

Judul Artikel :

Penapisan Khamir Inulinolitik Jawa Tengah dan Pengujian Aktivitas Inulinasenya

Arina T.L¹⁾; Wijanarka²⁾ and Endang K³⁾

¹⁾²⁾ Lab. Mikrobiologi –FMIPA Universitas Diponegoro Semarang, Indonesia. ³⁾ Lab. Biokimia- FMIPA Universitas Diponegoro Semarang

Pendahuluan

Inulin yang merupakan polimer fruktosa ini dapat digunakan sebagai substrat pada industri makanan maupun industri fermentasi. Inulin mempunyai banyak kegunaan terutama dibidang pangan dan kesehatan. Di bidang kesehatan, unilin antara lain berperan mencegah kanker usus besar dan penyakit jantung (Tungland, 2000). Sifat fungsional inulin sebagai serat makanan yang dapat larut (*Soluble Dietary Fiber*) sangat bermanfaat bagi pencernaan dan kesehatan tubuh secara umum. Inulin mempunyai sifat yang unik yaitu larut dalam air namun tidak dapat dicerna oleh enzim-enzim yang berada pada sistem pencernaan mamalia sehingga inulin mencapai usus besar tidak mengalami perubahan struktur. Hal inilah yang nantinya akan digunakan oleh mikrofolra yang terdapat didalam usus besar, yang mana dapat diimplifikasikan positif terhadap kesehatan inang, baik itu manusia ataupun binatang. Oleh karena itu inulin dapat digunakan dan dimanfaatkan sebagai prebiotik.

Prebiotik seperti *IOS* memiliki peluang pasar yang baik untuk dikembangkan pengadaannya. Namun produksi *IOS* di Indonesia sampai saat ini belum dapat berkembang dengan baik, karena 1) belum adanya produsen *IOS*, 2) belum diketahui adanya bahan dasar untuk produksi *IOS* yang secara alami sudah tersedia yaitu umbi dahlia (*Dahlia variabilis* Willd) , 3) hidrolisis inulin menjadi fruktosa dengan menggunakan asam pada suhu tinggi akan menghasilkan fraksi warna yang gelap serta hasil samping yang tak diinginkan seperti difruktofuranoanhidrida (Allais *et al.*, 1986; Xiao *et al.*, 1998). 4) *IOS* sebagai produk prebiotik belum populer, padahal sangat berpengaruh positif bagi kesehatan manusia. Salah satu mikrobia yang dapat menghasilkan *IOS* adalah khamir inulinolitik

Khamir inulinolitik diisolasi dari *Tropical Bioresources* pada tanaman *Dahlia variabilis* Willd di Jawa Tengah. Isolat khamir terpilih akan diuji kemampuannya dalam

menghasilkan enzim endonulinase untuk produksi *IOS Ingredient Food* prebiotik dan aplikasinya terhadap bakteri uji (BAL). Mengingat potensi khamir inulinolitik dan kandungan inulin (berkisar 65,7% per 100 gr umbi) pada tanaman dahlia sangat tinggi, prospektif, komersial dan sampai saat ini belum pernah di lakukan kajian secara mendalam di Indonesia maka perlu dilakukan penelitian.

Tujuan Penelitian

Penelitian bertujuan untuk : 1) Mendapatkan khamir inulinolitik yang potensial dalam menghasilkan enzim inulinase. 2) Identifikasi dan karakterisasi khamir inulinolitik terpilih.

Metodelogi

Tahap pertama umbi dahlia (1 gr) dibuat suspensi selanjutnya ditumbuhkan pada medium selektif yang mengandung inulin sebagai satu-satunya sumber karbon. Isolat yang tumbuh dan menghasilkan inulinase tertinggi ditetapkan sebagai isolat terpilih. Sedangkan tahap kedua meliputi optimasi sumber karbon (inulin) dengan konsentrasi (0,25;0,5 dan 0,75%) dan optimasi berupa konsentrasi nitrogen (0,1; 0,25 dan 0,50%) dengan pH medium 5,5. Data yang diperoleh dianalisis dengan ANOVA dan apabila berbeda nyata atau sangat nyata dilanjutkan dengan uji t dengan taraf kepercayaan 1%. Pada tahap ini juga dilakukan tes rasio stabilitas inulinase. Tahap berikutnya identifikasi dan karakterisasi khamir inulinolitik terpilih.

