

PRODUKSI INULINASE DARI UMBI DAHLIA (*Dahlia variabilis*) OLEH *Pichia manshurica* DUCC Y-015 DENGAN VARIASI WAKTU INKUBASI DAN KONSENTRASI GLUKOSA SEBAGAI SUMBER KARBON TAMBAHAN

Fathika Fitriana, MG Isworo Rukmi dan Wijanarka

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Tembalang,
Semarang 50275 Telepon (024) 7474754; Fax. (024) 76480690

Abstract

The production of fructose from inulin by inulinase would only take one stage enzymatic reaction and yielding 95% fructose. Inulin obtained from the dahlia tubers and inulinase produced by *Pichia manshurica* DUCC Y-015. The production of inulinase (E.C 3.2.1.7) can be influenced by the presence of glucose as additional carbon source. The purpose of this research is to analyze influence of variation glucose concentration and incubation time to production inulinase *P. manshurica* DUCC Y-015 in dahlia tubers substrate. Measurement of production enzyme covering activity inulinase and activity invertase. Both analyzed by DNS method and determined based on 1 μ mole fructose resulting. The design used in this research were Randomized Factorial Block Design (RAFBD). Factor I in the form of glucose concentration 0% (G_0); 0.25% (G_1); 0.5% (G_2) and factor II were incubation time 6 hours (T_6), 12 hours (T_{12}), and 18 hours (T_{18}) with repetition 3 times. The data obtained were analyzed by ANOVA method. The result showed variation of glucose concentration and incubation time difference had no significant effect on production of inulinase from *P. manshurica* DUCC Y-015. The highest production of the inulinase was demonstrated by treatment G_1T_{12} with 0,25% glucose and incubation time 12 hours with value of the activity of inulinase as much as 0,574 IU/mL.

Keywords : Dahlia tubers, Glucose, Inulinase, Incubation time, *Pichia manshurica* DUCC Y-015,

Abstrak

Produksi fruktosa secara langsung dari inulin oleh inulinase hanya memerlukan satu tahap reaksi enzimatik dan menghasilkan 95% fruktosa. Inulin diperoleh dari tepung umbi dahlia dan inulinase diproduksi *Pichia manshurica* DUCC Y-015. Produksi inulinase (E.C. 3.2.1.7) dapat dipengaruhi oleh keberadaan glukosa sebagai sumber karbon tambahan. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis pengaruh variasi konsentrasi glukosa dan waktu inkubasi terhadap produksi inulinase khamir *P. manshurica* DUCC-Y015 dalam substrat umbi dahlia. Pengukuran produksi enzim meliputi aktivitas inulinase dan aktivitas invertase. Aktivitas inulinase dan invertase dianalisis dengan metode DNS dan ditentukan berdasarkan 1 μ mol fruktosa yang dihasilkan. Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) pola faktorial. Faktor I berupa konsentrasi glukosa 0% (G_0) ; 0,25% (G_1) ; 0,5% (G_2) dan faktor II berupa waktu inkubasi 6 jam (T_6), 12 jam (T_{12}), dan 18 jam (T_{18}) dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Data yang diperoleh dianalisis dengan metode ANOVA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi konsentrasi glukosa, perbedaan waktu inkubasi maupun interaksi keduanya berpengaruh tidak signifikan terhadap produksi enzim inulinase. Produksi enzim inulinase tertinggi dari *P. manshurica* DUCC Y-015

ditunjukkan oleh perlakuan G_1T_{12} dengan konsentrasi glukosa sebesar 0,25% dan waktu inkubasi 12 jam dengan nilai aktivitas enzim sebesar 0,574 IU/mL.

Kata Kunci : Glukosa, Inulinase, *Pichia manshurica* DUCC Y-015, Umbi dahlia, Waktu inkubasi

Pendahuluan

Fruktosa merupakan gula yang telah banyak digunakan sebagai bahan aditif dalam industri produk dairy, makanan dan farmasi. Fruktosa merupakan sumber pemanis nutritif karena dapat langsung diserap oleh usus dan memiliki resiko kesehatan yang rendah (Rukmana, 2000). Fruktosa juga bersifat ekonomis karena mempunyai kadar kemanisan 120-180% lebih tinggi dari sukrosa. Ketersediaan fruktosa untuk industri dalam negeri sebagian besar masih impor, oleh karena itu, untuk memenuhi kebutuhan fruktosa secara mandiri, perlu dieksplorasi inovasi teknologi produksi fruktosa. Fruktosa dapat diproduksi secara enzimatik maupun kimiawi. Produksi fruktosa secara kimiawi dengan hidrolisis inulin menggunakan senyawa asam memerlukan biaya tinggi dan menghasilkan senyawa difruktosa anhidrat yang rasanya pahit (Xiao et al., 1988). Produksi fruktosa dari pati secara enzimatik melibatkan α -amilase, amyloglukosidase dan glukosa isomerase menghasilkan 45% fruktosa (Sharma et al., 2006), sedangkan produksi fruktosa dari inulin dengan enzim inulinase dapat menghasilkan 95% fruktosa (Singh et al., 2006).

