

Kemampuan memproduksi inulinase isolat khamir hasil isolasi dari Nira Siwalan (*Borassus flabellifer* L.) dengan variasi konsentrasi CaCl_2

Siti Maisaroh^{a*}, Wijanarka^a dan Agung Suprihadi^a

^aLaboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Jl. Prof Soedharto, SH, Tembalang, Semarang 50275
email: Sitimaisaroh15011997@gmail.com

Abstrak

Inulinase (EC 3.2.1.7.) merupakan enzim yang dapat menghidrolisis inulin menjadi fruktosa atau frukto-oligosakarida. Inulinase mikrobial sangat menarik dan menjadi perhatian banyak peneliti salah satunya berasal dari golongan khamir. Khamir seringkali ditemukan pada makanan yang banyak mengandung gula seperti pada nira siwalan (*Borassus flabellifer* L.). Khamir memanfaatkan gula sederhana pada makanan untuk mendapatkan energi. Bila nira disimpan maka akan terjadi fermentasi oleh adanya mikroorganisme yang terdapat dalam nira sehingga menyebabkan rasa asam karena terbentuknya asam asetat dan merupakan media yang baik untuk pertumbuhan mikroorganisme seperti khamir. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis pengaruh kalsium terbaik terhadap produksi inulinase khamir indigen nira siwalan (*Borassus flabellifer* L.). Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium bioteknologi, Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro. Penentuan aktivitas Inulinase dilakukan dengan metode DNS. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RAL) dengan dua faktor yaitu konsentrasi CaCl_2 (Ca_0 , $\text{Ca}_{0,5}$, $\text{Ca}_{1,0}$, dan $\text{Ca}_{1,5}$) dan faktor II waktu inkubasi (T_0 , T_4 , T_8 , T_{12} , T_{16} , dan T_{20}). Masing – masing perlakuan diulang sebanyak tiga kali. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan metode ANOVA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi CaCl_2 0.5 mM dengan aktivitas inulinase 0.555 IU/mL memberikan pengaruh terbaik.

Kata Kunci: inulinase, khamir, nira siwalan (*Borassus flabellifer* L.), CaCl_2

I. PENDAHULUAN

Produksi gula nasional belum mencukupi kebutuhan gula masyarakat Indonesia, sehingga pengadaan impor gula terjadi. Upaya yang dilakukan untuk mengurangi impor gula adalah mencari bahan pemanis alternatif, salah satunya fruktosa. Fruktosa sering digunakan dalam industri sebagai fruktooligosakarida (FOS), yang memiliki manfaat antara lain: sebagai prebiotik, serat larut, rendah kalori, bersifat non-karsinogenik, dan baik untuk kesehatan saluran cerna (Zobel, 2005).

Menurut Wijanarka et al., (2013) Produksi inulinase dari mikroorganisme banyak digunakan diberbagai bidang, karena pertumbuhan mikroorganisme yang relatif cepat, dan menghasilkan enzim yang lebih banyak. Kelebihan lain mikroorganisme adalah dapat menghasilkan 95% fruktosa murni hanya dengan menggunakan satu tahap reaksi hidrolisis enzimatis inulin.

Produksi inulinase dapat dioptimalkan dengan melakukan penelitian dan pengembangan, salah satunya dengan penambahan mikronutrien dalam substrat pertumbuhan khamir. Penambahan CaCl_2 ke dalam medium pertumbuhan isolat khamir K-1 dan isolat khamir K-2 hasil isolasi dari nira siwalan (*Borassus flabellifer* L.) dilakukan dalam penelitian ini, kalsium klorida mudah terdisosiasi menjadi ion kalsium (Ca^{2+}) dan ion klorida (Cl^-) di dalam air. Ion Ca^{2+} (kalsium) merupakan mikronutrien yang berperan penting dalam fungsi struktural dan fungsional sel khamir, ion klorida (Cl^-) digunakan untuk mengatur kesetimbangan asam basa larutan dan mengatur netralitas elektrokimia (Venkateshwar, et al., 2010). Penggunaan CaCl_2 pada medium fermentasi dalam penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan produksi inulinase. Berdasarkan uraian tersebut, perlu

dilakukan penelitian tentang pengaruh CaCl_2 terhadap produksi enzim inulinase oleh isolat khamir K-1 dan isolat khamir K-2 hasil isolasi dari nira siwalan (*Borassus flabellifer* L.) dalam substrat tepung umbi dahlia.

