

Kinetika Pertumbuhan Dan Produksi Inulinase Fusan F7

Wijanarka¹⁾; Endang Sutariningsih Soetarto²⁾; Kumala Dewi³⁾ dan Ari Indrianto⁴⁾

¹⁾ Lab. Mikrobiologi_FSM Undip; mahasiswa S3 Biologi UGM, Bulaksumur Yogyakarta 55281

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

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

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

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

Abstrak

Pertumbuhan dapat diartikan sebagai suatu pertambahan bagian-bagian sel. Adanya pertumbuhan sel biasanya dapat diketahui dengan adanya pertambahan ukuran dan pembelahan sel. Populasi sel khususnya mikroba secara kuantitatif atau kualitatif dapat digunakan untuk memantau atau mengkaji fenomena pertumbuhan.

Enzim inulinase (E.C. 3.2.1.7) adalah enzim yang mampu merombak substrat inulin menjadi monomer fruktosa. Fruktosa merupakan bahan baku (*doctoring agent*) untuk proses pembuatan FOS, IOS, pulullan, aseton dan sorbitol.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kinetika kecepatan pertumbuhan spesifik (μ), waktu generasi (g) dan aktivitas inulinase yang dihasilkan oleh fusan F7. Fusan F7 merupakan hasil fusi antara *Pichia manshurica* dan *Rhodospiridium paludigenum*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa Fusan F7 mempunyai kecepatan pertumbuhan specific (μ) sebesar 0.3299 jam dengan waktu generasi (g) 2.1012 jam dan aktivitas enzim inulinase yang dihasilkan sebesar 0.5337 IU. Hasil tersebut terletak diantara kedua parentalnya yaitu *P. manshurica* (μ = 0.27935 jam; g = 2.4815 jam dan aktivitas = 0.557 IU) dan *Rh. paludigenum* (μ = 0.3787 jam; g = 1.8304 jam dan aktivitas = 0.3263 IU).

Kata kunci : Pertumbuhan; fusan F7; inulinase ; umbi dahlia

PENDAHULUAN

Untuk melihat pertumbuhan suatu mikroba tidak lepas dari proses fermentasi. Fermentasi merupakan suatu proses perubahan senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan memanfaatkan agen biologi, baik dalam kondisi aerob maupun anaerob.

Produk fermentasi tersebut merupakan hasil dari metabolit primer maupun metabolit sekunder. Enzim merupakan hasil dari metabolit primer.

Proses pertumbuhan suatu mikrobia merupakan suatu proses yang dinamik dan proses kinetika dapat digunakan untuk melihat atau memprediksi produksi biomasa atau produk yang akan dihasilkan selama proses fermentasi. Pertumbuhan suatu mikrobia pada umumnya mengikuti pola fase stasioner (lag phase), fase pertumbuhan dipercepat, fase eksponensial, fase pertumbuhan diperlambat dan fase kematian.

Faktor utama yang mempengaruhi pertumbuhan dan perilaku mikroba salah satunya adalah sumber karbon. Diantara sumber karbon

tersebut adalah inulin. Inulin merupakan polimer fruktosa rantai linier dengan ikatan β -2,1-fruktofruktanosidik dengan I unit terminal glukosa (Skowronek & Fiedurek, 2005; Synder & Phaff, 1962), dengan panjang rantai polisakarida ini kurang lebih 25 – 35 unit fruktosa (Allais, *et.al.*, 1986). Karbohidrat ini dihasilkan oleh tanaman jenis Compositae seperti pada umbi dahlia (*Dahlia* sp. L), umbi Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*), chicory (*Chicoryum intybus* L), dandelion (*Taraxacum officinale* Weber), umbi yacon (*Smallanthus sanchifolius*), dan dalam jumlah kecil terdapat di dalam bawang merah, bawang putih, asparagus, pisang, dan gandum. Polifruktosa dengan derajat polimerisasi 30 ke atas 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 & Derycke, 1983). Enzim yang mampu merombak inulin menjadi molekul glukosa inulinase.

