

## Kemampuan Fusan F1 Dalam Memproduksi Inulinase

Wijanarka<sup>1)</sup>; Endang Sutariningsih Soetarto<sup>2)</sup>; Kumala Dewi<sup>3)</sup> dan Ari Indrianto<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> Lab. Mikrobiologi\_FSM (MIPA) Undip, Tembalang Semarang 50275

<sup>2)</sup> Lab. Mikrobiologi \_ F Biologi UGM, Bulaksumur Yogyakarta 55281

<sup>3)</sup> Lab. Fisiologi Tumbuhan \_ F Biologi UGM, Bulaksumur Yogyakarta 55281

<sup>4)</sup> Lab. Bioteknologi \_ F Biologi UGM, Bulaksumur Yogyakarta 55281

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

### Abstract

Fusan F1 was the result of the fusion of the *Pichia manshurica* and *Rhodospiridium paludigenum*. The second type of yeast has the ability to produce inulinase. Inulinase (EC. 3.2.1.7) is an enzyme that is classified as a hydrolase enzyme, this enzyme has the ability to break down complex inulin into simpler components that fructose. Fructose was a monosaccharide with huge potential for the manufacture of butanol, iOS, pullan, FOS and ethanol. The purpose of research to determine the ability fusan F1 in producing inulinase and to determine the specific growth rate ( $\mu$ ), as well as the generation time (g) fusan F1. The results showed that fusan F1 at the 18<sup>th</sup> hour was able to produce inulinase of 0.61 mol / min. These results are higher than the parental namely *P. manshurica* (0.56 mol / min) and *Rh. paludigenum* (0.33 mol / min). While The specific growth rate ( $\mu$ ) and generation time (g) fusan F1 respectly 0.25 h and 2.7/ h.

**Keywords:** Fusan F1; inulinase; the specific growth; generation time

### Abstrak

Fusan F1 merupakan hasil fusi dari *Pichia manshurica* dan *Rhodospiridium paludigenum*. Kedua jenis khamir tersebut mempunyai kemampuan menghasilkan inulinase. Inulinase (E.C.3.2.1.7) merupakan enzim yang tergolong sebagai enzim hidrolase, enzim ini mempunyai kemampuan untuk memecah kompleks inulin menjadi komponen yang lebih sederhana yaitu fruktosa. Fruktosa merupakan suatu monosakarida yang sangat potensial untuk pembuatan butanol, IOS, pullan, FOS dan ethanol. Tujuan penelitian untuk mengetahui kemampuan fusan F1 dalam memproduksi inulinase dan untuk mengetahui kecepatan pertumbuhan specific ( $\mu$ ), serta waktu generasi (g) fusan F1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fusan F1 pada jam ke-18 mampu menghasilkan inulinase sebesar 0.61  $\mu$ mol/menit. Hasil tersebut lebih tinggi dibanding dengan parentalnya yaitu *P. manshurica* (0.56  $\mu$ mol/menit) dan *Rh. paludigenum* (0.33  $\mu$ mol/menit). Sedangkan kecepatan pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ) dan waktu generasi (g) fusan F1 masing-masing sebesar 0.25 jam dan dengan 2.7/ jam.

**Kata kunci :** Fusan F1; inulinase; pertumbuhan spesifik; waktu generasi

### PENDAHULUAN

Tanaman dahlia merupakan tanaman perdu setinggi 1,5 m atau lebih dan berumbi besar. Bentuk umbi akar dahlia bervariasi mulai dari bulat kecil sampai besar atau panjang sampai lonjong. Struktur umbi dahlia terdiri atas kulit umbi yang berwarna putih kekuning-kuningan sampai kecoklatan, daging umbi tebal berwarna putih atau bening dan mempunyai mata tunas. Setiap 100 gram umbi dahlia mengandung inulin 65,7%, abu 4,5%, protein 3,71%, air 2,97% dan

bahan lainnya 23,10% (Rukmana, 2000). Menurut Byun & Nahm (1978), total persentase gula sebagai fruktosa dalam inulin bervariasi dari 75-98% tergantung pada pertumbuhan dan kondisi penyimpanan setelah panen.

