

PRODUKSI INULINASE FUSAN 3 HASIL FUSI PROTOPLAS INTERSPECIFIK *Kluyveromyces marxianus* DAN *Torulospira pretoriensis* AUTOTHONUS

¹⁾Wijanarka*, ²⁾Endang K*, ³⁾Hermin PS*

* Staf Pengajar Biologi Bagian ¹⁾ Lab. Mikrobiologi, ²⁾ Lab. Biokimia, ³⁾ Lab. Genetika FMIPA Universitas Diponegoro, Semarang

ABSTRAK.---Produksi Sirup pemanis fruktosa atau *High Fructose Syrup* (HFS) merupakan salah satu industri pangan dan minuman di Indonesia yang sampai saat ini belum berkembang. Untuk produksi HFS salah satunya memerlukan enzim inulinase. Enzim ini telah mampu diproduksi oleh *Torulospira pretoriensis* (organisme alami), namun aktivitasnya rendah. Untuk meningkatkannya maka perlu difusikan dengan *Kluyveromyces marxianus*. Penelitian ini akan mengembangkan suatu perbaikan sifat strain (*strain improvement*) melalui teknik fusi protoplas. Teknik fusi protoplas pada penelitian ini bersifat interspecific, sehingga diperoleh strain khamir baru (mutan) yang mampu menghasilkan inulinase tinggi. Teknik fusi protoplas akan dilakukan pada tiga tahap yaitu isolasi protoplas, proses fusi protoplas dan regenerasi protoplas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa teknik fusi protoplas telah berhasil mendapatkan fusan (fusan 3) yang mampu menghasilkan aktivitas enzim yang lebih tinggi (0,1298 IU/ml) dibanding khamir induk *Torulospira pretoriensis* (0,1045 IU/ml). Semua fusan yang didapat memiliki sifat karakteristik sesuai dengan *Torulospira pretoriensis* dan *Kluyveromyces marxianus*.

PENDAHULUAN

Pemanis alami yang dihasilkan dari bahan dasar amilum dapat berupa gula cair atau *High Fructose Syrup* (HFS) (Tjokrodikoesoemo, 1986; Lutong, 1993). Pembuatan HFS secara konvensional yaitu dengan menghidrolisis amilum menjadi glukosa dan kemudian dilakukan isomerisasi menjadi fruktosa dengan menggunakan enzim glukosa isomerase. Sirup fruktosa juga dapat dibuat dari bahan dasar inulin dengan cara dihidrolisis menggunakan asam atau enzim inulinase (Byun and Nahm, 1978; Allais *et al.*, 1986; Xiao *et al.*, 1988).

Produksi HFS merupakan salah satu industri pangan dan minuman di Indonesia yang sampai saat ini belum berkembang. Hal ini disebabkan ada beberapa kendala, 1) belum adanya produsen enzim inulinase, 2) biaya untuk mengimport enzim yang sangat mahal, 3) enzim yang dihasilkan sangat sedikit, 4) hidrolisis inulin menjadi fruktosa menghasilkan fraksi yang berwarna gelap serta hasil samping yang tak diinginkan seperti difruktofuranohidrida (Allais *et al.*, 1986; Xiao *et al.*, 1988). Untuk mengatasi hal tersebut diatas maka perlu digunakan suatu teknik fusi protoplas yang mampu menghasilkan inulinase tinggi dan bersifat termostabil pada suhu tinggi. Teknik fusi protoplas dipilih secara intensif untuk meningkatkan kemampuan strain khamir

karena mereka umumnya bersifat poliploid sehingga mudah dilakukan hibridisasi seksual, mutagenesis maupun aplikasi teknologi DNA rekombinan. Dengan demikian akan diperoleh strain unggul baru yang diharapkan mempunyai produksi inulinase tinggi.

TUJUAN PENELITIAN

Untuk mempelajari dan mengembangkan kemampuan *Torulospira pretoriensis* dan *Kluyveromyces marxianus* dalam menghasilkan enzim inulinase aktivitas tinggi melalui teknik fusi protoplas.

