

Isolasi Yeast Inulinolitik dan Optimasi Produksi Inulinase Pada Berbagai Konsentrasi Nitrogen Yeast Ekstrak Sebagai Sumber N

Wijanarka¹⁾; Endang Sutariningsih²⁾; Kumala Dewi³⁾ dan Ari Indrianto⁴⁾

¹⁾ Lab. Mikrobiologi _ F MIPA UNDIP, Kampus UNDIP Tembalang Semarang 50275

²⁾ Lab. Mikrobiologi _ F Biologi UGM, Bulaksumur Yogyakarta 55281

³⁾ Lab. Fisiologi Tumbuhan _ F Biologi UGM, Bulaksumur Yogyakarta 55281

⁴⁾ Lab. Kultur Jaringan _ F Biologi UGM, Bulaksumur Yogyakarta 55281

Email : wikasmara@yahoo.co.id. HP. 08179526187

Abstract

Inulin is a linear fructose polymer of plant origin found in the Jerusalem artichoke, dandelion, dahlia tuber and several other members of the family Compositae. Inulin is one of the numerous polysaccharides of plant origin that contain glucose or fructose and that can be used in the food industry and in industrial fermentations as a substrate. Fifteen yeast growing on inulin as the sole carbon and energy source. An inulinase activity in the liquid culture was measured with sugar reduction. The best optimization conditions at concentration of 0.75% inulin and 12 hour incubation time. On condition that the optimization of inulin activity produced 0.8772 IU by isolate P 12. These yeast have potential uses in the preparation of ingredient food prebiotic.

Key word : inulinase, yeast inulinolitik, optimization, inulin

PENDAHULUAN

Inulin merupakan suatu polimer dari unit-unit fruktosa yang berikatan dan diakhiri oleh unit glukosa. Inulin dapat diperoleh melalui ekstraksi dari bahan alam (seperti pada dahlia, *Jerusalem artichoke* dan *chicory*) dan berperan sebagai karbohidrat cadangan (Gupta *et al.*, 1990). Inulin merupakan polifruktan, yaitu polimer fruktosa rantai linier dengan ikatan β -21-fruktofruktanosidik dengan satu rantai terminal glukosa di ujung, dengan panjang rantai polisakarida ini kurang lebih 25 – 35 unit fruktosa (Allais *et al.*, 1987). Inulin mempunyai banyak kegunaan terutama dibidang pangan dan kesehatan. Di bidang kesehatan, inulin antara lain berperan mencegah kanker usus besar dan penyakit jantung (Tungland, 2000). Sifat fungsional inulin sebagai serat makanan yang dapat larut (*Soluble Dietary Fiber*) sangat bermanfaat bagi pencernaan dan kesehatan tubuh secara umum. Inulin mempunyai sifat yang unik yaitu larut dalam air namun tidak dapat dicerna oleh enzim-enzim yang berada pada sistem pencernaan mamalia sehingga inulin mencapai usus besar tidak mengalami perubahan struktur. Hal inilah yang nantinya akan digunakan oleh

mikroflora yang terdapat didalam usus besar, yang mana dapat diimplifikasikan positif terhadap kesehatan inang, baik itu manusia ataupun binatang. Oleh karena itu inulin dapat digunakan dan dimanfaatkan sebagai prebiotik.

Prebiotik seperti *IOS* memiliki peluang pasar yang baik untuk dikembangkan pengadaannya. Namun produksi *IOS* di Indonesia sampai saat ini belum dapat berkembang dengan baik, karena 1) belum adanya produsen *IOS*, 2) belum diketahui adanya bahan dasar untuk produksi *IOS* yang secara alami sudah tersedia yaitu umbi dahlia (*Dahlia variabilis* Willd), 3) hidrolisis inulin menjadi fruktosa dengan menggunakan asam pada suhu tinggi akan menghasilkan fraksi warna yang gelap serta hasil samping yang tak diinginkan seperti difruktofuranoanhidrida (Allais *et al.*, 1986; Xiao *et al.*, 1998). 4) *IOS* sebagai produk prebiotik belum populer, padahal sangat berpengaruh positif bagi kesehatan manusia. Salah satu mikrobia yang dapat menghasilkan *IOS* adalah khamir inulinolitik

Khamir inulinolitik diisolasi dari *Tropical Bioresources* pada tanaman *Dahlia variabilis* Willd di Jawa Tengah. Isolat khamir terpilih akan

diuji kemampuannya dalam menghasilkan enzim endonulinase untuk produksi *IOS Ingredient Food* prebiotik dan aplikasinya terhadap bakteri uji (BAL). Mengingat potensi khamir inulinolitik dan kandungan inulin (berkisar 65,7% per 100 gr umbi) pada tanaman dahlia sangat tinggi, prospektif, komersial dan sampai saat ini belum pernah di lakukan kajian secara mendalam di Indonesia maka perlu dilakukan penelitian. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan khamir inulinolitik yang potensial dalam menghasilkan enzim inulinase dan untuk mengetahui konsentrasi terbaik sumber karbon inulin dalam menghasilkan inulinase.

