

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi dan Karakterisasi Morfologi Isolat Khamir Termotoleran

Dari penelitian ini diperoleh tiga isolat khamir (YD.1, YD.2 dan YD.3) penghasil inulinase yang diisolasi dari rhizosfer umbi dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.) di daerah Bandungan Ambarawa, hal ini sesuai dengan pernyataan Sheocky *et al.*, (2001) bahwa mikrobia penghasil inulinase dapat ditemukan pada rhizosfer tanaman yang mempunyai cadangan makanan inulin. Menurut Islami dan Utomo (1995) rhizosfer merupakan daerah disekitar akar tanaman yang mengandung materi yang dilepaskan akar, yang disebut eksudat akar dalam jumlah dan macam yang sangat bervariasi. Adanya eksudat akar ini akan merubah kondisi lingkungan tanah, sehingga mempengaruhi kehidupan mikrobia disekitarnya.

Semua isolat mampu tumbuh pada medium basal dengan inulin sebagai satu – satunya sumber karbon dengan suhu inkubasi 40°C. Pengaturan suhu inkubasi pada 40°C di tujukan untuk mendapatkan isolat khamir yang bersifat termotoleran, hal ini sesuai dengan anjuran Gams *et al.*, (1987) yang menyatakan bahwa untuk mengisolasi khamir dengan sifat termotoleran dapat dilakukan dengan menginkubasikan media pada suhu 35°C atau 40°C.

Dengan diperolehnya isolat khamir yang bersifat termotoleran, maka diharapkan isolat khamir tersebut mampu menghasilkan inulinase yang bersifat termostabil. Penggunaan inulinase termostabil pada produksi sirup fruktosa (HFS) akan memberikan keuntungan, karena jika suhu pada proses produksi meningkat maka kecepatan reaksi akan meningkat pula, sehingga produksi akan lebih efisien, selain itu juga memperkecil kemungkinan terjadinya kontaminasi.

Kondisi tanah perkebunan dahlia di daerah Bandungan Ambarawa merupakan tanah jenis latosol dengan kisaran pH antara 4,2 – 6,2 dan suhu tanahnya rata – rata 25°C, kondisi tanah ini memungkinkan khamir hidup sebab menurut Fardiaz (1992) khamir tumbuh baik pada kondisi asam (pH 4 - 4,5) dan dengan suhu optimum untuk pertumbuhannya antara 25°-30°C.

Untuk identifikasi khamir sampai dengan tingkat genus, pengamatan karakteristik morfologi merupakan salah satu cara yang dapat ditempuh (Kirshop *et al.*,1984). Karakteristik morfologi dari masing – masing isolat khamir tertera pada Tabel 01.

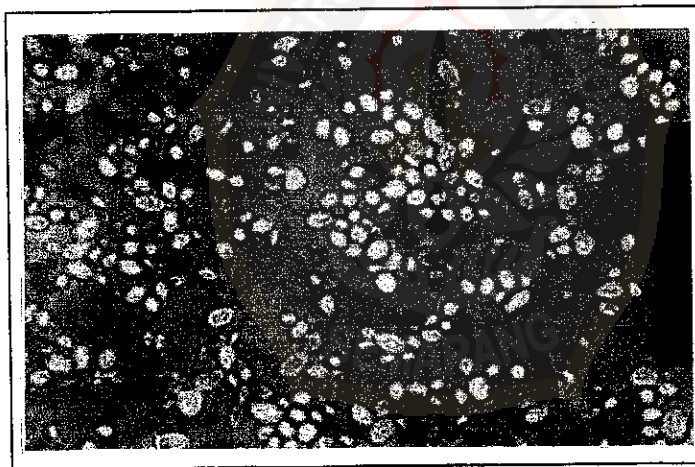
Tabel 01. Morfologi isolat khamir dari rhizosfer umbi dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.) di daerah Bandungan – Ambarawa

Pengamatan	Jenis Isolat Khamir		
	Isolat YD.1	Isolat YD.2	Isolat YD.3
Koloni pada YMA: - Warna - Permukaan koloni - Tepian koloni - Tekstur koloni	krem cembung rata halus	krem cembung rata halus	krem cembung rata halus
Pertumbuhan pada YM cair: - Tipe deposit - Pelikel - Tipe pelikel	Flokulen Negatif -	Flokulen Negatif -	Flokulen Positif Cincin
Bentuk sel	Oval	Oval	Oval
Ukuran sel	5 µm – 7,5 µm	5 µm – 6,25 µm	5 µm – 6,25 µm
Balistospora	-	-	-
Reproduksi: - Aseksual - Seksual	Tunas (multi polar) Askospora	Tunas (multi polar) Askospora	Tunas (multi polar) Askospora

