

PENGARUH $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ DAN WAKTU INKUBASI
TERHADAP PRODUKSI INULINASE OLEH *Pichia*
manshurica DUCC Y-015 DALAM SUBSTRAT TEPUNG
UMBI DAHLIA

Dahnier Saraswati, Wijanarka, Isworo Rukmi

Laboratorium Bioteknologi

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang

Jalan Prof. Soedarto, SH, Semarang, 50275, Telp: (024)7474754; Fax (024) 76480923

Email : dahnier.saras@gmail.com

Abstract

Fructose production from inulin by inulinase only need one reaction enzymatic step and produce 95% fructose. Inulin obtained from dahlia tuber and inulinase produced by *Pichia manshurica* DUCC Y-015. Inulinase production (E.C. 3.2.1.7.) can be influenced by metal salt supplementation, such as $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. The purpose of this research were to know the influence of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and incubation time to inulinase production by *P. manshurica* DUCC Y-015 on Dahlia Tuber Substrate. The design that use in this research were Randomized Factorial Block Design (RAFBD). Factor I (C_0, C_1, C_2, C_3) as the concentration of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0 mM, 0.25 mM, 0.50 mM, 1.00 mM) and Factor II ($T_{12}, T_{18},$ dan T_{24}) as incubation time (6, 12, 18 hour), the repetition were 3 times. The result analyze by ANOVA (Analysis of Variance) and continued by LSD test. The result of this research indicate that $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and incubation time were not significantly influence to inulinase production. The highest inulinase production by *Pichia manshurica* DUCC Y-015 indicate by C_2T_{12} treatment which use 0.50 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 12 hour incubation time, the enzyme activity is 0.60 IU/mL

Key Words : $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Dahlia tuber, Incubation time, Inulin, Inulinase, *Pichia manshurica* DUCC Y-015.

Abstrak

Produksi fruktosa secara langsung dari inulin oleh inulinase hanya memerlukan satu tahap reaksi enzimatis dan menghasilkan 90% fruktosa. Inulin diperoleh dari tepung umbi dahlia dan produksi inulinase oleh *Pichia manshurica* DUCC Y-015. Produksi inulinase (E.C. 3.2.1.7) dapat dipengaruhi oleh suplementasi garam logam, salah satunya $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan waktu inkubasi terhadap produksi enzim inulinase oleh khamir *Pichia manshurica* DUCC Y-015 dalam substrat tepung umbi dahlia (*Dahlia* sp.). Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) Faktorial. Faktor I ($C_0, C_1, C_2,$ dan C_3) berupa konsentrasi $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (-mM, 0.25 mM, 0.50 mM, 1.00 mM) dan faktor II ($T_{12}, T_{18},$ dan T_{24}) berupa waktu inkubasi (6 jam, 12 jam, dan 18 jam) dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Data yang diperoleh dianalisis dengan metode ANOVA dan dilanjutkan dengan uji lanjut BNT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi konsentrasi $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tidak berpengaruh signifikan terhadap produksi enzim inulinase. Produksi enzim inulinase tertinggi dari *Pichia manshurica* DUCC Y-015 ditunjukkan oleh perlakuan C_2T_{12} dengan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebesar 0.50 mM dan waktu inkubasi 12 jam, nilai aktivitas enzimnya sebesar 0.60 IU/mL.

Kata Kunci : $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Inulin, Inulinase, *Pichia manshurica* DUCC Y-015, Umbi Dahlia, Waktu Inkubasi.

PENDAHULUAN

Produksi gula nasional belum mencukupi kebutuhan gula masyarakat Indonesia, sehingga pengadaan impor gula terjadi. Upaya yang dilakukan untuk mengurangi impor gula adalah mencari bahan pemanis alternatif, salah satunya fruktosa. Fruktosa sering digunakan dalam industri sebagai fruktooligosakarida (FOS), yang memiliki manfaat antara lain: sebagai prebiotik, serat larut, rendah kalori, bersifat non-karsinogenik, dan baik untuk kesehatan saluran cerna (Zobel, 2005).