Enzim inulinase dapat diproduksi oleh mikroba dan merupakan enzim induktif, sintesis inulinase biasanya diinduksi oleh inulin (Allais et al., 1987). Inulin adalah fruktan yang

dapat ditemukan pada akar dan umbi tanaman sebagai cadangan karbohidrat. Umumnya, inulin ditemukan pada famili compositae dan gramineae seperti jerusalem artichoke, chicory dan dahlia (Kumar et al., 2005). Umbi dahlia segar mengandung inulin dengan kadar 72,6% dan 41,7% setelah ekstraksi lanjutan (Widowati dkk., 2005), sehingga umbi dahlia cocok menjadi substrat dalam medium produksi enzim inulinase.

Pichia manshurica DUCC Y-015 merupakan khamir inulolitik yang berhasil diisolasi dari umbi dahlia (Lunggani dkk., 2009). *P. manshurica* DUCC Y-015 mampu tumbuh pada medium yang mengandung inulin sebagai satu-satunya sumber karbon dan memiliki aktivitas inulinase sebesar 0,683 IU/mL (Lunggani dkk., 2009). Angka tersebut masih terbilang rendah jika dibandingkan dengan khamir potensial lainnya, seperti *Kluyveromyces marxianus* yang memiliki aktivitas inulinase sebesar 84,3 IU/mL (Zhou et al., 2014), sehingga diperlukan upaya untuk meningkatkan produksi enzim inulinase oleh *P. manshurica* DUCC Y-015.

Komposisi medium dan kondisi fermentasi berpengaruh dalam produksi enzim (Silva-santisteban et al., 2009). Upaya optimasi produksi enzim dapat dilakukan dengan penambahan glukosa sebagai sumber karbon tambahan pada medium fermentasi (Kumar et al., 2005).

Menurut Galdieri et al. (2010) glukosa dapat langsung digunakan oleh sel khamir untuk pembentukan energi dan dapat mendukung pertumbuhan khamir (Pandey et al., 1999). Glukosa diketahui dapat pula berperan sebagai induser untuk enzim inulinase (Sokolenko et al., 2015). Penambahan senyawa induktif pada konsentrasi yang tepat akan berpengaruh terhadap produksi enzim (Yang et al., 2013). Berdasarkan uraian tersebut, maka dilakukan penelitian mengenai pengaruh variasi konsentrasi glukosa sebagai sumber karbon tambahan terhadap produksi inulinase oleh *Pichia manshurica* DUCC Y-015.

Bahan dan Metode

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain khamir *P. manshurica* DUCC Y-015 dalam medium ISM (Inulin Screening Media), PDA (Potato Dextrose Agar), inulin murni, sukrosa, agar, kertas saring, kapas, indikator pH, reagen DNS (Dinitrosalicylic Acid), akuades steril, tepung umbi dahlia (*Dahlia* sp.) (Wijanarka) 3,0 %, NH_4NO_3 0,23%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,37%, K_2HPO_4 0,1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%, yeast extract 0,15% aquadest, glukosa, buffer natrium asetat dan asam asetat glasial.

Metode

a. Pembuatan Kultur Stok dan Kultur Kerja

Isolat *Pichia manshurica* DUCC Y-015 diinokulasikan ke dalam medium ISM (Inulinase Selecting Medium), kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang sebagai kultur stok. Khamir yang telah tumbuh diinokulasikan ke dalam medium ISM

baru dan digunakan sebagai kultur kerja.

b. Pembuatan Medium Produksi Enzim Inulinase

Tepung umbi dahlia sebanyak 30 gram, dilarutkan dalam 1 L akuades, dipanaskan dalam penangas sampai mendidih ± 25 menit, disaring menggunakan kapas dan kertas saring. Hasil saringan dididihkan, kemudian disaring kembali menggunakan kapas dan kertas saring. Ekstrak umbi dahlia yang diperoleh ditambahkan akuades sampai volume mencapai 1 L, kemudianditambahkan dengan NH_4NO_3 2,3 gram; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 3,7 gram; yeast ekstrak 1,5 gram pH 5; glukosa 0 % pada perlakuan kontrol (G_0); glukosa 0,25% pada perlakuan pertama (G_1); 0,5% pada perlakuan kedua (G_2); dan $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 gram yang telah dilarutkan dalam HCl 5 mL. Larutan dibuat menjadi pH 5. Medium disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm (Ertan et al., 2003). Pengulangan produksi dilakukan sebanyak 3 kali.

