

NICHE Journal of Tropical Biology

Available online: <https://ejournal2.undip.ac.id/index.php/niche>

Isolasi khamir penghasil enzim inulinase dari buah kersen (*Muntingia calabura*) serta pengaruh mikronutrien mangan (Mn) pada produksi enzimnya

Isolation of the yeast producing enzyme inulinase from cherry fruits (*Muntingia calabura*) and the effect of manganese micronutrients (Mn) on enzyme production

Fitri Ulfana Risky^a, Wijanarka^a, dan Sri Pujiyanto^{a*}

^aDepartemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro,
Jl. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang Semarang 50275 Indonesia

ABSTRACT

The purpose of this research is to obtain isolates yeast enzyme-producing inulinase from *Muntingia calabura* and knowing the effect of adding manganese ions to the production of inulinase enzyme from isolation results. The method to be performed is yeast isolation, yeast growth test and inulinase production test. This research is conducted experimentally using Randomized Complete Block Design (RCBD) factorial pattern with 2 factors and three times repetition. The first factor was yeast isolate. The second factor was manganese concentration level (mM) of 0,5 (M1), 1.5 (M2) and 2.5 (M3). The collected data were analyzed using ANOVA 5% signification ($\alpha = 0.05$) and completed by the Duncan test. The results of this research there are 3 isolates of yeast that produce inulinase enzyme were isolated from *Muntingia calabura*. The maximum production of inulinase produced by yeast K2 and K4 is at the 6th hour of incubation time (logarithmic phase). Maximum inulinase enzyme production produced by the yeast K2 and K4 at the 6th hour of incubation. ANOVA analysis showed variations in the contribution of manganese had a significant effect on the production of the enzyme Y2 and K4 inulinase at the 6th hour of incubation time. Post Hoc Duncan test showed the concentration of manganese M1 (0.5 mM) was the best treatment and had a significant effect on the inulinase production at the 6th hour of incubation time.

Keywords: Isolation, yeast, inulinolitic, Muntingia calabura, inulinase, manganese

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat khamir penghasil enzim inulinase dari buah kersen (*Muntingia calabura*) serta mengetahui pengaruh penambahan ion mangan dalam bentuk mangan sulfat ($MnSO_4$) terhadap produksi enzim inulinase dari hasil isolasi tersebut. Metode yang dilakukan adalah isolasi khamir, uji pertumbuhan khamir dan uji produksi enzim inulinase. Penelitian dilakukan secara eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial dengan ulangan sebanyak 3 kali. Data dianalisis menggunakan metode ANOVA taraf signifikan 5% ($\alpha = 0,05$) dan uji lanjut Duncan. Hasil penelitian didapatkan 3 isolat khamir yang menghasilkan enzim inulinase dari buah kersen. Produksi enzim inulinase maksimum yang dihasilkan oleh khamir K2 dan K4 adalah pada waktu inkubasi jam ke 6 (fase logaritmik). Hasil analisis ANOVA menunjukkan bahwa penambahan variasi konsentrasi mangan berpengaruh signifikan terhadap produksi enzim inulinase khamir K2 dan K4 pada waktu inkubasi jam ke-6. Hasil uji lanjut *Post Hoc* Duncan menunjukkan bahwa konsentrasi mangan M1 (0,5 mM) merupakan perlakuan paling baik dan berpengaruh signifikan terhadap produksi enzim inulinase pada waktu inkubasi jam ke-6.

Kata kunci: Isolasi, khamir, inulinolitik, Muntingia calabura, inulinase, mangan

*Corresponding author

E-mail addresses: wijanarka1810@gmail.com

I. PENDAHULUAN

Enzim inulinase adalah enzim yang dapat memecah inulin menjadi monomer-monomer fruktosa dan fruktooligosakarida. Fruktosa merupakan pemanis alami rendah kalori, dengan tingkat kemanisan 70% lebih tinggi dari sukrosa, sehingga aman dikonsumsi bagi penderita diabetes. Fruktosa mampu digunakan sebagai pemanis alternatif pengganti pemanis buatan. Aplikasi utama dari enzim inulinase di bidang pangan yaitu sebagai bahan dalam memproduksi *High Fructose Syrup* (HFS). Pada bidang kosmetik dan obat-obatan, fruktosa lebih disukai karena tidak mudah mengkristal sehingga baik untuk dicampur dengan kosmetik seperti *lipstick* atau pelapis kapsul. Aplikasi penting lainnya dari enzim inulinase antara lain untuk produksi prebiotik seperti inulooligosakarida (IOS) dan fruktooligosakarida (FOS), serta mampu digunakan untuk produksi etanol, pullulan, sorbitol, dll (Singh *et al.*, 2006).

Bunga Dahlia (*Dahlia variabilis*) merupakan tanaman di Indonesia yang telah diteliti umbinya mengandung inulin tinggi sehingga dapat dimanfaatkan sebagai sumber inulin. Namun, potensi umbi dahlia ini belum mampu dieksplor dan dimanfaatkan secara maksimal di Indonesia. Produksi inulin secara komersial di luar negeri diambil dari umbi tanaman chicory (*Cichorium intybus* L.) yang tidak ditemukan di Indonesia. Inulin belum diproduksi di Indonesia sehingga keberadaan inulin masih diimpor dari luar negeri. Maka dari itu, diperlukan bahan baku lokal yang dapat memenuhi kebutuhan inulin di Indonesia (Pandiyan *et al.*, 2012). Pemilihan isolat-isolat potensial yang menghasilkan enzim inulinase merupakan salah satu upaya yang dapat ditempuh untuk meningkatkan produksi enzim inulinase. Inulinase dapat disekresikan oleh berbagai mikroba termasuk jamur, ragi, dan bakteri, di antaranya yaitu Strain *Aspergillus* dan *Kluyveromyces* umumnya pilihan yang disukai untuk aplikasi komersial (Zhang *et al.*, 2004). Khamir merupakan mikroorganisme kemoorganotrop. Hal ini dikarenakan khamir menggunakan senyawa organik sebagai sumber energi dan dalam pertumbuhannya khamir tidak memerlukan sinar. Keberadaan khamir sangat tersebar luas di alam dan khamir sering ditemukan pada berbagai jenis makanan dengan kandungan gula yang tinggi (Yurliasni dan Zakaria, 2013). Khamir memiliki manfaat yang penting dalam perkembangan bioteknologi. Indonesia merupakan negara yang kaya akan berbagai jenis genus khamir, namun pemanfaatan khamir di Indonesia masih sangat jarang dilakukan (Kurtzman *et al.*, 2006). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, khamir dapat diisolasi dari berbagai bahan, salah satunya buah-buahan (Spencer and Spencer, 1997). Salah satu tanaman yang berpotensi menghasilkan khamir adalah buah kersen (*Muntingia calabura*) yang memiliki kadar gula tinggi. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Pramuditio (2013) buah kersen mengandung gula diantaranya fruktosa, glukosa dan sukrosa.

