Jurnal Biologi, Volume 6 No 3, Juli 2017
Hal. 22-30

PRODUKSI INULINASE OLEH KHAMIR Pichia manshurica DUCC Y-015 PADA TEPUNG UMBI DAHLIA (Dahlia variabilis Willd.) DENGAN VARIASI KONSENTRASI $MnSO_4.H_2O$ DAN WAKTU INKUBASI

Berlian Abadianti, Agung Suprihadi, Wijanarka.
Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang
Jln. Prof. Soedarto, SH, Semarang, 50275, Telp: (024)7474754; Fax (024) 76480923
Email: berlianabadianti@gmail.com

Abstract

Inulinase (E.C. 3.2.1.7) is an enzyme which able to hydrolyze an inulin into fructose and fructooligosaccharides. The main application of inulinase enzyme in the food industries is as the ingredient in producing *High Fructose Syrup* (HFS). Moreover, the other important applications of inulinase enzyme are to produce ethanol, inulooligosacarida (IOS), fruktooligosacarida (FOS), pullulan, sorbitol, etc. *Pichia manshurica* DUCC Y-015 is kind of yeast that is capable in producing inulinase in medium containing inulin. Optimization of inulinase enzyme production needs to be done to increase inulinase production, the way that could be conducted is by the addition of metal ion and optimization of incubation time. The purpose of this research is to investigate the effect of adding mangan ion ($MnSO_4.H_2O$) and incubation time. In conducting this study, the researcher applies experimentally research by using Randomized Complete Block Design (RCBD) factorial pattern. The first factor is concentration of $MnSO_4.H_2O$, with concentration level 0 mM (M_0), 0,1 mM (M_1), 0,5 mM (M_2). The second factor is the variation of incubation time, i.e. 6 hours (I_6), 12 hours (I_{12}), and 18 hours (I_{18}) with three times repetition. The collected data were analyzed using ANOVA 5% signification (α= 0,05) and completed by the Duncan test. The result of analysis shows that variation of $MnSO_4.H_2O$ concentration and incubation time does not significantly influential on inulinase activity of *Pichia manshurica* DUCC Y-015.

Keywords: Inulinase, Inulin, *Pichia manshurica* DUCC Y-015, $MnSO_4.H_2O$, Incubation time.

Abstrak

Inulinase (E.C. 3.2.1.7) merupakan enzim yang mampu menghidrolisis inulin menjadi fruktosa dan fruktooligosakarida. Aplikasi utama dari enzim inulinase di bidang industri pangan yaitu sebagai bahan dalam memproduksi *High Fructose Syrup* (HFS). Aplikasi penting lainnya dari enzim inulinase antara lain untuk produksi etanol, inulooligosakarida (IOS), fruktooligosakarida (FOS), pullulan, sorbitol, dll. *Pichia manshurica* DUCC Y-015 merupakan khamir yang mampu menghasilkan inulinase pada medium kultur yang mengandung inulin. Optimasi produksi enzim inulinase perlu dilakukan untuk meningkatkan produksi inulinase, salah satunya dengan penambahan ion logam dan optimasi waktu inkubasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan ion mangan dalam bentuk mangan sulfat ($MnSO_4.H_2O$) dan waktu inkubasi. Penelitian dilakukan secara eksperimental menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) pola factorial. Faktor pertama adalah konsentrasi $MnSO_4.H_2O$ yaitu 0 mM (M_0), 0,1 mM (M_1), 0,5 mM (M_2). Faktor kedua adalah variasi waktu inkubasi, yaitu 6 jam (I_6), 12 jam (I_{12}), dan 18 jam (I_{18}), dengan ulangan sebanyak 3 kali. Data dianalisis menggunakan metode ANOVA taraf signifikan 5% (α= 0,05) dan uji lanjut Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi konsentrasi $MnSO_4.H_2O$ dan perbedaan waktu inkubasi tidak berpengaruh signifikan terhadap aktivitas inulinase khamir *Pichia manshurica* DUCC Y-015.

Kata kunci: Inulinase, Inulin, *Pichia manshurica* DUCC Y-015, $MnSO_4.H_2O$, Waktu Inkubasi.

PENDAHULUAN

Enzim inulinase merupakan enzim yang mampu menghidrolisis inulin menjadi fruktosa dan fruktooligosakarida. Fruktosa merupakan pemanis alami rendah kalori, dengan tingkat kemanisan 70% lebih tinggi dari sukrosa, sehingga aman dikonsumsi bagi penderita diabetes. Fruktosa mampu digunakan sebagai pemanis alternatif pengganti pemanis buatan. Aplikasi utama dari enzim inulinase di bidang pangan yaitu sebagai bahan dalam memproduksi *High Fructose Syrup* (HFS). Pada bidang kosmetik dan obat- obatan, fruktosa lebih disukai karena tidak mudah mengkristal sehingga baik untuk dicampur dengan kosmetik seperti *lipstick* atau pelapis kapsul. Aplikasi penting lainnya dari enzim inulinase antara lain untuk produksi prebiotik seperti inulooligosakarida (IOS) dan fruktooligosakarida (FOS), serta mampu digunakan untuk produksi etanol, pullulan, sorbitol, dll (Singh *et al.*, 2006).

