

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Identifikasi khamir

Dari hasil penelitian, diketahui bahwa isolat khamir DUCC Y4-W penghasil inulinase yang diidentifikasi memiliki ciri-ciri sebagai berikut:

- a. Ciri morfologi :
- Bentuk sel : Bulat
 - Ukuran sel : 5-6,25 μm x 5- 6,25 μm
 - Warna koloni : Putih
 - Tekstur koloni : Halus
 - Permukaan koloni : Cembung
 - Tipe pertumbuhan : Flokulen (mengendap)
 - Reproduksi : Seksual, dengan askospora
Aseksual, dengan budding (tunas)
dan membentuk pseudomiselium.

b. Ciri Fisiologi

Tabel 01. Ciri fisiologi isolat kamir DUCC Y4-W.

Parameter	Hari				
	1	2	7	14	21
Fermentasi senyawa karbon	+	+	+	+	+
Pertumbuhan pada konsentrasi garam :					
a. 10 %			+	+	+
b. 15 %			+	+	+
c. 20 %			+	+	+
Pertumbuhan pada konsentrasi glukosa :					
a. 50 %			+	+	+
b. 60 %			-	-	-
Pertumbuhan pada suhu 37°C			+	+	+
Aktivitas lipolitik			+	+	+
Produksi asam			+	+	+
Aktivitas urease			-	-	-

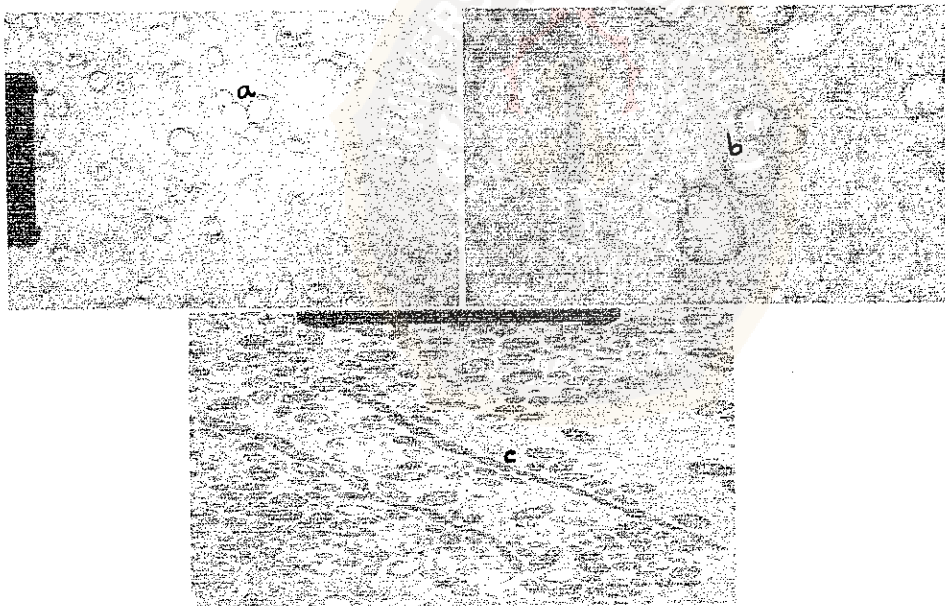
Sumber : Data primer Beti Mardiyati 2002

Keterangan : - = negatif

+ = positif (ada reaksi)

Ciri-ciri morfologi dan fisiologi tersebut kemudian dicocokkan dengan kunci identifikasi dari Kreger van Rij (1987 dalam Barnett *et.al.*, 1989), dan diketahui bahwa isolat khamir DUCC Y4-W tersebut mempunyai kemiripan sifat dengan *Torulospora pretoriensis* (Gambar 03). Spesies ini memiliki taksonomi sebagai berikut:

Kingdom : Fungi
 Divisio : Eumycota
 Subdivisio : Ascomycotina
 Classis : Hemiascomycetes
 Ordo : Endomycetales
 Familia : Saccharomycetaceae
 Genus : *Torulospora*
 Species : *Torulospora pretoriensis*



Gambar 03. Sel Khamir DUCC Y4-W yang sedang budding (a) pada medium YMA dengan perbesaran 400x, membentuk akospora (b) pada medium “Gorodkowa Agar” dengan perbesaran 1000x, dan membentuk pseudomiselium (c), pada medium PDA dengan perbesaran 400x

Secara morfologi spesies ini tidak berbeda jauh dengan jenis khamir lainnya. Bentuk selnya bulat, dengan ukuran $5 - 6,25 \mu\text{m} \times 5 - 6,25 \mu\text{m}$ (Gambar 3a). Pada medium YMA, koloninya berwarna putih dengan tekstur halus dan permukaannya cembung, sedangkan pada medium YMB pertumbuhannya bersifat flokulen (mengendap).