Inulin merupakan polifruktan yaitu polimer fruktosa rantai linier dengan ikatan -2,1-fruktofruktanosidik dengan satu unit terminal glukosa di ujung (Byun & Nahm, 1978), dengan panjang rantai polisakarida ini kurang lebih 25-35 unit fruktosa (Allais *et al.*, 1986). Inulin terdiri

dari atas molekul fruktosa yang terpolimerisasi dan terdapat sebagai cadangan makanan pada sejumlah tumbuhan seperti Compositae (misal umbi dahlia). Inulin tidak dapat larut dalam air dingin tetapi suhu 50°C dapat melarutkan 50% inulin (Vandamme & Derycke, 1983).

Struktur umbi dahlia terdiri atas kulit umbi berwarna putih kekuning-kuningan sampai kecoklatan, daging umbi tebal berwarna putih atau bening dan mempunyai mata tunas. Satu rumpun tanaman dahlia dapat menghasilkan umbi sebanyak 2-5 kg, tergantung pada varietas dan kesuburan tanaman. Umbi dahlia mengandung 80% air dan 20% padatan. Padatan ini tersusun oleh kira-kira 65% inulin; abu 4,5%; protein 3,71%; air 2,97%; dan bahan lainnya 23,10% (Rukmana, 2000). Semakin tua umur umbi dahlia, maka kandungan inulin dalam umbi tersebut juga semakin banyak. Kemampuan enzim yang mampu merombak inulin menjadi unit sederhana fruktosa dikenal dengan nama inulinase.

Inulinase (E.C.3.2.1.7.) merupakan enzim hidrolase yang digolongkan sebagai 2,1-β-D-fructan-fructanohidrolase yang mampu menghidrolisis molekul inulin menjadi sejumlah besar fruktosa dan sedikit glukosa dengan memotong unit fruktosa dari molekul inulin pada posisi terminal -2,1 (Rouwenhorst *et al.*, 1990; Park & Yun, 2000). Inulinase terdapat secara alami pada umbi tanaman yang mengandung inulin (misal: umbi dahlia) atau pada mikroorganisme seperti dari golongan jamur: *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Chrysosporium* sp, golongan khamir: *Kluyveromyces* sp, *Candida* sp, *Debaryomyces* sp, *Saccharomyces* sp, dan dari golongan bakteri: *Arthrobacter* sp, *Flavobacterium* sp, dan *Bacillus* sp.

Berdasarkan tempat aktivitasnya, inulinase dapat dibedakan menjadi dua, yaitu eksoinulinase dan endoinulinase. Eksoinulinase (-D-fruktanfruktohidrolase, EC 3.2.1.80) memecah inulin dari ujung non reduktif, sedangkan endoinulinase (2,1- -D-fruktan fruktanohidrolase, EC 3.2.1.7) memecah inulin secara acak dari bagian dalam untuk menghasilkan fruktooligosakarida seperti inulotriosa, tetraosa, dan pentaosa sebagai produk utamanya. Sampai saat ini sifat eksoinulinase lebih banyak diketahui dari pada sifat endoinulinase (Allais *et al.*, 1986).

Enzim adalah biokatalis yang dalam jumlah sedikit mempunyai kemampuan untuk mempercepat berlangsungnya reaksi kimiawi dan enzim tersebut tak mengalami perubahan bentuk. Katalis ini bersifat spesifik, artinya suatu katalis tertentu akan berfungsi pada suatu jenis reaksi tertentu saja.

Enzim sebagai produk sel hanya dapat disintesis jika sel mempunyai gen untuk enzim tersebut (Sadikin, 2002). Suatu organisme harus mempunyai gen struktural untuk menentukan sintesis struktur enzim dalam hal urutan asam-asam aminonya, yang diperlukan untuk kehidupannya.