Produksi enzim inulinase dari mikroorganisme banyak sekali digunakan, karena pertumbuhan mikroorganisme yang relatif cepat, sehingga menghasilkan enzim yang lebih banyak. Mikroorganisme dapat menghasilkan 95% fruktosa murni hanya dengan menggunakan satu tahap reaksi hidrolisis enzimatis inulin. *Pichia manshurica* DUCC Y-015 merupakan salah satu khamir indigenous yang berhasil diisolasi dari umbi dahlia yang bersifat inulinolitik (Wijanarka dkk., 2013). Khamir *P.manshurica* merupakan khamir yang bersifat induktif, sehingga khamir tersebut hanya akan menghasilkan inulinase jika diinduksi oleh substrat inulin.

Pada penelitian ini digunakan tepung umbi dahlia sebagai sumber inulin alami dan satu- satunya sumber karbon yang dimanfaatkan oleh khamir tersebut untuk pertumbuhan dan metabolisme sel. Umbi dahlia dipilih sebagai substrat inulin karena selain mengandung inulin yang melimpah, umbi dahlia juga mudah dijumpai di dataran tinggi Indonesia, salah satunya di daerah Baturaden, Jawa Tengah. Pemanfaatan umbi dahlia sebagai substrat inulin juga mampu meningkatkan nilai jual dari tanaman dahlia, karena selama ini tanaman dahlia hanya dimanfaatkan sebagai bunga potong saja.

Upaya dalam meningkatkan produksi enzim inulinase dari berbagai mikroba saat ini sedang banyak diteliti. Salah satunya dengan melakukan modifikasi medium produksi inulinase pada khamir *Pichia manshurica* DUCC Y-015. Mikroorganisme membutuhkan media dengan komposisi nutrien yang optimal agar mampu tumbuh dan menghasilkan enzim yang optimal pula. Makronutrien seperti sumber karbon dan nitrogen merupakan salah satu nutrien yang harus tersedia pada medium produksi enzim. Selain makronutrien, khamir juga membutuhkan beberapa mikronutrien berupa ion logam untuk pertumbuhan dan fungsi metabolisme sel (Venkateshwar, 2010). Adanya ion logam mampu berperan sebagai aktivator pada sebagian besar enzim yang sangat penting untuk reaksi katalitik enzim. Ion mangan (Mn^{2+}) merupakan salah satu ion logam yang mampu meningkatkan produksi inulinase secara signifikan dari beberapa khamir. Penelitian Singh *et al.,* (2006) menjelaskan bahwa penambahan ion mangan (Mn) dalam bentuk $MnSO_4$ mampu meningkatkan produksi enzim inulinase secara signifikan dari *Kluyveromyces marxianus* YS-1. Hasil penelitian Zhang *et* al., (2009) juga menunjukkan bahwa ion Mn^{2+} mampu berperan sebagai aktivator bagi enzim inulinase dari *Pichia pastoris.*

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh penambahan $MnSO_4.H_2O$ dan variasi waktu inkubasi terhadap produksi enzim inulinase oleh khamir *Pichia manshurica* DUCC Y-015.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret hingga Mei 2017 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro.

Bahan. Kultur Koleksi khamir *P. manshurica* DUCC Y-015, tepung umbi dahlia, inulin murni 1%, sukrosa 1%, medium produksi inulinase (Ertan *et al.*, 2003), *Inulinase Selecting Medium* (ISM), reagen DNS, buffer sodium asetat 0,1 mM, NaOH, dan agar.

Pembuatan Kultur Peremajaan (Ertan *et al.*, 2003)

Satu ose isolat khamir khamir *P. manshurica* DUCC Y-015 pada media agar inulin diremajakan dengan menumbuhkan pada media agar inulin selama 48 jam pada suhu ruang (27-28^{o}C).

Pembuatan Medium Produksi Inulinase (g/L) (Ertan *et al.*, 2003)

Tepung umbi dahlia sebanyak 3 g dalam 100 mL aquades dipanaskan sampai mendidih ± 25 menit, kemudian disaring menggunakan kapas dan kertas saring. Hasil saringan didihkan, kemudian disaring kembali. Hasil ekstrak umbi dahlia ditambahkan dengan 0,23 g NH_4NO_3; 0,37 g $(NH_4)_2.HPO_4$; 0,1 g K_2HPO_4 ; 0,05 g $MgSO_4.7H_2O$ dan 0,15 g *yeast extract* pada pH 5. Larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121^{o}C 2 atm selama 15 menit. Terdapat 3 perlakuan pada pembuatan medium produksi dan pertumbuhan sel. Pada medium perlakuan pertama (M_1) ditambahkan $MnSO_4.H_2O$ sebanyak 0,1 mM. Pada medium perlakuan yang kedua (M_2) ditambahkan $MnSO_4.H_2O$ sebanyak 0,5 mM. Medium kontrol (M_0) tidak diberikan tambahan $MnSO_4.H_2O$.