Melihat potensi dari buah kersen tersebut, sangat diperlukan penelitian mengenai isolasi khamir penghasil enzim inulinase, salah satu kandidat tanaman yang dapat diambil mikroorganisme penghasil enzim inulinase adalah buah kersen (*Muntingia calabura*) yang banyak mengandung fruktosa, di mana seperti yang diketahui bahwa inulin yang berperan sebagai substrat enzim inulinase merupakan polimer yang terdiri dari monomer-monomer fruktosa.

Produksi enzim inulinase dapat dimaksimalkan salah satunya dengan cara menambahkan mikronutrien ke dalam media produksinya. Mangan (Mn) merupakan salah satu mikronutrien yang dapat meningkatkan produksi enzim kelompok hidrolase. Adanya ion logam mampu berperan sebagai aktivator pada sebagian besar enzim yang sangat penting untuk reaksi katalitik enzim. Ion mangan (Mn^{2+}) merupakan salah satu ion logam yang mampu meningkatkan produksi inulinase secara signifikan dari beberapa khamir (Abadianti dkk, 2017).

II. BAHAN DAN METODE

1) Isolasi Khamir dari Buah Kersen (Barnett *et al.*, 2000)

Sebanyak 30-50 gram buah kersen merah yang matang dan segar diblender dengan penambahan 30 mL air untuk diperoleh ekstrak. Ekstrak buah kersen yang diperoleh, selanjutnya disaring menggunakan saringan dan ditempatkan pada gelas beker. Ekstrak buah kersen diambil sebanyak 1 mL dan dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10^{-4} . Medium isolasi yang digunakan yaitu medium YEPG (*Yeast Extract Peptone Glucose*). Ekstrak buah kersen yang diperoleh dari pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} diambil sebanyak 1 mL kemudian ditanam pada medium YEPG (komposisi: 0.5 gram *yeast extract*, 2 gram glukosa, 1 gram pepton dan 1.6 gram agar dalam 100 mL aquadest dan diberi penambahan kloramfenikol sebanyak 0.05 gram sebagai antibiotik) dalam cawan petri dengan metode *pour plate* dalam keadaan aseptis, setelah itu diinkubasi pada suhu 28° C selama 48 jam. Koloni yang tumbuh dan mempunyai morfologi yang berbeda selanjutnya masing-masing dimurnikan pada medium YEPG miring pada tabung dengan metode gores (*streak*).

2) Seleksi Isolat Penghasil Enzim Inulinase serta Pembuatan Kultur Stok dan Kultur Kerja (Ertan *et al.*, 2003)

Satu ose isolat khamir buah kersen yang tumbuh dari media YEPG diinokulasikan ke dalam *Inulinase Selecting Medium* (ISM) dengan komposisi: 1 gram inulin murni, 1 gram *yeast extract*, 2 gram agar yang dilarutkan dalam 100 mL aquadest, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Dua isolat khamir yang memiliki koloni paling banyak dalam kultur stok diinokulasikan ke dalam medium produksi untuk dijadikan kultur kerja

3) Pembuatan Larutan Tepung Umbi Dahlia

Larutan tepung umbi dahlia dibuat dengan komposisi 3 gram tepung umbi dahlia dilarutkan dalam 100 mL air, kemudian dipanaskan dan disaring menggunakan kapas, setelah itu dilakukan penyaringan kembali dengan menggunakan kertas saring sampai tidak ada endapan yang tersisa.

4) Pembuatan Media Produksi (Ertan, *et al.*, 2003)

Tahap pembuatan media produksi dibuat dengan komposisi (g/L) yang terdiri dari larutan tepung umbi dahlia 1 L, NH_4NO_3 (2,3), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (3,7), K_2HPO_4 (0,5), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5), *yeast extract* (1,5), dengan penambahan 0,5 mM MnSO_4 pada perlakuan pertama; penambahan 1,5 mM MnSO_4 untuk perlakuan kedua dan perlakuan ketiga dengan penambahan 2,5 mM MnSO_4 , serta tanpa penambahan MnSO_4 sebagai kontrol, kemudian larutan dihomogenkan dan dibagi ke dalam 2 erlenmeyer masing masing 50 mL untuk media produksi enzim, kemudian sisa larutan dibagi ke dalam 2 tabung reaksi, tabung reaksi pertama diisi sebanyak 2.5 mL sebagai media starter, sedangkan tabung reaksi kedua diisi sebanyak 5 mL untuk blanko pengukuran pertumbuhan OD. Media produksi disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

Produksi enzim tanpa penambahan ion atau inhibitor atau surfaktan dianggap sebagai 100% dan berfungsi sebagai kontrol (Meghavarnam *et al.*, 2017).

5) Pembuatan Starter Khamir Buah Kersen (Wijanarka, *et al.*, 2013)

Starter dibuat dengan menginokulasikan khamir sebanyak satu ose secara aseptik ke dalam masing-masing media produksi steril dalam erlenmeyer yang berisi 2 mL media produksi, kemudian diagitasi pada *Rotary Shaker* dengan kecepatan 120 rpm dalam suhu ruang selama 18 jam. Hasil kultur khamir yang tumbuh dicirikan dengan media produksi yang menjadi keruh

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

Kultur khamir pada starter setelah 18 jam dipanen, kemudian diinokulasikan pada masing-masing medium produksi steril dalam erlenmeyer, kemudian diagitasi pada *Rotary Shaker* dengan kecepatan 120 rpm dalam suhu ruang. Pemanenan enzim dilakukan per 6 jam, dimulai pada jam ke-0 (setelah pemanenan starter), ke-6, ke-12, ke-18, dan ke-24. Sampel diambil secara aseptis ke dalam tabung sampel untuk dilakukan pengukuran pertumbuhan. Sedangkan untuk pengukuran produksi enzim, sampel diambil secara aseptis untuk disentrifugasi pada *centrifuge* dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Hasil sentrifugasi yang didapatkan berupa pelet dan *crude enzyme*. *Crude enzyme* digunakan untuk uji produksi enzim.