Hasil dan pembahasan

A. Survey dan pengambilan sample umbi dahlia

Sampel diambil dari umbi tanaman *Dahlia variabilis* Willd di Jawa Tengah (Bandungan, Tawangmangu dan Baturraden-Purwokerto). Daerah Bandungan, untuk mewakili isolat khamir Jawa Tengah bagian Utara ; Daerah Baturraden – Purwokerto, untuk mewakili isolat khamir inulinolitik Jawa Tengah bagian Barat dan Daerah Tawangmangu, untuk mewakili isolat khamir inulinolitik Jawa Tengah bagian Selatan. Sampel umbi dahlia untuk masing-masing daerah dapat dilihat pada Gambar 1, 2 dan 3.



Gambar 1. Umbi dahlia Bandungan



Gambar 2. Umbi dahlia Purwokerto



Gambar 3. Umbi dahlia Tawangmangu

B. Eksplorasi dan isolasi khamir inulinolitik

Eksplorasi dan isolasi khamir inulinolitik berasal dari umbi tanaman *Dahlia variabilis* Willd di Jawa Tengah.

Tabel 1. Ciri morfologi isolat khamir inulinolitik

No.	Isolat	Ciri	No.	Isolat	Ciri
1.	P1	Bulat, putih pucat.	9.	P9	Oval, putih
2.	P2	Bulat, putih	10.	P10	Bulat, putih keruh
3.	P3	Bulat asimetris, putih	11.	P11	Bulat, orange
4.	P4	Bulat, putih pucat	12.	E1	Oval, putih pucat
5.	P5	Bulat, merah muda, pucat	13.	Y1	Bulat, kusam
6.	P6	Bulat, merah muda berderet, pucat	14.	Y2	Bulat, keruh
7.	P7	Bulat keruh, krem	15.	P12	Bulat, berderet, krem
8.	P8	Bulat, putih serkulir	16.	P13	Bulat, cembung, pucat

Umbi-umbi tersebut yang telah cukup umur dipilih dan diambil untuk diisolasi jenis khamirnya. Masing-masing 10 gram umbi dahlia dari bermacam-macam sampel dimasukkan kedalam 50 ml medium pengkaya YPD dan diinkubasi selama 48 jam. Kemudian di inokulasikan 1 ml kedalam media YPD Agar dan dilakukan pengamatan selama 24-48 jam. Kenampakan koloni khamir inulinolitik dapat ditunjukkan pada Tabel 1.

Koloni yang tumbuh selanjutnya dipindahkan secara secara goresan pada media selektif PIA, PDA inulin 2% dan Medium Agar Erthan serta diinkubasi selama 24-48 jam untuk dilakukan pengamatan.

Tabel 2. Pertumbuhan isolat khamir inulinolitik pada media selektif

No.	Isolat	YPD	Media selektif			Asal umbi
			PIA	PDA inulin 2%	Erthan	
1.	P1	+++	+++	+++	+++	Bandungan
2.	P2	+++	+++	+++	+++	Bandungan
3.	P3	+++	+++	+++	+++	Bandungan
4.	P4	+++	-	-	-	Bandungan
5.	P5	+++	+++	+++	+++	Bandungan
6.	P6	+++	+++	+++	+++	Bandungan
7.	P7	+++	+++	+++	+++	Bandungan
8.	P8	+++	++	+++	+	Tawangmangu
9.	P9	+++	++	+++	+	Tawangmangu
10.	P10	+++	+++	+++	+++	Purwokerto
11.	P11	+++	-	-	-	Purwokerto
12.	E1	+++	-	-	-	Purwokerto
13.	Y1	+++	+++	+++	+++	Tawangmangu
14.	Y2	+++	+++	+++	+++	Tawangmangu
15.	P12	+++	+++	+++	+++	Purwokerto
16.	P13	+++	+++	+++	+++	Purwokerto

