

Pengaruh Penambahan Tepung *Azolla* Sp. dan Perbedaan Waktu Inkubasi Terhadap Produksi Inulinase Khamir *Pichia manshurica* DUCC Y-015 Pada Medium Tepung Umbi Dahlia (*Dahlia Variabilis* Willd.)

Rahmawati Dewi^{1*}, Wijanarka^{2*}, Sri Pujiyanto²

¹Mahasiswa Prodi S1 Biologi, Departemen Biologi, FSM, Universitas Diponegoro,

²Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, FSM, Universitas Diponegoro,

Jl. Prof. Soedarto, SH, Tembalang, Semarang 50275

Email: rahmaaawd@gmail.com

Abstract

Inulin is a high-food fibrous fructose polymer, one of which is found in dahlia tubers which are found around the roots of *Pichia manshurica*. *P. manshurica* produces an inulinase enzyme which can break down inulin into a unit of fructose and is used as raw material for making fructose syrup. Based on the benefits of the inulin, a lot of research has been done on the optimization of the production of inulinase enzymes by *P. manshurica* DUCC Y-015 to obtain optimal products. Optimization of inulinase enzyme production can be goes by modifying the nutrient content in the medium, one of which is by followed a nitrogen source to the production medium. This study aims to determine the effect of addition of *Azolla* sp. as a source of nitrogen and the difference in incubation time. The research was carried out experimentally using a Randomized Block Design factorial with three replications. The first factor is the variation in the concentration of *Azolla* sp., those are 0%; 0.14%; 0.28%; and 0.42%. The second factor is the variation of incubation time, those are 0 hours; 6 hours; 12 hours; 18 hours; and 24 hours. Anova calculations showed that the addition of various *Azolla* sp. concentrations in the production medium not affected the inulinase and invertase activity *P. manshurica* DUCC Y-015, while the incubation time significantly affected the inulinase activity and invertase activity. Based on BNT test, the optimal incubation time of inulinase and invertase activity is at 6 hours incubation time.

Keywords: *Inulinase, invertase, Azolla sp., Pichia manshurica* DUCC Y-015.

Abstrak

Inulin merupakan polimer fruktosa berserat pangan tinggi yang salah satunya ditemukan pada umbi dahlia yang disekitar perakarannya ditemukan *Pichia manshurica*. *P. manshurica* menghasilkan enzim inulinase yang dapat memecah inulin menjadi uni-unit fruktosa dan digunakan sebagai bahan baku pembuatan sirup fruktosa. Berdasarkan manfaat yang dimiliki inulin tersebut, telah banyak dilakukan penelitian mengenai optimasi produksi enzim inulinase oleh *P. manshurica* DUCC Y-015 untuk mendapatkan produk yang optimal. Optimasi produksi enzim inulinase dapat dilakukan dengan memodifikasi kandungan nutrisi dalam medium, salah satunya dengan menambahkan sumber nitrogen pada medium produksi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan tepung *Azolla* sp. sebagai sumber nitrogen dan perbedaan waktu inkubasi. Penelitian dilakukan secara eksperimental menggunakan Rancangan Acak Kelompok pola factorial, dengan tiga kali ulangan. Faktor pertama adalah variasi konsentrasi tepung *Azolla* sp., yaitu 0%; 0,14%; 0,28%; dan 0,42%. Faktor kedua adalah variasi waktu inkubasi yaitu 0 jam; 6 jam; 12 jam; 18 jam; dan 24 jam. Hasil perhitungan Anova menunjukkan bahwa penambahan berbagai konsentrasi *Azolla* sp. pada medium produksi belum mempengaruhi aktivitas inulinase dan invertase *P. manshurica* DUCC Y-015, sedangkan waktu inkubasi berpengaruh nyata terhadap aktivitas inulinase dan aktivitas invertase. Berdasarkan uji BNT, waktu inkubasi optimal aktivitas inulinase dan invertase adalah pada waktu inkubasi 6 jam.

Kata kunci: *Inulinase, invertase, Azolla sp., Pichia manshurica* DUCC Y-015.

