

Pengaruh Pepton dan Waktu Inkubasi terhadap Produksi Inulinase oleh *Pichia alni* DUCC-W4 Berbahan Dasar Tepung Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.)

Wijanarka, M. G. Isworo Rukmi, Lynda Sutrisna
Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi FMIPA Undip

Abstrak

Sumber pemanis alami alternatif yang aman bagi kesehatan dapat diproduksi dari inulin dalam umbi dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.) dan dapat dihidrolisis dengan inulinase dari *Pichia alni* DUCC-W4. Peningkatan produksi inulinase dapat dilakukan dengan menambahkan sumber nitrogen organik berupa pepton ke dalam medium. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas inulinase tertinggi sebesar 1,237 IU/mL (P₂T₃), aktivitas invertase tertinggi sebesar 1,568 IU/mL (P₂T₃) dan aktivitas katalitik inulinase sebesar 0,824 IU/mL (P₂T₂) diperoleh melalui rasio S/I dengan membandingkan aktivitas invertase (S) dan aktivitas inulinase (I). Kesimpulan dari penelitian ini adalah penambahan pepton dengan berbagai konsentrasi (0%; 0,5% dan 1%) dan lama waktu inkubasi (12 jam, 18 jam dan 24 jam) tidak meningkatkan produksi inulinase *Pichia alni* DUCC-W4.

Kata Kunci: Umbi dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.), inulinase, *Pichia alni* DUCC-W4, pepton dan waktu inkubasi.

PENDAHULUAN

Produksi gula nasional belum dapat memenuhi tingkat konsumsi gula di Indonesia. Hal ini terbukti dengan produksi gula dalam negeri yang hanya mencapai 1,7 juta ton/ tahun, sementara kebutuhan gula meningkat 3,3 juta ton per tahun (Richana, 2006). Pemerintah melakukan impor gula untuk mencukupi kebutuhan masyarakat tersebut (Tjokroadikoesoemo, 1986). Keadaan inilah yang mendorong upaya mencari alternatif pemanis. Pemanis sintesis lebih banyak diproduksi karena lebih manis dan lebih murah daripada pemanis alami, namun membahayakan kesehatan karena bersifat karsinogenik (Rismana dan Paryanto, 2002).

Sumber pemanis alami alternatif yang aman bagi kesehatan adalah fruktosa dalam bentuk *High Fructose Syrup* atau sirup fruktosa. Konsumsi sirup fruktosa diketahui tidak menyebabkan toksisitas, karsinogenitas dan mortalitas (Park *et al.*, 2001). Sirup fruktosa 1,7 kali lebih manis daripada sukrosa (Doelle dkk., 1993).

Salah satu sumber fruktosa adalah inulin yang merupakan polimer dari unit fruktosa dan dihasilkan oleh tanaman dahlia (Gupta *et al.*, 1990). Umbi akar dahlia mengandung 80% air dan 20% padatan. Padatan ini tersusun oleh \pm 85%

inulin dan bahan berselulosa (Kukun, 2004). Umbi dahlia lebih produktif daripada umbi lain karena menghasilkan 95% rendemen sirup fruktosa dalam satu reaksi enzimatik dengan inulinase, sedangkan umbi lain membutuhkan 3 tahap reaksi enzimatik dengan 45% rendemen sirup fruktosa (Rukmana, 2000).

Penelitian Wijanarka dkk. (2006) telah menemukan isolat khamir inulinolitik *Pichia alni* DUCC-W4 dari umbi dahlia. Khamir tersebut dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan produksi inulinase dengan menambahkan sumber nitrogen organik ke dalam medium. Priest (1992) menyatakan pertumbuhan dan produksi enzim akan meningkat apabila menggunakan sumber nitrogen organik. Hasil penelitian Xiao *et al.* (1988) menyatakan polipepton dan *corn steep liquor* merupakan sumber nitrogen organik yang lebih baik untuk produksi inulinase oleh *Penicillium* sp. dan *Aspergillus niger*-12. Sumber nitrogen dalam penelitian ini adalah pepton dengan total N 7,5% (Anonim, 2002). Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh penambahan berbagai konsentrasi pepton dan lama waktu inkubasi terhadap produksi inulinase *Pichia alni* DUCC-W4.