II. BAHAN DAN METODE

1. Mikroorganisme dan Kultur Medium Kultur murni

Isolat khamir K-1 dan isolat khamir K-2 diperoleh dari isolasi nira siwalan (*Borassus flabellifer* L.) koleksi Laboratorium Bioteknologi FSM Universitas Diponegoro. Media untuk pemeliharaan kultur dan produksi enzim inulin murni, medium agar miring YGP (*Yeast Glucose Pepton*), medium agar miring ISM (*Inulinase Selecting Medium*), medium cair YGP (*Yeast Glucose Pepton*), akuades, formula medium produksi dengan variasi konsentrasi CaCl_2 (0 mM, 0.5 mM, 1.0 mM dan 1.5 mM), reagen DNS, bufer sodium asetat.

2. Pembuatan Medium Produksi Inulinase

Tepung umbi dahlia sebanyak tiga gram dalam 100 mL aquades dipanaskan selama 25 menit, disaring dan selanjutnya ditambahkan dengan 0,23 g NH_4NO_3 ; 0,37 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 0,1 g K_2HPO_4 ; 0,05 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, dan 0,15 g yeast ekstrak pada pH 5 (Wijanarka, *et al.*, 2008), Perlakuan CaCl_2 (0 mM, 0.5 mM, 1.0 mM dan 1.5 mM) dalam medium produksi. Medium produksi kemudian diautoklaf dengan suhu 115°C selama 30 menit.

3. Pembuatan Starter

Satu ose isolat khamir K-1 dan isolat khamir K-2 dari nira siwalan (*Borassus flabellifer* L.) dari kultur kerja dinokulasikan ke dalam medium produksi steril, kemudian diagitasi dengan rotary shaker berkecepatan 120 rpm pada suhu ruang selama 22 jam. (Wijanarka, *et al.*, 2004).

4. Pertumbuhan Sel (Wijanarka, *et al.*, 2008)

Kultur dari starter diambil sebanyak 5% (2,5 ml) dan diinokulasikan pada masing-masing 50 ml medium produksi dengan berbagai konsentrasi (Mm) CaCl_2 , yaitu C_0 , $\text{C}_{0,5}$, $\text{C}_{1,0}$, dan $\text{C}_{1,5}$. kemudian diinkubasi selama 30 jam dengan *rotary shaker* berkecepatan 120 rpm pada suhu ruang. Pengambilan sampel dilakukan setiap empat jam sebanyak lima mililiter untuk mengukur pertumbuhan sel secara langsung dengan metode turbidimetri. Pertumbuhan sel ditentukan dengan mengukur nilai optical density (OD) menggunakan spektrofotometer pada $\lambda 520$ nm. Pola pertumbuhan digunakan untuk menentukan waktu inkubasi yang dipilih untuk uji aktivitas enzim.

5. Produksi Enzim (Wijanarka, *et al.*, 2008)

Produksi enzim inulinase dilakukan dengan cara starter diambil sebanyak 5% (v/v) dan diinokulasikan pada masing-masing medium produksi dengan berbagai konsentrasi (mM) CaCl_2 , yaitu Ca_0 , $\text{Ca}_{0,5}$, $\text{Ca}_{1,0}$, dan $\text{Ca}_{1,5}$, kemudian diinkubasi selama 30 jam dengan *rotary shaker* berkecepatan 120 rpm pada suhu ruang. Pemanenan enzim dilakukan dengan cara pengambilan kultur pada jam ke-0, 4, 8, 12, 16, dan 20 sebanyak satu mililiter cairan kultur disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit (sampel mengendap). Supernatan yang diperoleh merupakan *crude enzim* dan digunakan untuk uji aktivitas enzim inulinase.