Pembuatan Starter Khamir P. manshurica DUCC Y-015

Kultur *P. manshurica* DUCC Y-015 pada media agar inulin, sebanyak 1 ose diinokulasikan ke 50 mL medium produksi inulinase cair dengan pH 5 dan diinkubasi pada *rotary shaker* dengan kecepatan agitasi 120 rpm dalam suhu ruang (27-28^{o}C) selama ±22 jam, hingga diperoleh kultur dengan kepadatan 10^7-10^8 sel/mL (fase logaritmik akhir).

Pengukuran Pertumbuhan Sel

Pengukuran pertumbuhan sel dilakukan dengan mengambil kultur dari starter setiap 6 jam sekali selama ± 30 jam. Setiap pengamatan diambil 5 mL sampel untuk diukur OD (*optical density*), menggunakan spektrofotometer pada λ_{520} nm. Nilai OD yang diperoleh menunjukkan pertumbuhan khamir *P. manshurica* DUCC- Y-015. Nilai OD yang diperoleh setiap pengamatan digunakan untuk membuat kurva pertumbuhan.

Produksi Enzim

Produksi inulinase dilakukan dengan cara menginokulasikan starter *P.manshurica* 5%, dengan kepadatan 10^7 – 10^8 sel/mL pada masing- masing medium perlakuan yang berisi 50 mL medium pertumbuhan dan produksi enzim. Biakan diinkubasi dan digoyangkan dengan menggunakan *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Pengamatan pertumbuhan sel pada masing- masing perlakuan dilakukan setiap 6 jam sekali selama ±30 jam. Aktivitas inulinase dari setiap perlakuan diamati pada waktu inkubasi 6 jam (I_6), 12 jam (I_{12}) dan 18 jam (I_{18}), dengan cara mengambil sampel kultur sebanyak 1,5 mL dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* dan disentrifugasi dengan kecepmatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan *crude* enzim yang nantinya digunakan untuk uji aktivitas enzim inulinase dan invertase.

Pengukuran Aktivitas Enzim (Xiao *et al.*, 1988).

Pengukuran aktivitas enzim meliputi aktivitas inulinase dan invertase. Pengukuran ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas relatif antara inulin dengan sukrosa (rasio I/S). Aktivitas inulinase dan invertase dianalisis menggunakan metode DNS (Chaplin dan Kennedy, 1994), didasarkan pada sejumlah 1 µmol gula reduksi yang dibebaskan per menit pada kondisi tertentu. Gula reduksi diukur dengan cara menghitung absorbansi enzim substrat (ES) dikurangi dengan absorbansi

substrat (S) dan enzim (E), sehingga diperoleh rumus:

Aktivitas Enzim (IU) =

$$\frac{(X.\ 1000) \times 0{,}00555 \times 50}{30}$$

Keterangan:

X = Kadar Fruktosa (mg/mL)

0,00555 = Konstanta Fruktosa

50 = Faktor Pengenceran

30 = Waktu Inkubasi

Aktivitas Inulinase

Aktivitas inulinase ditentukan dengan metode 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) dengan menggunakan inulin sebagai substrat. Satu unit aktivitas enzim didefinisi sejumlah enzim yang mampu membebaskan 1 µmol fruktosa inulin per menit (Bonciu *et al*., 2010).

Aktivitas inulinase dianalisis dengan cara menyiapkan 4 reaksi yang berbeda. Reaksi- reaksi tersebut antara lain reaksi enzim-substrat (ES), reaksi substrat (S), reaksi enzim (E), dan reaksi blanko. Reaksi enzim substrat (ES) berisi 0,5 mL inulin murni 1%; 0,4 mL buffer sodium asetat; dan 0,1 mL crude enzim. Reaksi substrat (S) berisi substrat inulin 1% 0,5 mL; buffer asetat 0,4 mL, dan akuades 0,1 mL. Reaksi enzim (E) berisi 0,4 mL buffer sodium asetat; 0,1 mL crude enzim; 0,5 mL aquades. Reaksi blanko berisi buffer sodium asetat 0,4 mL dan akuades 0,6 mL .

Setiap reaksi (ES, S, E) dari tiap umur kultur diinkubasi pada suhu 50^{o}C selama 30 menit. Tiap tabung sampel dimasukkan dalam air mendidih selama 5 menit untuk menghentikan reaksi enzim yang terjadi. Sampel yang telah dingin ditambahkan reagen DNS sebanyak 1 mL dan dipanaskan kembali dalam air mendidih selama 3 menit. Adanya gula pereduksi ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi merah. Selanjutnya setiap tabung reaksi (ES, S, E) ditambahkan 5 mL aquades untuk diukur kerapatan dan optisnya dengan spektofotometer (λ_{570} nm) (Chaplin & Kennedy, 1994). Aktivitas inulinase ditentukan berdasarkan sejumlah 1 µmol gula reduksi yang dibebaskan per menit pada kondisi tertentu.

Aktivitas Invertase

Penentuan aktivitas invertase dilakukan sama seperti pada penentuan aktivitas inulinase, hanya saja yang berbeda adalah substratnya. Substrat yang digunakan adalah sukrosa 1%.