Produksi fruktosa dari inulin oleh inulinase hanya memerlukan satu tahap reaksi enzimatik dan menghasilkan 95% fruktosa. Tepung umbi dahlia dalam penelitian ini dimanfaatkan sebagai sumber inulin sebagai karbon utama dalam substrat pertumbuhan. *Pichia manshurica* DUCC Y-015, salah satu khamir inulinolitik yang berhasil diisolasi dari umbi dahlia. Produksi inulinase (E.C. 3.2.1.7.) dapat dilakukan dengan menumbuhkan *P. manshurica* DUCC Y-015 dalam substrat umbi dahlia. Khamir tersebut akan terinduksi untuk menghasilkan inulinase agar dapat memecah inulin menjadi monomer-monomer fruktosa untuk pertumbuhan dan metabolismenya. Produksi inulinase dapat dioptimalkan dengan melakukan penelitian dan pengembangan, salah satunya dengan suplementasi garam logam dalam substrat pertumbuhan khamir.

Suplementasi garam logam tertentu baik untuk pertumbuhan mikroorganisme dan produksi enzim. Suplementasi $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam medium pertumbuhan *Pichia manshurica* DUCC Y-015 dilakukan dalam penelitian ini, kalsium klorida mudah terdisosiasi menjadi ion kalsium (Ca^{2+}) dan ion klorida (Cl^-) di dalam air. Ion Ca^{2+} (kalsium) merupakan ion logam yang berperan penting dalam fungsi struktural dan fungsional sel khamir, ion klorida (Cl^-) digunakan untuk mengatur kesetimbangan asam basa larutan dan mengatur netralitas elektrokimia (Venkateshwar, *et al.*, 2010). Penggunaan CaCl_2 pada medium fermentasi dalam penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan produksi enzim. Berdasarkan uraian tersebut, perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ terhadap produksi enzim inulinase oleh khamir *Pichia manshurica* DUCC Y-015 dalam substrat tepung umbi dahlia

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Sains dan Matematika, Departemen Biologi, Universitas Diponegoro, Semarang. Waktu pelaksanaan penelitian yaitu Maret hingga Mei 2017.

Bahan, medium ISM (*Inulin Screening Media*), tepung umbi dahlia (*Dahlia* sp.), PDA (*Potato Dxtrose Agar*), inulin murni, sukrosa, agar, kertas saring, kapas, *pH meter*, reagen DNS (*Dinitrosalicylic Acid*), akuades steril, tepung umbi dahlia 3.0 %, NH_4NO_3 0.23%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.37%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%, *yeast extract* 0.15% aquadest, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, *buffer* natrium asetat dan asam asetat glasial.

Pembuatan Kultur Stok dan Kultur Kerja (Ertan, *et al.*, 2003).

Isolat khamir *P. manshurica* DUCC Y-015 sebanyak satu ose diinokulasikan ke dalam *Inulinase Selecting Medium (ISM)*, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Khamir yang telah tumbuh disebut kultur stok. Khamir dari kultur stok diinokulasikan ke dalam media agar inulin untuk dijadikan kultur kerja.

Pembuatan Medium Produksi (Ertan, *et al.*, 2005).

Pembuatan medium produksi hampir sama dengan pembuatan medium standar. Komposisi medium standar adalah tepung umbi dahlia 3.0 %, NH_4NO_3 0.23%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.37%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%, *yeast extract* 0.15% dalam 100 mL akuades. pH awal adalah 6.0 (Ertan *et al.*, 2005), namun digunakan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dengan variasi konsentrasi (0 mM, 0.25 mM, 0.5 mM, dan 1.0 mM) dalam medium produksi. Medium produksi kemudian diautoklaf dengan suhu 115 °C selama 30 menit

Pembuatan Starter Khamir *P. manshurica* (Wijanarka, dkk, 2004).

Satu ose isolat khamir *P. manshurica* dari kultur kerja diinokulasikan ke dalam 50 mL medium produksi inulinase cair dengan pH 5 dan diinkubasi menggunakan *rotary shaker* dengan kecepatan agitasi 120 rpm pada

suhu ruang selama 22 jam, kemudian kultur diatur kepadatannya hingga mencapai 10^7 sel/mL.