Keterangan :

+++ : tumbuh banyak sekali ; ++ : tumbuh banyak ; + : tumbuh cukup banyak

- : tidak tumbuh

Hasil isolasi menunjukkan bahwa semua isolat (16 isolat) mampu tumbuh pada media YPD Agar, setelah ditumbuhkan pada media selektif (PIA, PDA inulin 2% dan Medium Agar Erthan) hanya 13 isolat yang mampu tumbuh. Hal ini membuktikan bahwa ke-13 isolat tersebut mampu menghasilkan enzim inulinase, sehingga kelangsungan hidupnya dapat dipertahankan. Hasil isolasi khamir inulinolitik pada media selektif selanjutnya dapat dilihat pada Tabel 2. Sedangkan aktivitas inulinase tertinggi masing-masing isolat dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Aktivitas inulinase khamir inulinolitik

No.	Isolat	Aktivitas (IU)	No.	Isolat	Aktivitas (IU)
1.	P1	0.581	9.	P9	0.432
2.	P2	0.512	10.	P10	0.514
3.	P3	0.498	11.	P11	0
4.	P4	0.001	12.	E1	0
5.	P5	0.509	13.	Y1	0.411
6.	P6	0.532	14.	Y2	0.645
7.	P7	0.489	15.	P12	0.683
8.	P8	0.476	16.	P13	0.570

Pada Tabel 3 terlihat jelas bahwa Isolat P12 mampu menghasilkan aktivitas inulinase yang tertinggi yaitu sebesar 0.683 IU, diikuti Y2 (0.645 IU) dan P1 (0.581 IU). Sedangkan Isolat P4, P11 dan E 1 tidak menghasilkan aktivitas inulinase ataupun bila menghasilkan sangat kecil. Hal ini sangat beralasan karena ke-3 jenis khamir tersebut tidak mampu tumbuh pada media selektif.

C. Optimasi produksi enzim inulinase

C.1. Optimasi sumber Karbon (K)

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, isolat P 12 mampu tumbuh dan menghasilkan enzim inulinase. Berdasarkan uji ANOVA dan optimasi berbagai konsentrasi sumber karbon (inulin) yaitu 0.25, 0.5 dan 0.75 % serta optimasi waktu inkubasi (12 dan 18 jam) menunjukkan pengaruh sangat nyata (Tabel 4). Pada analisis lebih lanjut pengaruh karbon, ternyata konsentrasi terbaik adalah K3 (0.75%) yang mampu

menghasilkan aktivitas sebesar 0.8497 IU (Tabel 5) dan waktu inkubasi terbaik adalah T12 (Tabel 6). dengan sebesar 0.8244 IU. Sedangkan interaksinya terbaik pada konsentrasi K3 dan waktu inkubasi 12 jam dengan aktivitas tertinggi 0.8772 IU (K3T12; Tabel 7). Hal ini membuktikan bahwa semakin besar konsentrasi sumber karbon (inulin) yang diberikan maka akan berpengaruh positif terhadap produksi enzim inulinase (produksinya semakin besar). Hal ini disebabkan karena inulin dapat berfungsi induser. Hal ini sesuai dengan pernyataan Park *et al.* (2001) bahwa sintesis inulinase bersifat inducibel dan dapat dikategorikan sebagai enzim ekstraseluler.

