

Optimasi Produksi Inulinase isolat P 12 pada Tepung Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis* Wild) dengan Variasi Konsentrasi Nitrogen Organik dan Waktu Inkubasi

Arina Tri Lunggani¹, Wijanarka² dan Endang Kusdiyantini³

1.2. Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi FMIPA Undip

3. Laboratorium Biokimia, Jurusan Biologi FMIPA Undip

Abstract

Efforts to address health problems mainly related to the digestive tract is by consuming one prebiotic, eg fruktooligosakarida (FOS). FOS is a prebiotic that one species can be produced from the hydrolysis of inulin using inulinase enzyme. Isolate P12 is an isolate that has been proven to have high inulinase activity on standard medium inulin production. Inulinase production increase can be done by adding a source of organic nitrogen in the form of yeast extract in medium. The results indicate that the best on the concentration of nitrogen concentration P₂ (Yeast extract 0.25%) with the activity of 0.7983 IU, while the best 12-hour incubation time with the activity of 0.7899 IU. Likewise for the best interaction P₂ T₂ treatment with inulinase activity of 0.9025 IU.

Key word : *FOS, Inulinase, Dahlia tubers, isolate P 12*

PENDAHULUAN

Inulin merupakan suatu polisakarida yang dibangun oleh unit-unit monosakarida fruktosa melalui ikatan β -2-1 fruktofuransida yang diawali oleh suatu molekul glukosa. Karbohidrat ini dihasilkan oleh tanaman jenis Compositae seperti dahlia, *chicory*, dan *Jerrusalem artichoke* (Nakamura *et al.*, 1995).

Inulinase merupakan enzim yang mampu menghidrolisis polimer inulin menjadi bentuk oligosakarida melalui aktivitas endoinulinase dan monomer fruktosa melalui aktivitas eksoinulinase. Endoinulinase adalah enzim inulinase yang menghidrolisis polimer inulin pada bagian internal, sehingga menghasilkan produk berupa fruktooligosakarida (FOS) (Rahayuningsih dan Purwanti, 1993 dalam Widowati, 2005).

FOS yang telah banyak diproduksi saat ini diperoleh dari sukrosa melalui reaksi pemindahan gugus fruktosil pada sukrosa menggunakan enzim fruktofuranosidase (EC 3.2.1.26) atau fruktosiltransferase (EC 2.4.1.9) (Arrojo, *et al.*, 2009). Cara ini kurang begitu menguntungkan karena hasil akhir yang diperoleh tidak hanya FOS tapi juga Glukooligosakarida (GOS), sehingga produk FOS yang diperoleh kurang optimum

(Borromei, *et al.*, 2009). Hal ini dapat dimengerti, karena sukrosa merupakan disakarida yang tersusun atas glukosa dan fruktosa. Sedangkan inulin sebagian besar tersusun atas unit-unit fruktosa, sehingga FOS yang diperoleh dari hasil hidrolisis inulin menggunakan enzim inulinase akan lebih murni.

Fruktooligosakarida (FOS) adalah suatu senyawa kimia yang termasuk prebiotik. Prebiotik adalah suplemen pangan yang tidak dapat dicerna oleh enzim-enzim pada pencernaan manusia dan berperan secara selektif dalam menstimulasi pertumbuhan mikroflora yang menguntungkan, sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen yang terdapat di dalam usus (Garcia, 2003).

Isolat P 12 merupakan khamir yang diisolasi dari rhizosfere umbi dahlia dari daerah Baturraden Purwokerto. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, isolat P12 mampu tumbuh dan menghasilkan enzim inulinase. Bahkan Isolat P 12 mampu menghasilkan aktivitas inulinase yang cukup tinggi dibandingkan isolat yang lain yaitu sebesar 0.683 IU.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi optimum aktivitas inulinase pada variasi

konsentrasi yeast extract dan waktu inkubasi oleh isolat P12 pada medium yang berasal dari tepung umbi dahlia (*Dahlia variabilis* Wild) dan mengetahui stabilitas enzim inulinase isolat P 12.