Produksi Enzim Inulinase dan Pengukuran Pertumbuhan Sel (Wijanarka, dkk, 2004).

Starter sebanyak 10% (5ml) berumur 22 jam diinokulasikan ke dalam 50 mL medium produksi, kemudian diinkubasi selama 30 jam menggunakan *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Kultur medium produksi diambil setiap 6 jam sebanyak 5 mL dan disimpan dalam tabung film, selanjutnya sebanyak 3 ml digunakan untuk pengukuran OD pertumbuhan ($_{520}$ nm). Pengukuran pertumbuhan merupakan penelitian pendahuluan untuk menentukan waktu inkubasi yang dipilih dalam uji aktivitas enzim.

Cairan kultur medium produksi sebanyak 5 mL yang sebelumnya sebanyak 3 mL digunakan untuk pengukuran OD pertumbuhan, kemudian pada interval waktu inkubasi selama 6 jam (T_6), 12 jam (T_{12}) dan 18 jam (T_{18}) sebanyak 1.5 mL cairan kultur disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit sehingga diperoleh supernatan (*crude* enzim) yang digunakan dalam pengukuran aktivitas inulinase. .

Uji Aktivitas Enzim

Pengukuran aktivitas enzim meliputi aktivitas inulinase dan invertase sehingga dapat dihitung rasio I/S. Aktivitas inulinase dan invertase dianalisis dengan metode DNS (Chaplin dan Kennedy, 1994) dan ditentukan berdasarkan sejumlah 1 μ mol gula reduksi yang dibebaskan per menit pada kondisi tertentu.

a. Aktivitas Inulinase (Xiao, *et al.*, 1998).

Penentuan aktivitas inulinase dilakukan dengan menyiapkan 4 tabung untuk diisi campuran yang berbeda. Tabung pertama (ES) berisi 0.9 mL campuran substrat inulin dengan *buffer* sodium asetat dan 0.1 mL *crude* enzim. Tabung kedua (S) diisi 0.9 mL campuran substrat inulin

dengan *buffer* sodium asetat dan 0.1 mL akuades. Tabung ketiga (E) berisi 0.4 mL *buffer* sodium asetat, 0.1 mL *crude* enzim dan 0.5 mL akuades. Tabung keempat sebagai blanko diisi 0.4 mL *buffer* sodium asetat dan 0.6 mL akuades. Masing-masing tabung (ES, S dan E) diinkubasi pada suhu 50 °C selama 30 menit. Reaksi enzimatis dihentikan dengan pemanasan dalam air mendidih selama 5 menit dan setelah dingin ditambahkan reagen DNS sebanyak 1 mL. Larutan dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan larutan berubah warna menjadi kemerahan, yang mengindikasikan adanya kandungan gula pereduksi. Larutan kemudian diencerkan dengan 5 mL akuades dan diukur kerapatan optisnya ($_{520}$ nm).

b. Aktivitas Invertase (Xiao, *et al.*, 1988)

Penentuan aktivitas invertase dilakukan sama seperti pada penentuan aktivitas inulinase, namun substrat yang digunakan adalah larutan sukrosa 1%. Gula reduksi diukur dengan cara menghitung absorbansi enzim substrat (ES) dikurangi dengan absorbansi substrat (S) dan enzim (E), sehingga diperoleh rumus sebagai berikut:

$$\text{Akt. Enzim (IU)} = \frac{(\text{AbsES} - \text{AbsE} - \text{AbsS}) \times P \times 10^3}{\text{BMf} \times 30}$$

Keterangan :

AbsES = absorbansi enzim substrat

AbsE = absorbansi enzim

AbsS = absorbansi Substrat

BMf = berat molekul fruktosa (180,1)