6. Pengukuran Aktivitas Inulinase (Xiao *et al.*, 1998; Wijanarka dkk., 2008)

Penentuan aktivitas inulinase dilakukan dengan cara menyiapkan 4 tabung untuk diisi campuran yang berbeda. Tabung pertama (ES) berisi 0,9 mL campuran substrat inulin dan *buffer* dan 0,1 mL *crude enzim*. Tabung kedua (S) berisi 0,9 mL campuran substrat inulin dan *buffer* dan 0,1 mL akuades. Tabung ketiga (E) berisi 0,4 mL *buffer*; 0,1 mL *crude enzim* dan 0,5 mL akuades. Tabung keempat sebagai blangko diisi 0,4 mL *buffer* dan 0,6 mL akuades. Masing-masing tabung (ES, S dan E) diinkubasi selama 30 menit pada suhu 50°C . Reaksi enzimatik dihentikan dengan memasukkan tabung sampel ke dalam air

mendidih selama lima menit dan setelah dingin ditambahkan reagen DNS sebanyak satu mililiter. Perlakuan selanjutnya dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit dingin ditambahkan dengan lima mililiter akuades. Pengukuran absorbansi sampel dengan spektrofotometer pada $\lambda 570$ nm. Aktivitas inulinase ditentukan berdasarkan sejumlah 1 μ mol gula reduksi yang dibebaskan per menit pada kondisi tertentu.

Aktivitas inulinase dianalisis dengan metode DNS (Chaplin dan Kennedy, 1994) dan ditentukan berdasarkan sejumlah 1 μ mol gula reduksi yang dibebaskan per menit pada kondisi tertentu. Gula reduksi diukur dengan cara menghitung absorbansi enzim substrat (ES) dikurangi dengan absorbansi substrat (S) dan enzim (E), sehingga diperoleh rumus sebagai berikut (Xiao *et al.*, 1998):

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{(\text{AbsES} - \text{AbsE} - \text{AbsS}) \times P \times 10^3}{\text{BMf} \times 30}$$

Keterangan:

AbsES absorbansi enzim substrat,

AbsE = absorbansi enzim,

AbsS = absorbansi Substrat,

BMf = berat molekul fruktosa (180,1),

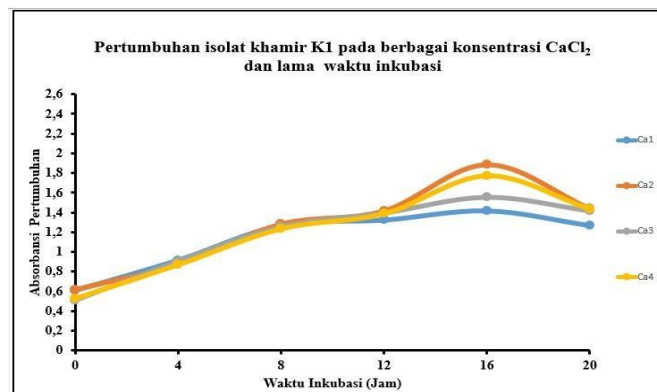
P= faktor pengenceran

3. Rancangan Percobaan dan Analisis Data

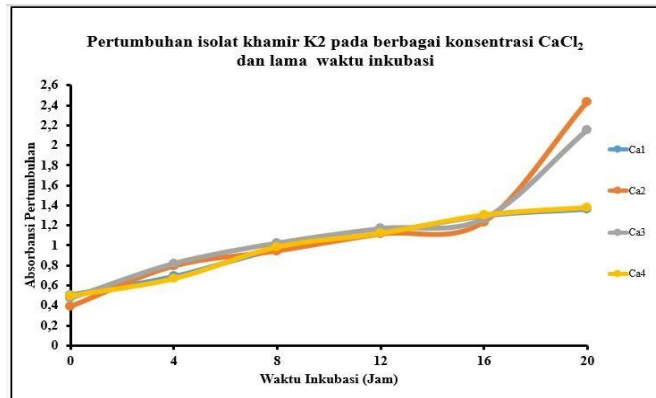
Analisis statistik menggunakan Rancangan Acak Lengkap faktorial dengan 2 faktor yang dicoba yaitu faktor I konsentrasi CaCl_2 (Ca_0 , $\text{Ca}_{0,5}$, $\text{Ca}_{1,0}$, dan $\text{Ca}_{1,5}$) dan faktor II waktu inkubasi (T_0 , T_4 , T_8 , T_{12} , T_{16} , dan T_{20}). Masing – masing percobaan diulang sebanyak tiga kali. Data yang diperoleh dilakukan uji homogenitas varian dan uji normalitas dengan uji komolgorov – Smirnov. Data yang normal dan varian homogen dianalisis dengan Analysis of Varian (Sugandi dan Sugiarto, 1994; Steel dan Torrie, 1995; Hanafiah, 2000).

III. Hasil

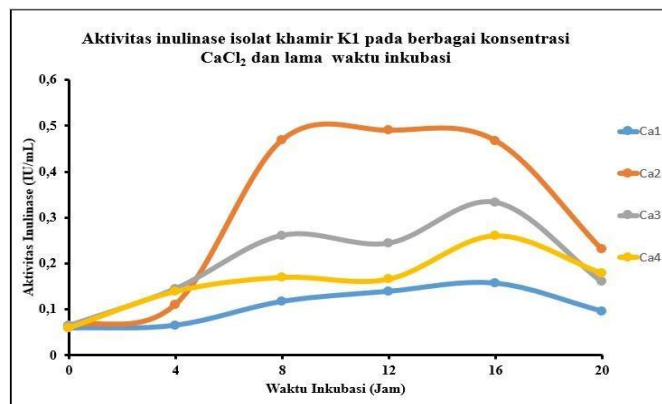
Penelitian mengenai kemampuan memproduksi inulinase isolate khamir hasil isolasi dari Nira Siwalan (*Borassus flabellifer* L.) dengan variasi konsentrasi CaCl_2 didapatkan hasil pertumbuhan yang diukur dengan spektrofotometer pada $\lambda 520$ dan aktivitas inulinase pada $\lambda 570$ yang ditunjukkan pada gambar berikut:



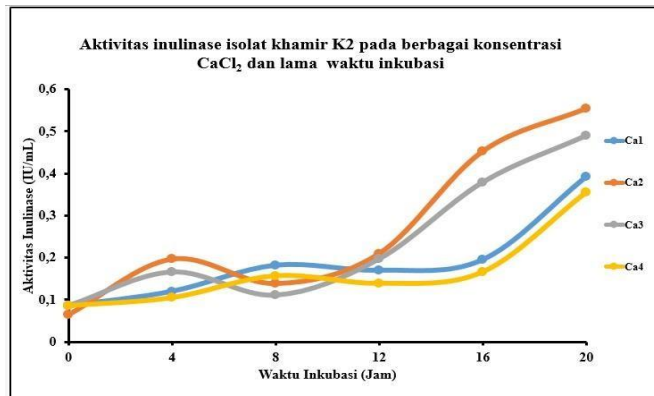
Gambar 1. Kurva pertumbuhan isolate khamir K1 dalam medium produksi dengan penambahan CaCl_2 pada berbagai konsentrasi selama waktu pertumbuhan inkubasi 20 jam



Gambar 2. Kurva pertumbuhan isolate khamir K2 dalam medium produksi dengan penambahan CaCl_2 pada berbagai konsentrasi selama waktu pertumbuhan inkubasi 20 jam