c. Pembuatan Starter Khamir *Pichia manshurica* DUCC Y-015

Medium starter memiliki komposisi seperti medium produksi kontrol. *Pichia manshurica* DUCC Y-015 dari kultur stok diinokulasikan sebanyak satu ose bulat ke 50 mL medium starter. Medium diagitasi menggunakan rotary shaker pada kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Medium diambil 3 mL dengan pipet untuk pengukuran OD (Optical Density) secara berkala sampai diperoleh kepadatan sebesar 10^7 sel/mL (OD = 0,7) (Wijanarka dkk., 2013) pada jam ke-22.

d. Pengukuran Pertumbuhan Sel dan Produksi Enzim Inulinase

Pengukuran pertumbuhan sel dilakukan dengan menginokulasikan starter 10% (v/v) pada medium produksi (Wijanarka dkk., 2013). Inkubasi dilakukan selama 24 jam menggunakan rotary shaker dengan kecepatan 120 rpm. Kultur diambil setiap 6 jam untuk dilakukan pengukuran pertumbuhan sel menggunakan metode turbidimetri. Pengukuran pertumbuhan dilakukan dengan mengambil cairan kultur sebanyak 5 mL kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada 520 nm.

Cairan kultur sebanyak 5 mL tersebut diambil menjadi 3 mL untuk pengukuran OD (Optical Density) pertumbuhan, 1 mL untuk pengukuran aktivitas inulinase, dan 1 mL digunakan sebagai blanko. Pengambilan sampel dilakukan pada interval waktu inkubasi 6 jam (T_6), 12 jam (T_{12}) dan 18 jam (T_{18}). Kultur medium produksi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit (Wijanarka dkk., 2007).

e. Pengukuran Aktivitas Enzim Inulinase

Pengukuran aktivitas enzim meliputi aktivitas inulinase dan invertase sehingga dapat dihitung rasio I/S. Aktivitas inulinase dan invertase dianalisis dengan metode Dinitrosalicylic acid (DNS) (Chaplin dan Kennedy, 1994) dan ditentukan berdasarkan sejumlah 1 μ mol gula reduksi yang dibebaskan per menit pada kondisi tertentu. Supernatan hasil sentrifugasi adalah crude enzyme yang digunakan untuk penentuan aktivitas inulinase dan invertase. Pengukuran aktivitas inulinase menggunakan 4

jenis reaksi yaitu Reaksi enzim-substrat (ES) berisi substrat inulin 1% 0,5 mL; buffer asetat 0,4 mL, dan crude enzyme 0,1 mL; Reaksi substrat (S) berisi substrat inulin 1% 0,5 mL; buffer asetat 0,4 mL, dan akuades 0,1 mL. Reaksi enzim (E) berisi buffer asetat 0,4 mL, crude enzyme 0,1 mL, dan akuades 0,5 mL. Reaksi blanko berisi buffer asetat 0,4 mL dan akuades 0,6 mL (Xiao et al., 1988).

Keempat tabung reaksi (ES, S, E, B) selanjutnya diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Reaksi enzimatik dihentikan dengan memasukkan tabung reaksi sampel ke dalam air mendidih selama 2 menit. Reagen DNS ditambahkan sebanyak 1 mL pada kondisi dingin dan dipanaskan kembali selama 10 menit. Warna larutan yang berubah menjadi keco-klatan mengindikasikan adanya gula reduksi. Seluruh tabung reaksi ditambahkan 4 mL akuades dan diukur menggunakan spektrofotometer pada 570 nm. Gula reduksi diukur dengan cara menghitung absorbansi dari ES, S dan E. Berikut rumus penghitungan aktivitas enzim.

$$\text{Aktivitas enzim (IU)} = \frac{(\text{Abs ES} - \text{Abs S} - \text{Abs E}) \text{fruktosa}}{\text{BM}^2 \text{fruktosa} \times 30 \text{ menit}} \times 1000$$

f. Pengukuran Aktivitas Invertase

Invertase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis sukrosa menjadi fruktosa dan glukosa, sehingga pengukuran aktivitas invertase menggunakan substrat sukrosa 1%. Cara pengukuran enzim invertase sama seperti pengukuran aktivitas enzim inulinase yaitu dengan metode DNS.

g. Pembuatan Kurva Standar Fruktosa

Larutan fruktosa standar dengan konsentrasi berbeda (1%; 0,8%; 0,6%; 0,4%; 0,2% dan 0%) masing-

masing diambil 1 mL, kemudian ditambahkan reagen DNS sebanyak 1 mL, dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit dan didinginkan. Larutan ditambahkan 8 mL akuades steril dan diukur ab-sorbansi dengan 570 nm, sehingga diperoleh garis regresi hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi larutan fruktosa standar. Garis regresi digunakan untuk mendapatkan nilai aktivitas enzim inulinase.