Inulin merupakan polisakarida yang dibangun oleh unit-unit monomer fruktosa melalui ikatan -2-1-fruktofuranosida yang diawali oleh satu molekul glukosa. Karbohidrat ini dihasilkan oleh tanaman jenis compositae seperti *Chicory*, *Jerusalem artichoke* dan dahlia. Polifruktosa dengan derajat polimerisasi 30 keatas disebut dengan inulin (Nakamura *et al.*, 1995). Inulin tidak dapat larut dalam air dingin tetapi suhu 50°C dapat melarutkan 50% inulin. Molekul ini dapat mengendap dalam campuran etanol-air (Vandamme dan Derycke, 1983). Total persentase gula sebagai fruktosa dalam inulin bervariasi dari 75–95% tergantung pada pertumbuhan dan kondisi penyimpanan setelah dipanen (Byun & Nahm, 1978).

Hidrolisis inulin menjadi fruktosa dapat dilakukan pada kondisi asam pada pH 1-2 dengan suhu 80°C - 100°C, namun hasil yang diperoleh berkualitas rendah karena akan terbentuk fraksi yang berwarna gelap dan hasil samping yang tak diinginkan seperti difruktosa anhidrat (Allais *et al.*, 1986; Xiao *et al.*, 1988). Hidrolisis menggunakan enzim inulinase dapat menghindari adanya kerugian tersebut. Produksi fruktosa dari bahan berpati lainnya memerlukan 3 macam enzim yaitu amylase, amilogluksidase, dan glukosa isomerase.

Fusan F1 merupakan fusan hasil fusi dari *Pichia manshurica* dan *Rhodospiridium paludigenum*. Kedua jenis khamir tersebut merupakan *bioresources* dari tanaman bunga Dahlia dan mempunyai sifat sebagai khamir inulinolitik. Namun demikian kedua jenis khamir tersebut hanya mampu memproduksi enzim inulinase dalam jumlah yang kecil. Sehingga

dengan demikian perlu diupayakan untuk mencari sumber enzim (mikrobia, fusan) yang mampu meningkatkan produksi inulinase. Salah satu upaya untuk meningkatkan produksi enzim tersebut dengan cara fusi protoplas. Metode fusi protoplas dipilih karena tidak memerlukan vector, mudah dan tidak memerlukan sel yang kompeten.

## BAHAN DAN METODE

### Mikroorganisme

Sumber mikroba yang digunakan pada penelitian ini adalah kultur murni fusan F1 yang merupakan hasil fusi dari *Pichia manshurica* dan *Rhodospiridium paludigenum*.

### Kultivikasi medium dan produksi inulinase

Media untuk pemeliharaan kultur dan produksi inulinase menurut Erthan (2003)(g/L): inulin-30;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -2.3;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -3.7;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0.5; yeast ekstrak-1.5 dan pH 5. Medium di autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 20 menit. Setelah diinokulasi, Erlenmeyer di *rotary shaker* pada suhu  $28^\circ\text{C}$  dengan kecepatan 150 rpm.

### Enzyme assay

Sebanyak 0,1 ml larutan enzim dicampur dengan substrat inulin 0,1% dalam larutan bufer sodium asetat pH 5. Selanjutnya diinkubasi selama 30 menit pada suhu  $50^\circ\text{C}$ . Gula reduksi yang terbentuk ditentukan dengan metode DNS (Chaplin, 1994; Park, J.P and J.W. Yun. 2001). Aktivitas inulinase ditentukan berdasarkan

sejumlah enzim yang mampu merombak 1  $\mu\text{mol}$  substrat permenit pada kondisi tertentu.

