

576.119  
WJ  
W 9

PENELITIAN DASAR



LAPORAN PENELITIAN

**FUSI PROTOPLAS INTERSPECIFIK**  
***Kluveromyces marxianus* DAN *Torulospira pretoriensis* AUTOTHONUS**  
**UNTUK PRODUKSI ENZIM INULINASE TERMOSTABIL**

Oleh :

**Drs. Wijanarka, MSi**  
**Dr. Endang Kusdiyantini, DEA**  
**Hermin P. Sakti, Ssi,MSi**

---

**Dibiayai oleh Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi,  
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan  
Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Dasar Nomor: 68/P2IPT/DPPM/PID/III/2004  
tanggal 1 bulan Maret Tahun 2004**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS DIPONEGORO SEMARANG**

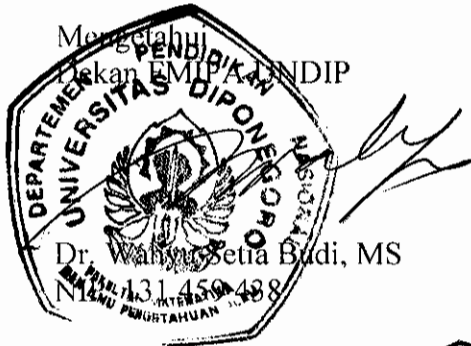
**2004**

**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR  
HASIL PENELITIAN DASAR**

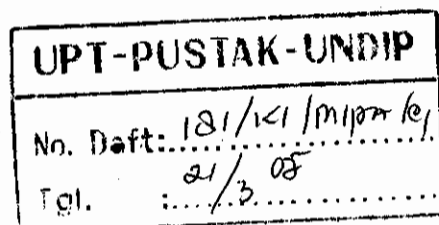
- 1. Judul Penelitian** : Fusi Protoplas Interspecific *Kluveromyces marxianus* Dan *Torulospira pretoriensis* Autothonus Untuk Produksi Enzim Inulinase Termostabil
- 2. Ketua Peneliti**
- a. Nama lengkap dan gelar : Drs. Wijanarka, MSi
  - b. Jenis kelamin : Laki-laki
  - c. Pangkat/Gol/NIP : Penata/ III C/131962226
  - d. Jabatan Fungsional : Lektor
  - e. Fakultas/Jurusan : FMIPA/Biologi
  - f. Perguruan Tinggi : Universitas Diponegoro
  - g. Pusat Penelitian : Lab. Mikrobiologi
- 3. Jumlah Tim Peneliti** : 2 orang
- 4. Lokasi Penelitian** : Lab. Mikrobiologi, FMIPA-Jur. Biologi UNDIP
- 5. Kerja Sama dengan instansi lain** : tidak ada
- 6. Masa Penelitian** : 9 bulan
- 7. Biaya Yang Diperlukan** : Rp. 15.000.000,00 (Lima belas juta rupiah)

Semarang, Oktober 2004

Ketua Peneliti



Drs. Wijanarka, MSi  
NIP. 131 962 226



## DAFTAR ISI

### Halaman

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN.....	i
DAFTAR ISI.....	ii
RINGKASAN DAN SUMMARY.....	iii
PRAKATA.....	v
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
I. PENDAHULUAN.....	1
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	3
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	7
IV. METODE PENELITIAN.....	8
V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	10
VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	16
DAFTAR PUSTAKA.....	17
LAMPIRAN.....	21

## RINGKASAN

Pada saat sekarang penggunaan enzim pada berbagai industri semakin berkembang, baik untuk industri pangan, minuman atau non pangan dan minuman. 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 *Kluveromyces marxianus*.

Penelitian ini akan mengembangkan suatu perbaikan sifat strain (*strain improvement*). Salah satu metode perbaikan strain yang dapat dipergunakan adalah 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 *Kluveromyces marxianus*.

## SUMMARY

At the of this time enzyme use of various industry progressively expand, good to food and beverage industry. Produce the syrup of sweetener fructose (HFS) represent one of industry of food and beverage in Indonesia which underdeveloped to date. To produce the HFS one of them is need the enzyme inulinase. This enzyme have been able to be yielded by *Torulospora pretoriensis* (natural organism), but its activity lower. For the improving of it of hence need the fusion with *Kluveromyces marxianus*.

The research will develop an repair of is nature strain (strain improvement). One of method of repair strain which can be used by fusion protoplas. Technique merger the proplas at this research have the character of the interspecific, so that obtained new strain yeast (mutant; fusan) capable to yield the high enzyme inulinase activity. This tecnique cover the isolation protoplas, fusion processes of protoplas and generation protoplas.

Result of research indicate that the technique protoplas have succeeded to get the new fusan (fusan 3) capable to yeild the higher level enzyme activitry (0,1298 IU/ml) compared to yeast of main *Torulospora pretoriensis* (0,1045 IU/ml). All fusan got measure up to the characteristic according to *Torulospora pretoriensis* and *Kluveromyces marxianus*.