h. Analisis Data

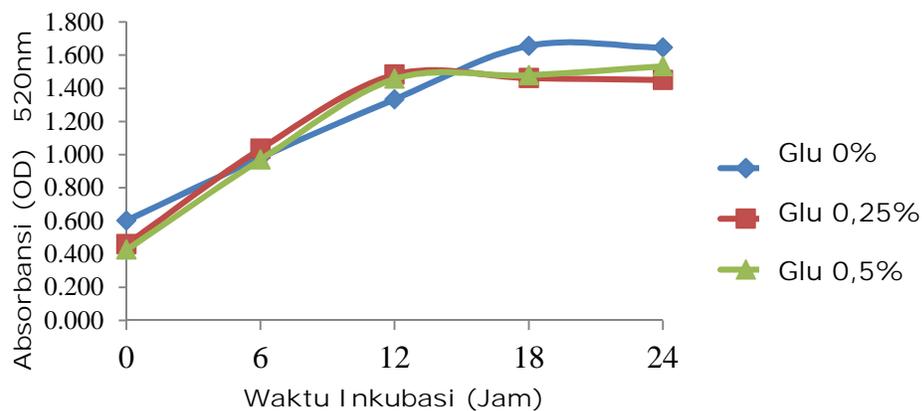
Penelitian ini dilakukan secara eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) pola faktorial. Faktor pertama yaitu variasi sumber karbon tambahan yang terdiri dari (G_0) 0 % glukosa, 0,25 % glukosa (G_1), 0,5% glukosa (G_2). Faktor kedua adalah variasi waktu inkubasi yaitu 6 jam (T_6), 12 jam (T_{12}) dan 18 jam (T_{18}).

Pengulangan produksi dilakukan sebanyak 3 kali. Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis ANOVA dengan taraf signifikansi 5% dan jika menunjukkan terdapat pengaruh selanjutnya diuji lanjut dengan uji BNT.

Hasil dan Pembahasan

Pertumbuhan *Pichia manshurica* DUC Y-015

Pertumbuhan *Pichia manshurica* DUC Y-015 diamati dengan mengukur kerapatan optis (optical density) menggunakan spektrofotometer dengan 520 nm . Pertumbuhan khamir pada media tepung umbi dahlia dengan berbagai konsentrasi glukosa diukur setiap 6 jam selama 24 jam. Kurva pertumbuhan *Pichia manshurica* DUC Y-015 ditunjukkan dalam Gambar 1.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan *Pichia manshurica* DUC Y-015 pada medium produksi dengan variasi konsentrasi glukosa.

P. manshurica DUC Y-015 tidak mengalami fase lag (adaptasi), hal ini disebabkan karena penggunaan starter yang telah memasuki fase log (eksponensial). Hal tersebut sesuai

dengan Holzapfel (2002) bahwa penggunaan starter pada medium produksi dapat memperpendek sampai meniadakan fase lag (adaptasi) pertumbuhan mikroorganismenya. Kultur

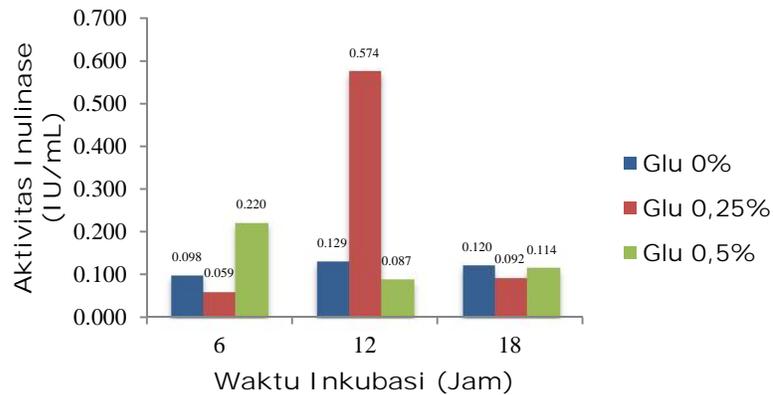
yang telah tumbuh secara logaritmik pada medium starter, kemudian ditransfer ke medium dengan kondisi pertumbuhan (suhu, aerasi, dan sejenisnya) yang sama, maka kultur memasuki fase log dan fase lag tidak terjadi (Madigan et al., 2009).