BAHAN DAN METODE

Tahap pertama umbi dahlia (1 gr) dibuat suspensi selanjutnya ditumbuhkan pada medium selektif yang mengandung inulin sebagai satu-satunya sumber karbon. Isolat yang tumbuh dan menghasilkan inulinase tertinggi ditetapkan sebagai isolat terpilih. Sedangkan tahap kedua meliputi optimasi sumber karbon (inulin) dengan konsentrasi (0,25;0,5 dan 0,75%) dan optimasi berupa konsentrasi nitrogen (0,1; 0,25 dan 0,50%) dengan pH medium 5,5. Data yang diperoleh dianalisis dengan ANOVA dan apabila berbeda nyata atau sangat nyata dilanjutkan dengan uji t dengan taraf kepercayaan 1%. Pada tahap ini juga dilakukan tes rasio stabilitas inulinase. Tahap berikutnya identifikasi dan karakterisasi khamir inulinolitik terpilih.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Survey dan pengambilan sample umbi dahlia

Sampel diambil dari umbi tanaman *Dahlia variabilis* Willd di Jawa Tengah (Bandungan, Tawangmangu dan Baturraden-Purwokerto). Daerah Bandungan, untuk mewakili isolat khamir Jawa Tengah bagian Utara ; Daerah Baturraden – Purwokerto, untuk mewakili isolat khamir inulinolitik Jawa Tengah bagian Barat dan Daerah Tawangmangu, untuk mewakili isolat khamir inulinolitik Jawa Tengah bagian Selatan. Sampel umbi dahlia untuk masing-masing daerah dapat dilihat pada Gambar 1, 2 dan 3.



Gambar 1. Umbi dahlia Bandungan



Gambar 2. Umbi dahlia Purwokerto



Gambar 3. Umbi dahlia Tawangmangu

B. Eksplorasi dan isolasi khamir inulinolitik

Eksplorasi dan isolasi khamir inulinolitik berasal dari umbi tanaman *Dahlia variabilis* Willd di Jawa Tengah.

Tabel 1. Ciri morfologi isolat khamir inulinolitik

No.	Isolat	Ciri	No.	Isolat	Ciri
1.	P1	Bulat, putih pucat.	9.	P9	Oval, putih
2.	P2	Bulat, putih	10.	P10	Bulat, putih keruh
3.	P3	Bulat asimetris, putih	11.	P11	Bulat, orange
4.	P4	Bulat, putih pucat	12.	E1	Oval, putih pucat
5.	P5	Bulat, merah muda, pucat	13.	Y1	Bulat, kusam
6.	P6	Bulat, merah muda	14.	Y2	Bulat, keruh

7.	P7	berderet, pucat Bulat keruh, krem	15.	P12
8.	P8	Bulat, putih serkulir	16.	P13

Keterangan :

+++ : tumbuh banyak sekali ; ++ : tumbuh banyak ; + : tumbuh cukup banyak ; - : tidak tumbuh

Hasil isolasi menunjukkan bahwa semua isolat (16 isolat) mampu tumbuh pada media YPD cembung agar, setelah ditumbuhkan pada media selektif pucat (PIA, PDA inulin 2% dan Medium Agar Erthan)

Umbo-umbo tersebut yang telah cukup umur dipilih dan diambil untuk diisolasi jenis khamirnya. Masing-masing 10 gram umbo dahlia dari bermacam-macam sampel dimasukkan kedalam 50 ml medium pengkaya YPD dan diinkubasi selama 48 jam. Kemudian diinokulasikan 1 ml kedalam media YPD Agar dan dilakukan pengamatan selama 24-48 jam. Kenampakan koloni khamir inulinolitik dapat ditunjukkan pada Tabel 1.

Koloni yang tumbuh selanjutnya dipindahkan secara goresan pada media selektif PIA, PDA inulin 2% dan Medium Agar Erthan serta diinkubasi selama 24-48 jam untuk dilakukan pengamatan.

