

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian dilakukan untuk mengidentifikasi dan menguji aktivitas inulinase isolat khamir YD.2 dari rhizosfer umbi dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.) di daerah Bandung-Ambarawa.

A. Identifikasi Khamir

Dari penelitian terhadap identifikasi isolat khamir YD.2, diperoleh hasil sebagai berikut:

1. Sifat morfologi isolat khamir YD.2

Tabel 01. Sifat morfologi isolat khamir YD.2 dari rhizosfer umbi dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.) di daerah Bandung-Ambarawa

No	Jenis Uji Morfologi	Parameter	Hasil Pengamatan
1	Sel vegetatif dan karakteristik kultur	a. Bentuk sel	Oval
		b. Ukuran sel	2 – 9 μm x 2 – 6 μm
		c. Koloni pada YMA	
		(i) Warna	Krem
		(ii) Permukaan	Cembung
		(iii) Tepian	Rata
		(iv) Tekstur	Halus
		d. Kultur pada YMB	
(i) Tipe pelikel	“Islets”		
(ii) Tipe deposit	Flokulen		
2	Reproduksi Aseksual	“Budding”	“Budding” multipolar
3	Reproduksi Seksual	Askospora	Askospora berbentuk bulat dan bertepi halus
4	Morfologi Khusus	a. Pseudomiselium	Tidak ada
		b. Arthrospora	Tidak ada
		c. Blastospora	Tidak ada
		d. Endospora	Tidak ada
		e. Khlamidospora	Tidak ada
5	Ballistospora	Pola sporulasi	Tidak ada

Sumber data primer: Linda Dwi Purnomowati (2003)

Berdasarkan hasil penelitian terhadap sifat morfologi (Tabel 01.), pada perbesaran mikroskop 400x isolat khamir YD.2 mempunyai sel yang bersifat uniseluler dan berbentuk oval (Gambar 11.) dan pada perbesaran mikroskop 1000x diketahui selnya mempunyai ukuran panjang antara 2 – 9 μm dan lebar antara 2 – 6 μm . Berdasarkan hasil penelitian terhadap karakteristik kultur (Tabel 01.), pertumbuhan isolat khamir YD.2 pada medium “Yeast Malt Extract Agar” (YMA) menunjukkan koloni yang berwarna krem, permukaannya cembung, tepinya rata dan teksturnya halus. Pertumbuhan isolat khamir YD.2 pada medium “Yeast Malt Extract Broth” (YMB) menunjukkan tipe pelikel “islets” dan tipe deposit flokulen.

Tipe pelikel “islets” adalah karakteristik kultur yang membentuk lapisan di atas permukaan medium nutrisi cair. Tipe deposit flokulen adalah deposit yang terbentuk karena perpindahan pertumbuhan sel-sel khamir dari permukaan medium menuju bagian bawah permukaan medium karena terjadi penurunan kebutuhan oksigen dalam pertumbuhan dan biasanya mempunyai tekstur seperti mukosa (Kratochvilova *et al.*, 1990).

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap reproduksi aseksual dan seksual (Tabel 01.), pada perbesaran mikroskop 400x reproduksi aseksual isolat khamir YD. adalah dengan cara “budding” multipolar (Gambar 12.1.) dan reproduksi seksualnya adalah dengan membentuk askospora yang berbentuk bulat dan bertepi halus (Gambar 12.2.).

“Budding” multipolar adalah pembentukan tunas di sekitar ujung sel. “Budding” sel diawali dengan terbentuknya suatu saluran dari vakuola di dekat nukleus menuju dinding sel induk yang terdekat dengan vakuola. Terjadinya penipisan dinding sel menyebabkan protoplasma akan tersembul ke luar sebagai calon tunas pada dinding sel tersebut, kemudian membesar dan diisi dengan komponen-komponen nukleus dan sitoplasma dari sel induk melalui saluran yang terbentuk. Tunas akan terus tumbuh, membentuk dinding sel baru, dan jika ukuran tunas sudah hampir sama besar dengan sel induknya, komponen-komponen nukleus terpisah menjadi dua dan terbentuk dinding penyekat antara sel induk dan sel anak. Selanjutnya sel anak melepaskan diri dari sel induk, atau tetap menempel pada sel induk dan membentuk tunas baru (Fardiaz, 1992).