7) Pengukuran Pertumbuhan Sel Khamir (Wijanarka, *et al.*, 2008)

Kultur khamir pada starter setelah 18 jam dipanen, diinokulasikan pada masing-masing medium produksi steril dalam erlenmeyer, kemudian diagitasi pada *Rotary Shaker* dengan kecepatan 120 rpm dalam suhu ruang. Tiap 6 jam, kultur dalam erlemeyer diambil sampel secara aseptis dan diukur *optical density* (OD) dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 520 nm.

8) Uji Produksi Enzim (Xiao *et al.*, 1988)

Sebanyak 4 buah tabung reaksi disiapkan untuk masing-masing perlakuan dengan label ES (Enzim-Substrat), S (Substrat inulin), E (*Crude Enzyme*) dan blanko. Tabung ES dimasukkan 0,5 mL substrat inulin murni 1%, 0,4 mL buffer sodium asetat 0,1 M pH 5 dan 0,1 mL *crude enzyme*; tabung S dimasukkan 0,5 mL substrat inulin murni 1%, 0,4 mL buffer sodium asetat 0,1 M pH 5 dan 0,1 mL akuades steril; tabung E dimasukkan 0,4 mL buffer sodium asetat, 0,1 mL *crude enzyme* dan 0,5 mL akuades steril; dan tabung blanko diisi 0,4 mL buffer sodium asetat dan 0,6 mL akuades steril. Semua tabung diinkubasikan dalam oven pada suhu 50°C selama 30 menit. Reaksi dimatikan dengan air mendidih ± 2 menit dan ditunggu hingga larutan hangat-hangat kuku, kemudian ditambahkan 1 mL reagen DNS dan dipanaskan kembali selama ± 2 menit, ditambahkan 5 mL akuades dan diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 570 nm.

Pengukuran produksi inulinase dilakukan untuk mengetahui rasio produksi relatif antara inulin dan sukrosa (rasio I/S). Produksi enzim inulinase didasarkan pada hasil gula reduksi yang terbentuk. Gula reduksi diukur dengan cara menghitung absorbansi enzim substrat (ES) dikurangi dengan absorbansi substrat (S) dan enzim (E), sehingga diperoleh rumus sebagai berikut:

Produksi Enzim (IU):

$$= \frac{(AbsES - AbsE - AbsS)}{BM_{fruktosa} \times 30} \times P \times 1000$$

Keterangan : AbsES = absorbansi enzim substrat, AbsE = absorbansi enzim, AbsS = absorbansi Substrat, BM = berat molekul fruktosa (180,1), P = faktor pengenceran

9) Metode Analisis Data

Percobaan produksi enzim dan laju pertumbuhan, menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial dengan 2 faktor. Faktor pertama yaitu tentang isolat khamir yang didapatkan dari isolasi buah kersen, di mana dalam penelitian ini akan digunakan dua isolat dari keseluruhan hasil isolasi yang didapat. Faktor kedua tentang konsentrasi $MnSO_4$, dengan konsentrasi sebesar 0,5mM; 1,5mM, dan 2,5mM. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan ANOVA apabila terdapat pengaruh perlakuan dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan pada taraf signifikansi 5%. Analisis data dilakukan menggunakan perangkat lunak SPSS 16.0.

III. HASIL

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika dan Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Semarang. Waktu pelaksanaan penelitian ini yaitu pada bulan November-Mei 2019. Buah kersen yang digunakan untuk isolasi adalah buah kersen yang matang dan berwarna merah. Hasil isolasi dari buah kersen yaitu didapatkan 4 isolat khamir. Keempat isolat khamir ini diberi kode K1, K2, K3 dan K4. Berdasarkan hasil seleksi isolat khamir dengan menggunakan media selektif inulin, tiga isolat di antara keempat isolat khamir yang berhasil diisolasi ternyata mengandung enzim inulinase yaitu isolat khamir K1, K2, dan K4. Sedangkan isolat khamir K3 tidak menghasilkan enzim inulinase. Isolat khamir K2 dan K4 digunakan untuk uji selanjutnya karena mampu tumbuh paling baik pada media selektif inulinase.

Hasil uji pertumbuhan khamir K2 dan K4 dengan penambahan berbagai konsentrasi mangan (dalam bentuk $MnSO_4$) menunjukkan pola pertumbuhan serupa. Khamir K2 dan K4 mengalami fase logaritmik pada waktu inkubasi jam ke-6 serta mengalami fase stasioner pada waktu inkubasi jam ke 12-24. Khamir K2 dan K4 belum menunjukkan adanya penurunan pertumbuhan yang signifikan pada waktu inkubasi jam ke-24.

Hasil uji produksi enzim menunjukkan bahwa produksi enzim inulinase khamir K2 dan K4 penambahan berbagai konsentrasi mangan (dalam bentuk $MnSO_4$) yang paling maksimal dihasilkan pada waktu inkubasi jam ke-6. Khamir dengan penambahan ion mangan konsentrasi M1 (0,5 mM) menunjukkan produksi enzim inulinase yang paling maksimal pada waktu inkubasi jam ke-6 dibandingkan kontrol (M0) dan variasi penambahan ion mangan dengan konsentrasi yang lain (M2 dan M3).

IV. PEMBAHASAN

1) Isolasi dan Seleksi Khamir dari Buah Kersen (*Muntingia calabura*)

Khamir yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari buah kersen (*Muntingia calabura*). Buah kersen yang digunakan adalah buah kersen yang berwarna merah besar sehingga memiliki kadar gula yang tinggi dan diharapkan terdapat banyak khamir yang dapat diisolasi dari buah kersen tersebut. Pernyataan tersebut didukung oleh (Sampaio *et al.*, 2008) bahwa khamir dari kelompok *Saccharomycetales* dapat diisolasi dari kulit kayu dan juga dapat diperoleh dari buah-buahan maupun lingkungan dengan kadar gula tinggi. Seleksi isolat yang akan digunakan untuk uji selanjutnya didasarkan pada ketebalan koloni masing-masing isolat khamir, perbedaan morfologi isolat khamir dan konsistensi isolat yang tumbuh pada media selektif inulinase. Inulin murni komersial digunakan sebagai sumber karbon pada media selektif tersebut untuk menyeleksi dan menumbuhkan mikroba yang mampu menghasilkan enzim inulinase. Penelitian Ertan, *et al* (2003) yang mengungkapkan bahwa prosedur *screening* untuk *R.solani* dalam menghasilkan enzim inulinase adalah dengan menumbuhkan *R.solani* ke dalam media modifikasi berisi inulin sebagai satu-satunya sumber karbon dan hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa *R.solani* adalah penghasil inulinase terbaik karena mampu tumbuh dengan baik pada media modifikasi berisi inulin tersebut. Hal tersebut juga telah dibuktikan pada penelitian ini, di mana khamir K1, K2 dan K4 menghasilkan dapat enzim inulinase karena dapat tumbuh dengan baik pada media selektif inulin sedangkan khamir K3 tidak menghasilkan enzim inulinase karena tidak mampu tumbuh dengan baik pada media selektif inulin. Khamir yang dapat tumbuh pada media yang