Metode Analisa Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) pola faktorial dengan dua faktor. Faktor pertama merupakan konsentrasi dari jumlah $MnSO_4.H_2O$ yang berbeda, yaitu M_0 (0), M_1 (0,1), M_2 (0,5) mM. Faktor kedua merupakan lama waktu inkubasi yaitu I_6 (6 jam), I_{12} (12 jam), dan I_{18} (18 jam). Masing- masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali, sehingga total perlakuan pada penelitian ini yaitu 27 perlakuan. Data yang diperoleh diuji normalitas dan homogenitas. Uji normalitas menggunakan statistic Uji Kolmogorov- Smirnov Z dan uji homogenitas dilakukan dengan uji Bartlett. Jika asumsi normalitas dan homogenitas diterima, dilanjutkan analisis sidik ragam (ANOVA) dengan taraf uji 5%. Data yang berbeda nyata dilanjutkan dengan uji lanjut (Uji Duncan).

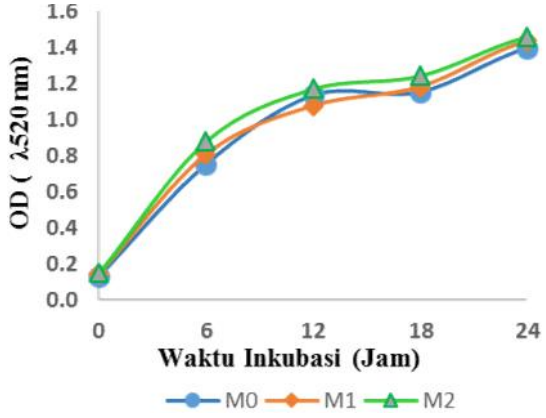
Hasil dan Pembahasan

Pertumbuhan Khamir *Pichia manshurica* DUCC Y-015

Pertumbuhan *Pichia manshurica* DUCC Y-015 pada medium produksi dihitung berdasarkan nilai densitas optik dari kultur produksi. Hubungan antara nilai *optical density* dan waktu inkubasi dinyatakan dalam kurva pertumbuhan (Gambar 1).

Kultur khamir *P. manshurica* DUCC Y-015 pada ketiga perlakuan langsung memasuki fase logaritmik (fase eksponensial) sejak inkubasi 0 jam hingga 12 jam (Gambar 1). Hal ini dicirikan dengan adanya pertumbuhan yang signifikan dari sel khamir, yang disebabkan karena adanya nutrien yang melimpah, salah

satunya yaitu tersedianya substrat inulin sebagai sumber karbon utama bagi khamir dan juga sebagai induser dalam menghasilkan inulinase. Adanya inulinase tersebut mampu menghidrolisis inulin menjadi fruktosa sehingga digunakan sel khamir untuk proses metabolisme.



Gambar 1. Grafik pertumbuhan *P. manshurica* DUCC Y-015 pada medium perlakuan konsentrasi $MnSO_4.H_2O$ dan waktu inkubasi

Keterangan:

M0: Medium kontrol

M1: Medium dengan 0,1 mM $MnSO_4.H_2O$

M2: Medium dengan 0,5 mM $MnSO_4.H_2O$

Setelah melewati waktu inkubasi 12 jam, kultur khamir mulai memasuki fase stasioner. Pada tahap ini terlihat pertumbuhan sel khamir mulai lambat karena mulai terjadi kematian sel pada kultur (Gambar 1). Pertumbuhan khamir yang lambat dan kematian sel kultur dapat disebabkan karena telah berkurangnya nutrien pada medium produksi akibat dari konsumsi nutrien yang tinggi pada fase logaritmik. Pada Gambar 1 menunjukkan bahwa ketika fase stasioner masih terjadi pertumbuhan sel khamir, yang ditunjukkan dengan kenaikan nilai absobansi, yaitu pada waktu inkubasi 18-24 jam. Hal ini disebabkan karena adanya gula reduksi seperti glukosa dan fruktosa hasil hidrolisis inulin ketika fase log, yang mampu digunakan sebagai sumber karbon bagi sel khamir..

Pada kurva pertumbuhan tersebut, kultur khamir belum menunjukkan fase kematian, karena hingga waktu inkubasi 24 jam, kurva pertumbuhan masih memperlihatkan kenaikan sel khamir.