Inulinase (E.C.3.2.1.7) termasuk kedalam kelompok enzim hidrolase yang mampu menghidrolisis inulin menjadi fruktooligosakarida (FOS) atau fruktosa. Enzim ini dapat dihasilkan oleh bakteri, jamur, maupun tumbuh-tumbuhan (Vandamme & Derycke, 1983). Enzim inulinase pertama kali diisolasi dari tumbuhan, namun enzim ini juga dihasilkan oleh beberapa jenis mikrobial seperti bakteri, khamir, dan kapang berfilamen. Inulinase yang dihasilkan oleh mikrobial menunjukkan aktivitas hidrolisis inulin yang lebih tinggi (Georgescu & Stoica, 2005).

Fusan F7 merupakan fusan hasil fusi parental *Pichia manshurica* dan *Rhodospiridium paludigenum*. Kedua jenis khamir parental tersebut merupakan *bioresources* mikroba 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 (mikrobial, 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 sel yang kompeten, tidak memerlukan vector dan cukup mudah untuk dilakukan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kinetika kecepatan pertumbuhan spesifik (μ), waktu generasi (g) dan aktivitas inulinase yang dihasilkan oleh fusan F7. Fusan F7 merupakan hasil fusi antara *Pichia manshurica* dan *Rhodospiridium paludigenum*.

BAHAN DAN METODE

Mikroorganisme

Sumber mikroba yang digunakan pada penelitian ini adalah kultur murni fusan F7 yang merupakan hasil fusi dari *Pichia manshurica* dan *Rhodospiridium paludigenum* (Lunggani dkk., 2009)

Kultivikasi medium dan produksi inulinase

Media untuk kultivasi kultur dan produksi inulinase menurut Erthan (2003)(g/L): inulin-30; NH_4NO_3 -2.3; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -3.7; K_2HPO_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°C selama 20 menit. Setelah diinokulasi, Erlenmeyer di *rotary shaker* pada suhu 28°C dengan kecepatan 150 rpm.

Enzyme assay

Sejumlah 0,1 ml larutan enzim dicampur dengan substrat inulin 0,1% dalam larutan bufer sodium asetat pH 5.0. Selanjutnya diinkubasi selama 30 menit pada suhu 50°C . Penentuan aktivitas inulinase ditentukan berdasarkan sejumlah enzim yang mampu merombak 1 μmol substrat permenit pada kondisi tertentu. Gula reduksi yang terbentuk ditentukan dengan metode DNS (Chaplin, 1994; Park, J.P and J.W. Yun, 2001)..

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Pertumbuhan dan inulinase Fusan F7

Pertumbuhan merupakan suatu keadaan dimana terjadi penambahan bagian sel, ukuran sel dan volume sel. Populasi sel merupakan akibat dari pertumbuhan sel itu sendiri. Populasi sel baik secara kuantitatif atau kualitatif dapat digunakan untuk memantau atau mengkaji fenomena pertumbuhan. Kinetika pertumbuhan mikroba secara dinamik dapat digunakan untuk menentukan atau memprediksi produksi biomassa dalam suatu proses fermentasi.