Gambar 3. Aktivitas inulinase isolate khamir K1 dalam medium produksi dengan penambahan CaCl_2 pada berbagai konsentrasi selama waktu pertumbuhan inkubasi 20 jam



Gambar 4. Aktivitas inulinase isolate khamir K2 dalam medium produksi dengan penambahan CaCl_2 pada berbagai konsentrasi selama waktu pertumbuhan inkubasi 20 jam

Keterangan:

Ca1= CaCl_2 0 mM

Ca2= CaCl_2 0.5 mM

Ca3= CaCl_2 1.0 mM

Ca4= CaCl_2 1.5 mM

IV. PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan pertumbuhan pada isolat khamir K1 dan isolat khamir K2 terjadi pada medium dengan CaCl_2 0.5 mM. Kedua Isolat khamir tidak mengalami fase adaptasi karena inokulum khamir K1 dan khamir K2 yang digunakan berada pada fase eksponensial (Gambar 1). Menurut Xia, Z. and Shengjun Wu (2012), menyatakan bahwa dalam penelitiannya sel khamir dari fase eksponensial beradaptasi lebih cepat pada media segar dan menghasilkan fase lag terpendek sampai tidak adanya fase lag. Hasil yang diperoleh mirip Ginovart *et al.*, (2011) dimana fase lag terpendek diperoleh dengan inokulasi terbesar dan sel induk inokulasi termuda.

Pertumbuhan khamir K1 pada variasi konsentrasi CaCl_2 pada waktu inkubasi ke 20 menunjukkan fase deklinasi diikuti penurunan aktivitas enzim inulinase serta fase eksponensial terjadi pada waktu inkubasi ke 16 jam. Pertumbuhan khamir K2 pada waktu inkubasi 0 jam sampai waktu inkubasi 20 jam terus mengalami fase eksponensial. Produksi inulinase pada keempat medium dengan konsentrasi CaCl_2 yang berbeda menunjukkan kenaikan produksi enzim dari inkubasi 0 jam sampai inkubasi 20 jam Kumar *et al.*(2005) menyatakan waktu inkubasi berhubungan dengan aktivitas metabolisme yang terjadi pada mikroorganisme selama masa inkubasi berlangsung dapat berpengaruh signifikan terhadap aktivitas enzim. Pertumbuhan khamir yang tinggi diharapkan aktifitas enzim juga tinggi karena aktivitas inulinase yang tinggi terjadi pada saat logaritmik (Maria, *et al.*, 2005).

Produksi inulinase oleh isolat khamir K-1 dan Isolat Khamir K-2 dilakukan berdasarkan pola pertumbuhan dari penelitian pendahuluan, ditentukan produksi inulinase diukur pada waktu inkubasi 0, 4, 8, 12, 16, dan 20 jam. Jumlah inulinase yang diproduksi dapat ditentukan dengan uji aktivitas enzim. Menurut Chaplin (1994) dan Park and Yun (2001) sejumlah enzim yang mampu merombak 1 mol 1 μmol substrat per menit pada kondisi tertentu dijadikan dasar dalam penentuan aktivitas enzim. Gambar 2 berikut menunjukkan aktivitas inulinase isolat khamir K-1 dan isolat khamir K-2.

Aktivitas inulinase tertinggi dari dua isolate khamir diperoleh pada perlakuan CaCl_2 0,5 mM, dengan nilai 0.555 IU/ML. Hasil analisis sidik ragam (Anova) terhadap aktivitas inulinase isolate khamir K-1 dan isolate khamir K2 menunjukkan bahwa aktivitas inulinase dipengaruhi signifikan oleh pemberian CaCl_2 pada waktu inkubasi tertentu dalam medium produksi. Hal ini sesuai dengan pendapat Sivaramkrishnan, *et al.* (2006) bahwa, penambahan CaCl_2 pada medium fermentasi dapat meningkatkan produksi enzim.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diambil kesimpulan bahwa penambahan konsentrasi CaCl_2 pada medium produksi konsentrasi 0.5 mM memberikan pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas inulinase isolat khamir K-1 dan isolat Khamir K-2.