mengandung inulinase sebagai satu-satunya sumber karbon, maka akan digunakan untuk uji pertumbuhan dan produksi enzim karena dapat menghasilkan enzim inulinase dengan mendegradasi inulin dalam media selektif tersebut.

Hasil isolasi khamir dari buah kersen (*Muntingia calabura*) menunjukkan bahwa didapatkan 4 isolat khamir yaitu K1, K2, K3 dan K4. Tiga isolat (K1, K2 dan K4) (Gambar 1.1) ternyata dapat tumbuh pada media basal yang mengandung inulin sebagai satu-satunya sumber karbon, sedangkan khamir K3 tidak menghasilkan enzim inulinase karena tidak dapat tumbuh pada media ISM. Hasil seleksi menunjukkan bahwa isolat K2 dan K4 adalah dua isolat terbaik penghasil enzim inulinase karena mampu tumbuh dengan baik dan lebat pada media selektif inulinase dan akan digunakan untuk uji pertumbuhan dan produksi enzim. Songpim dkk. (2011) dan Madigan dkk. (2009) menyatakan bahwa sumber karbon sangat penting bagi metabolisme mikroba karena berhubungan dengan proses regenerasi. Sumber karbon pada media akan berperan sebagai pemacu produksi enzim dan sebagai biokatalisator sehingga mempercepat proses regenerasi. Pertumbuhan keempat isolat khamir pada media ISM (*Inulinase Selective Media*) ditunjukkan pada Gambar 1.1.



Gambar 1.1. Pertumbuhan Isolat Khamir dari Buah Kersen pada Media Selektif Inulin.

2) Karakterisasi Morfologi Khamir Penghasil Enzim Inulinase dari Buah Kersen (*Muntingia calabura*)

Karakterisasi morfologi khamir hasil isolasi dilakukan dua macam pengamatan yaitu pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan morfologi makroskopis merupakan pengamatan morfologi koloni pada saat proses isolasi dan pemurnian (purifikasi), meliputi bentuk koloni, permukaan koloni, elevasi, warna koloni dan tepi koloni. Sedangkan pengamatan secara mikroskopik, merupakan pengamatan sel yang dilakukan menggunakan mikroskop dengan menggunakan *methylene blue* untuk melihat bentuk sel secara mikroskopis. Karakterisasi khamir secara mikroskopik dilakukan dengan cara pewarnaan khamir menggunakan *methylene blue* dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Menurut Fugelsang dan Edwards (2007) *methylene blue* akan menyebabkan sel khamir yang hidup mereduksi *methylene blue* sehingga warna koloni khamir hidup memudar. Sedangkan sel khamir yang mati akan mengoksidasi *methylene blue* sehingga warna koloni khamir mati berwarna biru sampai kehitaman.

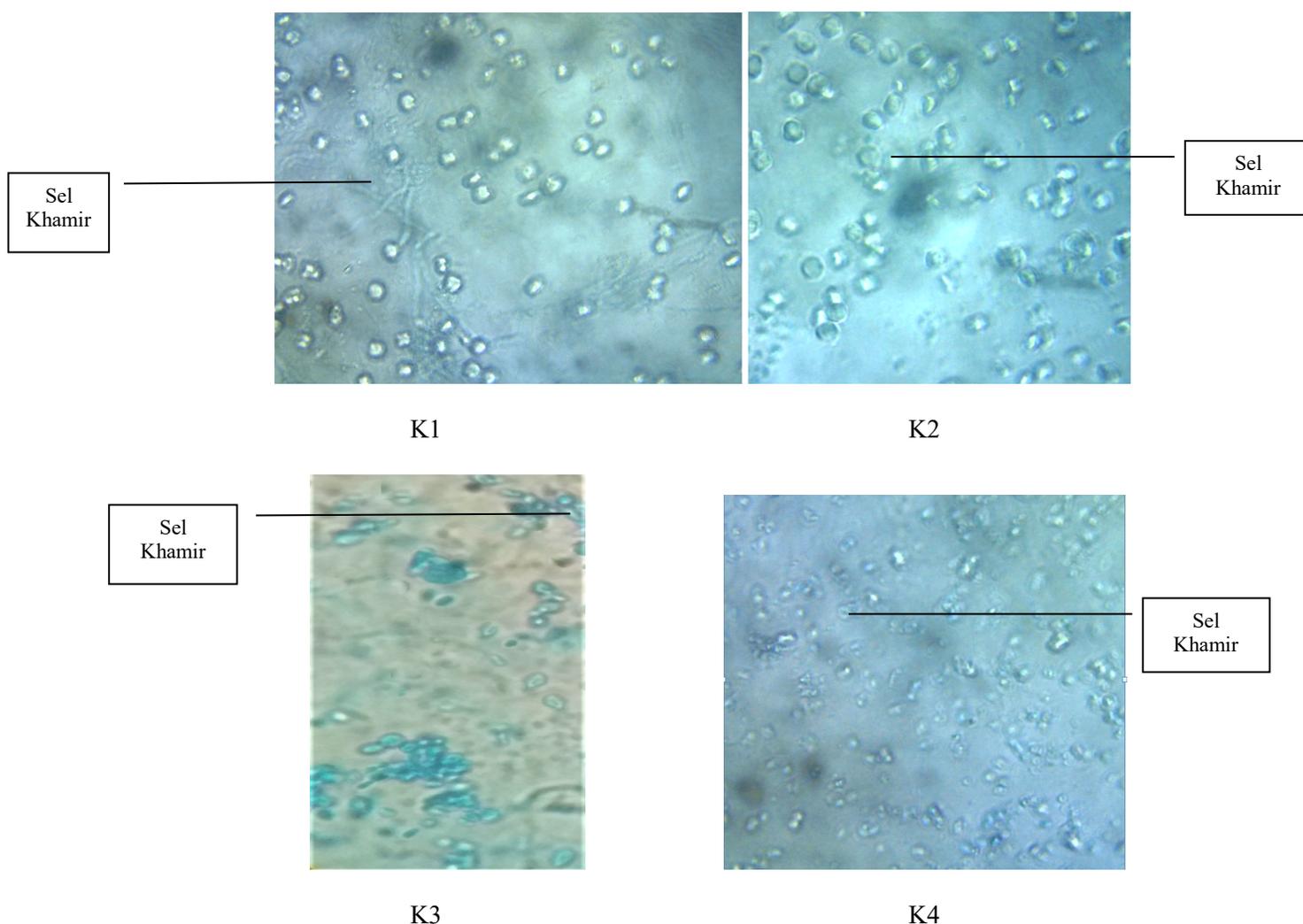
Karakteristik morfologi makroskopis khamir penghasil enzim inulinase yang telah diisolasi dari buah kersen (*Muntingia calabura*) tertera pada Tabel 2.1. Sedangkan gambar mikroskopik keempat isolat khamir yang diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali tertera pada Gambar 2.1.