BAHAN DAN METODE

Bahan. *Pichia alni* DUCC-W4 koleksi Wijanarka, dkk (2006); tepung umbi dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.); inulin murni; sukrosa; medium produksi inulinase; pepton (Pronadisa); *Dinitrosalicylic acid* dan sodium asetat.

Pembuatan Tepung Umbi Dahlia (Ertan et al., 2003). Umbi dahlia dicuci, dikupas, dipotong kecil-kecil, dikeringkan dalam oven (80° C), digiling sampai menjadi tepung dan disaring (120 mesh).

Pembuatan Medium Produksi Inulinase

1. Medium basal (Ertan et al., 2003; Byun and Nahm, 1978). Tepung umbi dahlia 3 g dalam 100 mL aquades dipanaskan selama 25 menit, disaring, ditambahkan 0,23% NH₄NO₃; 0,37% (NH₄)₂HPO₄; 0,1% K₂HPO₄; 0,05% MgSO₄·7H₂O, dan 0,15% ekstrak yeast pada pH 5 dan disterilisasi

2. Medium perlakuan. Pembuatan medium perlakuan sama seperti medium basal, hanya dilakukan penambahan pepton 0% (P₀); 0,5% (P₁) dan 1% (P₂).

Pembuatan Starter. Satu ose biakan *P. alni* DUCC-W4 berumur 3 hari diinokulasikan ke dalam 50 mL medium basal dan diagitasi 150 rpm selama 22 jam. **Pertumbuhan sel.** Starter 10% (v/v) diinokulasikan pada 50 mL medium perlakuan dan diagitasi 150 rpm selama 30 jam. Pengambilan sampel dilakukan tiap 6 jam. Pertumbuhan sel diukur dengan metode turbidimetri. Cairan kultur diambil 5 ml dan diukur pada λ₅₂₀ nm. Pengukuran pertumbuhan dilakukan untuk menentukan waktu inkubasi yang akan digunakan dalam produksi enzim.

Produksi Enzim. Starter 10% (v/v) diinokulasikan pada medium perlakuan dan diagitasi 150 rpm. Pengambilan sampel dilakukan pada waktu inkubasi

12 jam (T₁), 18 jam (T₂) dan 24 jam (T₃), disentrifugasi 3000 rpm (10 menit). Supernatan hasil sentrifugasi merupakan enzim kasar inulinase untuk penentuan aktivitas inulinase dan invertase.

Penentuan Aktivitas Enzim (Xiao, et. al., 1998; Ertan et al., 2003).

1. Aktivitas Inulinase. Aktivitas inulinase didasarkan pada gula reduksi yang terbentuk

dengan menghitung absorbansi enzim-substrat (ES) dikurangi substrat (S) dan enzim (E). ES dibuat dari 0,5 mL substrat inulin 1%; 0,4 mL buffer dan 0,1 mL enzim kasar. S dari 0,5 mL substrat inulin 1%; 0,4 mL buffer; 0,1 mL aquades. E dari 0,4 mL buffer; 0,1 mL enzim kasar dan 0,5 mL aquades. Tiap campuran diinkubasi 30 menit (50° C). Reaksi dihentikan dengan memasukkan tabung sampel ke dalam air mendidih

(5 menit), setelah dingin ditambahkan 1 mL DNS, dipanaskan ke dalam air mendidih (10 menit) dan setelah dingin ditambahkan 5 mL aquades. Pengukuran absorbansi dilakukan pada λ₅₇₀ nm.