PENDAHULUAN

Gula merupakan salah satu kebutuhan pokok dalam kehidupan sehari-hari. Sebagai salah satu bahan pangan pokok, konsumsi gula selalu mengalami peningkatan dari tahun ke

tahun. Berdasarkan data Kementerian Pertanian, pada tahun 2013, tingkat konsumsi gula nasional sebanyak 5,6 ton. Jumlah tersebut terdiri dari 2,8 juta ton konsumsi gula industri dan 2,8 juta ton konsumsi gula nasional, sedangkan pada tahun 2017, konsumsi gula nasional mencapai 5,7 juta

ton. Jumlah tersebut terdiri dari gula industri sebesar 2,8 juta ton dan gula konsumsi rumah tangga 2,9 juta ton. Berdasarkan data tersebut, dapat dilihat bahwa konsumsi gula industri meningkat, hal ini dikarenakan tumbuhnya industri makanan dan minuman membuat permintaan gula industri meningkat (Komalasari dkk., 2017).

Pada industri pangan, pemanis sintetis banyak digunakan dalam menggantikan peran gula dengan tujuan untuk menekan biaya produksi (Cahyadi, 2006). Salah satu pemanis sintetis yang sering digunakan adalah siklamat dan aspartam. Diketahui kedua pemanis sintetis tersebut memiliki berbagai macam dampak buruk bagi kesehatan. (Lingga, 2012). Oleh karena itu, dibutuhkan suatu pemanis yang dapat digunakan sebagai alternatif lain yang dapat memenuhi kebutuhan industri pangan yang baik untuk kesehatan, salah satunya adalah inulin.

Salah satu tanaman yang memiliki kandungan inulin paling tinggi adalah pada umbi dahlia (*Dahlia* sp.), yaitu sebanyak 9-12,5% dari total berat basah (Kango, 2011). Selain itu, pada umbi dahlia terdapat khamir *Pichia manshurica* yang secara indigenous berada di sekitar umbi dahlia dan perakaran umbi dahlia (Guo et al., 2009).

Pichia manshurica adalah salah satu jenis khamir yang mampu menghasilkan enzim inulinase (Guo et al., 2009). Enzim inulinase adalah enzim hidrolitik yang mengkatalisis reaksi hidrolisis polisakarida inulin menjadi fruktosa dan atau fruktooligosakarida (Singh and Singh, 2010). Penelitian mengenai optimasi enzim inulinase oleh khamir *P. manshurica* DUC Y-015 telah banyak dilakukan, salah satunya dengan memodifikasi kandungan nutrisi dalam medium. Penelitian ini mencoba menggunakan tepung *Azolla* sp. sebagai sumber nitrogen bagi *P. manshurica* DUC Y-015 dalam menghasilkan enzim inulinase. Menurut Lumpkin dan Placknet (1985), total kandungan protein yang dimiliki *Azolla* sp. yaitu 13- 24 % dari total berat kering.

Menurut Samantha et al. (2006), sumber nitrogen merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan. Rossi et al. (2011) menambahkan bahwa selama fase pertumbuhan, nitrogen diperlukan untuk sintesis protein dan asam nukleat.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April hingga September 2016 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro.

Bahan

Khamir *P. manshurica* DUC Y-015 dalam medium ISM (*Inulin Screening Media*), tepung umbi dahlia (*Dahlia variabilis* Wild.), inulin murni, tepung *Azolla* sp., sukrosa, agar, kertas saring, reagen DNS (*Dinitrosalicylic Acid*), akuades steril, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, yeast ekstrak, larutan fruktosa, buffer sodium asetat dan asam asetat glasial.

Pembuatan Tepung *Azolla* sp. (Abdillah, 2013)

Azolla sp. di dapatkan dari tempat budidaya *Azolla* sp. di Jakarta. *Azolla* sp. dicuci sampai bersih, kemudian dijemur di bawah sinar matahari. *Azolla* sp. yang sudah kering digiling menggunakan blender hingga menjadi tepung

Pembuatan Tepung Umbi Dahlia (Ertan et al., 2003)

Umbi dahlia dikupas dan dicuci hingga bersih. Umbi dipotong kecil-kecil dan dikeringkan menggunakan oven suhu 80 °C selama 2 jam. Umbi dahlia yang sudah kering selanjutnya digiling sampai menjadi tepung