Pertumbuhan *Pichia manshurica* DUCC Y-015 pada medium G_0 lebih lama dibandingkan pertumbuhan *P. manshurica* DUCC Y-015 pada medium G_1 dan G_2 . Pertumbuhan *P. manshurica* DUCC Y-015 pada medium G_1 dan G_2 mengalami fase log dari jam ke-0 sampai jam ke-12, sedangkan pertumbuhan *P. manshurica* DUCC Y-015 pada medium G_0 mengalami fase log dari jam ke-0 sampai jam ke-18. Hal tersebut menunjukkan bahwa khamir pada medium dengan penambahan glukosa sebagai sumber karbon tambahan memiliki pertumbuhan lebih baik dibandingkan pertumbuhan khamir pada medium tanpa glukosa sebagai sumber karbon tambahan. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Takeda et al., (2015) yang membuktikan bahwa penambahan glukosa (0-2%) mampu meningkatkan laju pertumbuhan spesifik *Schizosaccharomyces pombe*. Hal tersebut sesuai dengan pendapat

Nobili et al., (2001) bahwa glukosa mampu meningkatkan kecepatan metabolisme sel. Glukosa sebagai sumber karbon tambahan berfungsi menyediakan sumber karbon yang mudah digunakan oleh sel khamir untuk pembentukan energi (Galdieri et al., 2010), sehingga dapat mendukung pertumbuhan sel khamir. Glukosa menginduksi biosintesis dan aktivasi enzim yang diperlukan untuk metabolisme optimal bersama beberapa komponen yang diperlukan untuk mencapai tingkat pertumbuhan yang lebih cepat (Stayanarayana and Kunze, 2009).

Produksi Enzim Inulinase oleh *Pichia manshurica* DUCC Y-015

Jumlah inulinase yang diproduksi ditentukan dengan pengukuran aktivitas enzim. Aktivitas enzim inulinase didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang mampu mengkatalisis pembentukan 1 μ mol fruktosa permenit (Gong et al., 2007). Enzim yang diukur aktivitasnya adalah enzim kasar yang didapat melalui supernatan hasil sentrifugasi. Aktivitas enzim inulinase *Pichia manshurica* DUCC Y-015 dengan variasi konsentrasi glukosa dan waktu inkubasi dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 1. Diagram aktivitas inulinase *Pichia manshurica* DUC Y-015 dengan variasi konsentrasi glukosa dan waktu inkubasi.

Gambar 2. menunjukkan bahwa aktivitas inulinase *P. manshurica* DUC Y-015 pada konsentrasi glukosa yang berbeda mempunyai waktu inkubasi optimum yang berbeda. Aktivitas enzim inulinase *Pichia manshurica* DUC Y-015 paling tinggi terjadi pada medium dengan sumber karbon tambahan berupa glukosa 0,25% (G_1) pada waktu inkubasi 12 jam (T_{12}) (0,574 IU/mL). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan sumber karbon tambahan berupa glukosa pada konsentrasi 0,25% dapat menginduksi sintesis inulinase oleh *P. manshurica* DUC Y-015 pada waktu inkubasi 12 jam. Hal ini sesuai dengan pernyataan Sokolenko dan Karpachenko (2014), bahwa penambahan glukosa dapat menginduksi dan dapat pula menekan pembentukan enzim, tergantung konsentrasi yang diberikan, jenis mikroba yang digunakan, perbedaan spesies dan strain mikroba yang dipakai. Penelitian Sokolenko dan Karpachenko (2014) membuktikan bahwa glukosa menekan produksi

enzim inulinase oleh *Kluyveromyces marxianus* Y-1148, namun meng-

induksi produksi enzim inulinase oleh *Saccharomyces cerevisiae* G. Menurut Stayanarayana dan Kunze (2009) glukosa mampu menginduksi biosintesis dan aktivasi enzim yang diperlukan untuk metabolisme optimal pada konsentrasi 0,002 – 0,2 % atau 1 - 100 mg dalam medium.

Penambahan glukosa dapat menginduksi sintesis enzim, namun penambahan tingkat lanjut dapat menghambat sintesis enzim dengan menurunkan laju reaksi pada enzim (Page, 1989). Hal tersebut sesuai dengan penelitian Zhang et al. (2005) yang membuktikan bahwa glukosa dapat menghambat aktivitas inulinase *Kluyveromyces marxianus* pada konsentrasi 2 % dengan menurunkan laju hidrolisis enzim. Penurunan laju hidrolisis enzim dapat terjadi karena mekanisme represi katabolit (Zhang et al., 2005). Represi katabolit adalah suatu mekanisme penghambatan ekspresi gen yang mengkode sintesis enzim-enzim yang digunakan untuk metabolisme suatu