Aktivitas inulinase dianalisis dengan metode DNS (Chaplin and Kennedy, 1994) dan ditentukan berdasarkan sejumlah 1 μmol gula reduksi yang dibebaskan per menit pada kondisi tertentu.

$$\text{Akt enzim} = \frac{(A_{ES} - A_S - A_E)}{P} \times \text{BM} \times 30'$$

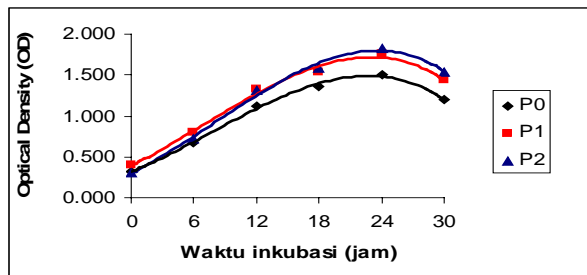
A_{ES} : absorbansi enzim-substrat; A_S : absorbansi substrat; A_E : absorbansi enzim; P : faktor pengenceran; BM : berat molekul fruktosa; 30' : waktu inkubasi

2. Aktivitas Invertase. Penentuan aktivitas invertase dilakukan seperti aktivitas inulinase. Substrat yang digunakan adalah sukrosa 1%.

Analisis Data. Metode penelitian dilakukan secara eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial. Faktor pertama adalah konsentrasi pepton dengan taraf 0% (P₀); 0,5% (P₁) dan 1% (P₂), sedangkan faktor kedua adalah lama waktu inkubasi dengan taraf 12 jam (T₁), 18 jam (T₂) dan 24 jam (T₃). Masing-masing perlakuan diulang 3 kali. Data yang diperoleh dianalisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan taraf kepercayaan 95%, apabila berbeda nyata selanjutnya diuji lanjut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan Sel *P. alni* DUCC-W4. *P. alni* DUCC-W4 dapat dikatakan sebagai penghasil inulinase karena mampu tumbuh pada medium yang mengandung inulin sebagai satu-satunya sumber karbon.



Gambar 4.1. Grafik pertumbuhan sel *P. alni* DUCC-W4 selama 30 jam

Keterangan :

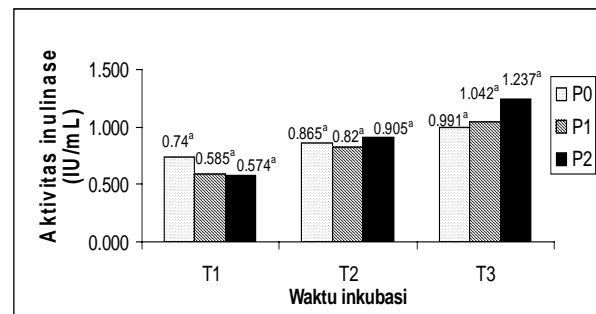
P₀ : medium perlakuan dengan 0% pepton (kontrol)

P₁ : medium perlakuan dengan 0,5% pepton

P₂ : medium perlakuan dengan 1% pepton

Grafik pertumbuhan menunjukkan tidak terdapat fase lag karena starter berada pada fase log (22 jam). Pertumbuhan khamir memasuki fase log, fase stasioner dan mencapai kematian setelah inkubasi 24 jam. Fase log terjadi pada inkubasi 6 sampai 12 jam, pada fase ini sel-sel khamir membelah sangat cepat dan mensintesis berbagai metabolit. Salah satu metabolit yang disintesis adalah inulinase yang memecah inulin dalam medium. Kultur memasuki fase stasioner pada inkubasi 18 sampai 24 jam, pada saat ini kecepatan pembelahan menurun karena menipisnya ketersediaan nutrisi di dalam medium dan terjadi akumulasi produk metabolit beracun yang menghambat pertumbuhan khamir. Sebagian populasi sel mulai mengalami kematian setelah inkubasi 24 jam karena nutrisi di dalam medium dan energi cadangan di dalam sel telah habis (Waluyo, 2004). Hasil pengamatan dari grafik pertumbuhan menunjukkan sel *P. alni* DUCC-W4 pada semua perlakuan meningkat pada waktu inkubasi 12 sampai 24 jam, sehingga hasil tersebut digunakan untuk menentukan waktu inkubasi dalam produksi enzim.