Tabel 4. ANOVA Isolat P12 terhadap produksi inulinase

SK	DB	JK	KT	Fhit	Ftab (0,05)	Ftab (0,01)
Perlakuan	5	0.0477	0.00954	36.976**	3.11	5.06
K	2	0.024	0.012	46.511**	3.88	6.93
T	1	0.0122	0.0122	47.286**	4.75	9.33
Interaksi	4	0.0115	0.00575	22.286**	3.88	6.93
Galat	12	0.0031	0.000258			
Total	17					

** F Hitung (P) > F Tabel (0,05) maka berbeda nyata

Tabel 5. Analisis lanjut Pengaruh K pada Isolat P 12

Inulin	Rata-rata	Beda Dengan		
		K3	K2	K1
K1	0.768	0.0817**	0.009	-
K2	0.775	0.0722**	-	
K3	0.8497	-		-
		BNT 5% (12; 0,05) 0,028	BNT 1% (12; 0,01) 0,040	

Tabel 6. Analisis lanjut Pengaruh T pada Isolat P 12

Inulin	Rata-rata	Beda Dengan	
		T12	T18
T18	0.7723	0.0521**	-
T12	0.8244	-	
		BNT 5% (12; 0,05) 0,028	BNT 1% (12; 0,01) 0,040

Tabel 7. Pengaruh interaksi sumber karbon dan waktu inkubasi Isolat P12

Interaksi	Rata-rata	K3T12	K1T12	K3T18	K2T18	K2T12
K1T18	0.7118	0.1654**	0.1125**	0.1104**	0.0714**	0.06
K2T12	0.7718	0.1054**	0.0525**	0.0504	0.0114	
K2T18	0.7832	0.094**	0.0411	0.039		
K3T18	0.8222	0.065**	0.0021		-	
K1T12	0.8243	0.0629**			0,0114	-
K3T12	0.8772				0,0172	0,0058
		BNT 5% (12; 0,05) 0,028		BNT 1% (12; 0,01) 0,040		

D. Identifikasi Isolat P12

Dari hasil penelitian diketahui bahwa isolat P12 yang diidentifikasi memiliki ciri-ciri seperti terlihat pada Tabel 8.

Tabel 8 . Hasil karakterisasi isolat khamir inulinolitik

No.	Karakterisasi	Isolat P12
1	Bentuk sel	Bulat telur, tunggal dan berpasangan
2	Ukuran sel	P(2-7) x (2-5) μ m
3	Pertunasan	multipolar
4	Miselium palsu dan miselium sejati	terbentuk
5	Penampakan koloni	Agak krem, halus, tengah koloni menguning
6	Spora seksual	bulat
7	Asimilasi C	Positif : sukrosa, glukosa, selibiosa, laktosa, inulin, xilosa, arabinosa, ribosa, gliserol Negatif : galaktosa, maltosa, melibiosa, etanol
8	Asimilasi N	Positif : amonium sulfat, kalium nitrit, natrium nitrit Negatif : imidasol, kasein
9	Pembentukan enzim urease	negatif
10	Pertumbuhan pada suhu 37°C	positif
11	Pertumbuhan pada medium 60% sukrosa	negatif

Ciri-ciri morfologi dan fisiologi tersebut selanjutnya dicocokkan dengan kunci identifikasi dari Barnett et al., 1983; Kurtzman and J.W. Fell, 1998) dan diketahui bahwa isolat tersebut mempunyai kemiripan sifat dengan *Pichia* sp.

Kesimpulan dan saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan :

1. Telah ditemukan 16 isolat khamir inulinolitik, isolat P12 merupakan isolat terpilih karena mampu menghasilkan aktivitas inulinase tertinggi
2. Kondisi optimasi terbaik sumber karbon 0,75% (K3)
3. Berdasarkan identifikasi dan determinasi isolat P12 adalah *Pichia* sp

Saran yang dapat disampaikan setelah penelitian ini sebagai berikut:

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aplikasi inulinase pada proses pembuatan IOS prebiotik berbahan dasar inulin umbi dahlia serta pengujiannya terhadap bakteri patogen

Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Proyek Peningkatan Kualitas Sumberdaya Manusia-Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi-Departemen Pendidikan Nasional-Tahun Anggaran 2009 atas terlaksananya Penelitian Hibah Multi Tahun-Desentralisasi