METODE PENELITIAN

Kluyveromyces marxianus dan *Torulospira pretoriensis* (hasil isolasi dari umbi ketela rambat, Wijanarka dkk., 2001). Khamir ini ditumbuhkan dan disimpan dalam medium dengan komposisi sebagai berikut : glukosa 10 g/l, pepton 5 mg/l, ekstrak yeast 3 g/l dan agar 20 g/l. Suhu penyimpanan 4°C. Apabila akan digunakan untuk produksi enzim, maka kedua khamir tersebut harus ditumbuhkan pada media produksi (gr / L) sebagai berikut: inulin 2,5 g; yeast ekstrak 2,5 g; KH₂PO₄ 1 g; MgSO₄. 7H₂O 0,5 g; NaNO₃ 1,5 g; NH₄H₂PO₄ 2,0 g; KCl 0,5 g FeSO₄. 7H₂O 0,1 g dan pH 4,0 (Allains *et al.*, 1986).

6.1. Pemilihan Penanda (marker)

Hal ini berdasarkan pada uji konsentrasi penghambatan minimal antifungi yang dapat bertindak sebagai marker (Hocart and Peberdy, 1990).

6.2. Isolasi protoplas

Protoplas diisolasi dengan menggunakan metode modifikasi Chun (1992). Sel khamir dengan kepadatan 10^7 direndam dalam larutan buffer sodium suksinat (pH 4,5); 0,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,6 M KCl dan 0,1 M 2-mercaptoethanol. Protoplas diperoleh dengan menambahkan 2-3 mg/ml Novozyme 234 selama 2-3 jam.

6.3. Fusi protoplas

Protoplas kedua sel khamir difusikan dengan cara dicampur dalam larutan buffer fosfat (pH 6) yang mengandung 35% polyethylene glycol 0.1 CaCl_2 selanjutnya diinkubasi selama 45 menit. Setelah inkubasi, suspensi disentrifugasi 700x g selama 5 menit untuk menghilangkan PEG, selanjutnya dilakukan pencucian dan resuspensi dua kali dengan larutan penyangga buffer pospat. Pelet protoplas yang terbentuk selanjutnya dilarutkan kembali dalam larutan penyangga yang sama, kemudian diinokulasikan secara *pour plate* pada medium PDA dan cawan petri disimpan sampai tumbuh fusan pada suhu 28°C .

6.4. Regenerasi protoplas

Regenerasi protoplas dilakukan dengan menumbuhkan hybrid pada medium agar lunak (PDA *semi solid*). Setelah diinkubasi selama 5-7 hari koloni yang muncul dianalisis lebih lanjut.

6.5. Analisis hybrid hasil fusi

Setelah diperoleh fusan, selanjutnya diuji terhadap fusan yang dicurigai. Uji yang dilakukan adalah uji secara biokemis yaitu mengukur aktivitas enzim inulinase secara kuantitatif. Secara lengkap pengujian fusan seperti berikut ini:

6.5.2. Aktivitas enzim (Xiao et al., 1988; Park, J.P and J.W. Yun. 2001).

Enzim kasar yang diperoleh dari beberapa isolat di ambil 1ml dan direaksikan dengan 1 ml substrat dan inkubasi pada suhu 50°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan jalan memasukkan tabung sampel kedalam air yang mendidih selama 5 menit. Aktivitas inulinase ditentukan berdasarkan Tabel 1. Pengaruh konsentrasi Nistatin 500 mg terhadap pertumbuhan *Kluveromyces marxianus* dan *Torulospora pretoriensis*

sejumlah 1 μmol gula reduksi yang dibebaskan permenit pada kondisi tertentu. Dari pengujian ini, nantinya akan diperoleh isolat yang mampu menghasilkan aktivitas enzim tertinggi. Gula reduksi yang dihasilkan diukur dengan menggunakan metode Nelson-Somogy. Pembacaan absorbansi menggunakan spektrometer dengan panjang gelombang 550 nm (Chaplin, 1994). Pengukuran aktivitas enzim ditentukan berdasarkan formulasi berikut :

$$\text{Aktivitas enzim} = P (X_s - X_b) / (\text{BM fruktosa} \times 10)$$

P : faktor pengenceran

X_s : kadar fruktosa sampel

X_b : kadar fruktosa blangko

6.5.2 Pertumbuhan sel (Park, J.P and J.W. Yun. 2001).

Yaitu dengan mengukur berat sel kering, diambil 10 ml cairan kultur dan disentrifugasi, endapan yang diperoleh dicuci dengan air destilasi dan kemudian dikeringkan pada suhu 70°C sampai konstan.