Askospora dibentuk melalui tiga tahap yaitu plasmogami, karyogami dan meiosis. Plasmogami adalah proses penyatuan protoplasma dari dua buah sel diploid dan dilanjutkan dengan pembelahan dari masing-masing inti sel secara bersamaan (pembelahan terkonjugasi) menghasilkan inti haploid. Karyogami adalah proses bersatunya dua inti haploid menjadi inti zigot diploid. Meiosis terjadi pada inti zigot diploid bersamaan dengan pembentukan askus. Askospora yang terbentuk bersifat haploid (Schlegel & Schmidt, 1994).

Berdasarkan hasil penelitian terhadap morfologi khusus (Tabel 01.), isolat khamir YD.2 tidak membentuk pseudomiselium, arthrospora, blastospora, endospora, dan khlamidospora. Berdasarkan hasil penelitian terhadap ballistospora (Tabel 01.), isolat khamir YD.2 tidak membentuk ballistospora.

2. Sifat fisiologi isolat khamir YD.2

Tabel 02. Sifat fisiologi isolat khamir YD.2 dari rhizosfer umbi dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.) di daerah Bandungan-Ambarawa

No	Jenis Uji Fisiologi	Parameter	Hasil Pengamatan Hari Ke-					
			1	2	7	14	21	
1	Fermentasi glukosa	Gas dalam tabung Durham	+	++	+++	++	++	
2	Aktivitas urease	Perubahan warna medium dari putih menjadi merah jambu	-	-	+	++	++	
3	Aktivitas lipolitik	Zona jernih di sekitar koloni	-	-	+	++	++	
4	Produksi asam	Zona jernih di sekitar koloni	-	-	+	++	+++	
5	Pertumbuhan pada suhu 37°C	Adanya koloni yang tumbuh pada medium			+	++	+++	
6	Pertumbuhan pada garam (NaCl) konsentrasi tinggi	Kekeruhan dan flokulen						
			a. 10%			+	++	++
			b. 15%			+	+	++
			c. 20%			+	+	++
7	Pertumbuhan pada glukosa konsentrasi tinggi	Pertumbuhan koloni						
			a. 50%			+	++	++
			b. 60%			-	-	-

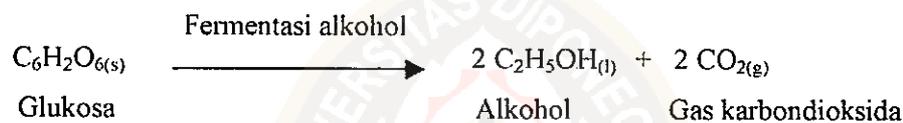
Sumber data primer: Linda Dwi Purnomowati (2003)

Keterangan:

1. Ada parameter sedikit (+), cukup banyak (++) dan banyak (+++)
2. Tidak ada parameter (-)

Pengamatan sifat fisiologi isolat khamir YD.2 dilakukan melalui pengamatan reaksi fisiologi yang dihasilkan selama pertumbuhannya pada berbagai medium uji. Berdasarkan hasil penelitian terhadap sifat fisiologi (Tabel 02.), isolat khamir YD.2 mempunyai kemampuan untuk memfermentasi senyawa karbon (glukosa), aktivitas urease, aktivitas lipolitik, produksi asam, tumbuh pada suhu 37°C serta tumbuh pada garam (NaCl) dan glukosa konsentrasi tinggi.

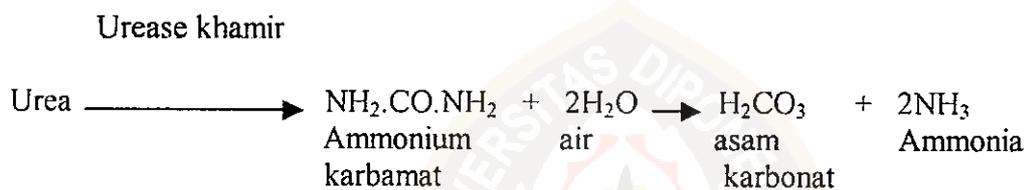
Fermentasi adalah penguraian metabolik senyawa organik oleh mikroorganisme yang menghasilkan energi, umumnya berlangsung pada kondisi anaerobik dan disertai pembebasan gas (Pudjaatmaka & Susilowati, 1987). Berdasarkan hasil penelitian terhadap fermentasi glukosa (Tabel 02.), isolat khamir YD.2 mampu memfermentasi glukosa pada kondisi anaerobik untuk memperoleh energi dan disertai pembebasan gas karbondioksida. Jenis fermentasi ini disebut fermentasi alkohol, sedangkan khamirnya digolongkan sebagai khamir fermentatif. Menurut Brock *et al.* (1984), total reaksi fermentasi alkohol adalah sebagai berikut:



Gambar 03. Total reaksi fermentasi alkohol khamir

Urease adalah enzim yang berperan dalam hidrolisis urea menjadi ammonium karbamat, yang mudah terhidrolisis menjadi senyawa asam yaitu asam karbonat dan senyawa basa yaitu ammonia, enzim ini dapat dihasilkan oleh khamir. Asam karbonat menyebabkan medium menjadi bersifat asam, sedangkan ammonia sangat mungkin digunakan sebagai sumber nitrogen untuk sintesis protein sel (Barnett *et al.*, 1990). Berdasarkan hasil penelitian terhadap aktivitas urease (Tabel 02.), menunjukkan adanya aktivitas urease isolat khamir YD.2 pada medium "Urea Agar".

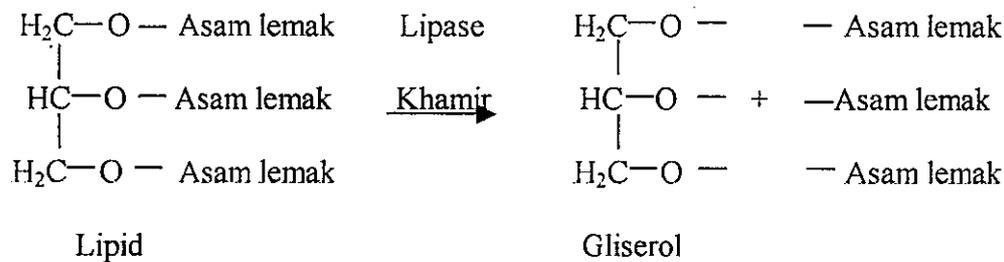
Reaksi positif pada uji aktivitas urease ditunjukkan dengan adanya perubahan warna medium dari putih menjadi merah jambu. Perubahan warna medium tersebut terjadi karena perubahan pH medium dari basa menjadi asam, sehingga indikator fenol merah yang ditambahkan ke dalam medium akan berubah warna dari kuning menjadi merah. Indikator pH fenol merah berfungsi pada pH antara 6.8-8.4 dengan perubahan warna menjadi kuning pada kondisi basa dan menjadi merah pada kondisi asam (Harrow *et al.*, 1960). Menurut Brock *et al.* (1984), total reaksi aktivitas urease khamir adalah sebagai berikut:



Gambar 04. Total reaksi aktivitas urease khamir

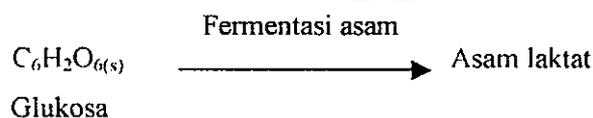
Khamir yang menghasilkan lipase mempunyai aktivitas lipolitik. Zona jernih terjadi karena hasil hidrolisis lipid berupa gliserol dan asam lemak bersifat larut dalam medium, sehingga dapat digunakan sebagai sumber karbon, sedangkan lipid bersifat tidak larut (Brock *et al.*, 1984). Berdasarkan hasil penelitian terhadap aktivitas lipolitik (Tabel 02.), isolat khamir YD.2 mempunyai aktivitas lipolitik karena menghasilkan lipase untuk menghidrolisis lipid pada medium "Tributyryn Agar", yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona jernih di sekitar koloni.