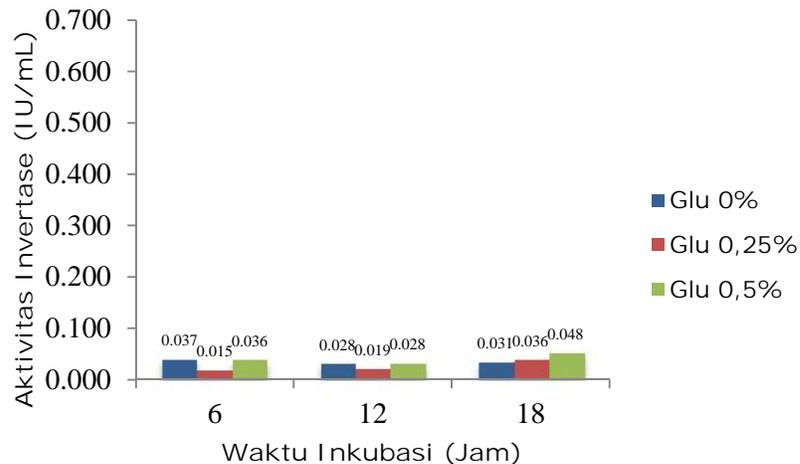
sumber karbon karena adanya sumber karbon lain yang mudah dimetabolisme (Yuwono, 2005).

Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian Lunggani dkk. (2009) yang menyatakan bahwa aktivitas inulinase *P. manshurica* DUCC Y-015 mampu mencapai 0,683 IU/mL, sedangkan pada penelitian ini aktivitas inulinase *P. manshurica* DUCC Y-015 tertinggi adalah sebesar 0,574 IU/mL. Perbedaan hasil penelitian ini dengan penelitian Lunggani dkk. (2009) diduga karena perbedaan sumber karbon yang digunakan. Penelitian ini menggunakan sumber karbon berupa tepung umbi dahlia yang diperoleh dari koleksi Wijanarka dkk. (2013) serta penambahan glukosa sebesar 0,25%, sedangkan pada penelitian Lunggani dkk. (2009) digunakan inulin murni sebagai satu-satunya sumber karbon. Tepung umbi dahlia merupakan konversi langsung dari umbi dahlia dengan penghilangan komponen air dan belum melalui proses separasi

(pemisahan) tingkat lanjut senyawa inulin dari senyawa lain yang terkandung dalam umbi dahlia. Keberadaan material selain inulin menyebabkan penurunan efektifitas khamir dalam mensintesis inulinase, dikarenakan inulinase bekerja selektif terhadap substrat (Yuliana dkk., 2014).

Produksi enzim Invertase oleh *Pichia manshurica* DUCC Y-015

Aktivitas inulinase biasanya disertai aktivitas invertase dan kompleks enzimatik yang dinyatakan sebagai rasio I/S dengan I adalah aktivitas inulinase dan S adalah aktivitas invertase (Singh and Chauhan, 2016). Aktivitas invertase pada inulinase diperlukan untuk menghidrolisis ujung akhir inulin berupa sukrosa yang tersisa setelah hidrolisis sempurna inulin oleh enzim inulinase (Ricca et al., 2007). Aktivitas enzim invertase *P. manshurica* DUCC Y-015 dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 2. Diagram aktivitas invertase *Pichia manshurica* DUCC Y-015 dengan variasi konsentrasi glukosa dan waktu inkubasi.

Gambar 3 menunjukkan aktivitas enzim invertase yang rendah apabila

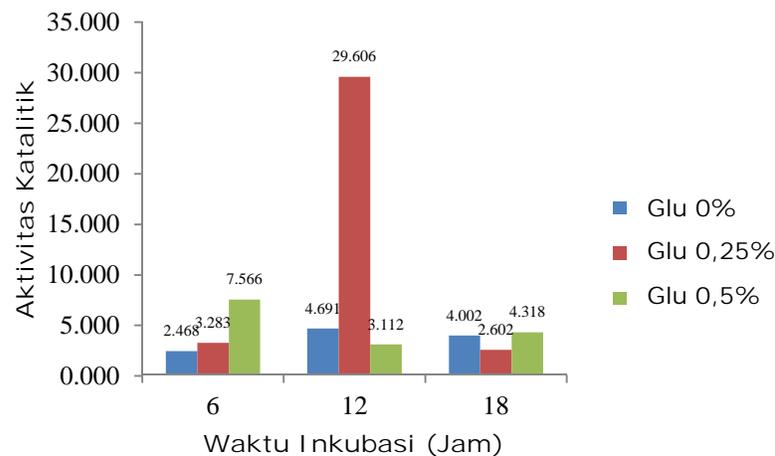
dibandingkan dengan aktivitas inulinase khamir. Sintesis enzim oleh

khamir didasarkan pada kebutuhan dan disesuaikan dengan nutrisi yang tersedia dalam medium. Enzim invertase bekerja dengan menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa (Sharma et al., 2006), apabila glukosa dan fruktosa tersedia dalam medium dalam jumlah yang cukup, maka khamir cenderung memperlambat atau bahkan menghentikan sintesis enzim invertase. Hal tersebut sesuai dengan Martin et al., (1981) yang menyatakan bahwa aktivitas enzim dipengaruhi oleh konsentrasi produk, apabila produk

sudah tersedia dalam medium, maka reaksi melambat atau bahkan berhenti.