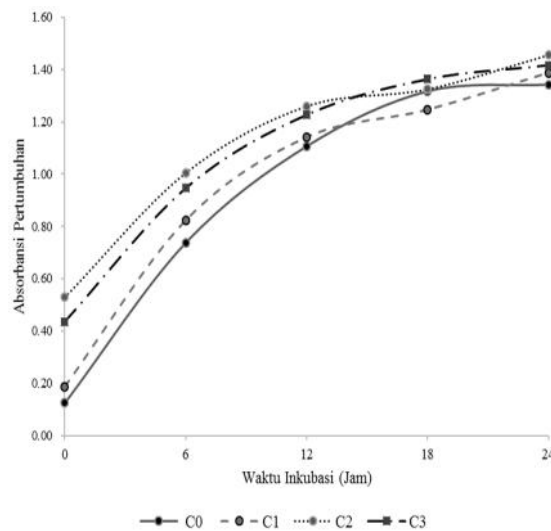
P = faktor pengenceran

f = persamaan regresi kurva fruktosa

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan *Pichia manshurica* DUCC Y-015

Pertumbuhan *P. manshurica* DUCC Y-015 pada media yang digunakan tidak mengalami fase adaptasi. Hal ini dikarenakan inokulum (starter) *P. manshurica* (starter) yang digunakan berada di dalam fase eksponensial. Madigan, *et al.*, (2012) mengungkapkan, kultur yang telah tumbuh secara eksponensial pada medium starter, kemudian diinokulasikan ke medium dengan kondisi pertumbuhan yang sama, maka fase lag tidak terjadi dan fase eksponensial dimulai.



Gambar 4.1 Kurva Pertumbuhan *P. manshurica* DUCC Y-015 pada Variasi Konsentrasi $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan Waktu Inkubasi
Keterangan:

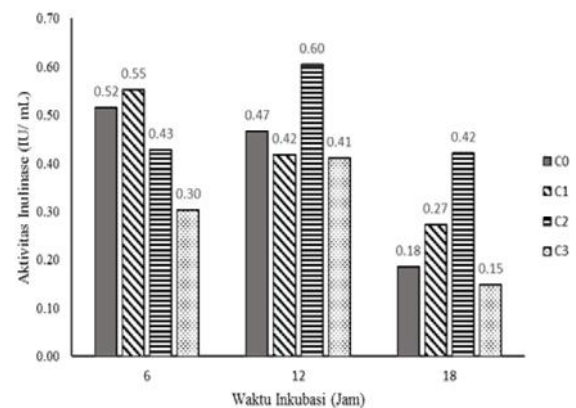
C₀ : 0 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
C₁ : 0.25 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
C₂ : 0.50 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
C₃ : 1.00 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Kenaikan absorbansi tertinggi ada pada waktu inkubasi 6, 12 dan 18 jam. Pertumbuhan khamir yang tinggi diharapkan aktivitas enzim

juga tinggi karena aktivitas inulinase yang tinggi terjadi saat fase logaritmik (Maria, *et al.*, 2005). Enzim inulinase digolongkan dalam metabolit primer yang dibentuk pada fase pertumbuhan logaritmik (Brock dan Madigan, 1994).

Produksi Inulinase oleh *Pichia manshurica* DUCC Y-015

Produksi inulinase oleh *Pichia manshurica* DUCC Y-015 dilakukan berdasarkan pola pertumbuhan dari penelitian pendahuluan, ditentukan produksi inulinase diukur pada waktu inkubasi 6, 12 dan 18 jam. Jumlah inulinase yang diproduksi dapat ditentukan dengan uji aktivitas enzim. Menurut Chaplin (1994) dan Park and Yun (2001) sejumlah enzim yang mampu merombak 1 mol 1 μmol substrat per menit pada kondisi tertentu dijadikan dasar dalam penentuan aktivitas enzim. Gambar 4.2 berikut menunjukkan aktivitas inulinase *P. manshurica* DUCC Y-015.