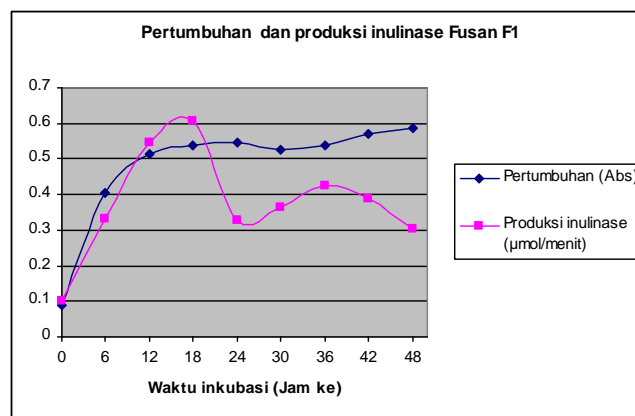
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Pertumbuhan dan inulinase Fusan F1

Pertumbuhan populasi suatu mikroorganisme merupakan akibat dari pertumbuhan sel secara individu. Pertumbuhan tersebut biasanya ditunjukkan dengan adanya penambahan jumlah sel atau masa sel yang sedang tumbuh. Pertumbuhan mikroorganisme dipengaruhi oleh faktor lingkungan atau genetik.

Fusan F1 merupakan khamir yang tumbuh dalam medium pertumbuhan dengan inulin sebagai satu-satunya sumber karbon dengan pH 5. Pertumbuhan fusan F1 dilakukan selama 48 jam dan dilakukan pengamatan setiap 6 jam. Fusan ini merupakan fusan yang diperoleh dari fusi dari *Pichia manshurica* dan *Rhodospiridium paludigenum*. Kedua jenis khamir tersebut merupakan *bioresources* mikroorganisme dari tanaman bunga Dahlia (Lunggani dkk., 2009).

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa pertumbuhan fusan F1, terjadi fase log setelah waktu inkubasi antara  $t_0$  sampai  $t_{18}$  (Gambar 1). Fase log yang terjadi pada jam tersebut yang demikian singkat diakibatkan adanya pemberian starter. Adanya starter ini mengakibatkan fase lag (fase adaptasi) hilang atau diperpendek sehingga mengakibatkan lebih cepat memasuki fase logaritmik.



Gambar1. Pertumbuhan fusan F1

## 2. Produksi inulinase

Produksi inulinase oleh fusan F1 dilakukan dengan menumbuhkan fusan tersebut kedalam medium produksi cair. Inulinase merupakan enzim ekstraseluler yang disekresikan keluar sel

bercampur dengan medium produksi, sehingga di dalam proses penghitungan produksi enzim diukur melalui supernatan hasil sentrifugasi medium. Jumlah inulinase yang diproduksi dapat ditentukan dengan uji aktivitas enzim (Sadikin, 2002).

Tabel 1. Produksi inulinase fusan F1

Waktu inkubasi (Jam ke-)	Pertumbuhan (Abs)	Produksi inulinase ( $\mu\text{mol}/\text{menit}$ )
0	0.0883	0.1009
6	0.4045	0.3306
12	0.5129	0.5470
18	0.5379	0.6088
24	0.5469	0.3261
30	0.5272	0.3649
36	0.5391	0.4249
42	0.5686	0.3885
48	0.5884	0.3024

Adanya inulin dalam medium produksi cair dapat menginduksi proses pembentukan enzim inulinase oleh fusan F1. Sehingga dengan demikian proses pembentukan enzim inulinase dapat digolongkan sebagai enzim induktif. Hal ini sesuai dengan Xiao *et al.* (1988) bahwa inulin merupakan induser dalam sintesis inulinase dan , bersifat adaptif. Inulinase disintesis selama terjadi pertumbuhan khamir dan mencapai maksimum

pada fase stasioner (Byun & Nahm, 1978). Inulinase yang terdapat pada kultur cair disebut sebagai inulinase supernatan (Rouwenhorst<sup>b</sup> *et al.*, 1990) dan bersifat termotoleran (Park *et al.*, 2001). Inulinase merupakan hasil dari metabolit primer dan bersifat *growth asosiated*.