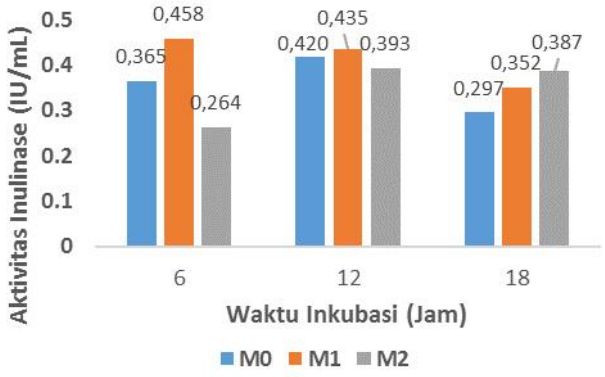
Pertumbuhan khamir dengan perlakuan M_2 pada waktu inkubasi 0 hingga 24 jam, memperlihatkan hasil yang paling tinggi diantara kedua perlakuan yang lain (M_0 dan M_1). Pertumbuhan *P.manshurica* pada perlakuan M_1 dan M_2 lebih tinggi dibanding dengan perlakuan kontrol. Hal ini kemungkinan disebabkan karena adanya penambahan ion $MnSO_4.H_2O$ pada perlakuan M_1 dan M_2, yang mempengaruhi peningkatan pertumbuhan sel khamir, walaupun peningkatannya tidak terlalu signifikan. Ion mangan yang ada pada medium produksi akan diabsorbsi ke dalam dinding sel khamir. Tomas *et al.*, (2003) menyatakan bahwa ion mangan diabsorbsi terutama pada dinding sel dan didistribusikan di dalam sel khamir. Ion mangan memiliki peran penting dalam pembentukan tunas pada khamir. Pada badan golgi, ion mangan mengaktifkan glikosiltransferase yang terlibat dalam metabolisme protein. Pada mitokondria, mangan berperan dalam menjaga sel terhadap stress oksidatif, dengan cara ikut menjadi bagian inti dari superoksida dismutase.

Aktivitas Inulinase *Pichia manshurica* DUCC Y-015

Inulinase merupakan enzim ekstraseluler, yang disekresikan keluar sel dan bercampur dengan medium inulin sehingga aktivitasnya dapat diukur melalui *crude enzyme* hasil sentrifugasi medium yang telah diinokulasikan *Pichia manshurica* DUCC Y-015.

Pada perlakuan M_0 dan M_2 memperlihatkan aktivitas inulinase tertinggi pada waktu inkubasi 12 jam, yaitu sebesar 0,420 IU/mL dan 0.393 IU/mL, sedangkan perlakuan M_1 menunjukkan aktivitas inulinase tertinggi pada waktu inkubasi 6 jam, sebesar 0.458 IU/mL (Gambar 2). Hal ini disebabkan karena pada waktu inkubasi 6-12 jam

merupakan fase logaritmik dari sel khamir *P. manshurica*, dimana pada fase tersebut inulinase disekresi dalam jumlah yang tinggi. Sesuai dengan pernyataan Brock *et al.*, (1994), bahwa enzim inulinase digolongkan sebagai metabolit primer yang biasanya dibentuk pada fase pertumbuhan logaritmik, sehingga aktivitas enzim yang tinggi dihasilkan pada fase log. Ditambahkan oleh Muslim *et al.*, (2015) bahwa aktivitas enzimatik rendah pada fase lag dan mengalami peningkatan pada fase logaritmik, dan mulai mengalami penurunan pada fase stasioner.



Gambar 2. Diagram batang aktivitas Inulinase *Pichia manshurica* DUCC Y-015 dengan variasi konsentrasi $MnSO_4.H_2O$ dan waktu inkubasi

Keterangan:

M0: Medium kontrol

M1: Medium dengan 0,1 mM $MnSO_4.H_2O$

M2: Medium dengan 0,5 mM $MnSO_4.H_2O$

Berdasarkan hasil penelitian (Gambar 2), aktivitas inulinase tertinggi diperoleh pada perlakuan penambahan $MnSO_4.H_2O$ konsentrasi 0,1 mM pada waktu inkubasi 6 jam (M_1I_6) yaitu sebesar 0,458 IU/mL. Adanya peningkatan aktivitas enzim menunjukkan bahwa ion mangan (Mn) berperan sebagai aktivator pada enzim inulinase. Richardson dan Hyslop (1985) menyatakan bahwa mekanisme ion logam dalam memperbesar aktivitas enzim dengan cara membantu reaksi katalitik, yaitu dengan mengikat substrat pada sisi pemotongan. Selain berperan dalam pengikatan enzim dengan substrat, ion logam juga dapat mengikat enzim secara langsung untuk menstabilkan konformasi aktifnya atau menginduksi formasi sisi aktif suatu enzim. Ditambahkan oleh Tomas *et al.*, (2003), mangan juga berperan sebagai aktivator penting dalam metabolisme nukleotida yaitu ribonukleotida reduktase.