Menurut Brock *et al.* (1984), total reaksi aktivitas lipolitik khamir adalah sebagai berikut:



Gambar 05. Total reaksi aktivitas lipolitik khamir

Berdasarkan hasil penelitian terhadap produksi asam (Tabel 02.), isolat khamir YD.2 mempunyai kemampuan untuk memproduksi asam pada medium "Glucose Chalk Agar", yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona jernih di sekitar koloni. Zona jernih terjadi karena glukosa pada medium difermentasi oleh khamir menjadi senyawa asam laktat (Brock *et al.*, 1984). Total reaksi produksi asam khamir adalah sebagai berikut:



Gambar 06. Total reaksi produksi asam khamir

Garam (NaCl) atau glukosa konsentrasi tinggi yang terdapat dalam suatu medium menyebabkan medium tersebut menjadi hipertonik terhadap sel khamir dan terjadi osmosis yang menyebabkan plasmolisis (Dwidjoseputro, 1989). Berdasarkan hasil penelitian terhadap pertumbuhan pada garam (NaCl) dan glukosa konsentrasi tinggi (Tabel 02.), isolat khamir YD.2 mampu tumbuh pada medium garam 20 % dan gula 50 %. Kadar tersebut merupakan kadar yang tinggi bagi pertumbuhan khamir, karena pada umumnya khamir tumbuh pada kadar garam antara <5%-20% (Garraway & Evans, 1984) dan kadar glukosa antara 1-10% (Kratochvilova, 1990). Mikroorganisme yang mampu tumbuh pada medium dengan kadar garam dan glukosa tinggi digolongkan sebagai mikroorganisme halofilik dan osmofilik (Rahayu & Sudarmadji, 1989).

Berdasarkan hasil penelitian terhadap pertumbuhan pada suhu 37°C (Tabel 02.), isolat khamir YD.2 ternyata tumbuh baik. Mikroorganisme yang tumbuh pada suhu optimum 25°C-40°C digolongkan sebagai mikroorganisme mesofilik (Dwidjoseputro, 1989).

Sifat-sifat morfologi dan sifat-sifat fisiologi isolat khamir YD.2 selanjutnya dicocokkan dengan kunci identifikasi dari Kreger Van-Rij (1987 dalam Barnett *et al.*, 1990). Dengan telah diketahuinya kemampuan isolat khamir YD.2 dalam memproduksi inulinase, identifikasi menjadi lebih mudah karena sudah terarah pada khamir-khamir yang tumbuh pada medium yang mengandung inulin. Dari hasil identifikasi, disimpulkan bahwa isolat khamir YD.2 mempunyai kemiripan sifat dengan jenis

Zygosaccharomyces fermentati, yang mempunyai klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom	: Fungi
Divisio	: Eumycota
Subdivisio	: Ascomycotina
Classis	: Hemiascomycetes
Ordo	: Endomycetales
Familia	: Saccharomycetaceae
Genus	: <i>Zygosaccharomyces</i>
Spesies	: <i>Zygosaccharomyces fermentati</i>

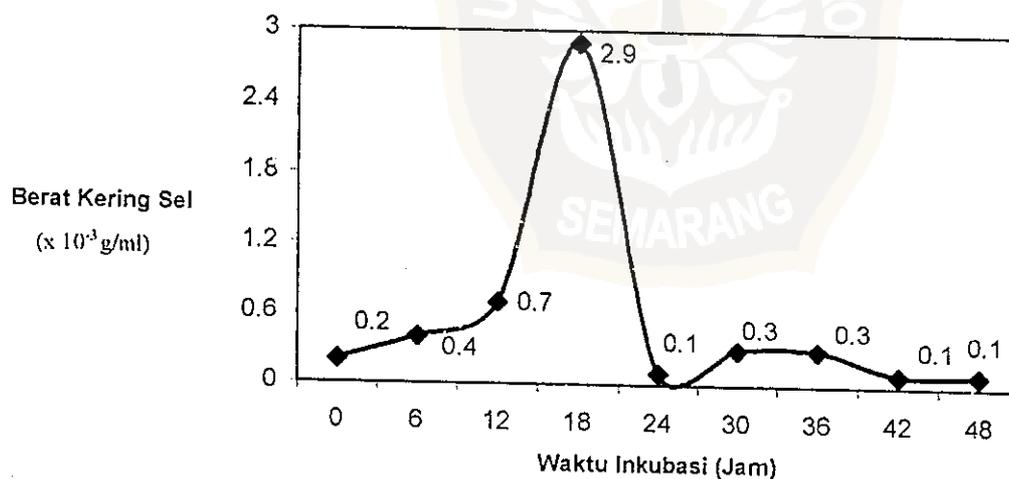
B. Uji Aktivitas Inulinase

Inulinase adalah enzim adaptif yang disintesis oleh isolat khamir YD.2 untuk memecah sumber karbon inulin pada medium pertumbuhannya. Sintesis inulinase dipengaruhi oleh faktor pertumbuhan yaitu medium dengan inulin sebagai satu-satunya sumber karbon, suhu 40°C, pH 4.5 dan agitasi 100 rpm (Xiao *et al.*, 1988) serta dipengaruhi juga oleh faktor genetis yaitu adanya gen struktural yang menentukan sintesis inulinase dalam hal urutan asam aminonya (Pelczar, 1986).