## PRAKATA

Puji dan syukur Tim peneliti panjatkan pada Allah SWT yang telah memberikan ramah dan hidayah-Nya sehingga selesailah sudah penyusunan hasil penelitian yang berjudul Fusi Protoplas Interspecific *Kluveromyces marxianus* Dan *Torulospora pretoriensis* Autothonus Untuk Produksi Enzim Inulinase Termotabil. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan fusan yang lebih baik dari kedua belah induknya melalui teknik fusi protoplas.

Pertama sekali tim peneliti ingin mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Pendidikan Tinggi - Departemen Pendidikan Nasional, yang telah memberikan kesempatan dan dana untuk membiayai penelitian ini. Dalam kesempatan ini pula, penulis mengucapkan banyak terima kasih atas kerja samanya kepada sesama peneliti yang telah bekerja seoptimal mungkin.

Akhir kata tim peneliti berharap semoga hasil karya ini bermanfaat bagi masyarakat pada umumnya dan dalam bidang bioteknologi pada khususnya. Tak ada gading yang tak retak, oleh karena itu segala kritik dan saran sangat penulis harapkan demi sempurnanya karya ini.

Semarang, Oktober 2004

Tim peneliti

## DAFTAR TABEL

### Halaman

Tabel 1. Pengaruh konsentrasi Nistatin 500 mg terhadap pertumbuhan <i>T. pretoriensis</i> Dan <i>K. marxianus</i> .....	10
Tabel 2. Hubungan antara Lysin enzim dan jumlah koloni <i>T. pretoriensis</i> .....	12
Tabel 3. Hubungan antara Lysin enzim dan jumlah koloni <i>K. marxianus</i> .....	12
Tabel 4. Ciri – ciri morfologi koloni fusan.....	13
Tabel 5. Aktivitas enzim dan aktivitas spesifik fusan 3 dan fusan 5.....	21
Tabel 6. Pengujian fusan terhadap maltosa 1%, sikloheksamid dan nistatin.....	22

## DAFTAR GAMBAR

### Halaman

Gambar 1. Pertumbuhan Fusan 3 dan kemampuan aktivitas enzimatis.....	14
Gambar 2. Pertumbuhan Fusan 5 dan kemampuan aktivitas enzimatis.....	15
Gambar 3. Protoplas fusan 3 (100 x).....	20
Gambar 4. Protoplas fusan 5 (100 x).....	20
Gambar 5. Pengujian fusan terhadap antifungi.....	21



## DAFTAR LAMPIRAN

### Halaman

Lampiran 1. Personalia peneliti .....	22
Lampiran 2. Sarana dan prasarana penelitian.....	29

## I. PENDAHULUAN

Kemampuan biokimiawi sangat besar dan berbagai macam komponen atau senyawa dapat dihasilkan oleh berbagai isolat mikrobia. Di dalam industri yang melibatkan aktivitas mikrobia, msalnya produk pangan, enzim, asam amino dan antibiotika diperlukan perbaikan secara terus menerus. Tujuan utama dari perbaikan strain ini adalah untuk memaksimalkan hasil selama proses, oleh karena itu diperlukan perbaikan dan pengembangan strain yang intensif.

Pemanis alami yang dihasilkan dari bahan dasar amilum dapat berupa gula cair fruktosa atau *High Fruktosa 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 dihidrolisa menggunakan asam atau enzim inulinase (Byun dan Nahjm, 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 ini yang sangat mahal, 3) enzim yang dihasilkan sangat sedikit 4) hidrolisis inulin menjadi fruktosa dengan menggunakan asam (pH 1 – 2) pada suhu tinggi ( 80<sup>0</sup>- 100<sup>0</sup> C ) akan menghasilkan fraksi warna yang gelap serta hasil samping yang tak diinginkan seperti difruktofuranoanhidrida (Allais *et al.*, 1986; Xiao *et al.*, 1988). Untuk mengatasi hal tersebut diatas maka perlu digunakan suatu teknik rekayasa genetik seperti seperti 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 poliploidi sehingga tidak mudah dilakukan hibridi seksual, mutagenesis maupun aplikasi teknologi DNA rekombinan. Dengan demikian akan diperoleh strain unggul baru yang diharapkan mempunyai produksi inulinase tinggi dan bersifat lebih termostabil terhadap suhu tinggi.

Fusi protoplas interspecific ini belum pernah dilakukan pada hal pengujian fusannya lebih sederhana dan sistematis. Sehingga permasalahan yang perlu diangkat dalam penelitian ini adalah penggunaan teknik fusi protoplas interspecific untuk mengembangkan kemampuan *Kluveromyces marxianus* dan *Torulospira pretoriensis* untuk produksi enzim inulinase termotabil.