6.5.3. Kadar protein enzim (Deutscher, 1990)

Sampel diambil 1 ml, kemudian ditambah 5 ml larutan Lowry B. Campuran divortek dan dibiarkan selama 10 menit. Larutan tersebut ditambahkan 0,5 ml Lowry A dan dibiarkan selama 20 menit. Selanjutnya larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Pemilihan Penanda (marker)

Suatu penanda (marker) dalam berbagai proses rekombinasi genetik sangat diperlukan untuk mengetahui dan menyeleksi terjadinya rekombinasi genetik yang baru. Sifat auktotrof dan antibiotik atau fungsi sering dipergunakan sebagai marker (Hocart and Peberdy, 1990). Pada Tabel 1 terlihat antara

Kluveromyces marxianus dan *Torulospora pretoriensis* mempunyai ketahanan minimum yang tak sama untuk jenis antifungi Nistatin 500 mg.

terhadap pertumbuhan *Kluveromyces marxianus* dan

Jenis Khamir	Konsentrasi (ppm)					
	50	100	200	300	400	500
<i>T. pretoriensis</i>	+	+	+	+	-	-
<i>K. marxianus</i>	+	+	+	+	+	-

Hasil uji konsentrasi penghambatan minimal bahwa konsentrasi penghambatan minimum nistatin untuk *Torulospora pretoriensis* sebesar 400 ppm. Sedangkan untuk *Kluveromyces marxianus*, penghambatan minimum 500 ppm. Oleh karena itu, konsentrasi yang dipakai sebagai penanda *Torulospora pretoriensis* adalah 400 ppm nistatin, sedangkan untuk *Kluveromyces marxianus* 500 ppm nistatin 500 mg.

B. Isolasi Protoplas

Isolasi protoplas tingkat keberhasilannya sangat ditentukan oleh berbagai faktor, diantaranya umur kultur dan jenis enzim litik yang dipergunakan. Fase pertumbuhan mikrobia pada saat dilakukan isolasi protoplas sangat mempengaruhi keberhasilan pada langkah berikutnya. Peberdy (1980) dan Santiago (1982) mengatkan bahwa kultur mikrobia pada fase eksponensial akan menghasilkan jumlah protoplas yang baik, sedangkan menurut Santopeitro *et al.* (1997) pada saat memasuki fase log, tepatnya pada fase mid log.

Pada penelitian ini, khamir *Kluveromyces marxianus* dan *Torulospora pretoriensis* telah memasuki fase log pada umur atau jam ke- 4 – 20, sehingga bila digunakan untuk mengisolasi protoplas pada fase mid log yaitu jam ke-12 untuk *Torulospora pretoriensis*, sedangkan jam ke – 8 untuk jenis *Kluveromyces marxianus*. Perbedaan fase mid log ini mungkin disebabkan adanya perbedaan species sehingga akan menyebabkan perbedaan umur kultur. Akibat selanjutnya, bahwa kedua kultur tersebut mempunyai fase mid log yang berbeda.

Enzim litik yang dipergunakan dalam isolasi protoplas tergantung pada komponen penyusun dinding sel mikrobia dalam hal ini khamir. Pada golongan Ascomycetes dinding

sel tersusun atas khitin dan glukukan (Bartnicki – Garcia, 1968). Menurut Pelczar and Chan (1986), bahwa penyusun dinding sel kapang kitin, selulosa dan glukukan. Sedangkan menurut Jutono dkk. (1980), bahwa dinding sel khamir terdiri dari atas kitin.

Dalam penelitian ini digunakan enzim litik yang berasal dari *Trichoderma harzianum* yang mengandung selulase, protease dan kitinase. Enzim ini ternyata mempunyai keidentikan dengan Novozyme 234 yang dikenal sebagai enzim litik (Sigma, 1995; Sigma, 2004). Oleh karena itu, enzim litik ini dapat dipergunakan untuk memecah komponen dinding sel, sehingga akan menghasilkan protoplas. Isolasi protoplas dengan menggunakan enzim litik, dihasilkan protoplas sebesar $17,9 - 23,3 \times 10^7$ protoplas/ ml untuk *Torulospora pretoriensis*, sedangkan untuk *Kluveromyces marxianus* sebesar $3,5 - 6,5 \times 10^7$ protoplas/ ml.