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

Pengukuran aktivitas katalitik dilakukan untuk menggambarkan perbedaan aktivitas inulinase dan invertase. Aktivitas katalitik ditentukan dengan rasio I/S. Apabila rasio I/S >1 maka enzim lebih didominasi inulinase, apabila rasio I/S <1 maka enzim lebih didominasi invertase (Skowronek et al., 2003).



Gambar 3. Diagram aktivitas katalitik enzim oleh *Pichia manshurica* DUCC Y-015 dengan variasi konsentrasi glukosa dan waktu inkubasi.

Rasio I/S tertinggi diperoleh pada perlakuan G_1T_{12} yaitu sebesar 29,606. Rasio I/S *P. manshurica* DUCC Y-015 pada semua perlakuan > 1 (Gambar 4), maka enzim yang dominan pada proses hidrolisis inulin adalah enzim inulinase. Hasil ini 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 terhadap inulin dibandingkan dengan invertase. Hasil ANOVA pengaruh variabel independen (konsentrasi glukosa dan waktu inkubasi) terhadap variabel dependen (Rasio I/S), menunjukkan baik variasi konsentrasi glukosa, waktu inkubasi maupun interaksi keduanya berbeda tidak nyata terhadap Rasio I/S. Hal tersebut menunjukkan bahwa dalam penelitian ini penambahan glukosa dan waktu

inkubasi tidak berpengaruh signifikan terhadap Rasio I/S *Pichia manshurica* DUCC Y-015.

Kesimpulan

Variasi konsentrasi glukosa, perbedaan waktu inkubasi maupun interaksi keduanya belum mampu meningkatkan produksi enzim inulinase oleh *Pichia manshurica* DUCC Y-015. Produksi enzim inulinase optimum dari *Pichia manshurica* DUCC Y-015 ditunjukkan oleh perlakuan G_1T_{12} dengan konsentrasi glukosa sebesar 0,25% dan waktu inkubasi 12 jam, dengan nilai aktivitas enzimnya sebesar 0,574 IU/mL.

Daftar Pustaka

- Allais, J.J., H.L.Glady, K.Sadok, and C.B. Jacques. 1987. Isolation and Characterization of Thermophylic Bacteria Strains with Inulinase Activity. *Applied and Environmental Microbiology* 53(5): 1086-1090.
- Amedia, I., Wijanarka dan S. Purwantisari 2016. Optimasi Produksi Inulinase oleh Khamir *Pichia manshurica* DUCC Y-015 pada Tepung Umbi dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.) dengan Variasi Konsentrasi K_2HPO_4 dan Waktu Inkubasi. *Bioma*. 18(1): 48-55
- Dinarvand, M., M. Rezaee, and M. Foroughi. 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 Conditions on the Production of Inulinase from *Rhizoctonia solani*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 16 (6): 1386-1388.
- Galdieri, L., S. Mehrotra, S.Yu, and A.Vancura. 2010. Transcriptional Regulation in Yeast during Diauxic Shift and Stationary Phase. *a Journal of Integrative Biology*, 629–638.
- Gandjar, I., S. Wellyzar, dan O. Ariyanti. 2014. Mikologi : Dasar dan Terapan. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta
- Gong, F., J.Sheng, C. Zhenming, and J. Li. 2007. Inulinase production by a marine yeast and inulin hydrolysis by the crude inulinase. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 179-185
- Holzappel, W.H. 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*. 197-212.
- Khatun, M., Mahfuza, C.G. Liu, Z.Q. Zhao, W.J. Yuan and F.W. Bai. 2016. Consolidated ethanol production from Jerusalem artichoke tubers at elevated temperature by *Saccharomyces cerevisiae* engineered with inulinase expression through cell surface