Tabel 2.1. Morfologi koloni khamir dari buah kersen (*Muntingia calabura*)

Kode Isolat	Warna Koloni	Permukaan Koloni	Tepi Koloni	Tekstur Koloni
K1	Krem	Cembung dan mengkilap	Rata	Halus
K2	Krem	Cembung dan	Rata	Halus

K3	Krem	sangat mengkilap Cembung dan tidak mengkilap	Rata	Halus
K4	Krem kekuningan	Cembung dan tidak mengkilap	Rata	Halus

Keterangan: K1= Khamir 1; K2= Khamir 2; K3= Khamir 3; K4= Khamir 4



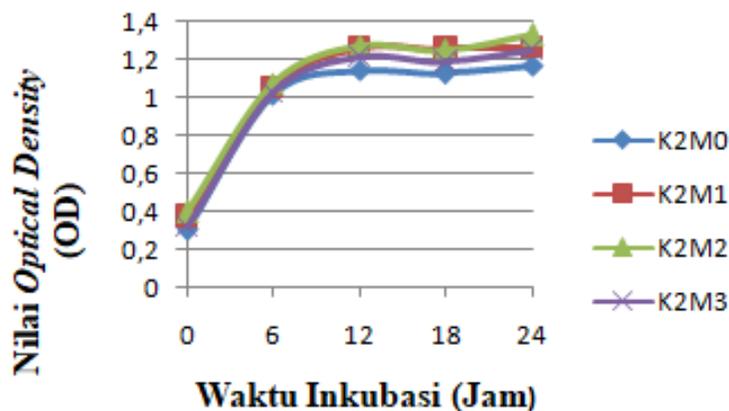
Gambar 2.1. Gambar Mikroskopis Khamir K1, K2, K3 dan K4 dari buah kersen (*Muntingia calabura*) (perbesaran 400 kali).

Berdasarkan Tabel 2.1 morfologi khamir yang berhasil diisolasi dari buah kersen (*Muntingia calabura*) menunjukkan adanya persamaan dan perbedaan. Keempat isolat khamir mempunyai warna krem namun untuk khamir K4 memiliki warna krem yang lebih kuning dibandingkan ketiga isolat khamir yang lainnya. Keempat isolat khamir memiliki tepi yang rata dan tekstur yang halus. Namun, khamir K1 memiliki permukaan koloni yang

cembung dan mengkilap. Khamir K2 memiliki permukaan koloni yang cembung dan sangat mengkilap, Khamir K3 memiliki permukaan yang cembung dan tidak mengkilap, serta khamir K4 memiliki permukaan yang cembung dan tidak mengkilap pula. Hal ini sesuai dengan pendapat dari Ahmad (2008) bahwa morfologi makroskopik khamir menunjukkan koloni berbentuk bulat dengan permukaan koloni yang kusam sampai berkilau, permukaan koloni licin, bertekstur lunak serta memiliki warna koloni abu-abu, krem hingga kecoklatan. Hal tersebut juga didukung oleh penelitian Suryaningsih, dkk (2018) yang berhasil mengisolasi khamir dengan ciri-ciri bentuk koloni bulat dengan warna putih kekrem, tepian rata, elevasi yang menonjol dan permukaan koloni khamir yang mengkilap.

3) Pertumbuhan Isolat Khamir Penghasil Inulinase dari Buah Kersen (*Muntingia calabura*)

Khamir K2 dan K4 dengan penambahan berbagai konsentrasi ion mangan menunjukkan pola pertumbuhan yang serupa. Pertumbuhan sel khamir K2 dan K4 maksimum pada waktu inkubasi ke 6 jam.



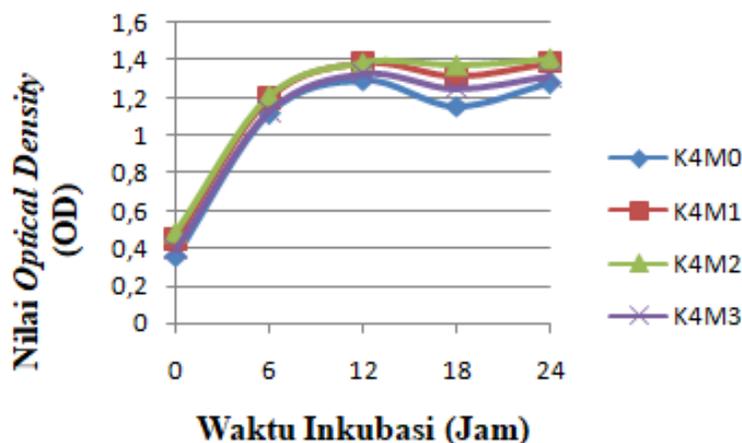
Gambar 3.1. Kurva Pertumbuhan Khamir K2

M0 = Kontrol (tanpa penambahan MnSO_4)

M1 = Konsentrasi MnSO_4 0,5 mM

M2 = Konsentrasi MnSO_4 1,5 mM

M3 = Konsentrasi MnSO_4 2,5 mM



Gambar 3.2. Kurva Pertumbuhan Khamir K4

M0 = Kontrol (tanpa penambahan MnSO_4)

M1 = Konsentrasi MnSO_4 0,5 mM

M2 = Konsentrasi MnSO_4 1,5 mM

M3 = Konsentrasi MnSO_4 2,5 mM

Berdasarkan Gambar 3.1, dapat dilihat bahwa pola rata-rata pertumbuhan khamir K2 dan K4 cenderung memiliki pola yang serupa. Fase lag tidak terjadi pada pertumbuhan kedua jenis khamir kemungkinan diakibatkan karena penggunaan starter 5% pada saat inokulasi. Madigan *et al.* (2012) menyatakan bahwa kultur mikroba pada medium starter yang sedang tumbuh secara eksponensial dan dipindahkan ke medium lain dengan kondisi pertumbuhan yang

sama seperti aerasi dan suhu, maka mikroba tersebut tidak akan mengalami fase lag/adaptasi serta akan segera memasuki fase logaritmik.