Khamir ini berkembangbiak secara seksual dengan askospora (Gambar 3b), secara aseksual memperbanyak diri dengan *budding* (Gambar 3a) dan kadang membentuk *pseudomiselium* (Gambar 3c).

Khamir DUCC Y4–W yang diduga *T. pretoriensis* memiliki beberapa keistimewaan ditinjau dari ciri-ciri sifat fisiologi yang dimilikinya. Khamir ini mampu memecah inulin menjadi fruktosa menggunakan enzim inulinase yang dihasilkannya. Menurut Xiao *et al.* (1989) Inulinase merupakan enzim adaptif yang memerlukan inulin sebagai induser. Hasil pemecahan inulin berupa fruktosa yang digunakan sebagai sumber karbon utama.

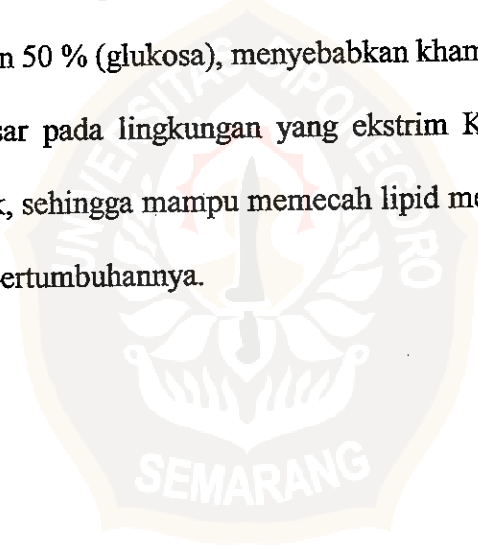
Inulinase selain dihasilkan oleh khamir ini, juga dapat dihasilkan oleh tanaman ketela rambat (*Ipomoea batatas*). Tanaman ini menyimpan inulin sebagai cadangan makanan dalam umbinya, sehingga untuk menggunakan senyawa ini harus dipecah menjadi fruktosa dengan bantuan inulinase. Namun demikian menurut Rouwenhorst *et al.* (1990), aktivitas inulinase dari tanaman tersebut lebih kecil dibandingkan dengan inulinase yang dihasilkan oleh khamir.

Penggunaan khamir sebagai produsen inulinase lebih potensial dibandingkan dengan tanaman karena khamir lebih mudah ditumbuhkan daripada tanaman, waktu generasinya lebih pendek, sehingga produksi enzimnya lebih cepat. Pengendalian lingkungan pertumbuhan untuk memproduksi enzim lebih

mudah dilakukan terhadap sel khamir, sehingga produksi enzim secara fermentasi dapat dilakukan setiap saat (Vandamme and Derycke, 1983 dalam Handayani, 1995)

Khamir DUCC Y4-W yang diduga *T. pretoriensis* mampu tumbuh pada suhu 37°C-40°C, sedangkan aktivitas inulinase yang dihasilkan optimal pada suhu 50°C. Menurut Widjanarka dkk. (2001) sifat ini merupakan keunggulan karena enzim inulinase yang dihasilkan mampu bertahan aktif pada suhu yang relatif tinggi. Berbeda dengan enzim lain yang akan terdenaturasi pada suhu tinggi.

Keistimewaan khamir *T. pretoriensis* sesuai dengan ciri fisiologisnya antara lain adalah mampu tumbuh pada konsentrasi garam dan glukosa cukup tinggi, yaitu 20 % (garam) dan 50 % (glukosa), menyebabkan khamir ini memiliki kesempatan hidup lebih besar pada lingkungan yang ekstrim. Khamir ini juga mempunyai aktivitas lipolitik, sehingga mampu memecah lipid menjadi senyawa-senyawa untuk mendukung pertumbuhannya.