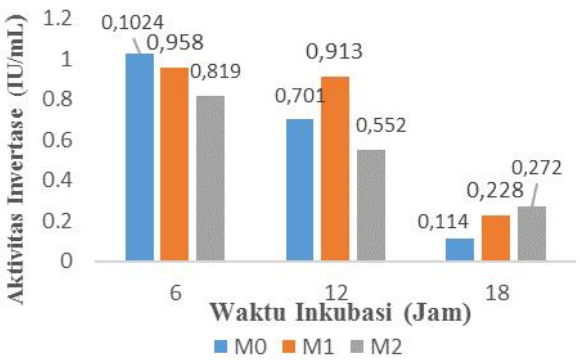
Hasil analisis Anova (α = 0,05) menunjukkan bahwa variasi konsentrasi $MnSO_4.H_2O$ (M), waktu inkubasi (W), dan interaksi keduanya (M>< W) tidak berpengaruh signifikan terhadap aktivitas inulinase. Hasil tersebut dapat diartikan bahwa penambahan variasi konsentrasi mangan sulfat sebesar 0 mM; 0,1 mM dan 0,5 mM dan perlakuan waktu inkubasi 6, 12, dan 18 jam dalam medium produksi, tidak berpengaruh nyata terhadap sintesis enzim inulinase pada khamir *P.manshurica* DUCC Y-015. Berdasarkan penelitian ini diperoleh hasil bahwa penambahan $MnSO_4.H_2O$ dengan konsentrasi 0,1 mM mampu menghasilkan enzim inulinase tertinggi, dengan hasil aktivitas inulinase sebesar 0,458 IU/mL. Hal ini didukung oleh penelitian Singh *et al.*, (2006), bahwa penambahan $MnSO_4$ sebesar 0,1 mM mampu meningkatkan produksi inulinase pada khamir *Kluyveromyces marxianus* YS-1. Namun penambahan konsentrasi 0,1 mM $MnSO_4.H_2O$ meningkatkan produksi inulinase lebih cepat, yaitu waktu inkubasi 6 jam, dibandingkan dengan inulinase yang dihasilkan oleh *Kluyveromyces marxianus* YS-1 pada penelitian Singh *et al.*, (2006) yang membutuhkan waktu inkubasi 72 jam untuk bisa meningkatkan produksi inulinase.

Aktivitas Invertase oleh *Pichia manshurica* DUCC Y-015

Enzim invertase merupakan enzim yang juga dihasilkan dalam hidrolisis inulin. Enzim ini menghidrolisis rantai karbon pada bagian ujung dari rantai inulin menjadi fruktosa dan

glukosa. Pessoni *et al.*, (1999) menyatakan unit aktivitas invertase adalah jumlah enzim yang mampu menghidrolisis sebanyak 1 µmol sukrosa per menit pada kondisi tertentu.

Aktivitas invertase tertinggi terjadi pada medium kontrol tanpa perlakuan dengan waktu inkubasi 6 jam (M_0I_6) yaitu sebesar 1,024 IU/mL, yang artinya medium tanpa penambahan $MnSO_4.H_2O$ pada waktu inkubasi 6 jam merupakan perlakuan optimal untuk menghasilkan aktivitas invertase, dibandingkan dengan penambahan variasi konsentrasi $MnSO_4.H_2O$. Hal ini disebabkan karena penambahan $MnSO_4.H_2O$ dengan kosentrasi 0,1 mM dan 0,5 mM pada jam ke 6 dalam medium produksi belum mampu meningkatkan produksi enzim invertase. Hal ini menunjukkan bahwa ion Mn^{2+} bertindak sebagai inhibitor bagi enzim invertase. Senyawa inhibitor merupakan senyawa yang dapat mengubah kemampuan enzim dalam mengikat substrat sehingga menyebabkan perubahan daya katalisator enzim. Perubahan ini mengakibatkan konformasi enzim menjadi tidak efektif dalam mengikat substrat dan akhirnya membuat aktivitas katalitiknya menurun. Hal ini didukung oleh penelitian Shankar, *et al.*, (2013), bahwa penambahan mangan sulfat pada medium produksi invertase menunjukkan aktivitas invertase yang minimum pada khamir *Saccharomyces cerevisiae*.



Gambar 3. Diagram batang aktivitas Invertase *Pichia manshurica* DUCC Y-015 pada berbagai konsentrasi $MnSO_4H_2O$ (M) dan waktu inkubasi (I)

Keterangan:

M0: Medium kontrol

M1: Medium dengan 0,1 mM $MnSO_4.H_2O$

M2: Medium dengan 0,5 mM $MnSO_4.H_2O$

Pada Gambar 3 memperlihatkan bahwa aktivitas invertase cenderung menurun pada inkubasi 12 dan 18 jam. Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena pengaruh represi dari enzim inulinase, yang diperlihatkan oleh meningkatnya aktivitas inulinase ketika enzim invertase mengalami penurunan, yaitu pada perlakuan kontrol pada jam ke 6 menuju jam ke 12 (Gambar 2 dan Gambar 3). Sintesis inulinase yang meningkat dan produksi invertase yang menurun pada khamir *P.manshurica* DUCC Y-015 ini disesuaikan dengan kebutuhan dan nutrien yang berada pada medium. Madigan *et al.*, (2009) menyatakan bahwa mekanisme pengaturan sintesis enzim di dalam sel berdasarkan pada proses induksi dan represi. Mekanisme proses induksi dan represi ini terjadi pada tahap transkripsi. Represi enzim disebabkan oleh adanya represor yaitu suatu protein khusus yang menempel pada daerah operator pada rantai DNA, karena daerah operator telah di tempeli represor, maka RNA polimerase tidak akan menempel pada daerah operator tersebut, sebagai akibatnya maka sintesis enzim tidak akan terjadi ataupun bila ada tapi jumlahnya sangat sedikit.