Aktivitas Inulinase. Jumlah inulinase yang diproduksi dapat ditentukan melalui uji aktivitas inulinase (Sadikin, 2002). Hasil pengamatan menunjukkan aktivitas inulinase ketiga perlakuan (P₀, P₁ dan P₂) mengalami peningkatan (Gambar 4.2).



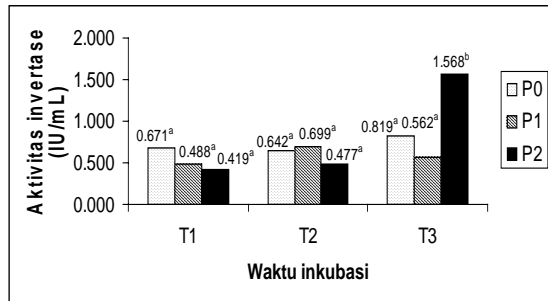
Gambar 4.2. Diagram batang aktivitas inulinase *P. alni* DUCC-W4 pada beberapa medium perlakuan dengan waktu inkubasi 12 jam (T₁), 18 jam (T₂) dan 24 jam (T₃).

Keterangan : angka yang diikuti dengan superskrip yang sama menunjukkan hasil perlakuan berbeda tidak nyata.

Aktivitas inulinase tertinggi diperoleh pada P₂T₃ (1,237 IU/mL), namun berbeda tidak nyata dengan perlakuan lain. Penambahan pepton sampai dengan konsentrasi 1% tidak mempengaruhi produksi inulinase secara signifikan. Hasil ini berbeda dengan penelitian Xiao *et al.* (1988) yang membuktikan bahwa konsentrasi polipepton 1% di dalam medium produksi inulinase untuk *Cryosporium panarum* menghasilkan aktivitas inulinase yang lebih tinggi (16,05 unit/mL), dibandingkan dengan konsentrasi 0,2% (5,82 unit/mL) dan 0,5% (15,37 unit/mL). Perbedaan hasil ini dapat disebabkan oleh penggunaan jenis mikroba dan kondisi perlakuan yang berbeda. Sumber nitrogen organik (polipepton) yang digunakan dalam penelitian Xiao *et al.* (1988) memiliki konsentrasi 0,2%; 0,5% dan 1%, sedangkan penelitian ini menggunakan ekstrak yeast dengan konsentrasi 0,15% dan pepton 0%; 0,5% dan 1%, sehingga kemungkinan medium menjadi lebih hipertonis, yang dapat menyebabkan gangguan penyerapan nutrisi ke dalam sel khamir. Faktor lain penyebab rendahnya aktivitas inulinase dalam penelitian ini adalah tidak digunakannya fermentor dan purifikasi enzim. Fermentor meminimalkan tingkat kontaminasi karena aerasi dilakukan dengan menggunakan filter mikroba pada aliran udara masuk dan larutan CuSO₄ yang mampu membunuh mikroba kontaminan (Bailey and Ollis, 1987). Purifikasi enzim merupakan suatu usaha yang dilakukan untuk memisahkan

enzim dari komponen lain. Inulinase yang masih tercampur dengan enzim atau protein lain akan mempengaruhi tingkat kemurnian inulinase itu sendiri, sehingga aktivitas inulinase yang diperoleh tidak dapat maksimal.

Aktivitas Invertase. Pengukuran aktivitas invertase dilakukan untuk mengetahui kemampuan aktivitas katalitik inulinase sebagai penentu tingkat keaktifan inulinase.



Gambar 4.3. Diagram batang aktivitas invertase *P. alni* DUCC-W4 pada beberapa medium perlakuan dengan waktu inkubasi 12 jam (T_1), 18 jam (T_2) dan 24 jam (T_3).

Keterangan : angka yang diikuti dengan superskrip yang sama menunjukkan hasil perlakuan berbeda tidak nyata.