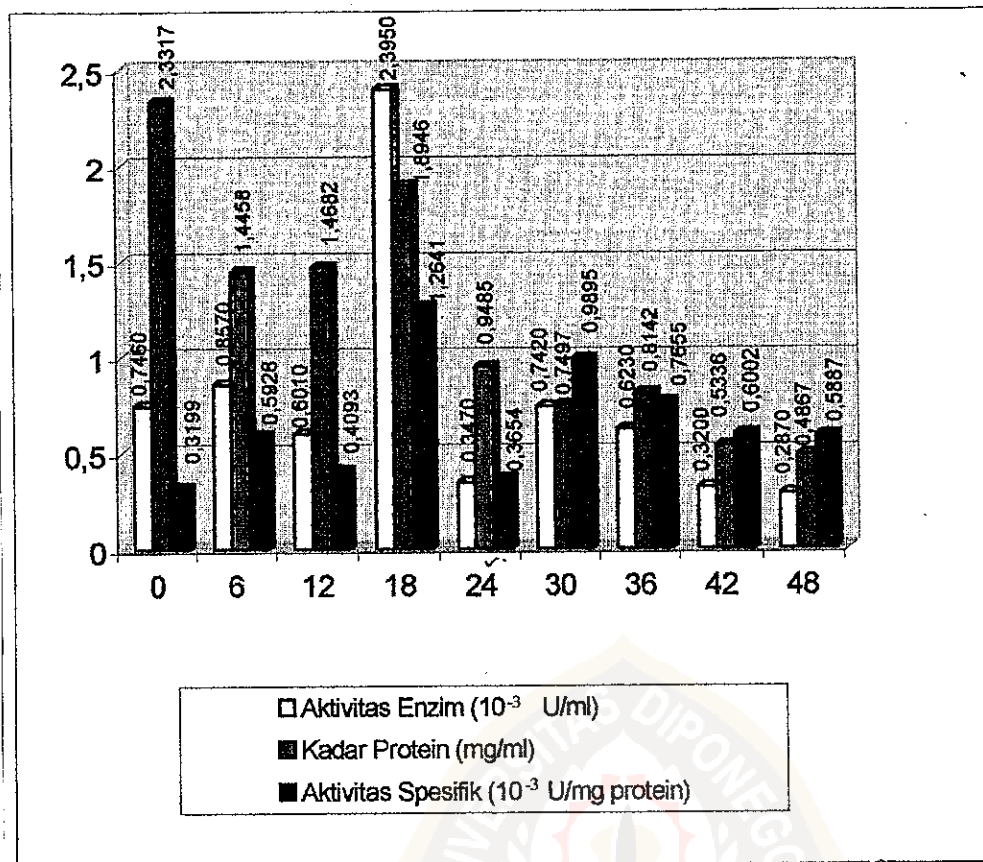
B. Aktivitas Inulinase

Kondisi optimum untuk produksi inulinase oleh galur khamir ini menurut Widjanarka dkk. (2000), adalah pada suhu 40⁰C, pH 4,5, dan waktu inkubasi 48 jam. Aktivitas inulinase dan aktivitas spesifik inulinase dari DUCC Y4-W yang ditumbuhkan pada kondisi tersebut diatas tertera pada Tabel 02.

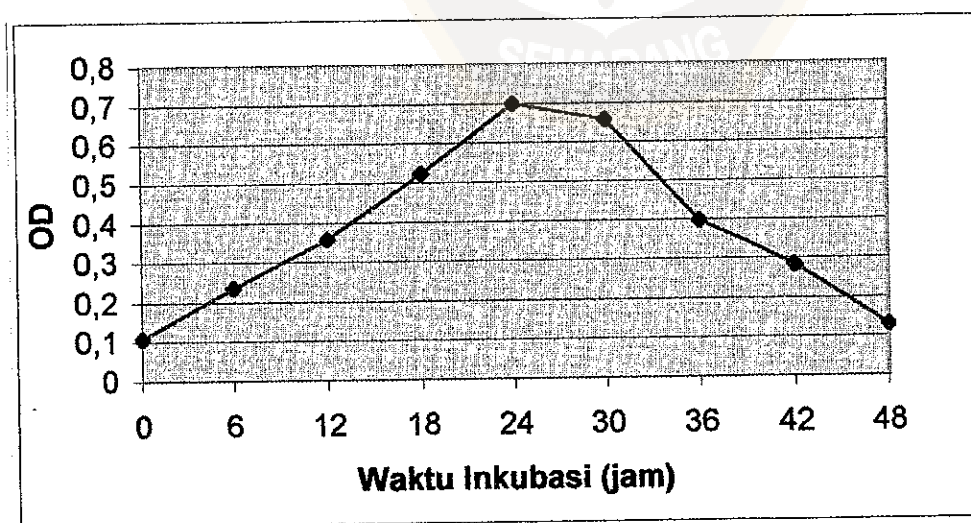
Tabel 02. Aktivitas Inulinase, Kadar Protein, Aktivitas Spesifik Inulinase dan Pertumbuhan sel DUCC Y4-W tiap 6 jam sekali selama 48 jam.