BAHAN DAN METODE

Metode penelitian ini dilakukan secara eksperimental, sehingga digunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial. Y_1 (yeast ekstrak 0,1%), Y_2 (yeast ekstrak 0,25 %) dan Y_3 (yeast ekstrak 0,5 %) sebagai faktor pertama, sedangkan faktor kedua adalah waktu inkubasi. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali untuk masing-masing perlakuan. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANOVA. Jika terdapat beda nyata dari data yang diperoleh, maka dilanjutkan dengan uji BNT.

a. Peremajaan dan Preparasi Kultur Isolat P 12

Kultur Isolat P 12 ditumbuhkan pada media inulin agar selama 48 jam pada suhu ruang. Selanjutnya kultur dipindahkan ke dalam medium inulin cair dengan pH 6 sebanyak 100 mL untuk aktivasi awal (prestarter) dan diinkubasi dengan agitasi 120 rpm pada suhu ruang selama 17 jam. Kultur tersebut adalah inokulum yang dipergunakan untuk pembuatan starter.

b. Pembuatan Starter dan Pembuatan Kurva Pertumbuhan Isolat P12

Inokulum dari prestarter sebanyak 10% (v/v) diinokulasikan ke dalam 250 mL medium produksi inulinase dengan pH 6 dan diinkubasi dengan agitasi 120 rpm pada suhu ruang selama 48 jam. Setiap 4 jam kultur diambil dan dilakukan pengukuran pertumbuhan sel dengan metode turbidimetri, menggunakan spektrofotometer (λ 520 nm).

c. Produksi Inulinase.

Produksi inulinase oleh isolat P 12 dilakukan dengan menginokulasikan 10% (v/v) starter isolat khamir pada medium produksi inulinase, pH medium 5,5. Masing – masing unit perlakuan (0,1; 0,25 dan 0,5 % yeast ekstrak). Kultur diinkubasi selama 54 jam serta diagitasi dengan kecepatan 120 rpm. Kemudian diukur produksi inulinasenya dengan cara sampel diambil pada waktu inkubasi tertentu. Kultur sebanyak 1,5 ml dimasukkan dalam tabung eppendorf dan disentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit.

Supernatan yang dihasilkan merupakan *crude enzim* (enzim kasar) inulinase yang selanjutnya akan diukur aktivitasnya. Pada tahap ini juga dilakukan tes rasio stabilitas inulinase serta pengukuran pertumbuhan isolat P12.

d. Pengukuran Aktivitas Enzim Inulinase. (Xiao et al., 1988; Ertan et al., 2002).

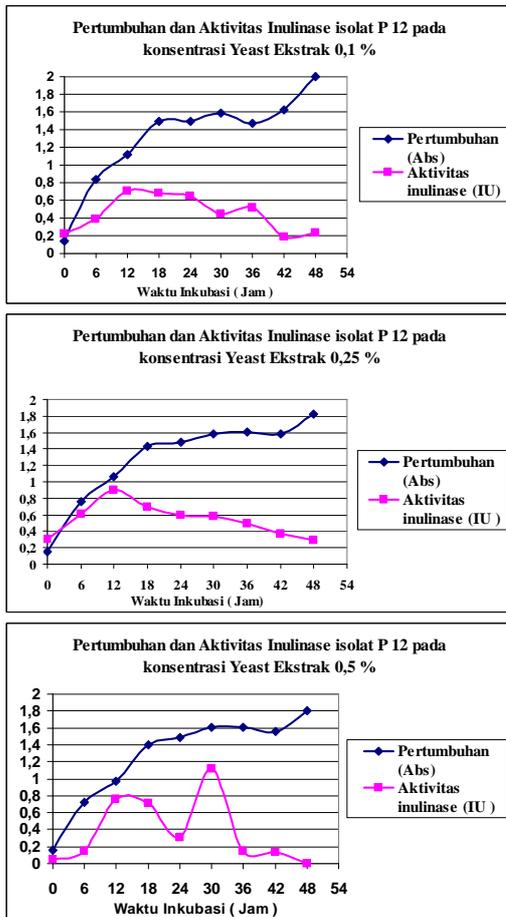
Aktivitas enzim inulinase dapat dilihat berdasarkan gula pereduksi yang terbentuk dan diuji menggunakan prosedur berikut : reaksi enzim-substrat (ES) yang berisi 0,5 ml inulin murni; 0,4 ml buffer sodium asetat; 0,1 ml crude enzim, reaksi substrat (S) berisi 0,5 ml inulin murni; 0,4 ml buffer sodium asetat; 0,1 ml aquades, dan reaksi enzim (E) yang berisi 0,4 ml buffer sodium asetat; 0,1 ml crude enzim; 0,5 ml aquades.