Pembuatan Medium Produksi Enzim Inulinase (Ertan et al., 2003)

Tepung umbi dahlia sebanyak 30 gr, dilarutkan dalam 1 L akuades, dipanaskan dalam penangas sampai mendidih selama 25 menit, disaring menggunakan kapas dan kertas saring. Larutan hasil penyaringan kemudian ditambahkan dengan NH_4NO_3 2,3g; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 3,7 g; K_2HPO_4 1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; dan yeast ekstrak 1,5 g dengan pH 5 digunakan sebagai medium kontrol (N_0). Medium perlakuan dibuat dengan menggantikan kandungan NH_4NO_3 dengan tepung *Azolla* sp. konsentrasi (b/v) 0,14% (N_1); 0,28% (N_2) dan 0,42% (N_3). Penambahan tepung *Azolla* sp. dilakukan dengan merebus 2 g, 4 g, 6 g tepung *Azolla* sp. masing-masing dalam 100 mL akuades. Pengulangan produksi dilakukan sebanyak tiga kali.

Pembuatan Starter Khamir *Pichia manshurica* DUC Y-015 (Wijanarka dkk., 2004).

Isolat khamir *P. manshurica* DUC Y-015 berumur 24 jam diinokulasikan sebanyak satu ose bulat ke dalam medium starter. Medium diagitasi menggunakan *rotary shaker* pada kecepatan 150 rpm selama 22 jam, sehingga didapatkan kultur dengan kepadatan 10^7 sel/mL .

Pengukuran Pertumbuhan Sel dan (Wijanarka dkk., 2004).

Pengukuran pertumbuhan sel dilakukan dengan menginokulasikan 10% starter berumur

22 jam dengan kepadatan 10^7 sel/mL ke dalam masing-masing perlakuan medium produksi. Inkubasi dilakukan selama 24 jam menggunakan rotary shaker dengan kecepatan 150 rpm pada suhu ruang. Kultur diambil sebanyak 3 mL setiap 6 jam, untuk dilakukan pengukuran pertumbuhan sel menggunakan metode turbidimetri. Pertumbuhan sel ditentukan dengan mengukur nilai optical density (OD) menggunakan spektrofotometer SP-300 pada λ 520 nm.

Produksi Enzim (Wijanarka dkk., 2004)

Cairan kultur sebanyak 1 mL diambil setiap 6 jam, dimasukkan ke dalam tabung eppendorf kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan enzim kasar dan digunakan untuk uji aktivitas enzim.

Pengukuran Aktivitas Enzim

Pengukuran aktivitas enzim terdiri atas aktivitas inulinase dan invertase, sehingga dapat diperoleh rasio I/S. Pengukuran aktivitas enzim ini dianalisis menggunakan metode gula reduksi yang diukur dengan cara menghitung absorbansi enzim substrat (ES) dikurangi absorbansi substrat (S) dan enzim (E). Berikut adalah rumus aktivitas enzim:

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

Keterangan :

Abs ES : Absorbansi Enzim-Substrat

Abs S : Absorbansi Substrat

Abs E : Absorbansi Enzim

BM : Berat molekul (180,1)

P : Faktor pengenceran

Fruktosa : Persamaan regresi kurva fruktosa standar

$$Y = -0,0288 + 0,5398X$$

1. Pembuatan Kurva Standar Fruktosa (Wijanarka dkk., 2008)

Larutan fruktosa 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 absorbansi λ 570 nm, sehingga diperoleh garis regresi hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi larutan fruktosa standar. Garis regresi digunakan untuk mendapatkan nilai aktivitas enzim inulinase.