Gambar 4.2 Nilai Rata-Rata Aktivitas Inulinase *P. manshurica* DUCC Y-015 dengan Variasi $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan Waktu Inkubasi

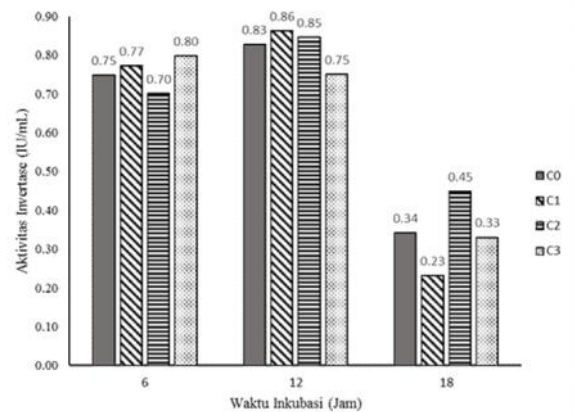
Keterangan: C₀ : 0 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
C₁ : 0.25 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
C₂ : 0.50 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
C₃ : 1.00 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Aktivitas inulinase tertinggi diperoleh pada perlakuan C₂T₁₂, dengan nilai 0.60 IU/mL, menunjukkan bahwa produksi inulinase dalam penelitian ini mencapai maksimum pada konsentrasi CaCl₂.2H₂O 0.5 mM dan waktu inkubasi 12 jam. Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Singh, *et al.* (2006) mengenai pengaruh CaCl₂ terhadap aktivitas inulinase oleh *Kluyveromyces marxianus* YS-1 menunjukkan bahwa aktivitas inulinase tertinggi diperoleh pada konsentrasi CaCl₂ 0.5 mM. Perlu diketahui bahwa *P. manshurica* DUCC Y-015 dan *K. marxianus* YS-1 memiliki hubungan kekerabatan yaitu keduanya termasuk dalam Filum Ascomycota, Keluarga Saccharomycetaceae.

Hasil analisis sidik ragam (Anova) terhadap aktivitas inulinase *Pichia manshurica* DUCC Y-015 menunjukkan bahwa perlakuan CaCl₂.2H₂O dan waktu inkubasi pada medium produksi memiliki pengaruh tidak berbeda nyata terhadap aktivitas inulinase, berarti aktivitas inulinase tidak dipengaruhi signifikan oleh variasi konsentrasi CaCl₂.2H₂O sebanyak 0.25; 0.50; 1.00 mM pada waktu inkubasi 6, 12, dan 18 jam. Hal ini tidak sesuai dengan pendapat Sivaramakrishnan, *et al.* (2006) bahwa, penambahan CaCl₂ pada medium fermentasi dapat meningkatkan produksi enzim.

Produksi Invertase oleh *Pichia manshurica* DUCC Y-015

Invertase diproduksi bersamaan dengan inulinase. Menurut Skowronek *et al.*, (2003), enzim ini bekerja bersama – sama dengan inulinase, yang memecah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa dari gugus sukrosa pada bagian rantai ujung inulin. Aktivitas invertase diukur dengan cara sama seperti pada pengukuran aktivitas inulinase, akan tetapi terdapat perbedaan pada substrat yang digunakan yaitu sukrosa 1%. Nilai rata-rata aktivitas invertase *Pichia manshurica* DUCC Y-015 pada variasi konsentrasi CaCl₂.2H₂O dengan waktu adalah sebagai berikut



Gambar 4.3 Nilai Rata-Rata Aktivitas Invertase *P. manshurica* DUCC Y-015 dengan Variasi CaCl₂.2H₂O dan Waktu Inkubasi

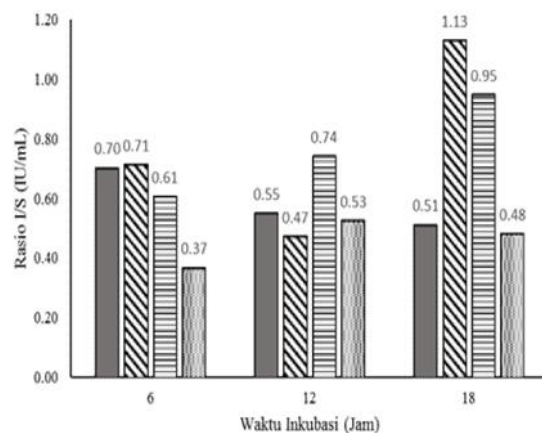
Keterangan: C₀ : 0 mM CaCl₂.2H₂O
C₁ : 0.25 mM CaCl₂.2H₂O
C₂ : 0.50 mM CaCl₂.2H₂O
C₃ : 1.00 mM CaCl₂.2H₂O