Konsentrasi enzim litik yang digunakan dalam penelitian ini sangat bervariasi, hal ini dilakukan untuk mencari konsentrasi yang optimum dalam proses isolasi protoplas. Pada Tabel 2 terlihat bahwa semakin pekat konsentrasi enzim litik yang dipergunakan dalam proses isolasi protoplas pada *Torulospora pretoriensis* dan *Kluveromyces marxianus*, ada kecenderungan semakin besar pula jumlah proplasp yang akan dihasilkan dibanding dengan kontrol. Hal ini membuktikan bahwa enzim litik tersebut mampu bekerja memecah dinding sel khamir tersebut yang umumnya terdiri selulosa, kitin atau gabungan keduanya.

Tabel 2. Hubungan antara lysing enzyme dan jumlah koloni *T. pretoriensis*

No.	Konsentrasi Lysing enzyme (mg/ml)	Σ koloni.10 ⁶ <i>T. pretoriensis</i>	Σ koloni.10 ⁶ <i>K. marxianus</i>
1	0	126,4	52,8
2	2	233,6	61,6
3	4	179,2	57,6
4	8	204	65,2

C. Fusi Protoplas

Teknik fusi protoplas dapat diterapkan pada berbagai mikrobia termasuk genus *Torulospora* dan *Kluveromyces*. Pada fusi protoplas menggunakan PEG 6000 terdapat dua atau lebih protoplas terlihat membentuk agregat. Pada penelitian ini, frekuensi antara *Torulospora pretoriensis* dan *Kluveromyces marxianus* dengan menggunakan PEG 35 % selama 45 menit sebesar 43,21%. Nilai frekuensi ini ternyata cukup besar. Bila dilihat dari kandungan enzim litik yang digunakan, maka makin besar enzim litik yang digunakan maka makin besar pula frekuensi fusi ini. Menurut Frehel *et al.* (1979) dalam Krismunandari (1991) bahwa proses aktivasi membran yang diinduksi dengan PEG menyebabkan pelekatan antara satu sel dengan sel yang lainnya sehingga terbentuk agregat protoplas. Protoplas yang telah kehilangan dinding selnya diharapkan mampu berfusi dengan sesamanya melalui penambahan agen penginduksi yaitu PEG (*Polyethylene glycol*).

D. Regenerasi Protoplas

Penggunaan protoplas mikrobia dalam rekayasa genetik sangat dimungkinkan, karena adanya kemampuan dari mikrobia tersebut untuk dapat kembali ke bentuk normalnya (Peberdy, 1979); Santiago, 1982).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa regenerasi protoplas untuk *Kluveromyces marxianus* dengan menggunakan liing enzyme sebesar 4 mg/ml memeberikan hasil yang maksimal yaitu sebesar 6,25%. Sedang untuk *Torulospora pretoriensis* lising enzyme konsentrasi 8 mg/ml memberikan hasil maksimal sebesar 39,45%. Dengan demikian *Torulospora pretoriensis* mempunyai kemampuan regenerasi lebih tinggi dibanding dengan *Kluveromyces marxianus*. Penyebab rendahnya persentase regenerasi protoplas belum sepenuhnya diketahui, pada umumnya dihubungkan dengan ketiadaan inti dalam

protoplas dan ketidak mampuan propllas yang keluar dari sel untuk melakukan regenerasi.