2. Pengukuran Aktivitas Enzim Inulinase (Ertan *et al.*, 2003; Wijanarka dkk., 2004).

Tabel 1. Komposisi Bahan Pengukuran Aktivitas Enzim Inulinase

Komposisi	ES (mL)	S (mL)	E (mL)	Blanko (mL)
Buffer Fosfat	0,4	0,4	0,4	0,4
Enzim Kasar	0,1	-	0,1	-
Substrat inulin 1 %	0,5	0,5	-	-
Akuades	-	0,1	0,5	0,6
Total volume	1	1	1	1

Aktivitas inulinase dilakukan dengan mengukur absorbansi ES, S, dan E. Tabung reaksi ES (Enzim Substrat), S (Substrat), E (Enzim), selanjutnya diinkubasi pada suhu 50 °C selama 30 menit. Reaksi enzimatik dihentikan dengan memasukkan tabung reaksi sampel ke dalam air mendidih selama 5 menit. Reagen DNS ditambahkan sebanyak 1 mL pada kondisi dingin dan dipanaskan kembali selama 10 menit. Seluruh tabung reaksi ditambahkan 5 mL akuades dan diukur menggunakan spektrofotometer SP-300 pada λ 570 nm. Aktivitas inulinase ditentukan berdasarkan sejumlah 1 μ mol gula reduksi yang dibebaskan per menit pada kondisi tertentu.

3. Pengukuran Aktivitas Enzim Invertase

Cara pengukuran aktivitas enzim invertase sama seperti pengukuran aktivitas enzim inulinase. Perbedaannya hanya pada substrat yang digunakan yaitu larutan sukrosa 1%.

Analisis Data

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) pola faktorial. Faktor pertama yaitu variasi konsentrasi tepung *Azolla* sp. yang terdiri dari 0% (N_0); 0,14% (N_1); 0,28% (N_2); dan 0,42% (N_3). Faktor kedua adalah variasi waktu inkubasi yaitu 0 jam (T_0); 6 jam (T_6); 12 jam (T_{12}); 18 jam (T_{18}); 24 jam (T_{24}). Pengulangan dilakukan sebanyak tiga kali. Data yang diperoleh dilakukan uji normalitas dengan uji Komolgorov-Smirnov, uji homogenitas dengan uji Levene dan dianalisis menggunakan Anova dengan taraf signifikan 5% dan lanjut uji BNT (Beda Nyata Terkecil).

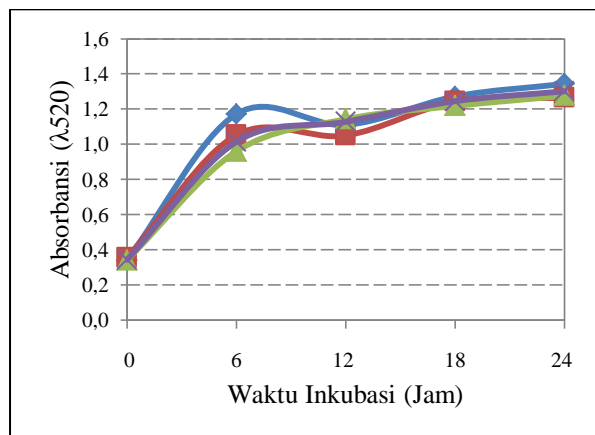
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan Khamir *P. manshurica* DUC Y-015

Pertumbuhan khamir *P. manshurica* DUC Y-015 ditentukan dengan mengukur nilai optical density (OD) menggunakan spektrofotometer pada λ 520 nm. Berdasarkan

pada gambar 4.1. pertumbuhan khamir *P. manshurica* DUCC Y-015 tertinggi terjadi pada kontrol, yaitu pada waktu inkubasi 24 jam. Selain itu juga terjadi pada waktu inkubasi 6 jam dan 12 jam. Hal ini dapat dikarenakan kandungan nitrogen yang dimiliki oleh kontrol yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan yang lain yang dapat mempengaruhi pertumbuhan khamir *P. manshurica* DUCC Y-015. Sumber nitrogen sangat diperlukan dalam pertumbuhan sel khamir (Dinarvand, 2013).

Hasil Gambar 4.1. menunjukkan bahwa pada waktu inkubasi 0 hingga 6 jam semua perlakuan menunjukkan pertumbuhan khamir *P. manshurica* DUCC Y-015 mengalami fase log, ditandai dengan perbanyakan jumlah sel yang sangat banyak dan aktivitas sel sangat meningkat (Moore and Landecker, 1996 dalam Roosheroe dan Sjamsuridzal, 2006). Hal tersebut menunjukkan bahwa fase lag (fase adaptasi) pada pertumbuhan khamir *P. manshurica* DUCC Y-015 tidak terjadi. Hal ini disebabkan, karena penggunaan starter pada saat inokulasi, yang mengakibatkan tidak akan terjadi fase lag.