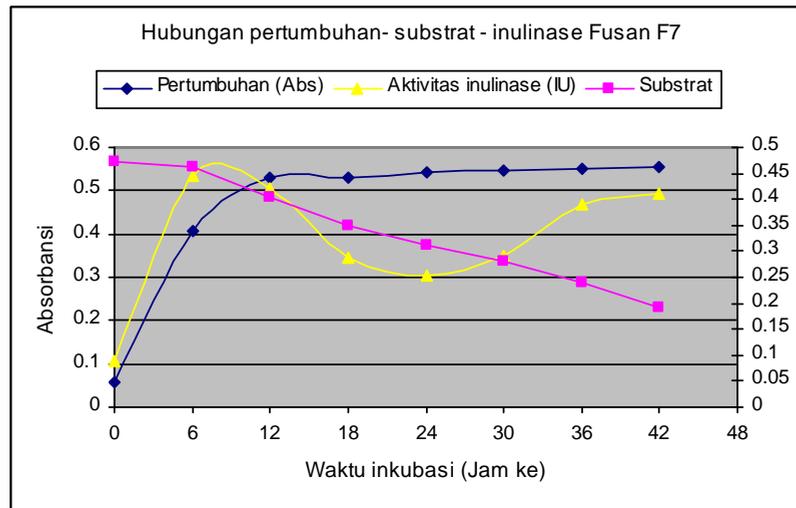
Dari hasil penelitian ini menggambarkan bahwa fusan F7 mengalami fase log (eksponensial, trophofase) pada jam ke t_0 sampai t_{12} tanpa diikuti oleh fase lag atau adaptasi. Hal ini disebabkan adanya starter F7 yang diberikan pada media produksi/ pertumbuhan, fusan tersebut tak membutuhkan fase lag lagi tetapi langsung fase log (Tabel 1 dan Gambar 1).

Tabel 1. Hubungan biomasa- substrat dan produk oleh fusan F7

Jam ke	X	ln X	X - X ₀	S (mg/ml)	S ₀ - S	P	P - P ₀
0	0.056	-2.8824	0	0.47304	0	0.1062	0
6	0.4056	-0.9023	0.3496	0.46156	0.01148	0.5337	0.4275
12	0.5287	-0.6373	0.4727	0.40386	0.06918	0.5036	0.3974
18	0.5316	-0.6319	0.4756	0.34942	0.12362	0.3438	0.2376
24	0.5436	-0.6095	0.4876	0.31225	0.16079	0.3055	0.1993
30	0.5452	-0.6066	0.4892	0.27922	0.19382	0.3494	0.2432
36	0.5513	-0.5955	0.4953	0.24141	0.23163	0.4697	0.3635
42	0.5528	-0.5928	0.4968	0.19067	0.28237	0.4924	0.3862

Pertumbuhan F7 pada umur jam t_0 sudah mempunyai massa sel dikarenakan fase lag atau fase adaptasi sudah ditiadakan sehingga langsung memasuki fase log. Pertumbuhan masuk fase log pada jam ke t_0 sampai t_{12} jam. Pada fase ini sel-sel membelah dengan cepat, dimana penambahan jumlahnya mengikuti kurva logaritmik (Waluyo, 2004). Fase stasioner mempunyai jumlah massa sel yang paling banyak pada waktu inkubasi jam t_{18} . Pertumbuhan khamir setelah inkubasi jam t_{18}

menunjukkan khamir memasuki fase pertumbuhan diperlambat dan fase menuju kematian. Pada fase ini nutrisi dalam medium mulai berkurang dan kemungkinan adanya zat hasil-hasil metabolisme yang mungkin beracun atau menghambat pertumbuhan khamir tersebut.



Gambar 1. Hubungan pertumbuhan-substrat dan produk oleh fusan F7

2. Produksi inulinase

Berdasarkan penelitian yang dilakukan terhadap fusan F7 untuk menghasilkan inulinase pada media produksi, ternyata aktivitas inulinase tertinggi tercapai pada jam t_6 dengan aktivitas sebesar 0.5337 IU. Hasil ini lebih tinggi dibanding

dengan *Rhodospiridium paludigenum* (0.326 IU), namun lebih rendah dari pada *Pichia manshurica* (0.557 IU). Hal ini di duga karena fusan F7 merupakan penggabungan sifat induk parentalnya dan bersifat kumulatif.