UCAPAN TERIMAKASIH

1. Dr. Wijanarka, M.Si., selaku Pembimbing I dan Drs. Agung Suprihadi, M.Si., selaku Pembimbing II yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran serta memberikan banyak masukan, bimbingan dan motivasi selama penelitian dan penulisan publikasi ini.
2. Cicin Dwi Pamungkas, Feri Hardianti, dan Fitri Ulfana Risky sebagai partner penelitian yang telah memberikan semangat dan motivasi dengan penuh kasih sayang. Imam Purwanto dan Ajie Susetyo yang telah memberi motivasi semangat kepada penulis dan membantu dalam kelancaran penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Chaplin, M. F. and J.F. Kennedy. 1994. *Carbohydrat Analysis: A Practical Approach. 2nd Edition.* Oxford University Press. Oxford.

- Ginovart, M., Prats C., Portell X, Sillbert M. 2011. Exploring the lag phase and growth initiation of a yeast culture by means of an individualbased model. *Food Microbiol.* 28: 810-817.
- Hanafiah, K.A. 2000. *Rancangan Percobaan : Teori dan Aplikasi*. PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Kumar, G. P., A. Kunamneni, T. Prabhakar and Ellaiah. 2005. Optimization of process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Aspergillus niger* AUP19. *World Journal of Microbial Biotechnol.* 295-301.
- Kurtzman, C.P., and Piskur J. 2006. *Taxonomy and Phylogenetic diversity among the yeasts*. Berlin:Springer-Verlag.
- Maria, C., Maria A., Ana, L.F.P., Keila A.M., and Jose, L. 2005. *Aspergillus niveus* Blochwitzm 4128URM New Sources for Inulinase Production. *J. Brazilian Archiv. Biol. Technol.* 48(3):343-350.
- Park, J.P. and Yun J.W. 2001. Utilization of Chicory Roots for Microbial Endoinulinase Production. *Letters. Appl. Microbiol.* 33: 183-187.
- Sivaramakrishnan. 2006. α -Amylase from Microbial Sources-an Overview on Recent Developments. *Food Technol Biotechnol* 44:173-184
- Steel, R. G. D and Torrie, J. H. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika: Suatu Pendekatan Biometrik*. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Sugandi, E and Sugiarto. 1994. *Rancangan Percobaan: Teori dan Aplikasi*. Andi Offset, Yogyakarta.
- Venkateshwar, M., K. Chaitanya, Md. A., Mahammad E. J., Hameeda B., and Gopal R. (2010). Influence of Micronutrients on Yeast Growth and β -D-Fructofuranosidase Production. *Indian. J. Microbiol.* 50 (1): 325-331.
- Wijanarka, E.S. Soetarto, K. Dewi, dan A. Indrianto. 2013. Aktivitas Inulinase oleh *Pichia manshurica* dan *Fusan F4* pada fermentasi Batch dengan Umbi Dahlia (*Dahlia* sp) sebagai Substrat. *Reaktor.* 14(3):187-192.
- Wijanarka, Rejeki, S. F., dan Salamah. 2004. Produksi Inulinase *Pichia alni* DUCC- W4 pada Tepung Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis* Wild) dengan Variasi Konsentrasi Ammonium Nitrat dan Waktu Inkubasi. *Bioma.* 10 (2): 58-64.
- Xia, Z. and Shengjun Wu. 2012. Cell number as an important variable in optimising inoculum age and size in yeast cultivation. *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(4), pp. 919-922
- Xiao, R., M. Tanida dan S. Takao. 1988. Inulinase from *Cryosporium pannorum*. *J. Ferment. Technol.* 66 (5): 244 – 248 Zobel, P. B. L. (2005). Inulin-type Fructans and Reduction in Colon Cancer Risk. *Braz J. Nutr.* 93 (1): 73-90.