DAFTAR PUSTAKA

- 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).
- Chaplin, M.F and J.F. Kennedy. 1994. Carbohydrat Analysis; A Practical Approach. 2nd Edition. Oxford University Press. Oxford.
- Deutscher, M. 1990. Guide To Protein Purification. Methods In Enzymology Vol. 182. Academic Press. Inc. Boston. Toronto. Tokyo.
- 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
- Dixon, M and Webb, E. 1979. Enzymes. Logman Group Ltd London
- Kreger-van Rij, N.J.W. 1984. The yeast, A Taxonomic Study. Third revised and Enlarged Ed., Elsevier sci. publ. B.v., Amsterdam.

- Kockova, A and Kratochilova. L990. Yeast and Yeast Like Organism. UCH. Publishers. France. Pp. 6 – 7, 42 – 51.
- Lunggani, Arina Tri dan Endang, K. 2006. Pemanfaatan Limbah cair Tahu Menjadi Minuman Fungsional Oleh Kultur campuran Bakteri Asam Laktat (BAL) Serta Uji Aktifitas Antimikrobiana. (Hibah Penelitian Program A2, 2006).
- Noris, J.R and M.H. Ricchmon. 1981. Assay In Applied Microbiology. John Wiley & Sons.
- Muchtadi, D. 1989. Petunjuk Laboratorium Evaluasi Nilai Gizi Pangan. PAU PAU Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor.
- Oku, T.T Tokunaga dan N. Hosoya. 1984. Nondigestibility of a New Sweetener, Neosugar, In The Rat. J. Nutr. 114: 1474-1481
- Park, J.P and J.W. Yun. 2001. Utilization of Chicory roots for Microbial Endoinulinase Production. Letters In Applied Microbiology. 2001 (33): 183 – 187
- , J.T Bae. D.J. You. B.W. Kim and J.W. Yun. 1999. Production of Oligosaccharides from inulin By Novel Endoinulinase From *Xanthomonas* sp. Bitech. Letters. 21: 1043-1046.
- Rahn, J.E. 1996. Dahlia. Di dalam Encyclopedia Americana International Edition. Vol.8 pp 421-426. Grolier Incorporated. Danbury, Connecticut.
- Roberfroid, M.B. 2000. Chicory Fructooligosaccharides and Gastrointestinal. Trac. Nutrition 16 (7/8): 677-679
- 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 Continuous Culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. Appl environ. Microbiol. 54(5): 1131 - 1137.
- _____; 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.
- Rukmana, R. 2000. Dahlia: Prospek Agribisnis dan Teknik Budi Daya. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Scholz-Ahrens, K.E. G. Schaafasma, E.G.H.M. Van den Heuvel dan Jurgen Schrezenmeir. 2001. Effect of Prebiotics on Mineral Metabolism. Am. J. Clin. Nutr. 73.
- Sharma, O.P. 1989. Text Book of Fungi. Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited., New Delhi.
- Surono, I. 2000. Probiotik-Susu fermentasi dan Kesehatan. PT. Tri Cipta Karya. Jakarta.
- Tungland, B.C. 2000. Inulin A Comprehensive Scientific Review. Duncan Crow Wholistic Consultan. [http:// members.shaw.ca/duncancrow/inulin review.html](http://members.shaw.ca/duncancrow/inulin%20review.html).

- Wijanarka, E. Kusdiyantini dan Hermin, P.S. 2006. Paket Teknologi Eksplorasi Khamir Inulinolitik Termotabil Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis* Willd) Jawa Tengah Melalui Teknik Fusi Protoplas Dan Aplikasinya Pada Produksi HFS (Hibah Bersaing, 2006)
- Xiao, R. ; M. Tanida dan S. Takao. 1998. Innulinase from *Cryosporium pannorum* J. Ferment. Technol. 66 (5) : 244 – 248
- _____ ; M. Tanida dan S. Takao. 1989. Purification and Some Properties of Endoinulinase from *Cryosporium pannorum* J. ferment. Bioeng 67 (4) : 244