Gambar 4.1. Pertumbuhan khamir *P. manshurica* DUCC Y-015 pada medium pertumbuhan dengan penambahan *Azolla* sp. pada berbagai konsentrasi selama inkubasi 24 jam N₀ (—); N₁ (—); N₂ (—); N₃ (—)

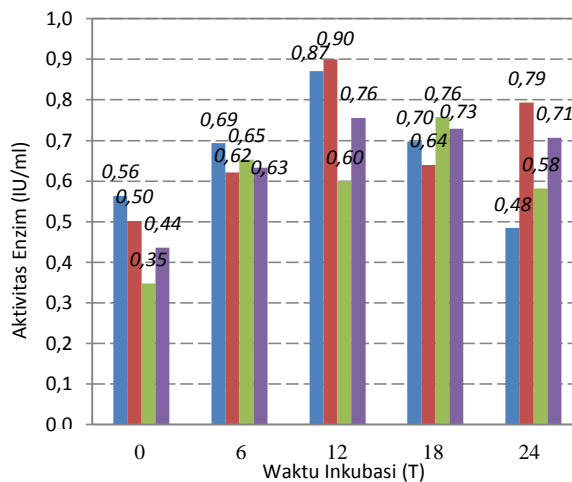
Menurut Madigan *et al.* (2015), kultur yang telah tumbuh secara eksponensial pada medium starter, kemudian ditransfer ke medium dengan kondisi pertumbuhan yang sama (suhu, aerasi, dan sejenisnya), maka fase lag tidak terjadi dan pertumbuhan eksponensial segera dimulai.

Pertumbuhan khamir setelah waktu inkubasi 6 jam menunjukkan khamir memasuki fase pertumbuhan diperlambat. Pada fase ini, zat nutrisi sudah sangat berkurang dan ada hasil metabolisme yang mungkin beracun atau dapat menghambat pertumbuhan. Jumlah populasi masih naik karena jumlah sel yang tumbuh

masih lebih banyak daripada yang mati (Suhartono, 1989).

Aktivitas Inulinase Khamir *P. manshurica* DUCC Y-015

Inulinase merupakan enzim ekstraseluler yang produksinya disekresikan keluar sel bercampur dengan medium sehingga penghitungan produksi enzim diukur melalui supernatan hasil sentrifugasi medium. Jumlah inulinase yang diproduksi dapat ditentukan dengan uji aktivitas enzim (Sadikin, 2002).



Gambar 4.2. Aktivitas enzim inulinase khamir *P. manshurica* DUCC Y-015 pada medium produksi dengan penambahan *Azolla* sp. pada berbagai konsentrasi selama inkubasi 24 jam N₀ (—); N₁ (—); N₂ (—); N₃ (—)

Hasil pengukuran aktivitas enzim inulinase pada Gambar 4.2. menunjukkan bahwa aktivitas enzim inulinase khamir *P. manshurica* DUCC Y-015 memiliki aktivitas enzim tertinggi pada waktu inkubasi 12 jam pada perlakuan N₁ yaitu 0,90 IU/ml serta perlakuan N₀ dan N₃ juga memiliki aktivitas tertinggi pada T₁₂ yaitu 0,87 IU/ml dan 0,76 IU/ml. Sedangkan pada N₂, aktivitas inulinase tertinggi pada T₁₈. Perlakuan N₁ juga memiliki aktivitas inulinase tertinggi pada T₂₄ dibandingkan perlakuan lainnya.