Setiap reaksi (ES, S, E) dari tiap umur kultur diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Tiap tabung sampel dimasukkan dalam air mendidih selama 5 menit, setelah dingin ditambahkan reagen DNS sebanyak 1 ml dan dididihkan dalam penangas selama 10 menit. Selanjutnya setiap tabung reaksi (ES, S, E) ditambahkan 5 ml aquadest untuk diukur kerapatan optisnya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 570 nm (Chaplin & Kennedy, 1994).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan dan Aktivitas Inulinase Isolat P12.

Hasil penelitian menunjukkan pertumbuhan khamir terbaik terjadi pada medium dengan yeast extract 0,25 %. Pada umumnya isolat Khamir tidak mengalami fase adaptasi karena starter yang digunakan berada pada fase log, sehingga pertumbuhan sel langsung memasuki fase logaritmik. Pertumbuhan dan Aktivitas Inulinase Isolat P 12 dapat diamati pada Gambar 1.



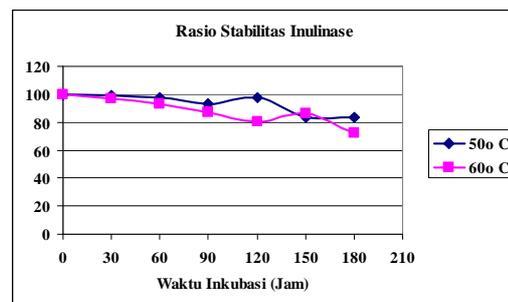
Gambar 1. Pertumbuhan dan Aktivitas Inulinase Isolat P12 pada berbagai variasi konsentrasi yeast ekstrak dan lama waktu inkubasi.

Berdasarkan penelitian dan uji ANOVA menunjukkan bahwa adanya perlakuan konsentrasi nitrogen (Y; yeast ekstrak) dan waktu inkubasi (T) berpengaruh sangat nyata terhadap produksi enzim inulinase. Selanjutnya setelah diuji lanjut konsentrasi nitrogen terbaik pada konsentrasi yeast ekstrak (0.25%) dengan aktivitas sebesar 0.7983 IU, sedangkan waktu inkubasi terbaik 12 jam dengan aktivitas sebesar 0.7899 IU. Demikian juga untuk interaksinya terbaik pada konsentrasi Yeast ekstrak 0,25 % dan waktu inkubasi 12 jam dengan aktivitas inulinase 0.9025 IU. Adanya kecenderungan dengan meningkatnya kandungan nitrogen dari 0.25% (0.9025 IU) menjadi 0.5% (0.7635 IU) dapat menurunkan aktivitas inulinase. Hal ini diduga dengan meningkatnya kandungan nitrogen, justru akan menaikkan biomasa sel dari

pada produksi enzim. Penambahan nitrogen (yeast ekstrak) pada medium fermentasi berfungsi untuk menyediakan sumber vitamin, mineral nitrogen dan sedikit sumber karbon. Dengan adanya sumber tersebut sel dapat mengalami pertumbuhan dan memproduksi enzim (Sangeetha, *et al.*, 2005)

Kestabilan inulinase

Enzim stabil adalah enzim yang memiliki umur setengah (*half life*) lebih besar dari pada enzim-enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme mesofilik atau termofilik setelah diperlakukan suhu tertentu dalam waktu yang telah ditentukan. Adanya mikrobia termotoleran dan enzim yang stabil akan lebih menguntungkan karena dapat mengendalikan kontaminan mikrobia lain, meningkatkan transfer masa, mengurangi viskositas dan lebih murah baik dalam skala produksi.