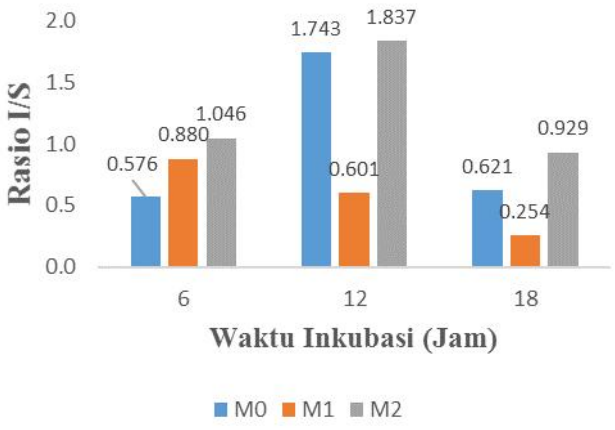
Hasil analisis Anova (α= 0,05) terhadap aktivitas invertase *P.manshurica* DUCC Y-015 menunjukkan bahwa perlakuan waktu inkubasi memberikan pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas invertase. Hasil uji Duncan terhadap aktivitas invertase pada perlakuan waktu inkubasi menunjukkan bahwa perlakuan inkubasi 6 jam (I_6) dan inkubasi 12 jam (I_{12}) berbeda nyata dengan perlakuan inkubasi 18 jam (I_{18}). Berdasarkan hasil uji Duncan, waktu inkubasi 6 jam memberikan pengaruh terbaik terhadap aktivitas invertase. Enzim invertase juga dikategorikan sebagai metabolit primer yang diproduksi selama fase log. Penelitian yang dilakukan oleh Rouwenhorst *et al*. (1990), menunjukkan bahwa inulinase dan invertase

dapat dihasilkan oleh satu jenis mikroorganisme yang sama pada saat yang bersamaan.

Rasio I/S *Pichia manshurica* DUCC Y-015

Rasio I/S merupakan rasio yang digunakan untuk mengetahui tingkat aktivitas katalitik suatu enzim. Nilai rasio I/S tergantung pada nilai aktivitas inulinase (I) maupun nilai aktivitas invertase (S), yaitu dengan membandingkan antara aktivitas inulinase dan invertase (Singh dan Kanika, 2016).

Rasio I/S tertinggi ditunjukkan oleh perlakuan M_2I_{12} (penambahan 0,5 mM $MnSO_4.H_2O$, waktu inkubasi 12 jam), yaitu sebesar 1,837. Nilai rasio I/S tersebut menunjukkan bahwa aktivitas katalitik enzim untuk mendegradasi inulin pada perlakuan M_2I_{12} tersebut lebih didominasi oleh enzim inulinase. Hal ini sesuai dengan pendapat Skowronek (2003), apabila rasio I/S lebih dari 1 maka enzim tersebut termasuk inulinase, sedangkan bila nilai rasio I/S kurang dari 1, maka enzim invertase lebih mendominasi. Semakin tinggi rasio I/S, semakin baik aktivitas katalitik enzim tersebut (Rouwenhorst, 1990).



Gambar 4. Diagram batang Rasio I/S *P. manshurica* DUCC Y-015 pada variasi konsentrasi $MnSO_4.H_2O$ dan waktu inkubasi

Keterangan:

M0: Medium kontrol

M1: Medium dengan 0,1 mM $MnSO_4.H_2O$

M2: Medium dengan 0,5 mM $MnSO_4.H_2O$

Pada Gambar 4 memperlihatkan bahwa masing-masing perlakuan menunjukkan aktivitas katalitik yang berbeda-beda. Hal ini sesuai dengan pernyataan Rica *et al.*, (2007), bahwa pada umumnya semua mikroorganisme memperlihatkan aktivitas inulinase dan invertase yang bervariasi. Umumnya mikroorganisme menunjukkan aktivitas keduanya, meski pada tingkat yang berbeda. Aktivitas invertase pada inulin diperlukan untuk mengkatalis hidrolisis ujung akhir antara fruktosa dan glukosa yang tersisa setelah aksi inulinase sempurna pada molekul inulin.

Hasil analisis Anova (α=0,05) menunjukkan bahwa perlakuan variasi konsentrasi $MnSO_4.H_2O$ sebesar 0 mM (M_0), 0,1 mM (M_1) dan 0,5 mM (M_2) dan waktu inkubasi 6 jam (I_6), 12 jam (I_{12}) dan 18 jam (I_{18}) tidak berbeda nyata (non signifikan) terhadap rasio I/S.

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa penambahan konsentrasi $MnSO_4.H_2O$ 0 mM (M_0), 0,1 mM (M_1) dan 0,5 mM (M_2) dan pengaruh waktu inkubasi 6 jam (I_6), 12 jam (I_{12}) dan 18 jam (I_{18}) tidak berpengaruh signifikan terhadap produksi enzim inulinase. Pada perlakuan penambahan $MnSO_4.H_2O$ sebesar 0,1 mM dan waktu inkubasi 6 jam menunjukkan aktivitas inulinase paling tinggi, yaitu sebesar 0,458 IU/mL.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Bapak Dr. Drs. Wijanarka, M.Si yang telah memberikan kesempatan untuk bergabung di penelitian penelitian tentang inulin serta bimbingannya dalam menyelesaikan penelitian ini. Terimakasih juga saya ucapkan kepada Drs. Bapak Agung Suprihadi, M.Si yang telah banyak membimbing dan memberikan nasehat demi kelancaran penelitian ini.