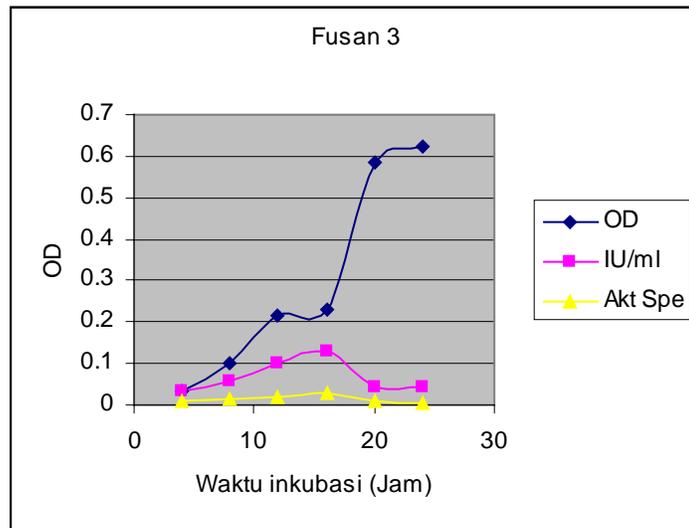
E. Analisis Fusan

Pada penelitian ini telah ditemukan 5 fusan (Tabel 3). Dari ke-5 fusan tersebut, fusan 2, 3 dan 5 merupakan fusan yang dapat tumbuh pada media produksi enzim, sedangkan fusan 1 dan 4 tidak. Setelah dilakukan uji lanjut, ternyata fusan 3 dan 5 mempunyai kemampuan pertumbuhan yang lebih cepat dibandingkan fusan 2. Berdasarkan uji aktivitas enzim inulinase dengan menggunakan inulin 0,5% sebagai satu satunya sumber karbon dan pada jam yang sama (jam ke-16), ternyata fusan 3 (0,1298 IU) lebih tinggi dibanding fusan 5 (0,0974 IU) (Gambar 1 dan 2).

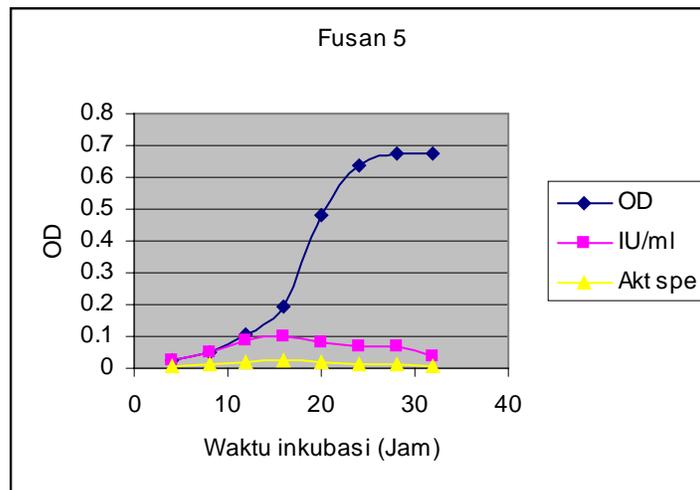
Tabel 3. Ciri ciri morfologi koloni fusan

Fusan ke-	Ciri Koloni
1	Bulat, transparan, cembung
2	Bulat, cembung
3	Bulat, lonjong, cembung
4	Bulat, datar (rata)
5	Lonjong, datar

Aktivitas inulinase untuk fusan 3 ternyata lebih tinggi dari dengan induk *Torulospora pretoriensis* (0,1045 IU), sedang dibandingkan dengan induk *Kluveromyces marxianus* sedikit lebih rendah (0,1492 IU). Sedangkan untuk fusan 5, aktivitas inulinase lebih rendah dibanding dengan kedua induknya. Dikemukakan oleh Crueger and Crueger (1984), bahwa dengan teknik fusi protoplas perolehan strain dengan kombinasi hasil tertinggi dari kedua induk hanya dalam jumlah yang sedikit. Kebanyakan produktivitas selalu berada diantara kedua nilai dari strain induk. Walaupun demikian teknik ini masih banyak digunakan dalam perbaikan strain, k arena dengan fusi protoplas efek komulatif dan rekombinasi lebih besar.



Gambar 1. Pertumbuhan Fusan 3 dan kemampuan aktivitas enzimatis



Gambar 2. Pertumbuhan Fusan 5 dan kemampuan aktivitas enzimatis

Kecilnya aktivitas enzim inulinase ini mungkin disebabkan adanya kandungan substrat atau induser yang relatif sedikit, dengan kata lain belum mencapai kebutuhan optimum. Mengingat enzim ini bersifat inducibel maka perlu adanya induser dari luar. Untuk meningkatkan kemampuannya. Hal ini senada dengan pernyataan (Xiao *et al.*, 1988). bahwa sintesis enzim inulinase dalam sel bersifat inducibel, karena enzim inulinase hanya akan

terbentuk apabila ada senyawa atau substrat tertentu yang bertindak sebagai induser. Substrat atau induser yang berperan dalam sintesis inulinase adalah inulin dan tidak oleh sukrosa, glukosa atau fruktosa. Sedangkan aktivitas spesifik tertinggi yang dihasilkan fusan 3 sebesar 0,0266 IU/mg, dan fusan 5 sebesar 0,0221 IU/mg (Tabel 4).