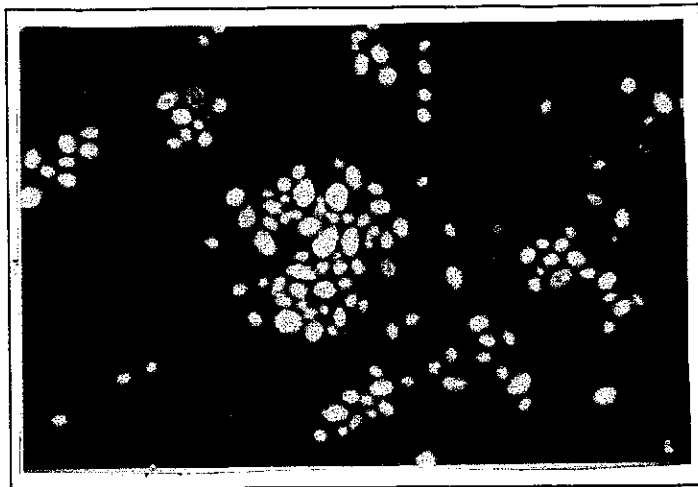
Sumber: Data primer Adi Yulandi 2003

Dari perbandingan ciri - ciri morfologi ke tiga isolat khamir dengan kunci identifikasi, ternyata isolat - isolat tersebut memiliki kemiripan ciri - ciri morfologi dengan khamir dari genus *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* dan *Saccharomyces*. Menurut Xiao *et al.*, (1988) genus khamir yang mampu menghasilkan enzim inulinase antara lain khamir dari genus *Kluyveromyces*, *Candida* dan *Debaryomyces*.

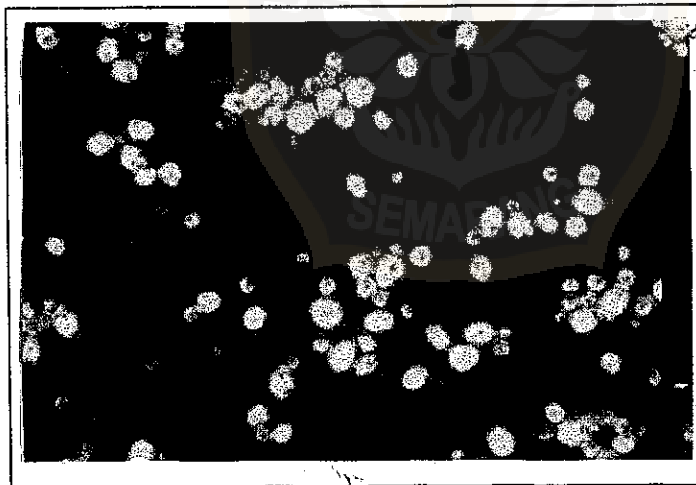
Selain genus - genus tersebut, khamir dari genus *Torulopsis*, *Schizosaccharomyces*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Hansenula*, *Schawaniomyces* dan *Saccharomyces* juga mampu memfermentasikan inulin (Vandamme dan Derycke, 1983 dalam Handayani, 1995). Kenampakan morfologi isolat khamir YD.1, YD.2 dan YD.3 di tunjukkan pada Gambar 02., 03. dan 04.



Gambar 02. Morfologi isolat khamir YD.1 umur 4 hari dalam media PDA pada perbesaran 400 x



Gambar 03. Morfologi isolat khamir YD.2 umur 4 hari dalam media PDA pada perbesaran 400 x