Aktivitas inulinase yang tinggi pada N₁ diduga dapat disebabkan karena penambahan konsentrasi *Azolla* sp. pada N₁ merupakan konsentrasi yang optimal untuk aktivitas inulinase dibandingkan dengan perlakuan lain, walaupun konsentrasi nitrogennya lebih rendah daripada N₀, akan tetapi *Azolla* sp. merupakan sumber nitrogen kompleks. Menurut penelitian Jain *et al.* (2012), sumber nitrogen kompleks lebih baik dibandingkan dengan sumber nitrogen anorganik. Penelitian yang dilakukan Jain *et al.* (2012), menunjukkan bahwa produksi

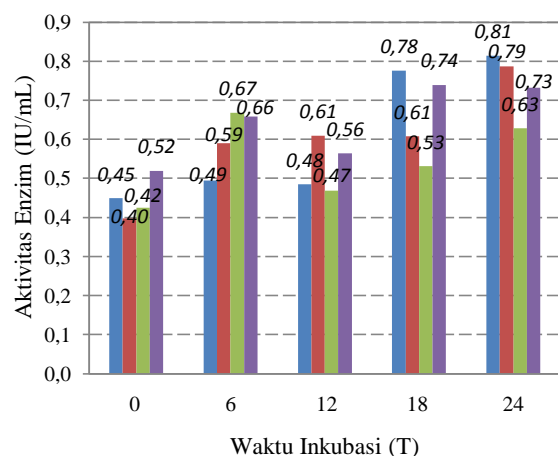
enzim inulinase oleh *K. Marxianus* MTCC 3995 pada medium yang menggunakan *yeast extract*, *peptone*, *corn steep liquor* dan *beef extract* lebih tinggi dibandingkan dengan medium yang menggunakan NaNO_3 , KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$.

Berdasarkan hasil analisis uji Anova dari aktivitas inulinase menunjukkan bahwa penambahan tepung *Azolla* sp. dengan konsentrasi yang berbeda tidak berpengaruh nyata pada aktivitas inulinase, sedangkan waktu inkubasi berpengaruh nyata terhadap aktivitas inulinase. Uji lanjut BNT kemudian dilakukan untuk membandingkan seluruh rata-rata waktu inkubasi untuk mengetahui waktu inkubasi optimum aktivitas enzim inulinase. Hasil yang diperoleh adalah waktu inkubasi optimum aktivitas enzim inulinase berdasarkan uji lanjut BNT adalah pada waktu inkubasi 6 jam.

Aktivitas Invertase Khamir *P. manshurica* DUCC Y-015

Invertase adalah suatu enzim yang menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa pada bagian ujung rantai inulin (Alegre *et al*, 2009). Pada banyak mikroorganisme penghasil inulinase, aktivitas invertase mengiringi aktivitas inulinase (Pessoni *et al*. 1999).

Pada Gambar 4.3. menunjukkan hasil pengukuran aktivitas enzim invertase khamir *P. manshurica* DUCC Y-015 memiliki aktivitas enzim tertinggi pada T_{24} pada perlakuan N_0 yaitu 0,81 IU/mL, selain itu pada N_1 menunjukkan aktivitas invertase yang tinggi pada T_{24} . Pada N_2 , aktivitas invertase tertinggi terjadi pada T_6 , sedangkan pada N_3 terjadi pada T_{18} .



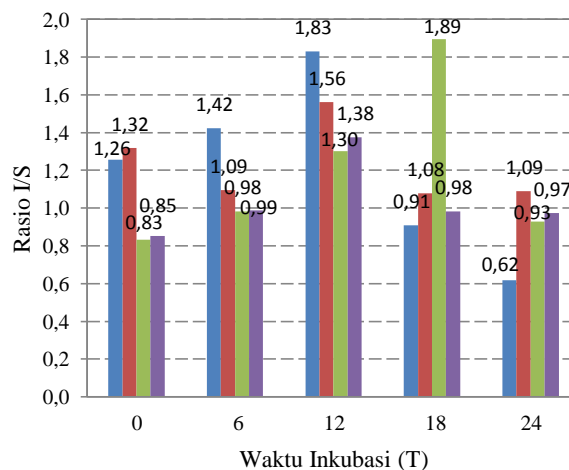
Gambar 4.3. Aktivitas enzim invertase khamir *P. manshurica* DUCC Y-015 pada medium produksi dengan penambahan *Azolla* sp. pada berbagai konsentrasi selama inkubasi 24 jam N_0 (—); N_1 (—); N_2 (—); N_3 (—)

Ada kecenderungan bahwa saat aktivitas inulinase yang tinggi maka aktivitas invertasinya rendah, hal ini dapat dilihat pada perlakuan N_0 pada waktu inkubasi 6 jam dan 12 jam, serta pada N_1 pada waktu inkubasi 12 jam. Pada saat aktivitas inulinase rendah juga aktivitas invertasinya tinggi, hal ini dapat dilihat pada perlakuan N_0 pada waktu inkubasi 18 jam dan 24 jam.