Tabel 2. Kecepatan pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ) dan waktu generasi (g) serta produksi inulinase fusan F1

Strain	Pertumbuhan spesifik ( $\mu$ )	Waktu generasi (g)	Produksi inulinase ( $\mu\text{mol}/\text{menit}$ )
F1	0.2536	2.7334	0.608
<i>P. manshurica</i>	0.2794	2.4815	0.557
<i>Rh. paludigenum</i>	0.3787	1.8304	0.326

Pada tahap ini dilakukan pengukuran kecepatan pertumbuhan specific ( $\mu$ ) dan waktu generasi. Berdasarkan Tabel 2 terlihat bahwa fusan F1 mampu menghasilkan produksi inulinase lebih tinggi dari pada kedua parentalnya yaitu *P. manshurica* dan *Rh. paludigenum*. Hal ini diduga karena adanya proses akumulatif dari kedua

induknya, sehingga mengakibatkan produksi inulin meningkat.

## KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa Fusan F4 mampu menghasilkan produksi inulinase sebesar 0.60882  $\mu\text{mol}/\text{menit}$  dengan kecepatan pertumbuhan

specific ( $\mu$ ) sebesar 0.2536 jam dengan waktu generasi (g) 2.7334 jam.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Allais, J.J. S. Kammoun, P. Blanc, C. Girard and J. Baratti. 1986. Isolation and Characteristic of Bacterial Strains with Inulinase Activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (5) : 1086-1090.
- Byun, S. M. dan B.H. Nahm. 1978. Production of Fructose from *Jerusalem artichoke* by Enzymatic Hydrolysis. *J. of Food science.* 43 : 1871-1873.
- Chaplin, M.F dan J.F. Kennedy. 1994. Cahbohydrat Analysis: A Practical Approach. 2<sup>nd</sup> Edition. Oxford University Press. Oxford.
- 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. Bi.l. Sci.* 6 (16): 1386-1388.
- Lunggani, A.T; Wijanarka dan Endang K., 2009. Produksi IOS Prebiotik Berbasis Pemanfaatan Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis*) Oleh Khamir Inulinolitik Dan Pengujian Antimikrobanya Secara Invitro. Penelitian Hibah Multiyears Desentralisasi.
- Nakamura, T., Y. Ogata, A. Shitasa, A. Nakamura dan K. Ohta. 1995. Continuous Production of Fructose Syrups from Inulin by Immobilized Inulinase from *Aspergillus niger* Mutan 817. *Journal of Fermentation and Bioeng.* 80(2) : 164-169. *et al*, 1995).
- Park, J.P and J.W. Yun. 2001. Utilization of Chicory roots for Microbial Endoinulinase Production. *Letters In Applied Microbiology.* 2001 (33): 183 – 187
- Pelczar. M.J. and Chan E.C.S. 1986. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Terjemahan: Ratna Siri H, T. Imas, S.S. Tjitrosomo, dan Sri Lestari Angka. UI press, Jakarta
- Rukmana, R. 2000. Dahlia: Prospek Agribisnis dan Teknik Budi Daya. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Rouwenhorst<sup>b</sup>, R.J., M. Hensing, J. Verbakel, W.A Scheffers & J.P.V. Dijken. 1990. Structure & Properties of The Extracellular Inulinase of *Kluyveromyces marxianus*. *Journal Appl. & Envir. Microbiology.* The Netherlands. p: 3337-3345.
- Sadikin, M. 2002. Seri Biokimia: Biokimia Enzim. Penerbit Widya Medika. Jakarta.
- Vandamme, E. J. and D.G. Derycke. 1983. Microbial Inulinases: Fermentation Process, Properties and Applications. *Advances in Appl. Microbiol.* 29: 139-176.
- Wijanarka, Endang K. dan Hermin P. 2006a. Paket Teknologi Eksplorasi Khamir Inulinolitik Termotabil Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.) Jawa Tengah Melalui Teknik Fusi Protoplas dan Aplikasinya pada Produksi *High Fructose Syrup* (HFS). Laporan HB PT XIV/1. Undip. Semarang
- Xiao, R., M. Tanida dan S. Takao. 1988. Innulinase from *Cryosporium pannorum*. *J. Fement. Technol.* 66 (5) : 244 – 248.