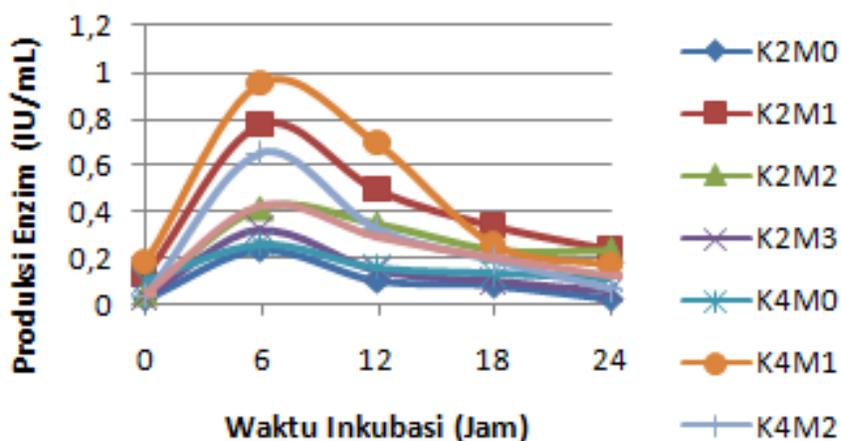
Fase eksponensial / logaritmik kedua jenis khamir terjadi pada waktu inkubasi 0-12 jam. Khamir K2 mengalami kenaikan OD yang signifikan pada waktu inkubasi jam ke-6 (Gambar 3.2). K2M2 memiliki nilai rata-rata OD tertinggi pada jam ke-6 yaitu sebesar 1,08. Sedangkan khamir K4 juga mengalami kenaikan OD yang signifikan pada waktu inkubasi jam ke-6. K4M2 memiliki nilai rata-rata OD tertinggi pada jam ke-6 yaitu sebesar 1,21 (Gambar 4.2.3). Fase logaritmik ini dicirikan dengan adanya kenaikan jumlah sel khamir yang signifikan dikarenakan nutrisi dalam media produksi yang melimpah selain itu didukung adanya inulin pada media produksi tepung umbi dahlia sebagai sumber karbon. Waluyo (2004) menyatakan sumber karbon dalam media kultur dapat diperoleh dengan penggunaan tepung umbi dahlia dan ekstrak inulin. Karbon sangat diperlukan untuk penyusun kerangka makromolekul seluler khamir sehingga peranan karbon di sini sangat penting bagi metabolisme khamir. Saat fase logaritmik ini sel khamir mengalami pembelahan sel yang sangat cepat dan maksimal dalam waktu yang konstan dan stabil serta diiringi meningkatnya produksi metabolit, sehingga produksi enzimnya dalam keadaan optimal

Fase stasioner khamir K2 dan K4 mulai terjadi pada waktu inkubasi 18-24 jam. Pada tahap ini terlihat pertumbuhan sel khamir mulai lambat karena mulai terjadi kematian sel. (Gambar 3.1). Pertumbuhan khamir yang lambat dan kematian sel khamir tersebut dapat disebabkan karena telah berkurangnya nutrisi pada media produksi akibat dari konsumsi nutrisi yang tinggi pada fase logaritmik. Hal ini sesuai dengan pendapat Dinarvand (2013) yang menyatakan kurangnya sumber karbon dalam media dapat menghambat sintesis enzim, sehingga menyebabkan terjadinya penurunan sel khamir.

Berdasarkan Gambar 3.2 dan 3.3 menunjukkan bahwa ketika fase stasioner, khamir K2 dan K4 masih mengalami pertumbuhan sel khamir, yang ditunjukkan dengan kenaikan nilai absorbansi, yaitu pada waktu inkubasi 24 jam. Abadianti, dkk (2017) menyatakan bahwa terjadinya pertumbuhan sel khamir setelah fase stasioner disebabkan karena adanya gula reduksi seperti glukosa dan fruktosa hasil hidrolisis inulin ketika fase log, yang mampu digunakan sebagai sumber karbon bagi sel khamir. Kurva pada Gambar 3.2 dan 3.3 menunjukkan bahwa belum terjadi adanya fase kematian sel khamir yang signifikan.

4) Produksi Enzim Inulinase Isolat Khamir dari Buah Kersen (*Muntingia calabura*)

Uji produksi inulinase merupakan suatu uji yang bertujuan untuk mengetahui kadar enzim inulinase yang dihasilkan oleh isolat khamir K2 dan K4 pada fase pertumbuhannya. Menurut Abadianti, dkk (2017) enzim inulinase merupakan salah satu jenis enzim ekstraseluler, sehingga enzim tersebut disekresikan keluar sel dan bercampur dengan medium inulin. Maka dari itu, produksi enzim inulinase dapat diukur dengan menggunakan *crude enzyme*. Uji produksi enzim pada khamir K2 dan K4 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nyata pada produksi enzim dengan berbagai perlakuan yang diberikan yaitu penambahan mikronutrien dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Kurva produksi enzim khamir K2 dan K4 dengan berbagai perlakuan ditunjukkan pada Gambar 4.1



Gambar 4.1. Kurva Produksi Enzim Khamir K2 dan K4 dengan Penambahan Berbagai Konsentrasi Mn

Berdasarkan Gambar 4.1 menunjukkan bahwa produksi enzim inulinase pada khamir K2 pada waktu inkubasi 0 jam produksi enzim sangat sedikit sehingga tidak menunjukkan adanya produksi enzim. Pada waktu inkubasi 0 jam khamir mulai mengalami fase logaritmik yang ditandai dengan adanya pertumbuhan, sel-sel mulai membelah dan jumlahnya mulai meningkat, namun pada waktu inkubasi ini khamir belum menghasilkan produksi enzim karena belum terlalu banyak menggunakan substrat. Produksi enzim inulinase khamir K2 paling tinggi pada waktu inkubasi 6 jam. Pada waktu inkubasi 6 jam tersebut khamir K2M0 memiliki rata-rata produksi enzim sebesar 0,24 UI/mL; khamir K2M1 sebesar 0,77 UI/mL; khamir K2M2 sebesar 0,47 UI/mL; sedangkan khamir K2M3 memiliki rata-rata produksi enzim sebesar 0,32 UI/mL.