Tabel 2. Pertumbuhan isolat khamir inulinolitik pada media selektif

No.	Isolat	YPD	Media selektif			Asal umbo
			PIA	PDA inulin 2%	Erthan	
1.	P1	+++	+++	+++	+++	Bandungan
2.	P2	+++	+++	+++	+++	Bandungan
3.	P3	+++	+++	+++	+++	Bandungan
4.	P4	+++	-	-	-	Bandungan
5.	P5	+++	+++	+++	+++	Bandungan
6.	P6	+++	+++	+++	+++	Bandungan
7.	P7	+++	+++	+++	+++	Bandungan
8.	P8	+++	++	+++	+	Tawangmangu
9.	P9	+++	++	+++	+	Tawangmangu
10.	P10	+++	+++	+++	+++	Purwokerto
11.	P11	+++	-	-	-	Purwokerto
12.	E1	+++	-	-	-	Purwokerto
13.	Y1	+++	+++	+++	+++	Tawangmangu
14.	Y2	+++	+++	+++	+++	Tawangmangu
15.	P12	+++	+++	+++	+++	Purwokerto
16.	P13	+++	+++	+++	+++	Purwokerto

hanya 13 isolat yang mampu tumbuh. Hal ini membuktikan bahwa ke-13 isolat tersebut mampu menghasilkan enzim inulinase, sehingga kelangsungan hidupnya dapat dipertahankan. Hasil isolasi khamir inulinolitik pada media selektif selanjutnya dapat dilihat pada Tabel 2. Sedangkan aktivitas inulinase tertinggi masing-masing isolat dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Aktivitas inulinase khamir inulinolitik

No.	Isolat	Aktivitas (IU)	No.	Isolat	Aktivitas (IU)
1.	P1	0.581	9.	P9	0.432
2.	P2	0.512	10.	P10	0.514
3.	P3	0.498	11.	P11	0
4.	P4	0.001	12.	E1	0
5.	P5	0.509	13.	Y1	0.411
6.	P6	0.532	14.	Y2	0.645
7.	P7	0.489	15.	P12	0.683
8.	P8	0.476	16.	P13	0.570

Pada Tabel 3 terlihat jelas bahwa Isolat P12 mampu menghasilkan aktivitas inulinase yang tertinggi yaitu sebesar 0.683 IU, diikuti Y2 (0.645 IU) dan P1 (0.581 IU). Sedangkan Isolat P4, P11 dan E 1 tidak menghasilkan aktivitas inulinase ataupun bila menghasilkan sangat kecil. Hal ini sangat beralasan karena ke-3 jenis khamir tersebut tidak mampu tumbuh pada media selektif.

C. Optimasi produksi enzim inulinase

C.1. Optimasi sumber Karbon (K)

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, isolat P 12 mampu tumbuh dan menghasilkan enzim inulinase. Berdasarkan uji ANOVA dan optimasi berbagai konsentrasi sumber karbon (inulin) yaitu 0.25, 0.5 dan 0.75 % serta optimasi waktu inkubasi (12 dan 18 jam) menunjukkan pengaruh sangat nyata (Tabel 4). Pada analisis lebih lanjut pengaruh karbon, ternyata konsentrasi terbaik adalah K3 (0.75%) yang mampu menghasilkan aktivitas sebesar

0.8497 IU (Tabel 5) dan waktu inkubasi terbaik adalah T12 (Tabel 6). dengan sebesar 0.8244 IU. Sedangkan interaksinya terbaik pada konsentrasi K3 dan waktu inkubasi 12 jam dengan aktivitas tertinggi 0.8772 IU (K3T12; Tabel 7). Hal ini membuktikan bahwa semakin besar konsentrasi sumber karbon (inulin) yang diberikan maka akan berpengaruh positif terhadap produksi enzim inulinase (produksinya semakin besar). Hal ini disebabkan karena inulin dapat berfungsi induser. Hal ini sesuai dengan pernyataan Park *et al.* (2001) bahwa sintesis inulinase bersifat inducibel dan dapat dikategorikan sebagai enzim ekstraseluler.

Tabel 4. ANOVA Isolat P12 terhadap produksi inulinase

SK	DB	JK	KT	Fhit	Ftab (0,05)	Ftab (0,01)
Perlakuan	5	0.0477	0.00954	36.976**	3.11	5.06
K	2	0.024	0.012	46.511**	3.88	6.93
T	1	0.0122	0.0122	47.286**	4.75	9.33
Interaksi	4	0.0115	0.00575	22.286**	3.88	6.93
Galat	12	0.0031	0.000258			
Total	17					

** F Hitung (P) > F Tabel (0,05) maka berbeda nyata

Tabel 5. Analisis lanjut Pengaruh K pada Isolat P 12

Inulin	Rata-rata	Beda Dengan		
		K3	K2	K1
K1	0.768	0.0817**	0.009	-
K2	0.775	0.0722**	-	-
K3	0.8497	-	-	-
		BNT 5% (12; 0,05)	BNT 1% (12; 0,01)	
		0,028	0,040	