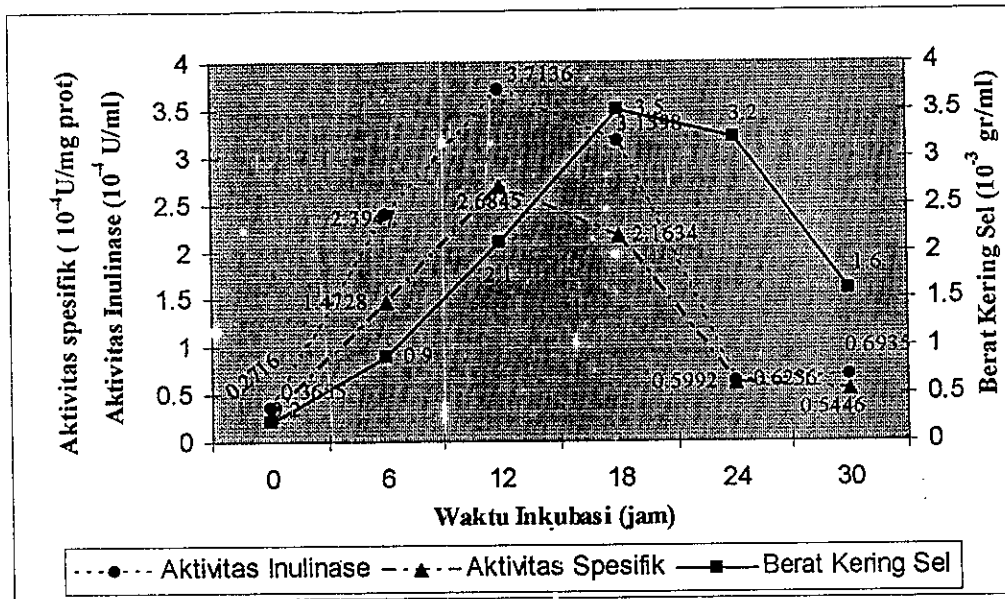
Gambar 04. Morfologi isolat khamir YD.3 umur 4 hari dalam media PDA pada perbesaran 400 x

4.2 Seleksi Isolat Khamir

Seleksi isolat khamir yang potensial dalam menghasilkan inulinase pada penelitian ini didasarkan pada pengamatan aktivitas inulinasenya. Satu unit aktivitas inulinase dinyatakan sebagai banyaknya gula reduksi dalam hal ini fruktosa (μmol) yang dibebaskan oleh setiap ml inulinase dalam tiap menit (U/ml) (Xiao *et al.*, 1988).

Inulinase hanya diproduksi dari medium yang mengandung inulin, sedangkan medium dengan sumber karbon sukrosa, glukosa, fruktosa atau lainnya inulinase tidak dihasilkan. (Xiao *et al.*, 1988), untuk itu media yang digunakan dalam produksi inulinase menggunakan media yang diperkaya (Lampiran 02.) dengan inulin sebagai satu – satunya sumber karbon. Ditambahkan oleh Bons (1987 dalam Zul 1999) bahwa media untuk produksi enzim pada dasarnya sama dengan media untuk pertumbuhan, hanya pemilihan sumber karbon harus tepat untuk mencegah terjadinya represi katabolit.

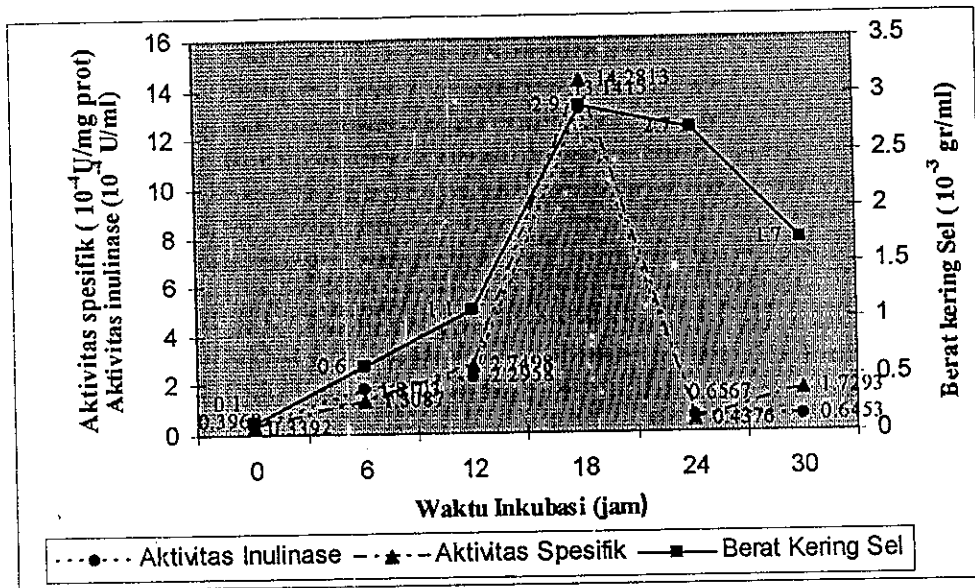
Hasil pengukuran aktivitas inulinase, aktivitas spesifik dan berat kering sel dari masing – masing isolat khamir tertera pada Gambar 05., 06., 07.