Berdasarkan Gambar 4.4.1. juga menunjukkan bahwa waktu inkubasi jam ke 0 juga produksi enzim inulinase belum terlalu banyak. Berdasarkan gambar tersebut, rata-rata produksi enzim inulinase pada khamir K4 paling tinggi pada waktu inkubasi 6 jam. Pada waktu inkubasi 6 jam tersebut khamir K4M0 memiliki rata-rata produksi enzim sebesar 0,26 UI/mL; khamir K4M1 sebesar 0,95275 UI/mL; khamir K4M2 sebesar 0,65 UI/mL; sedangkan khamir K4M3 memiliki rata-rata produksi enzim sebesar 0,43 UI/mL. Hal tersebut dikarenakan pertumbuhan khamir K2 dan K4 mengalami fase logaritmik juga pada waktu inkubasi jam ke 6, di mana jumlah sel-selnya meningkat secara signifikan sesuai dengan penambahan waktu diiringi dengan meningkatnya penggunaan substrat sehingga produksi enzim menjadi sangat optimal. Oleh karena itu dapat dikatakan bahwa produksi tersebut termasuk ke dalam metabolisme primer, sehingga produk enzim tersebut merupakan metabolit primer karena dihasilkan pada fase logaritmik, hal tersebut didukung oleh pendapat dari Wijanarka dkk. (2013) bahwa produksi enzim dapat dikolerasikan dengan pertumbuhan mikroba sehingga produk enzim suatu mikroba yang dihasilkan saat mikroba dalam kultur mengalami fase eksponensial dapat dikelompokkan sebagai metabolisme primer. Selain itu, saat fase logaritmik sel khamir tumbuh secara aktif disertai dengan meningkatnya produksi metabolit yang dihasilkan sehingga produksi enzim mencapai optimal. Pernyataan tersebut juga didukung kembali oleh pendapat Sari dan Hartiko (2005) yang menyatakan bahwa pada fase eksponensial, sel mikroba membelah dengan konstan dan cepat sehingga dibutuhkan energi yang lebih besar dibandingkan fase-fase pertumbuhan mikroba yang lain. Maka dari itu, mikroba dalam kultur akan mengeluarkan inulinase untuk menghidrolisis inulin yang ada pada media tersebut untuk dijadikan sebagai sumber energi dan sumber karbon, dengan demikian produksi enzim inulinase akan meningkat.

Produksi enzim inulinase yang dihasilkan oleh khamir K2 dan K4 mulai mengalami penurunan pada waktu inkubasi 12-24 jam di mana substrat sudah mengalami penurunan sehingga produksi enzim menurun. Selain itu hal tersebut juga berkaitan dengan pertumbuhan khamir K2 dan K4 yang memang mengalami fase stasioner mulai dari inkubasi pada awal jam ke 12 sampai jam ke 24, di mana jumlah sel-selnya tetap bahkan menurun diiringi dengan berkurangnya substrat sehingga produksi enzim menjadi tidak optimal. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Wijanarka dkk (2004) yang menyatakan bahwa setelah mengalami fase stasioner produksi enzim inulinase akan menurun karena sel mikroba mengalami kematian yang disebabkan penurunan jumlah nutrisi dalam medium. Menurut Sari dan Hartiko (2005) produksi enzim inulinase menurun pada fase stasioner. Pada fase stasioner metabolisme berjalan dengan lambat dan mengakibatkan kebutuhan akan energi yang menurun. Hal ini akan menyebabkan terjadinya represi katabolik. Semakin lama waktu inkubasi maka akan semakin besar pula jumlah gula reduksi yang dihasilkan sebagai hasil samping hidrolisis inulin. Gula reduksi akan menghambat produksi enzim inulinase apabila dihasilkan dalam jumlah yang besar.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa adanya penambahan mangan mampu meningkatkan produksi enzim. Terbukti dengan rendahnya produksi enzim pada perlakuan kontrol/tanpa penambahan konsentrasi mangan (K2M0 dan K4M0) dibandingkan perlakuan adanya penambahan konsentrasi mangan (K2M1, K2M2, K2M3, K4M1, K4M2 dan K4M3). Hal ini disebabkan karena adanya penambahan ion mangan yang mampu meningkatkan produksi enzim inulinase dari isolat khamir. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Abadianti, dkk (2017) yang menyatakan bahwa adanya ion logam mampu berperan sebagai aktivator pada sebagian besar enzim yang sangat penting untuk reaksi katalitik enzim. Ion mangan (Mn^{2+}) merupakan salah satu ion logam yang mampu meningkatkan produksi inulinase secara signifikan dari beberapa khamir. Mekanisme ion logam dalam memperbesar aktivitas enzim dengan cara membantu reaksi katalitik, yaitu dengan cara mengikat substrat pada sisi pemotongan. Selain itu juga berperan untuk menstabilkan konformasi aktif enzim serta menginduksi formasi aktif suatu enzim dengan cara mengikat enzim secara langsung. (Richardson dan Hyslop, 1985). Tomas *et al.*, (2003) menyatakan bahwa ion mangan diabsorpsi terutama pada dinding sel dan didistribusikan di dalam sel khamir. Ion mangan memiliki peran penting dalam pembentukan tunas pada khamir. Pada badan golgi, ion mangan mengaktifkan glikosiltransferase yang terlibat dalam metabolisme protein. Pada mitokondria, mangan berperan dalam menjaga sel terhadap stress oksidatif, dengan cara ikut menjadi bagian inti dari superoksida dismutase.

Penelitian Singh *et al.*, (2006) menjelaskan bahwa penambahan ion mangan (Mn) dalam bentuk MnSO₄ mampu meningkatkan produksi enzim inulinase secara signifikan dari *Kluyveromyces marxianus* YS-1. Hasil penelitian Zhang *et al.*, (2009) juga menunjukkan bahwa ion Mn²⁺ mampu berperan sebagai aktivator bagi enzim inulinase dari *Pichia pastoris*.