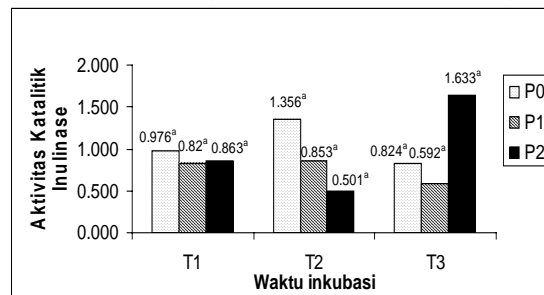
Aktivitas invertase tertinggi diperoleh pada P_2T_3 (1,568 IU/mL) yang berbeda nyata dengan perlakuan lain (Gambar 4.3). Penambahan pepton 1% dalam penelitian memacu *P. alni* DUCC-W4 untuk meningkatkan aktivitas invertase dalam memecah substrat berupa sukrosa pada T_3 (fase stasioner) karena metabolit yang disintesis oleh sel-sel khamir selama pertumbuhan terakumulasi pada waktu inkubasi tersebut. Hal ini sesuai dengan Byun and Nahm (1978) yang menyatakan pada fase stasioner terjadi akumulasi berbagai metabolit termasuk enzim yang disintesis selama pertumbuhan khamir.

Invertase merupakan enzim hidrolase yang memecah sukrosa pada bagian ujung rantai inulin menjadi glukosa dan fruktosa. Enzim ini bekerja bersama-sama dengan inulinase. Sebagian ahli berpendapat bahwa invertase termasuk ekso-inulinase, namun sebagian lagi menyatakan bahwa invertase merupakan enzim yang berbeda dengan ekso-inulinase (Skowronek *et al.*, 2003). Invertase

yang dibentuk pada perlakuan P_2T_3 lebih banyak dibandingkan inulinase karena selain memecah sukrosa, enzim ini juga memecah bagian ujung dari oligofruktan hasil pemecahan polimer fruktosa untuk menjadi fruktosa tunggal. Aktivitas inulinase pada P_2T_3 sebesar 1,237 IU/mL sedangkan aktivitas invertase sebesar 1,568 IU/mL.

Aktivitas Katalitik Inulinase. Tingkat keaktifan inulinase dapat diketahui dengan meneliti aktivitas katalitiknya. Aktivitas katalitik merupakan aktivitas bagian khusus dari molekul enzim (situs katalitik) yang berfungsi untuk mengenali, mengikat dan mengolah substrat secara spesifik (Sadikin, 2002). Aktivitas katalitik diperoleh melalui rasio S/I dengan cara membandingkan aktivitas invertase (S) dengan aktivitas inulinase (I). Rasio S/I yang rendah menunjukkan tingkat keaktifan inulinase yang tinggi (Rouwenhorst *et al.*, 1990).

Rasio S/I terendah atau aktivitas katalitik tertinggi diperoleh pada P_2T_2 (0,824) yang berbeda tidak nyata terhadap perlakuan lain (Gambar 4.4). Rasio S/I dengan nilai kurang dari 100 memiliki arti mayoritas enzim yang dihasilkan adalah inulinase, sedangkan rasio S/I lebih dari 100 adalah invertase (Ettalibi and Baratti, 1987).



Gambar 4.4. Diagram batang aktivitas katalitik inulinase *P. alni* DUCC-W4 pada beberapa medium perlakuan dengan waktu inkubasi 12 jam (T_1), 18 jam (T_2) dan 24 jam (T_3).

Keterangan : angka yang diikuti dengan superskrip yang sama menunjukkan hasil perlakuan berbeda tidak nyata.