- display. *J Ind Microbioal Biotechnol.* 295-301
- Kumar, G. P., A. Kunamneni, T. Prabhakar and Ellaiah. 2005. Optimization of process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Aspergillus niger* AUP19. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*,: 21:1359-1361.
- Lunggani, A.T, Wijanarka, and E. Kusdiyantini . 2009. Poduksi IOS Prebiotik Berbasis Pemanfaatan Umbi dahlia *Dahlia variabilis* oleh Khamir Inulolitik dan Pengujian Antimikrobanya Secara Invitro. Penelitian Hibah Multiyears Desentralisasi.
- Madigan, M. T., J.M.Martinko, P.V. Dunlap, and D.P. Clark. 2009. *Biology of Microorganisms* 12th Edition. Pearson Education Inc.
- Nakamura, T., Y. Ogata, S. Akichika, A.Nakamura, and K. Ohta. 1995. Continuous production of Fructose Syrups from Inulin by Immobilized Inulinase from *Aspergillus niger* Mutant 817. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* 80.
- Nobili, M. D., M. Contin, C. Mondini, P.C. Brookes. 2001. Soil microbial biomass is tregered into activity by trace amounts of substrate. *Soil Biology & Biochemistry.* 33 : 1163-1170.
- Pandey, A.,C.R. Soccol, P. Selvakumar, V.T. Soccol, N. Krieger, and J.D Fontana. 1999. Recent developments in microbial inulinases, its production, properties and industrial applications. *Appl Biochem Biotechnol.* 81: 35-52 . from *Penicillium janczewskii*, a Fungus Isolated from The Rizosphere of Vernonia herbacea (Asteraceae). *Journal of Applied Microbiology I*, 87 : 141-147.
- 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.
- Satyanarayana, T., and G. Kunze. 2009. *Yeast Biotechnolgy : Diversity and Applications.* Springer.
- Sharma, A. D., S. Kainth, and P. K. Gill. 2006. Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces* sp. *Food Engineering* , 486-49.
- Silva-Santisteban, B. O. Y., A. Converti, and F. M. Filho. 2009. Effects of Carbon and Nitrogen Sources and Oxygenation on the Production of Inulinase by *Kluyveromyces marxianus*. *Appl Biochem Biotechnol.* 152:249–261.
- Singh, R. S., S. S.Balwinder, and P.Munish. 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.
- Skowronek, M., K. Justyana, F. Jan, and G. Anna. 2003. Invertase Activity of Psycotrophic Fungi. *Akademicka.* 28(19): 20-33.

- Sokolenko, G.G., and N. A. Karpechenko. 2015. Expression of Inulinase Genes in the Yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *Microbiology*. Vol. 84, No. 1, pp. 23–27.
- Takeda, K., C. Starzynski, A. Mori, and M. Yanagida. 2015. The critical glucose concentration for respiration-independent Mitochondrion. 91–95.
- Widowati, S., C.S. Titi, dan A. Zahrani. 2005. Ekstraksi, Karakterisasi, dan Kajian Potensi Prebiotik Inulin dari Umbi dahlia (*Dahlia pinnata*). Seminar Rutin Puslitbang Tanaman Pangan Bogor. 1-2.
- Wijanarka, E. Kusdiyantini dan H. Pancasakti. 2006. Paket Teknologi Eksplorasi Khamir Inulinolitik Thermostabil Umbi dahlia (*Dahlia variabilis* Willd) Jawa Tengah melalui Teknik Fusi Protoplas dan Aplikasinya pada Produksi High Fructose Syrup (HFS). Laporan Hasil pelaksanaan Penelitian Hibah Bersaing Perguruan Tinggi XIV/I Tahun Anggaran 2006.
- _____, 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 : 187-192.
- _____, R.S. Ferniah, dan Salamah. 2008. Produksi Inulinase oleh *Pichia alni* DUCW4 pada Tepung Umbi dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.) dengan Variasi Konsentrasi Ammonium Nitrat dan Waktu Inkubasi. *BIOMA*. 2(19): 58-64
- Xiao, R., M. Tanida and S. Takao. 1988. Inulinase from *Cryosporium pannorum*. *J. Ferment. Technol.* 66 (5): 244-248.
- Yuliana, R., E. Kusdiyantini, M. Izzati. 2014. Potensi Tepung Umbi Dahlia Dan Ekstrak Inulin Dahlia Sebagai Sumber Karbon Dalam Produksi Fruktooligosakarida (FOS) oleh khamir *Kluyveromyces marxianus* DUCW-Y-003. *BIOMA*. 16(1) 39-49.
- Yuwono, T. 2002. *Biologi Molekular*. Jakarta : Penerbit Erlangga.
- Zhang, L., C. Zhao, W. Y. Ohta, and Y. Wang. 2005. Inhibition of glucose on an exoinulinase from *Kluyveromyces*. *Process Biochemistry* . 1541–1545.
- Zhou, H.X., F.H. Xin, Z. Chi, G.L. Liu, Z.M. Chi. 2014. Inulinase production by the yeast *Kluyveromyces marxianus* with the disrupted MIG1 gene and the over-expressed inulinase gene. *Process Biochemistry*. No. 5 : 8.