Berdasarkan hasil analisis uji Anova dari aktivitas invertase menunjukkan bahwa penambahan tepung *Azolla* sp. dengan konsentrasi yang berbeda tidak berpengaruh nyata pada aktivitas invertase, sedangkan waktu inkubasi berpengaruh nyata terhadap waktu inkubasi. Uji lanjut BNT kemudian dilakukan pada untuk mengetahui waktu inkubasi optimum aktivitas enzim invertase. Hasil yang diperoleh adalah waktu inkubasi optimum aktivitas invertase adalah 6 jam.

Rasio I/S Khamir *P. manshurica* DUCC Y-015

Nilai aktivitas inulinase dan invertase yang didapatkan dapat digunakan untuk mendapatkan nilai rasio I/S. Menurut Dinarvand *et al.* (2013), aktivitas katalitik dari enzim inulinase (I) dan invertase (S) dapat diketahui dengan rasio I/S.



Gambar 4.4. Rasio I/S khamir *P. manshurica* DUCC Y-015 pada medium produksi dengan penambahan *Azolla* sp. pada berbagai konsentrasi selama inkubasi 24 jam N_0 (—); N_1 (—); N_2 (—); N_3 (—)

Nilai Rasio I/S didapatkan dengan cara membagi aktivitas inulinase dengan aktivitas invertase. Berdasarkan Gambar 4.4., nilai rasio I/S tertinggi adalah pada N_2 pada T_{18} sebesar 1,89. Nilai rasio I/S N_0 tertinggi adalah pada T_{12} sebesar 1,83; pada N_1 adalah pada T_{12} sebesar 1,56; pada N_3 adalah pada T_{12} sebesar 1,38. Semakin besar nilai rasio I/S maka aktivitas inulinasenya juga besar, sehingga dapat

dikatakan bahwa aktivitas katalitik inulinase tertinggi adalah pada N₂ pada T₁₈.

Nilai rasio I/S sangat dipengaruhi oleh tinggi rendahnya aktivitas inulinase dan invertase, karena pada saat aktivitas inulinase tinggi dan aktivitas invertase rendah, maka nilai rasio I/S akan tinggi. Hal itu terjadi pada N₂ pada T₁₈ dengan nilai rasio I/S sebesar 1,89 dan pada N₀ pada T₁₂ dengan nilai rasio I/S sebesar 1,83. Saat aktivitas aktivitas invertase lebih tinggi dan aktivitas inulinase rendah, maka nilai rasio I/S akan semakin rendah. Dalam penelitian ini, hal tersebut dapat dilihat pada perlakuan kontrol pada waktu inkubasi 18 jam dan 24 jam yang memiliki aktivitas invertase terendah. Hal itu dikarenakan nilai aktivitas invertasenya lebih tinggi dibandingkan aktivitas inulinasenya.

Menurut Dinarvand *et al.* (2013), ketika nilai rasio I/S lebih tinggi dari 10⁻² menunjukkan bahwa inulinase lebih aktif bekerja dibanding invertase. Dapat disimpulkan bahwa dalam penelitian ini, inulinase lebih aktif bekerja dibanding invertase.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diambil kesimpulan bahwa penambahan berbagai konsentrasi tepung *Azolla* sp. pada medium produksi pada konsentrasi tepung *Azolla* sp. 0,14% (N₁), 0,28% (N₂), dan 0,42% (N₃) belum mempengaruhi aktivitas inulinase khamir *P. manshurica* DUCY Y-015, sedangkan waktu inkubasi berpengaruh nyata terhadap aktivitas inulinase. Uji lanjut BNT kemudian dilakukan dan dihasilkan bahwa waktu inkubasi optimal aktivitas inulinase adalah 6 jam.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Dr. Drs. Wijanarka, M.Si yang telah memberikan kesempatan kenapa penulis untuk bergabung dalam preyek penelitian tentang enzim inulinase pada tahun 2016.