Daftar Pustaka

Bonciu, C., V. Struta., and G. Bahrim. 2010. Isolation and Screening of New Mould Strains Able for Inulinase Biosintesis and Inulin From *Jerusalem artichoke* Hydrolysis. *Inovative Romanian Food Biotechnology*.7(1): 77-81

Brock, T. D., M.T. Madigan., J.M. Martinko., and J. Parker. 1994. Biology of Microorganism. 5th Edition. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs New Jersey, USA.

Chaplin, M. F. and J. F. Kennedy. 1994.Carbohydrat Analysis: A Practical Approach. 2nd Edition. Oxford University Press. Oxford

Ertan F., T. A.C Kaboglu., F.Ekinci, and E. Bakar. 2003. Determination of Optimum Cultivation Conditions on the Production of Inulinase from *Rhizoctonia solani. Pakistan Journal of Biological Science*. 6(16): 1386- 1388.

Madigan, M., J. Martinko., P.V. Dunlap .,and D.P. Clark. 2009. Biology of Microorganism 12 Edition. Pearson Benjamin Cummings. San Francisco, Booston, New York Muslim, S.N., A.N. Mahammed Ali., dan I. M. A. Salman. 2015. Detection of the Optimal Conditions for Inulinase Productivity and Activity by *Acinetobacter baumannii* Isolated from Agricultural Rhizosphere Soil. *J. of Advances in Chemical Engg & Biological Sciences.* 2(1):1-7

Pessoni, R.A.B., Ribeiro, R.C.CL.F. and Braga, M.R. 1999. Extracellular Inulinase from *Pennicillium janczewskii*, a Fungus Isolated from the Rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Asteraceae). *Journal of Applied Microbiology.* 1(87): 141-147

Ricca, E., V. Calabro., S. Curcio., and G. Lorio. 2007. The State of The Art In The Production of Fructose From Inulin Enzymatic Hydrolysis. Crit. Rev. *Biotechnol*. 27(1): 129–145Richardson, T and D.B. Hyslop. 1985. Enzymes In Food Chemistry, 2nd ed. New York: Marcel Dekker

Rouwenhorst, R.J., M.Hensing., J. Verbakel, W.A Scheffers and J.P.V. Dijken. 1990. Structure and Properties of The Extracelullar Inulinase of *Kluyveromyces marxianus. J. Appl. Environ, Microbiol.* The Netherland. 56(11): 3337- 3345

Shankar, T., P. Thangamati., R. Rama., dan T. Sivakumar. 2013. Optimization of Invertase Production Using Saccharomyces cerevisiae MK under Varying Cultural Conditions. 1(3): 47-56

Singh, R. S., R. Dhaliwal., and M. Puri. 2006. Production of Inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using Root Extract of *Asparagus racemocus*. *Process Biochemistry*. 41(10):1703-1707

_____, P and P.J. Gill. 2006. Production of Inulinase: Recent Advances. *Food Technol. Biotechnol*. 2(1): 151-162

_____, and C. Kanika. 2016. Inulinase Production from A New Inulinase Producer, *Penicillium oxalicum* BGPUP-4. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology .9(1): 1-10

Skowronek, M., C. Sklodowska., J. Fidurek and A. Gromada. 2003. Invertase Activity of Psycotropics Perbiotik Fungi. Maria Curie. Sklodowska: University Poland. 13(5): 749-754

Tomas, V. S., G.Z. Vlatka .Dami Link R S., Slobodan G., and Nada V. 2003. Zinc, Copper, and Manganase Enrichment in Yeast *Saccharomyces cerevisae*. *Journal Food Technol. Biotechnol*. 42(2): 115-120

Venkateshwar, M., K. Chaitanya., Md.Altaf, Mahammad E. J., H. Bee., and G. Reddy. 2010. Influence of Micronutrients on Yeast Growth and β-D-fructofuranosidase Production. *Indian J Microbiol.* 50 (3): 325-331

Wijanarka, E.S. Soetarto, K. Dewi, dan A. Indrianto. 2013. Aktivitas Inulinase oleh *Pichia manshurica* dan Fusan F4 pada fermentasi Batch dengan Umbi Dahlia (*Dahlia sp*) sebagai Substrat. *Reaktor.* 14(3):187-192

Xiao, R., M. Tanida and S. Takao. 1988. Inulinase from *Chrysosporium pannorum. J Ferment. Technol*. 66(5): 553- 558

Zhang, T., F. Gong., Y.Peng., and Z.Chi. 2009. Optimization of High Level Expression of the *Pichia guilliermondii* recombinant inulinase in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant inulinase. *Proses Biochemistry*. 44(5): 1335-1339

Jurnal Biologi, Volume 6 No 3, Juli 2017
Hal. 22-30