Tabel 4. Aktivitas enzim dan aktivitas spesifik fusan 3 dan fusan 5

Jam ke	Fusan 3		Fusan 5	
	Aktivitas enzim (IU/ml)	Aktivitas spesifik (IU/mg)	Aktivitas enzim (IU/ml)	Aktivitas spesifik (IU/mg)
4	0,0352	0,0074	0,02998	0,0056
8	0,05936	0,0208	0,04700	0,0104
12	0,0990	0,0125	0,0898	0,0199
16	0,1298	0,0266	0,0974	0,0221
20	0,0452	0,0098	0,0814	0,0185
24	0,0452	0,0098	0,0677	0,0143
28	0,0264	0,0054	0,0677	0,0154

Tabel 5. Pengujian fusan terhadap maltosa 1%, sikloheksamid dan nistatin

Sampel	Maltosa	sikloheksamid	nistatin
Kontrol <i>T. pretoriensis</i>	+	-	-
Kontrol <i>K. marxianus</i>	-	+	+
Fusan 1	+	+	-
Fusan 2	+	-+	-+
Fusan 3	+	-+	+
Fusan 4	+	-+	+
Fusan 5	+	-	+

Keterangan:

- + : tumbuh
- + : tumbuh tapi lemah
- : tak tumbuh

Berdasarkan uji kemampuan dalam menggunakan maltosa sebagai satu-satunya sumber karbon, maka fusan 3 dan 5 mempunyai banyak kemiripan dengan induk *Torulospira pretoriensis*. Sedangkan uji terhadap sikloheksamid, fusan 3 dapat tumbuh, meskipun lemah. Hal ini mengindikasikan bahwa fusan tersebut mempunyai gabungan dari sifat kedua induknya. Sedangkan fusan 5, tidak dapat tumbuh.

Untuk pemilihan penanda dengan menggunakan Nistatin 500 mg (400 ppm), ternyata fusan 3 dan 5 mampu tumbuh. Hal ini membuktikan bahwa kedua fusan tersebut memiliki sifat seperti *Kluveromyces marxianus* (Tabel 5).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan : Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa teknik fusi protoplas telah berhasil mendapatkan fusan yang mampu menghasilkan aktivitas enzim yang lebih tinggi (0,1298 IU/ml) dibanding khamir induk autothonus (0,1045 IU/ml).

Saran : Untuk meningkatkan aktivitas enzim dari fusan yang terpilih, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penambahan induser, optimasi lingkungan media dan penambahan konsentrasi *lising enzyme* serta teknik purifikasi enzim.

UCAPAN TERIMA KASIH

Untuk pertama sekali tim peneliti ingin mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Pendidikan Tinggi – Departemen Pendidikan Nasional, yang telah memberikan kesempatan dan dana tahun anggaran 2006, untuk membiaya penelitian ini. Dalam kesempatan ini pula, penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada sesama peneliti atas kerjasamanya selama menjalankan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. 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).