Aktivitas invertase tertinggi diperoleh pada perlakuan C₁T₁₂, dengan nilai 0.86 IU/mL, menunjukkan bahwa aktivitas invertase dalam penelitian ini mencapai maksimum pada konsentrasi CaCl₂.2H₂O 0.25 mM dan waktu inkubasi selama 12 jam. Hasil analisis sidik ragam (Anova) terhadap aktivitas invertase *Pichia manshurica* DUCC Y015 menunjukkan bahwa aktivitas invertase tidak dipengaruhi signifikan oleh CaCl₂.2H₂O pada waktu inkubasi tertentu dalam medium produksi. Aktivitas invertase oleh *P. manshurica* DUCC Y-015 terjadi selama pertumbuhan mikroorganisme karena invertase juga termasuk dalam metabolit primer. Hal ini didukung oleh pernyataan Rouwenhorst *et al.* (1990) menunjukkan bahwa inulinase dan invertase dapat dihasilkan oleh satu jenis mikroorganisme yang sama pada saat bersamaan.

Aktivitas Katalitik Enzim oleh *Pichia manshurica* DUCC Y-015

Aktivitas katalitik adalah peningkatan laju reaksi kimia yang disebabkan oleh adanya katalis. Rasio I/S digunakan untuk

mengetahui tingkat aktivitas katalitik enzim yang diperoleh dengan cara membagi aktivitas inulinase dengan aktivitas invertase. Rasio I/S juga digunakan untuk mengetahui aktivitas relatif antara aktivitas inulinase dan invertase. Aktivitas invertase pada inulinase diperlukan untuk mengkatalisis hidrolisis ujung akhir antara fruktosa dan glukosa yang tersisa setelah inulinase bekerja sempurna pada molekul inulin (Ricca, et al., 2007). Nilai Rasio I/S *Pichia manshurica* DUCC Y015 dengan variasi konsentrasi $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan waktu inkubasi ditunjukkan dalam Gambar 4.4. berikut.



Gambar 4.4 Nilai Aktivitas Katalitik Enzim (Rasio I/S) oleh *P. manshurica* DUCC Y-015 dengan Variasi $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan Waktu Inkubasi

Keterangan: C₀ : 0 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 C₁ : 0.25 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 C₂ : 0.50 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 C₃ : 1.00 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Hasil analisis sidik ragam (Anova) terhadap rasio I/S menunjukkan bahwa rasio I/S tidak dipengaruhi signifikan oleh variasi konsentrasi $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan waktu inkubasi. Sehingga nilai rasio I/S akibat perlakuan C₁, C₂ maupun C₃ pada waktu inkubasi 6, 12 dan 18 jam tidak berpengaruh secara signifikan apabila dibandingkan dengan kontrol (C₀).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan yang memiliki rasio I/S tertinggi

yaitu C₁T₁₈ dengan nilai sebesar 1.13 IU/ mL, hal tersebut dapat diartikan bahwa rasio I/S mencapai maksimum pada medium produksi dengan konsentrasi 0.25 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan waktu inkubasi selama 18. Menurut Guiraud (1981); dalam Ettalibi and Jacques (1987); Singh and Chauhan (2016) menyatakan bahwa, aktivitas inulinase (I) disertai dengan aktivitas invertase (S) dan kompleks enzimatik sebagai rasio I/S. Apabila rasio I/S lebih tinggi dari 10^{-2} , kompleks enzim lebih didominasi oleh aktivitas inulinase, sedangkan aktivitas invertase mendominasi apabila rasio I/S kurang dari 10^{-4} .

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai rasio I/S seluruh perlakuan lebih tinggi dari 10^{-2} sehingga enzim yang mendominasi dalam penelitian ini adalah inulinase, hal ini dikarenakan inulinase memiliki spesifitas terhadap inulin yang lebih tinggi dibandingkan dengan invertase, yang sesuai dengan pernyataan Dinarvand, et al. (2016) bahwa, inulinase (EC. 3.2.1.7) dan invertase (EC. 3.2.1.26), keduanya mengkatalisis hidrolisis inulin dan sukrosa, namun enzim inulinase memiliki spesifitas yang lebih tinggi untuk inulin dibandingkan dengan invertase.