KESIMPULAN

Penambahan pepton dengan berbagai konsentrasi (0%; 0,5% dan 1%) dan lama waktu inkubasi (12 jam, 18 jam dan 24 jam) tidak meningkatkan produksi inulinase *Pichia alni* DUCC-W4.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2002. **Pepton**. http://www.haifachem.co.il/tempate_e/default.asp?id_site=2&maicat=&catid=16&pageId=40&parntId=44. 7 Oktober 2006.
- Bailey, J. E. and D. F. Ollis. 1987. **Biochemical Engineering Fundamental**. McGraw-Hill Kogakusha Ltd. Tokyo.
- Byun, S. M. and B. H. Nahm. 1978. **Production of Fructose from Jerusalem artichoke by Enzymatic Hydrolysis**. *J. of Food Science*. 43: 1871-1873.
- Chaplin, M. F. and J. F. Kennedy. 1994. **Carbohydrate Analysis: A Practical Approach**. 2nd Edition. Oxford University Press. Oxford.
- Doelle, H. W., S. Purawisastral dan E. G. Said. 1993. **Fermentasi *Zymomonas mobilis* untuk Produksi Gula Cair Fruktosadari Tetes Tebu**. Vol. 2. *J. Mikrobiologi Indonesia*. Jakarta. 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***. *Pak. J. of Biosci*. 6 (16): 1386-1388.
- Ettalibi, M and C. Baratti. 1987. **Purification, Properties and Comparison of Invertase, Exoinulinase and Endoinulinase of *Aspergillus ficuum***. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 26: 13-20.
- Gupta, A. K., P. Rathore, N. Kaur and R. Singh. 1990. **Production ThermaStability and Immobilization of Inulinase of *Fusarium oxysporum***. *J. Chem. Tech. Biotech*. p:245-251.
- Kukun. 2004. **Dahlia, Cantik Bunganya, Manis Umbinya**. <http://kukun10.blogspot.com/2006/10/08/dahlia-cantik-bunganya-manisumbinya.html>. 19 Oktober 2006. Park, S., H. Y. Jeung, H. S. Kim, M. S.
- Yang and K. S. Chae. 2001. **Enhanced Production of *Aspergillus ficuum* Endoinulinase in *Saccharomyces cerevisiae* by Using The SUC2 Deletion Mutation**. *J. Enz. and Microbial Technol*. Elsevier Science Inc. Korea. 29 : 107-110.
- Priest, F. G. 1992. **Encyclopedia of Microbiology**. Vol. 2. Academic Press. Inc. New York.
- Richana, N. 2006. **Gula Singkong dapat Diproduksi di Pedesaan**. Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian. 28 (3):9-11.
- Rismana, E. dan I. Paryanto. 2002. **Beberapa Bahan Pemanis Alternatif yang Aman...!**. <http://www.kompas.com/kesehatn/news/0212/07/201426.htm>. 26 Oktober 2007.
- Rouwenhorst, R. J., M. Hensing, J. Verbakel, W. A. Scheffers and J.P. V. Dijken. 1990. **Structure and Properties of The Extracellular Inulinase of *Kluyveromyces marianus***. *J. Appl. and Envir. Microbiol*. The Netherland. p: 3337-3345. S
- Rukmana, R. 2000. **Dahlia: Prospek Agribisnis dan Teknik**

- Budidaya.**
Penerbit Kanisius. Yogyakarta. Sadikin, M.
2002. **Biokimia Enzim.**
Medika. Jakarta. Skowronek, M., J.
Kuszevska, J. Fiedurek and A.
Gromada. 2003. **Invertase Activity of
Psychotropic Fungi.** Maria Curie
Sklodowska University. Poland.
- Tjokroadikoesoemo, P. S. 1986. **HFS dan
Industri Ubi Kayu Lainnya.** PT. Gramedia.
Jakarta. Waluyo, L. 2004. **Mikrobiologi
Umum.** UMM Press. Malang.
- Wijanarka, E. Kusdiyantini dan H.
Pancasakti. 2006. **Paket
Teknologi Eksplorasi Khamir
Inulinolitik Termostabil Umbi Dahlia
(*Dahlia variabilis* Willd.) Jawa Tengah
melalui Teknik Fusi Protoplas dan
Aplikasinya pada Produksi High
Fructose Syrup (HFS).** Laporan Hasil
Pelaksanaan Penelitian Hibah Bersaing
Perguruan Tinggi XIV/I Tahun
Anggaran 2006.
- Xiao, R., M. Tanida and S. Takao. 1988.
**Inulinase from *Cryosporium
pannorum*.** *J. Ferment. Technol.* 66 (5):
244-248.
- Purification and Some Properties of
Endo Inulinase from *Cryosporium
pannorum*.** *J. Ferment. Bioeng.* 67 (4):
244.