Gambar 2. Ratio Stabilitas inulinase Isolat P12

Gambar 2. menunjukkan bahwa rasio stabilitas endoinulinase pada suhu 50°C dan 60°C relatif stabil antara 120 sampai 150 menit. Namun demikian setelah memasuki menit ke-180 rasio aktivitas inulinase suhu 50°C masih 83.73% sedangkan suhu 60°C tinggal 72.12%. Hal ini menunjukkan bahwa suhu 50°C mempunyai stabilitas enzim yang lebih baik dari pada suhu 60°C demikian juga dalam hal kecepatan reaksi enzimnya. Kecepatan reaksi enzim sangat ditentukan oleh perubahan suhu. Kepekaan enzim terhadap perubahan suhu dikenal dengan kestabilan enzim atau kestabilan panas atau "heat stability". Kestabilan panas berarti sampai berapa derajat pengaruh suhu tersebut terhadap kestabilan enzim. Pengertian secara umum termostabilitas enzim merupakan kemampuan enzim untuk stabil pada suhu optimumnya. Hal ini penting untuk

mengetahui waktu kerusakan enzim untuk proses produksi.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan :

1. Kondisi optimasi yang terbaik dan konsentrasi yeast ekstrak 0,25%.
2. Ratio aktivitas inulinase pada pengujian stabilitas suhu 50°C setelah 180 menit sebesar 83.73% sedangkan suhu 60°C sebesar 72.12%.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Proyek Peningkatan Kualitas Sumberdaya Manusia-Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi-Departemen Pendidikan Nasional-Tahun Anggaran 2009 atas terlaksananya Penelitian Hibah Multi Tahun- Desentralisasi

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).
- Arrojo, L.F, M. Alvaro, I. Ghazi., M. de Abreu, D. Linde, P. Gutierrez-Alonso, M. Alcalde, J. Jimenez-Barbero, A. Jimenez, A. Ballesteros, M. Fernandez-Lobato and F.J. Plou. 2009. On The Transfructosylation Activity and Selectivity of Microbial Beta-fructofuranosidases for The Production of Prebiotics. *J.Biotechnol.*, Departmanto de Biotalisis, Instituto de Catalisis y Petroleoquimica, CSIS, Cantobalnco, 28049 Madrid, Spain.
- Borromei, C., M.Careri, A. Cavazza. C. Corradini, L. Elviri, A. Mangia, and C. Merusi. 2009. Research Article: Evaluation of Fructooligosakarides and Inulins as Potentially Health Food Ingredients by HPAEC-PED and MALDI-TOF MS. Hindawi Publishing Corporation International Journal of Analytical Chemistry Volume 2009,
- Chaplin, M.F and J.F. Kennedy. 1994. *Carbohydrat Analysis; A Practical Approach.* 2nd Edition. Oxford University Press. Oxford.
- Ertan, F., T. Aktac, A. C. Kaboglu, F. Ekinici & E. Bakar. 2002. Determination of Optimum Cultivation Condition on The Production of Inulinase from *Rhizoctonia solani*. *Pak.J. Biol Sci* 6 (16): 1386-1388.
- Garcia, L. H. 2003. Probiotics and Prebiotics. *Biotech. Aplicada.* Vol 20. No 3.
- Nakamura T., Y. Ogata, A. Shitasa, A. Nakamura and K. Ohta. 1995. Continous Production of Fructose Syrup from Inulin by Immobilized Inulinase from *Aspergillus niger* Mutan 817. *J. Ferm.Bioeng.*, 80(2):164-169
- 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.
- Sangeetha, P. T, M. N. Ramesha, and S. G. Prapulla. 2005. Recent Trend in the Microbial Production, Analysis and Applications of Fructooligosaccharides. *Trend in Food Science & Technology.* Vol 16 : 442-457
- Widowati, S. 2005. Dahlia Bunganya Indah, Umbinya Mengandung Inulin.BB Litbang Pascapanen Pertanian. Bogor.
- Xiao, R. ; M. Tanida dan S. Takao. 1998. Inulinase from *Cryosporium pannorum* J. *Ferment. Technol.* 66 (5) : 244 – 248