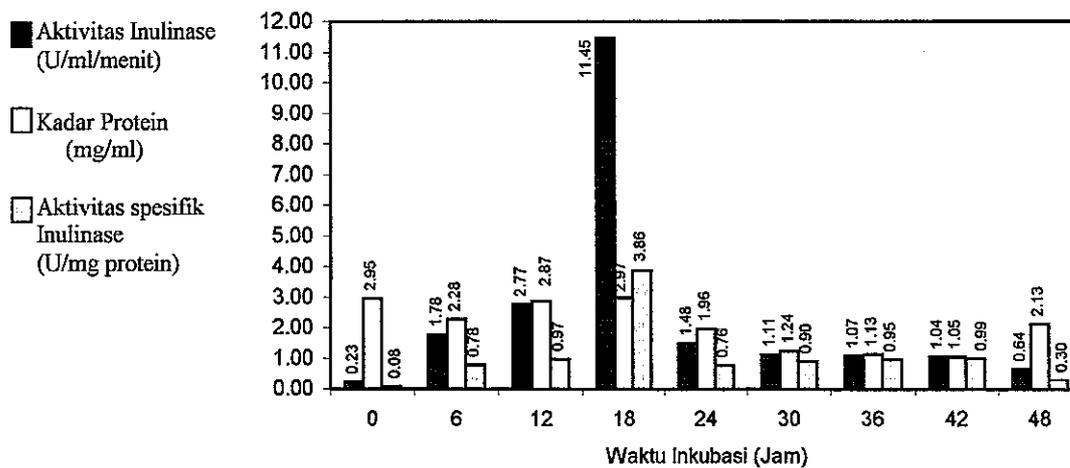
Sintesis inulinase selama pertumbuhan khamir dipengaruhi oleh mekanisme induksi enzim yang menyebabkan terjadinya sintesis enzim dan mekanisme represi enzim yang menyebabkan terhambatnya sintesis enzim (Schumm, 1993). Jumlah inulinase yang disintesis oleh khamir ditentukan dengan cara uji aktivitas inulinase (Sadikin, 2002).

Aktivitas inulinase khamir dipengaruhi oleh faktor genetis yaitu berhubungan dengan lamanya pertumbuhan yang tergantung pada jenis khamir (Pelczar, 1986) serta dipengaruhi juga oleh konsentrasi enzim dan substrat, suhu, pH dan inhibitor (Poedjiadi, 1994). Inulinase merupakan enzim termotoleran sehingga tidak mudah terdenaturasi dan memberikan keuntungan dalam industri enzim (Park *et al.*, 2001). Aktivitas inulinase terjadi pada suhu 50°C dan pH 4.5 yang menyebabkan adanya gerak termodinamik dan terbentuknya struktur molekul inulinase yang fungsional untuk terjadinya aktivitas inulinase. Aktivitas inulinase ditentukan dengan menggunakan parameter aktivitas enzim, kadar protein dan aktivitas spesifik enzim.

Dari penelitian terhadap uji aktivitas inulinase isolat khamir YD.2, diperoleh hasil sebagai berikut:



Gambar 07. Kurva pertumbuhan isolat khamir YD.2 dari rhizosfer umbi dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.) di daerah Bandungan-Ambarawa setiap 6 jam selama waktu inkubasi 48 jam.



Gambar 08. Histogram aktivitas inulinase, kadar protein , dan aktivitas spesifik inulinase isolat khamir YD.2 dari rhizosfer umbi dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.) di daerah Bandungan-Ambarawa setiap 6 jam selama waktu inkubasi 48 jam.