Gambar 05. Aktivitas inulinase, aktivitas spesifik dan berat kering sel isolat khamir YD.1 selama 30 jam.

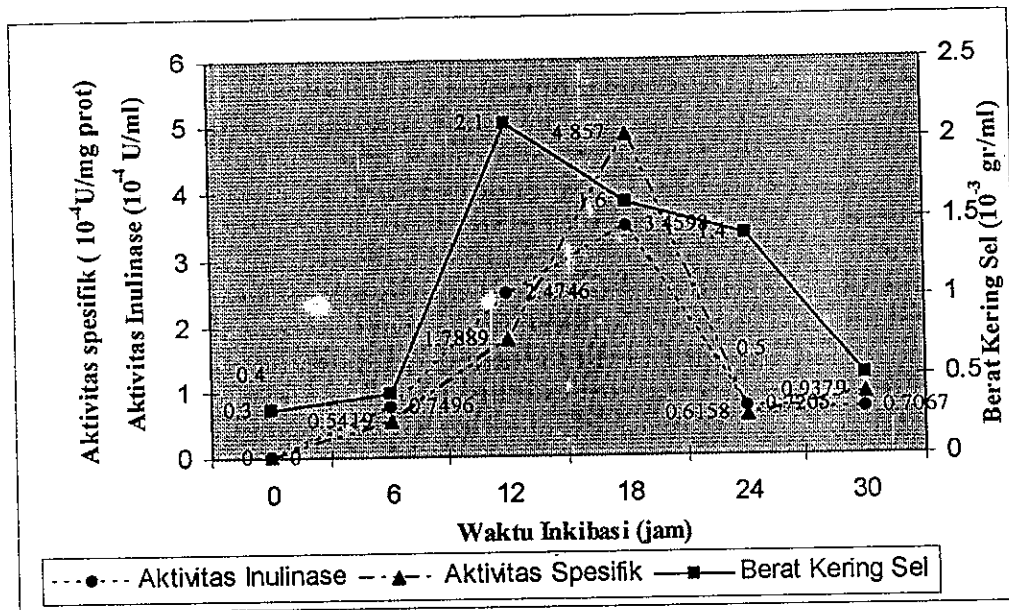
Aktivitas inulinase isolat khamir YD.1 mulai meningkat pada jam ke 6 yaitu sebesar $2,3947 \times 10^{-4}$ U/ml dan mencapai maksimal pada jam ke 12 dengan aktivitas inulinase sebesar $3,7136 \times 10^{-4}$ U/ml demikian juga dengan aktivitas spesifiknya yaitu sebesar $2,5845 \times 10^{-4}$ U/mg protein (Gambar 05.). Aktivitas spesifik dari suatu enzim dapat menggambarkan tingkat kemurnian enzim. Semakin tinggi aktivitas spesifiknya maka semakin tinggi derajat kemurnian enzim tersebut, sehingga semakin besar pula aktivitas enzimnya.

Isolat khamir berada pada fase logaritmik pada jam ke 12 (Gambar 05.), pada fase ini sel akan membelah dengan cepat yang mengakibatkan jumlah sel meningkat pesat. Peningkatan jumlah sel akan menyebabkan produksi inulinase akan semakin meningkat pula. Pada jam ke 18 aktivitas inulinase isolat YD.1 mengalami penurunan demikian pula dengan kurva pertumbuhannya.



Gambar 06. Aktivitas inulinase, aktivitas spesifik dan berat kering sel isolat khamir YD.2 selama 30 jam.

Pada Isolat YD.2 (Gambar 06.) aktivitas enzim inulinase mulai mengalami peningkatan pada jam ke 6 dengan aktivitas inulinase sebesar $1,8103 \times 10^{-4}$ U/ml. Aktivitas inulinase mencapai maksimum pada $13,1415 \times 10^{-4}$ U/ml pada jam ke 18 dengan aktivitas spesifik inulinase sebesar $14,2813 \times 10^{-4}$ U/mg protein. Pada jam ke 18 isolat YD.2 berada pada akhir fase logaritmik dan awal fase stasioner. Inulinase merupakan metabolit primer yang akan dibentuk pada fase logaritmik yang berperan penting dalam proses pertumbuhan sel, produksi inulinase ini akan mencapai optimal pada fase stasioner (Borris, 1987 dalam Wijanarka dkk. 2000) Aktivitas inulinase YD.2 mulai menurun pada jam ke 24 demikian pula dengan pertumbuhan selnya.