Waktu Inkubasi (jam)	Pertumbuhan Sel (OD)	Aktivitas enzim (10 ³ Unit/ ml)	Kadar Protein (mg/ml)	Aktivitas Spesifik (10 ³ Unit/ mg protein)
0	0,1079	0,7460	2,3317	0,3199
6	0,2365	0,8570	1,4458	0,5928
12	0,3565	0,6010	1,4682	0,4093
18	0,5228	2,3950	1,8946	1,2641
24	0,6989	0,3470	0,9485	0,3654
30	0,6575	0,7420	0,7497	0,9895
36	0,3979	0,6230	0,8142	0,7655
42	0,3200	0,3200	0,5336	0,6002
48	0,2870	0,2870	0,4867	0,5887

Sumber : Data primer Beti Mardiyati 2002



Gambar 04. Aktivitas enzim, kadar protein, dan aktivitas spesifik inulinase dari Khamir DUCC Y4-W tiap 6 jam sekali selama 48 jam



Gambar 05. Kurva Pertumbuhan Khamir DUCC Y4-W selama 48 jam

Inulinase yang dihasilkan oleh khamir DUCC Y4-W dari rhizosfer umbi ketela rambat (*Ipomoea batatas*) merupakan enzim ekstraseluler. Enzim ini menghidrolisis inulin pada ikatan β -2,1, yang akan menghasilkan sejumlah besar fruktosa dan sedikit glukosa. Besarnya aktivitas inulinase dinyatakan sebagai banyaknya fruktosa yang dibebaskan oleh setiap ml enzim per menit (U/ml) (Byun and Nahm, 1978 ; Bajpai and Margaritis, 1987).

Hasil penelitian Handayani (1995) menunjukkan bahwa, aktivitas inulinase dipengaruhi oleh waktu inkubasi. Semakin lama waktu inkubasi akan semakin meningkatkan aktivitas enzim, sampai waktu inkubasi tertentu. Aktivitas enzim selanjutnya akan mengalami penurunan, sejalan dengan bertambahnya waktu inkubasi.

Aktivitas inulinase khamir DUCC Y4-W mencapai maksimum (2,3950U/ml) pada waktu inkubasi 18 jam , yang menunjukkan jumlah molekul fruktosa yang dibebaskan oleh 1ml enzim per menit adalah 2,3950 μ mol (Gambar 04). Pada keadaan ini kurva pertumbuhan berada pada fase logaritmik hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Allais *et al.* (1986). Pada fase ini sel-sel khamir memerlukan nutrisi yang cukup untuk mendukung kecepatan pertumbuhannya, sehingga inulinase yang dihasilkan meningkat, untuk memecah inulin yang tersedia sebagai satu-satunya sumber karbon menjadi fruktosa .

Setelah waktu inkubasi 18 jam aktivitas inulinase mengalami penurunan, hal ini kemungkinan terjadi karena adanya penghambatan terhadap pembentukan inulinase. Adanya fruktosa hasil hidrolisis inulin dapat menyebabkan terjadinya represi katabolik terhadap sintesis inulinase. Menurut Wang *et al.* (1979, dalam Martien, 2000) represi katabolik dapat terjadi ketika suatu organisme berada pada

medium yang mengandung sumber energi seperti fruktosa. Fruktosa dalam jumlah banyak akan menghambat sintesis protein (enzim), sehingga produksi enzim menurun, kadar protein dalam medium menurun, dan aktivitas enzim juga menurun.

Vandamme and Derycke (1983 dalam Handayani, 1995) menyatakan bahwa residu glukosa hasil hidrolisis inulin dapat menjadi inhibitor bagi proses pembentukan inulinase. Semakin banyak inulinase yang dihasilkan semakin banyak inulin yang dihidrolisis, sehingga residu glukosa yang dihasilkan semakin meningkat, hal ini akan menyebabkan penghambatan terhadap pembentukan inulinase.

Selama pertumbuhan dalam waktu inkubasi 48 jam, aktivitas hidup sel akan menghasilkan asam organik yang dapat menurunkan pH medium. Dalam penelitian ini pH medium turun dari 4,5 pada awal inkubasi menjadi 4, hal ini kemungkinan mempengaruhi kondisi optimum untuk pertumbuhan, sehingga laju pertumbuhan pada masa akhir inkubasi mengalami penurunan. Proses ini berlangsung seiring dengan berkurangnya nutrisi, terutama fruktosa sebagai sumber karbon, dan juga penurunan kadar protein pada medium pertumbuhan (Gambar 04 dan Gambar 05).

Aktivitas spesifik enzim inulinase dalam penelitian ini mencapai maksimum pada waktu inkubasi 18 jam yaitu sebesar 1,2641 U/mg protein (Gambar 04). Aktivitas spesifik dari suatu enzim dapat digunakan untuk mengetahui derajat kemurnian enzim, menurut Handayani (2002) semakin besar aktivitas spesifiknya semakin tinggi derajat kemurnian enzim, sehingga semakin besar pula aktivitasnya dalam menghidrolisis substrat.

Dalam penelitian ini waktu inkubasi 18 jam merupakan waktu terbaik untuk memproduksi inulinase, karena aktivitas inulinase dan aktivitas spesifik mencapai nilai tertinggi. Penerapan waktu inkubasi ini penting dalam industri inulinase, sehingga proses produksi bisa lebih efektif dan efisien.