Tabel 2. Produksi inulinase Fusan F7

Waktu inkubasi (Jam ke-)	Pertumbuhan (Abs)	Aktivitas inulinase (IU)
0	0.056	0.1062
6	0.4056	0.5337
12	0.5287	0.5036
18	0.5316	0.3438
24	0.5436	0.3055
30	0.5452	0.3494
36	0.5513	0.4697
42	0.5528	0.4924
48	0.58	0.4924

Adanya inulin yang terkandung dalam tepung umbi dahlia pada media produksi dan berfungsi sebagai sumber karbon maka fusan F7 dapat memproduksi inulinase. Inulinase merupakan enzim ekstraseluler yang diproduksi dengan cara disekresikan keluar bercampur dengan medium sehingga penghitungan produksi enzim dapat diukur melalui supernatan hasil sentrifugasi medium produksi. Enzim inulinase juga termasuk enzim induktif dengan induser berupa inulin yang terdapat dalam tepung umbi dahlia. Adanya inulin tersebut maka sintesis enzim inulinase dapat berjalan. Hal ini sesuai dengan Byun & Nahm

(1978) dan Xiao *et al.* (1988) bahwa inulinase disintesis selama terjadi pertumbuhan khamir dan mencapai maksimum pada fase stasioner serta bersifat adaptif dan merupakan metabolit primer. Inulinase yang terdapat pada kultur cair disebut sebagai inulinase supernatan (Rouwenhorst^b *et al.*, 1990) dan bersifat termotoleran (Park *et al.*, 2001). Menurut Brock dan Madigan (1994), enzim digolongkan menjadi metabolit primer yang biasanya dibentuk pada fase pertumbuhan logaritmik. Pada fase ini, pertumbuhan sel akan terjadi sangat cepat dan produksi enzim meningkat.

Tabel 3. Kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) dan waktu generasi (g) serta produksi inulinase fusan F7

Strain	Pertumbuhan spesifik (μ)	Waktu generasi (g)	Aktivitas inulinase (IU)
F7	0.3299	2.1012	0.5337
<i>P. manshurica</i>	0.2794	2.4815	0.557
<i>Rh. paludigenum</i>	0.3787	1.8304	0.326

Pada penelitian ini juga dilakukan pengukuran kecepatan pertumbuhan specific (μ) dan waktu generasi (g) terhadap F7. Berdasarkan Tabel 3 seperti tersebut di atas bahwa fusan F7 mampu menghasilkan pertumbuhan specific (μ) dan waktu generasi (g) terletak diantara kedua parentalnya. Sedangkan untuk produksi inulinase

lebih tinggi dari pada *Rh. paludigenum*, tetapi lebih rendah dari pada *P. manshurica*. Hal ini membuktikan bahwa fusan F7 merupakan gabungan dari *P. manshurica* dan *Rh. paludigenum*.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan sebagai berikut Fusan F7 mempunyai kecepatan pertumbuhan specific (μ) sebesar 0.3299 jam dengan waktu generasi (g) 2.1012 jam dan aktivitas enzim inulinase yang dihasilkan sebesar 0.5337 IU. Hasil tersebut terletak diantara kedua parentalnya yaitu *P. manshurica* (μ = 0.27935 jam; g = 2.4815 jam dan aktivitas = 0.557 IU) dan *Rh. paludigenum* (μ = 0.3787 jam; g = 1.8304 jam dan aktivitas = 0.3263 IU).

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.
- Brock, T.D, M.T. Madigan, J.M. Martinko & J. Parker. 1994. *Biology Of Microorganism.* 7th edition. Prentice-Hall International Inc. Wisconsin
- Chaplin, M.F dan J.F. Kennedy. 1994. *Cahbohydrat Analysis: A Practical Approach.* 2nd Edition. Oxford University Press. Oxford.
- Ertan, F., T. Aktac, A. C. Kaboglu, F. Ekinici 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^b, 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.
- Skowronek, M., Justyna K., Jan F., Anna G., 2003. Invertase activity of psychrotrophic fungi. Department of Industrial Microbiology, Maria Curie-Skłodowska University. *Journal vol LVIII . Akademicka* 19, 20-033 Lublin, Poland
- 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
- Waluyo, L. 2004. *Mikrobiologi Umum.* UMM Pers, Malang.
- Xiao, R., M. Tanida dan S. Takao. 1988. Inulinase from *Cryosporium pannorum*. *J. Fement. Technol.* 66 (5) : 244 – 248.