2. _____; G. Hoyos-Lopez; S Kammoun dan J. Baratti. 1987. Isolation and Characterization of Thermophilic Bacterial Strains with Inulinase Activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (5) : 942 –945
3. Bajpai, P. dan A. Margaritis. 1987. Characterization of Molecular Sieve-Bound Inulinase. *J. Ferment Technol.* 65 (2) : 239 – 247.
4. Bucke, C. 1988. Enzymes in Fructose Manufacture. Dalam. *Enzymes and food Processing*. Applied. Science. Pub. Ltd.
5. Byun, S.M. dan B.H. Nahm. 1987. Production of Fructose from Jerusalem artichoke by Enzymatic Hydrolysis *J. Food sci.* 43 : 1871 – 1873.
6. 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
7. Dixon, M and Webb, E. 1979. *Enzymes*. Logman Group Ltd London
8. Deutscher, M. 1990. Guide To Protein Purification. *Methods In Enzymology* Vol. 182. Academic Press. Inc. Boston. Toronto. Tokyo.
9. Hartiko, H. 1994. *Biologi Organisme Termofilik*. PAU-Bioteknologi UGM. Jogyakarta.
10. Holz, G and Saunders G. 1985. Genetic Modification of Industrial Microorganisms. Didalam *Comprehensive Biotechnology. The Principles, Application and Regulation of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine*. Moo-Young, M (Ed) Pergamon Press.
11. Iwasaki R and M. Murakoshi. 1992. Palm oil yields carotene for world markets. *Inform.* vol 3 No 2 :210-217
12. Javadekar, VS, H. SivaRaman and D. Gokhale, 1995. Industrial yeast strain Improvement : construction of a highly flocculent yeast with a killer character by protoplast fusion. *Jou. Indst. Microbiology* 15 : 94-102
13. Kreger-van Rij, N.J.W. 1984. *The yeast, A Taxonomic Study*. Third revised and Enlarged Ed., Elsevier sci. publ. B.v., Amsterdam.
14. Krismundari, K.I. 1991. Fusi Protoplas B.t var. *istraelensis* var. *kurstaki* Untuk memperbesar Daya Bunuh. Tesis UGM
15. Lutony, T.L. 1993. *Tanaman Sumber Pemanis*. Penebar Swadaya, Jakarta.
16. Matsushima, R and Baltz R.H. 1986. Protoplas Fusion didalam *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Demain, A.L. and Solomon, N.A. American Society for Microbiology . Washington DC.
17. Nagy IZ, Palagyi, C. Vagvolgyi & L. Ferczy. 1994. Genomic Comparison among Wild-type and Mutant Strains of *P. rhodozyma*. *FEMS Microbiology. Lett.* 123 : 315-318
18. Park, J.P and J.W. Yun. 2001. Utilization of Chicory roots for Microbial Endoinulinase Production. *Letters In Applied Microbiology*. 2001 (33): 183 – 187
19. Peberdy, J.F. 1989. Genetic Manipulation dalam *Physiology of Industrial Microorganism*. Berry D.R. (Ed). Blackwel Sceintific Publi. Oxford.
20. Perkins, S. 1984. *Biotechnology: A New Industrial Revolution*. Orbis Publishing. London.
21. Rouwenhorst, R.J.; L.E.. Visser; A.A van Derbaan; W.A. Scheffer dan J.P. van Dijken. 1988. Production, Distribution and Kinetic Properties of inulinase in Continous Culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl environ. Microbiol.* 54(5): 1131 - 1137.
22. _____; W.S. Ritmeester; W.A. Scheffer dan J.P. van Dijken. 1990a. Localization of innulinase and Invertase in *Kluyveromyces* sp.. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (11) : 3329 – 3336.
23. _____; M. Hensing; J. Verbakel; W.a. Scheffer dan J.P. van Dijken. 1990b. Structure and Properties of the Extracellular Inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (11) : 3337 – 3345.
24. Santiago, C.M. 1982. Protoplast Fusion A New Tecnique for Genetic Manipulation and Breeding of Industrial Microorganism. *I.C. Biotech.* 5: 435-440.

25. Santopietro, L.M.D., J.F.T. Spencer, D.M. Spencer and F Sineriz. (1997). Characterization of Intergenetic Hybrids Obtains By protoplast Fusion Between *Phaffia rhodozyma*, *Cryptococcus laurentii* and *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Techniques. Vol. 11 No. 10. pp 769 – 771.
26. Tjokroadikoesoemo, P.s. 1986. HFS dan Industri Ubi Kayu lainnya. Penerbit PT. Gramedia, Jakarta.
27. Ushijima, S and Nakadai, T. 1987. Breeding By Protoplast Fusion of Koji Mold *Aspergillus sojae*. Agric. Biol. Chem. Vol. 51 (4) 1051 – 1057.
28. Wijanarka. Arina, T.L dan Emi Y. 2001. Seleksi Khamir dan Optimasi Produksi Enzim Inulinase Dari Tanah Sekitar Umbi Ketela Rambat (*Ipomoea batatas*) di Daerah Bandungan Ambarawa. Penelitian BBI. UNDIP. Semarang.
29. Xiao, R. ; M. Tanida dan S. Takao. 1988. Inulinase from *Cryosporium pannorum* J. Ferment. Technol. 66 (5) : 244 – 248
30. _____; M. Tanida dan S. Takao. 1989. Purification and Some Properties of Endoinulinase from *Cryosporium pannorum* J. ferment. Bioeng 67 (4) : 244