DAFTAR PUSTAKA

Abdillah, M.F.. 2013. Penambahan *Azolla microphylla* Hasil Fermentasi Dalam pakan Yang Disuplementasi Probiotik Terhadap *riias* sp.). Thesis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjajaran, Bandung.

Alegre, A.C.P., M.L.T.M. Polizeli. 2009. Production Of Thermostable Invertases By *Aspergillus Caespitosus* Under Submerged Or Solid State Fermentation Using Agroindustrial Residues As Carbon

Source. *Brazilian Journal of Microbiology*. 3(40): 612-622

- Cahyadi, S. 2006. Analisis dan Aspek Kesehatan Bahan Tambahan Pangan. PT. Bumi Aksara, Jakarta.
- Dinarvand, M., M. Rezaee, M. Masomian and S. D. Jazayeri. 2013. Effect of C/N Ratio and Media Optimization through Response Surface Methodology on Simultaneous Productions of Intrand Extracellular Inulinase and Invertase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Biomed Research International*. 1-13
- 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*. 6 (16): 1386-1388.
- Guo, N., F. Gong and Z. Chi. 2009. Enhanced inulinase production in solid state fermentation by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 36: 499-507.
- Jain, S.C., Jain, P.C., N. Kango. 2012. Production of Inulinase from *Kluyveromyces Marxianus* Using Dahlia Tuber Extract. *Brazilian Journal of Microbiology*. 62:69.
- Kango, N. and S.C Jani. 2011. Production and Properties of Microbial Inulinase: Recent Advances. *Food Biotechnology*. 25:165-212.
- Komalasari, W.B., Sabarella, Wahyuningsih, S., Manurung, M., Herwulan, M., Sehusman, Supriati, Y., dan Rinawati. 2017. Statistik Konsumsi Pangan. Kementrian Pertanian, Jakarta.
- Lingga, L. 2012. Bebas Diabetes Tipe-2 Tanpa Obat. AgroMedia Pustaka, Jakarta.
- Lumpkin, T.A., Plucknett, D.L. 1985. *Azolla*, A Low Cost Aquatic Green Manure for Agricultural Crops. In : C. Elfring (Ed.). Innovative Biological Technologies for lesser Developed Countries.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., and D.A. Stahl. 2015. Biology of Microorganisms. Pearson Education Inc., USA.
- Pessoni, R.A.B., Figueiredo-Ribeiro, RCL., and M.R. Braga. 1999. Extracellular inulinases from *Penicillium janczewskii*, a fungus isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Asteraceae). *Journal of Applied Microbiology*. 87: 141-147.
- Roosheroe, I.G., dan W. Sjamsuridzal. 2006. Mikologi Dasar dan Terapan. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta.

- Rossi, M., A. Amaretti, S. Raimondi and A. Leonardi. 2011. Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi. *In* : M. Stoytcheva and G. Montero (Eds.). Biodiesel – Feedstocks And Processing Technologies. InTech, Croatia.
- Sadikin, M. 2002. Seri Biokimia: Biokimia. Widya Medika, Jakarta.
- Samantha, A.,C. Larroche and A. Pandey. 2006. Microbiology and Industrial of Food-Grade Proteases: A Perspective. *Food Technology Biotechnology*. 44 (2). 156-162.
- Singh R.S. and R.P. Singh. 2010. Production of Fructooligosaccharides from Inulin by Endoinulinases and Their Prebiotic Potential. *Food Technol. Biotechnol.* 48 (4): 435-450.
- Suhartono, M. 1989. "Enzim dan Bioteknologi". IPB, Bogor.
- Wijanarka, R.S. Ferniah dan Salamah. 2004. Produksi Inulinase *Pichia alni* DUCC-W4 pada Tepung Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.) dengan Variasi Konsentrasi Ammonium Nitrat dan Waktu Inkubasi. *BIOMA*. 2 (10): 58-64
- _____, _____, _____. 2008. Produksi Inulinase oleh *Pichia alni* DUCC-W4 pada Tepung Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.) dengan Variasi Konsentrasi Ammonium Nitrat dan Waktu Inkubasi. *BIOMA*. 2 (19): 58-64.