Tabel 6. Analisis lanjut Pengaruh T pada Isolat P 12

Inulin	Rata-rata		
		T12	T18
T18	0.7723	0.0521**	-
T12	0.8244	-	
		BNT 5%	BNT

		(12; 0,05)	1% (12; 0,01)
		0,028	0,040

Tabel 7. Pengaruh interaksi sumber karbon dan waktu inkubasi Isolat P12

Interaksi	Rata-rata	K3T12	K1T12	K3T18	K2T18	K2T12
K1T18	0.7118	0.1654**	0.1125**	0.1104**	0.0714**	0.06
K2T12	0.7718	0.1054**	0.0525**	0.0504	0.0114	
K2T18	0.7832	0.094**	0.0411	0.039		
K3T18	0.8222	0.065**	0.0021		-	
K1T12	0.8243	0.0629**			0,0114	-
K3T12	0.8772				0,0172	0,0058
		BNT 5% (12; 0,05)		BNT 1% (12; 0,01)		
		0,028		0,040		

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan :

1. Telah ditemukan 16 isolat khamir inulinolitik, isolat P12 merupakan isolat terpilih karena mampu menghasilkan aktivitas inulinase tertinggi
2. Kondisi optimasi terbaik sumber karbon inulin konsentrasi 0,75% (K3) dengan waktu inkubasi 12 jam
3. Pada kondisi optimasi dihasilkan aktivitas inulinase sebesar 0.8772 IU

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Proyek Peningkatan Kualitas Sumberdaya Manusia-Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi-Departemen Pendidikan Nasional atas terlaksananya Penelitian Hibah Multi Tahun.

DAFTAR PUSTAKA

- Allains, J.J. S. Kammou; P. Blanc; C. Girard dan J. Baratti. 1986. Isolation and Characteristic of Bacterial Strains with Inulinase Activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (50 : 1086-1090).

- Chaplin, M.F and J.F. Kennedy. 1994. Carbohydrat Analysis; A Practical Approach. 2nd Edition. Oxford University Press. Oxford.
- Deutscher, M. 1990. Guide To Protein Purification. Methods In Enzymology Vol. 182. Academic Press. Inc. Boston. Toronto. Tokyo.
- Doty, T. dan Vaninen. 1979 The Properties, Manufacture and Uses as an Industrial Raw Material. Dalam : C.G. Birch dan K.J. Parker (ed) Sugar : Science and Technology Appl. Sci Publ. London
- Dixon, M and Webb, E. 1979. Enzymes. Logman Group Ltd London
- Kreger-van Rij, N.J.W. 1984. The yeast, A Taxonomic Study. Third revised and Enlarged Ed., Elsevier sci. publ. B.v., Amsterdam.
- Kockova, A and Kratochilova. L990. Yeast and Yeast Like Organism. UCH. Publishers. France. Pp. 6 – 7, 42 – 51.
- Lunggani, Arina Tri dan Endang, K. 2006. Pemanfaatan Limbah cair Tahu Menjadi Minuman Fungsional Oleh Kultur campuran Bakteri Asam Laktat (BAL) Serta Uji Aktifitas Antimikrobiana. (Hibah PenelitianProgram A2, 2006).
- Noris, J.R and M.H. Ricchmon. 1981. Assay In Applied Microbiology. John Wiley & Sons.
- Muchtadi, D. 1989. Petunjuk Laboratorium Evaluasi Nilai Gizi Pangan. PAU PAU Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor.
- Oku, T.T Tokunaga dan N. Hosoya. 1984. Nondigestibility of a New Sweetener, Neosugar, In The Rat. J. Nutr. 114: 1474-1481
- Park, J.P and J.W. Yun. 2001.Utilization of Chicory roots for Microbial Endoinulinase Production.Letters In Applied Microbiology. 2001 (33): 183 – 187
- , J.T Bae. D.J. You. B.W. Kim and J.W. Yun. 1999. Production of Oligosaccharides from inulin By Novel Endoinulinase From Xanthomonas sp. Bitech. Letters. 21: 1043-1046.
- Rahn, J.E. 1996. Dahlia. Di dalam Encyclopedia Americana International Editian. Vol.8 pp 421-426. Grolier Incorporated. Danbury, Conecticut.
- Roberfroid, M.B. 2000. Chicory Fructooligosaccharides and Gastrointeristestinal. Trac. Nutrition 16 (7/8): 677-679