Tabel 03. Perbandingan rata-rata hasil perlakuan untuk uji aktivitas inulinase pada taraf signifikan 1%

Waktu Inkubasi (Jam)	Aktivitas Inulinase (U/ml substrat/menit)	Kadar Protein (mg/ml)	Aktivitas Spesifik Inulinase (U / mg protein)
0	0.23 ^b	2.95 ^a	0.08 ^b
6	1.78 ^b	2.28 ^b	0.78 ^b
12	2.77 ^b	2.87 ^a	0.97 ^b
18	11.45 ^a	2.97 ^a	3.86 ^a
24	1.48 ^b	1.96 ^b	0.76 ^b
30	1.11 ^b	1.24 ^c	0.90 ^b
36	1.07 ^b	1.13 ^c	0.95 ^b
42	1.04 ^b	1.05 ^c	0.99 ^b
48	0.64 ^b	2.13 ^b	0.30 ^b

Keterangan:

Angka dengan superskrip huruf yang sama di kolom yang sama menunjukkan hasil perlakuan yang berbeda sangat tidak nyata pada taraf signifikan 1 %.

Berdasarkan hasil penelitian terhadap uji aktivitas inulinase, menunjukkan kurva pertumbuhan (Gambar 07.), histogram uji aktivitas inulinase, kadar protein dan aktivitas spesifik inulinase (Gambar 08.) serta perbandingan rata-rata hasil perlakuan (Tabel 03.) isolat khamir YD.2. Selama pertumbuhannya pada medium produksi inulinase (Lampiran 01.), isolat khamir YD.2 mensintesis inulinase ekstraseluler. Enzim tersebut diisolasi dengan cara sentrifugasi sehingga diperoleh inulinase supernatan yang digunakan untuk uji aktivitas inulinase.

Berdasarkan kurva pertumbuhan isolat khamir YD.2 (Gambar 07.), menunjukkan tidak terdapat fase lag karena dalam penelitian ini digunakan starter yang ditumbuhkan pada medium yang sama. Pertumbuhan khamir langsung terjadi pada fase logaritmik dilanjutkan dengan fase stasioner dan diakhiri dengan fase kematian.

Fase logaritmik khamir terjadi pada waktu inkubasi antara 0-18 jam dan berat kering sel antara 0.2×10^{-3} - 2.9×10^{-3} g / ml. Selama fase ini sel-sel membelah diri secara logaritmik dan diproduksi inulinase ekstraseluler untuk memecah sumber karbon inulin (Pelczar, 1986) sehingga aktivitas inulinase, kadar protein dan aktivitas spesifik inulinase dapat diukur.

Nilai aktivitas inulinase selama fase logaritmik khamir semakin meningkat seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi (Gambar 08.), dimana nilainya berbeda sangat tidak nyata antara waktu inkubasi 0, 6 dan 12 jam dan berbeda sangat nyata pada waktu inkubasi 18 jam pada taraf signifikan 1 % (Tabel 03.). Hal ini terjadi karena adanya peningkatan kebutuhan sel terhadap sumber karbon inulin.

Kadar protein selama fase logaritmik khamir menunjukkan nilai yang tinggi pada waktu inkubasi 0 jam, kemudian menurun pada waktu inkubasi 6 jam dan meningkat sampai waktu inkubasi 18 jam (Gambar 08.), dimana nilainya berbeda sangat tidak nyata antara waktu inkubasi 0, 12 dan 18 jam dan berbeda sangat nyata pada waktu inkubasi 6 jam pada taraf signifikan 1 % (Tabel 03.). Hal ini terjadi karena sel-sel khamir aktif mensintesis protein sebagai protein enzim dan adanya protein medium.

Nilai aktivitas spesifik inulinase selama fase logaritmik khamir semakin meningkat seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi (Gambar 08.), dimana nilainya berbeda sangat tidak nyata antara waktu inkubasi 0, 6 dan 12 jam dan berbeda sangat nyata pada waktu inkubasi 18 jam pada taraf signifikan 1 % (Tabel 03.). Hal ini terjadi karena adanya peningkatan sintesis protein enzim oleh sel khamir. Jumlah nutrisi yang semakin berkurang pada medium dan diikuti penimbunan zat racun sebagai hasil akhir metabolisme, menyebabkan pertumbuhan dan kematian sel berlangsung seimbang sehingga memasuki fase stasioner.