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa: Jumlah inulinase yang diproduksi ditunjukkan dengan nilai aktivitas enzim. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan waktu inkubasi berpengaruh tidak signifikan terhadap produksi inulinase, namun produksi inulinase tertinggi oleh *P. manshurica* DUCC Y-015 ditunjukkan pada perlakuan C₂T₁₂ dengan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebesar 0.50 mM dan waktu inkubasi 12 jam, nilai aktivitas enzimnya sebesar 0.60 IU/mL.

DAFTAR PUSTAKA

Dinarvand, M., Rezaee, M., and Foroughi, M. 2016. Optimizing Culture Conditions for Production of Intra and Extracellular Inulinase and Invertase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 by Response Surface

- Methodology (RSM). Braz. J. Microbiol. 220: 15-30.
- Ertan, F., T. Aktac, A. C., Kaboglu, F. Ekinci, and E. Bakar. 2003. Determination of Optimum Cultivation Condition on the Production of Inulinase from *Rhizoctonia solani*. *Pak. J. Biol. Sci.* 6 (16) : 1386-1388.
- Ettalibi, M., and Jacques C. B. 1987. Purification, Properties, and Comparison of Invertase, Exoinulinases dan Endoinulinases of *Aspergillus ficuum*. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 26: 13-20.
- Maria, C., Maria A., Ana, L. F. P., Keila A. M., and Jose, L. 2005. *Aspergillus niveus* Blochwitzm 4128URM New Sources for Inulinase Production. *J. Brazilian Archiv. Biol. Technol.* 48(3):343-350.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D.A. and Clark, D. P. 2012. *Brock Biology of Microorganism*, 3rd Edition. Cumming Publishing Company Inc. San Fransisco.
- Park, J.P. and Yun J.W. 2001. Utilization of Chicory Roots for Microbial Endoinulinase Production. *Letters. Appl. Microbiol.* 33: 183-187.
- Ricca, E., Calabro V., Curcio S., and Iorio G. 2007. The State of The Art in The Production of Fructose from Inulin Enzymatic Hydrolysis. *Crit. Rev. Biotechnol.* 27: 129-145.
- Rouwenhorst, R.J, Hensing, M., Verbakel, J., Scheffer, W.A., and Van Dijken, J.P.. 1990. Structure and Properties of the Extracellular Inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol* 56 (11): 3337-3345.
- Rukmana, R. 2000. *Dahlia: Prospek Agribisnis dan Teknik Budi Daya*. Kanisius. Yogyakarta.
- Singh, R. S., Balwinder S. S., and Munish P. 2006. Optimization of Medium and Process Parameters for The Production of Inulinase from a Newly Isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1. *Biores. Technol.* 98 :2518-2515.
- _____, and Chauhan, K. 2016. Production, Purification, Characterization, and Applications of Fungal Inulinases. *Current Biotechnology* 5:1-19.
- Sivaramakrishnan, S., Dhanya G., Kesavan, M.N., Carlos R.S., and Ashok P. 2006. -Amylases from Microbial Sources. *Food Technol. Biotechnol.* 44(2): 173–184.
- Skowronek, M., Justyna K., Jan F., and Anna G. 2003. Invertase Activity of Psychrotrophic Fungi. *J. Akademicka.* 19: 20-33.
- Wijanarka, Rejeki, S. F., dan Salamah. 2004. Produksi Inulinase *Pichia alni* DUCC-W4 pada Tepung Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis* Wild) dengan Variasi Konsentrasi Ammonium Nitrat dan Waktu Inkubasi. *Bioma.* 10 (2): 58-64.
- Xiao, R., Tanida, M. and Takao S. 1988. Inulinase from *Cryosporium pannorum*. *J. Ferment. Technol.* 66 (5): 244-248.
- Zobel, P. B. L. Inulin-type Fructans and Reduction in Colon Cancer Risk. *Braz J. Nutr.* 93 (1): 73-90.