Gambar 07. Aktivitas inulinase, aktivitas spesifik dan berat kering sel isolat khamir YD.3 selama 30 jam.

Gambar 07. menunjukkan aktivitas inulinase isolat YD.3 mulai meningkat pada jam ke 6 dengan besar aktivitas sebesar $0,7496 \times 10^{-4}$ U/ml dan mencapai maksimal pada jam ke 18 dengan aktivitas inulinase sebesar $3,1598 \times 10^{-4}$ U/ml. Aktivitas spesifiknya mencapai maksimal pada jam ke 18 dengan besar $4,857 \times 10^{-4}$ U/mg protein. Apabila diamati kurva pertumbuhannya, maka pada jam ke 18 isolat khamir berada pada fase stasioner akhir. Setelah jam ke 18 aktivitas inulinase isolat YD.3 mengalami penurunan begitu juga dengan pertumbuhannya.

Aktivitas inulinase masing – masing isolat khamir mencapai maksimal pada fase pertumbuhan yang berbeda – beda (Gambar 05., 06., dan 07.), pada isolat YD.1 tercapai pada fase pertumbuhan logaritmik, YD.2 pada awal fase stasioner, sedangkan YD.3 pada akhir fase stasioner. Perbedaan aktivitas inulinase ini menunjukkan bahwa ketiga isolat tersebut kemungkinan berasal dari jenis yang berbeda, karena khamir dari jenis berbeda akan memiliki sifat fisiologi yang berbeda pula (Fardiaz, 1992), walaupun dari kenampakan morfologi ketiga isolat

mempunyai kemiripan satu dengan yang lain. Dari pengamatan tersebut isolat YD.2 merupakan isolat yang paling potensial menghasilkan inulinase, dengan aktivitas inulinase $13,1415 \times 10^{-4}$ U/ml aktivitas spesifik inulinasenya $14,2813 \times 10^{-4}$ U/mg protein.

Gambar 05., 07. dan 09. menunjukkan bahwa sampai 6 jam inkubasi aktivitas inulinase dari isolat khamir masih rendah, hal ini dapat disebabkan karena isolat khamir pada saat tersebut masih berada pada fase adaptasi. Pada fase ini sel menyesuaikan diri terhadap kondisi media pertumbuhan yang baru dengan mensintesis enzim yang diperlukan untuk pertumbuhan (Schlegel dan Schmidt, 1995), sehingga jumlah sel belum bertambah secara nyata. Hal ini mengakibatkan aktivitas dan produksi inulinase masih rendah.

Penurunan aktivitas inulinase setelah maksimal dapat diakibatkan oleh adanya fruktosa hasil hidrolisis inulin yang dapat menyebabkan terjadinya represi katabolik terhadap sintesis inulinase. Inulinase merupakan enzim yang bersifat inducibel, yang terbentuk bila ada senyawa atau substrat yang bertindak sebagai inducer yaitu inulin. Menurut Pelczar dan Chan (1986) pengendalian sintesis enzim seperti ini merupakan pengendalian pada taraf genetik yang melibatkan proses induksi dan represi. Represi katabolik akan mempengaruhi pengaturan transkripsi RNA polimerase untuk menghasilkan suatu enzim.

Vandamme dan Derycke (1983 dalam Handayani, 1995) menambahkan bahwa residu glukosa yang dihasilkan dari hidrolisis inulin merupakan inhibitor kerja inulinase, sehingga semakin banyak inulin yang dipecah akan mengakibatkan semakin banyak glukosa yang menjadi inhibitor inulinase.

Jumlah substrat yang semakin menurun dalam medium merupakan faktor lain yang dapat mengakibatkan menurunnya aktivitas inulinase, karena ketersediaan nutrisi bagi isolat khamir semakin terbatas sehingga mengakibatkan pertumbuhan semakin menurun. Dengan menurunnya jumlah sel khamir, akan mengakibatkan penurunan aktivitas dan produksi enzim.