Fase stasioner khamir terjadi pada waktu inkubasi 18 jam, dengan berat kering sel 2.9×10^{-3} g/ml (Gambar 07.). Selama fase ini terjadi akumulasi produk metabolisme beracun dalam sel atau dalam media dan terhambatnya sintesis enzim karena berkurangnya nutrisi pada medium atau adanya represi katabolit. Pada fase stasioner khamir diperoleh nilai aktivitas inulinase yang paling optimal yaitu sebesar 11.45 U/ml substrat / menit (Gambar 08.)

dan berbeda sangat nyata dengan nilai aktivitas inulinase pada waktu inkubasi 0, 6, 12, 24, 30, 36, 42 dan 48 jam pada taraf signifikan 1 % (Tabel 03.). Hal ini terjadi karena sel-sel khamir tumbuh paling optimum pada fase stasioner sehingga kebutuhan inulin sebagai sumber karbon ada dalam jumlah yang paling tinggi.

Kadar protein inulinase yang diperoleh pada fase stasioner khamir menunjukkan nilai sebesar 2.97 mg / ml (Gambar 08.), nilai ini berbeda sangat nyata dengan nilai kadar protein pada waktu inkubasi 6, 24, 30, 36, 42 dan 48 jam tetapi berbeda sangat tidak nyata dengan nilai kadar protein pada waktu inkubasi 0 dan 12 jam pada taraf signifikan 1 % (Tabel 03.). Hal ini terjadi karena protein yang disintesis oleh sel-sel khamir selama pertumbuhannya terakumulasi pada fase stasioner.

Nilai aktivitas spesifik inulinase tertinggi dicapai pada fase stasioner khamir yaitu sebesar 3.86 U / mg protein (Gambar 08.) yang berbeda sangat nyata dengan nilai aktivitas inulinase pada waktu inkubasi 0, 6, 12, 24, 30, 36, 42 dan 48 jam pada taraf signifikan 1 % (Tabel 03.). Hal ini terjadi karena pada fase stasioner terjadi akumulasi protein enzim yang disintesis selama pertumbuhan khamir (Byun & Nahm, 1978), selain itu juga karena pada fase ini masih terjadi sintesis enzim (Schlegel & Schmidt, 1994).

Fase kematian khamir terjadi pada waktu inkubasi antara 24-48 jam dengan berat kering sel antara 0.1×10^{-3} – 0.3×10^{-3} g / ml (Gambar 07.). Selama fase ini terjadi kematian sel-sel khamir secara eksponensial yang dipengaruhi oleh aktivitas otolisis untuk memperoleh nutrisi, karena nutrisi pada medium sudah habis (Schlegel & Schmidt, 1994).

Aktivitas inulinase selama fase kematian khamir nilainya menurun pada waktu inkubasi 24 jam, meningkat pada waktu inkubasi 30,36 dan 42 jam, kemudian menurun kembali pada waktu inkubasi 48 jam (Gambar 08.), dimana semua nilainya berbeda sangat tidak nyata pada taraf signifikan 1 % (Tabel 03.). Hal ini terjadi karena sumber karbon inulin pada medium sudah habis digunakan untuk pertumbuhan khamir.

Kadar protein yang diperoleh selama fase kematian khamir nilainya menurun pada waktu inkubasi 24, 30, 36 dan 42 jam, kemudian meningkat pada waktu inkubasi 48 jam (Gambar 08.), dimana nilainya berbeda sangat nyata antara waktu inkubasi 24 dan 48 jam, tetapi berbeda sangat tidak nyata antara waktu inkubasi 30, 36 dan 42 jam pada taraf signifikan 1 % (Tabel 03.). Hal ini terjadi karena adanya akumulasi protein dari proses kematian sel-sel khamir dengan cara otolisis.

Aktivitas spesifik inulinase selama fase kematian khamir nilainya menurun pada waktu inkubasi 24 jam kemudian meningkat pada waktu inkubasi 30, 36 dan 42 jam dan menurun kembali pada waktu inkubasi 48 jam (Gambar 08.), dimana semua nilainya berbeda sangat tidak nyata pada taraf signifikan 1 % (Tabel 03.). Hal ini terjadi karena otolisis sel-sel khamir yang menyebabkan peningkatan kadar protein medium.