Penelitian ini juga menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi mikronutrien Mn yang ditambahkan maka produksi enzim akan semakin menurun. Hal ini disebabkan karena mikronutrien dibutuhkan dalam jumlah tertentu untuk mencapai produksi enzim yang optimal, Namun, apabila penambahan mikronutrien dalam konsentrasi tertentu yang berlebihan dapat mengakibatkan penurunan produksi enzim karena bersifat racun bagi mikroba. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Irshad dan Asgher (2011) bahwa penambahan ion logam dalam konsentrasi tertentu yang berlebihan dapat menyebabkan toksik bagi mikroorganisme. Hasil penelitian Singh *et al.*, (2006) menunjukkan bahwa penambahan MnSO₄ sebesar 0,1 mM mampu meningkatkan produksi inulinase pada khamir *Kluyveromyces marxianus* YS-1 dan semakin besar konsentrasi MnSO₄ yang diberikan produksi enzim inulinase semakin rendah.

Berdasarkan hasil analisis ANOVA menunjukkan bahwa penambahan variasi konsentrasi mangan berpengaruh signifikan terhadap produksi enzim inulinase khamir K2 dan K4 pada waktu inkubasi jam ke-6. Hasil uji lanjut *Post Hoc* Duncan menunjukkan bahwa konsentrasi mangan M1 (0,5 mM) merupakan perlakuan paling baik dan berpengaruh signifikan terhadap produksi enzim inulinase pada waktu inkubasi jam ke-6.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan 3 isolat khamir yang menghasilkan enzim inulinase dari buah kersen (*Muntingia calabura*). Produksi enzim inulinase maksimum yang dihasilkan oleh khamir K2 dan K4 adalah pada waktu inkubasi jam ke 6 (fase logaritmik). konsentrasi mangan M1 (0,5 mM) merupakan perlakuan yang paling baik dan berpengaruh signifikan terhadap produksi enzim inulinase pada waktu inkubasi jam ke-6.

DAFTAR PUSTAKA

- Abadiati, B., Supriyadi, A., Wijanarka (2017) Produksi Inulinase oleh Khamir *Pichia Manshurica* DUCC Y-015 pada Tepung Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.) dengan Variasi Konsentrasi MnSO₄.H₂O dan Waktu Inkubasi. *Jurnal Biologi*, 6 (3) : 22-30.
- Ahmad, R. Z. (2008) Pemanfaatan Cendawan untuk Meningkatkan Produktivitas dan Kesehatan Ternak. *Jurnal Litbang Pertanian*. 27(3) :1-9.
- Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (2000) *Yeasts: Characteristics and Identification*, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- Dinarvand, M., Malahat R., Malihe., Seyed DJ., Mohsen Z., Sahar A., dan Arbakariya B. Ariff (2013) "Effect of C/N Ratio and Media Optimization through Response Surface Methodology on Simultaneous Productions of Intraand Extracellular Inulinase and Invertase from *Aspergillus niger* ATCC 20611". *BioMedical Research International*. 2:13.
- Ertan, F., T. Aktac, A. C. Kaboglu, F. Ekinci, and E. Bakar (2003) Determination of Optimum Cultivation Condition on the Production of Inulinase from *Rhizoctonia solani*. *Pakistan J. Biological Science*. 6 (16) : 1386-1388
- Fugelsang, K.C., dan Edwards, C.G (2007) *Wine Microbiology : Practical Applications and Procedures*, Second Edition. Springer Science.
- Irshad, M, Asgher, M (2011) Production and Optimization of Lignolytic Enzymes by White Rot Fungus *Schizophyllum* Commune IBL-06 in Solid State Medium Banana Stalks. *African Journal of Biotechnology*. 10(79):18234-18242.
- Kurtzman, C.P. dan Fell, J.W (2006) Yeast Systematics and Phylogeny Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology in Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, *The Yeast Handbook*. Springer. New York.: 16-18.
- Madigan, M., J. Martinko., P.V. Dunlap, and D.P. Clark (2009) *Biology of Microorganism 12 Edition*. Pearson Benjamin Cummings. San Francisco, Boston, New York.
- _____, _____, D.A. Stahl, and D.P. Clark (2012) *Biology of Microorganisms*. 13th edition. Pearson education, Inc. San Fransisco, 117-128.
- Meghavarnam, A.K.; Salah, M.; Sreepriya, M.; Janakiraman, S (2017) Growth Inhibitory and Proapoptotic Effects of L-asparaginase from *Fusarium culmorum* ASP-87 on Human Leukemia Cells (Jurkat). *Fundam. Clin. Pharmacol*. 31: 292–300.
- Pandiyan C, Annal VR, Kumaresan G, Murugan B, Rajarajan G (2012) Effect of Incorporation of Inulin on the Survivability of *Lactobacillus acidophilus* in Synbiotic Ice Cream. *Int Food Res J*. 19(4):1729–1732.
- Pramuditio, D (2013) Studi Awal Pembuatan Asam Laktat dari Buah Kersen (*Muntingia calabura*). *Jurnal Teknik Pomits*. 2(1): 1-4.
- Sampaio. F. C. 2008. Screening of Filamentous Fungi for Production of Xylitol from D-Xylose. *Brazilian Journal of Microbiology*. 34: 325-8.
- Sari, S., Lusi A., Hartiko, Hari (2005) Produksi Inulinase Jamur yang Diisolasi dari Tanah Sekitar Umbi Dahlia (*Dahlia pinnata* cav). *BioSmart*. 7 (1): 1-5.
- Singh, P. Gill, K. Prabhjot. 2006. Production of Inulinase: Recent Advances. *Food Technol. Biotechnol* 44 (2): 151-162.
- Spencer, J.F.T. 1997. *Yeast in Natural and Artificial Habitats*. Berlin: Springer-Verlag.

- Songpim, M., Vaithanomst, P., Vanichsriratana, W., dan Sirisansaneeyakul, S., .2011., Enhancement of Inulinase and Invertase Production from a Newly Isolated *Candida guilliermondii* TISTR 5844, Kasetsart J. *Natural Science*. 45: 675-685
- Suryaningsih, V., Rejeki, S.F. , Endang K. 2018. Karakteristik Morfologi, Biokimia, dan Molekuler Isolat Khamir Ik-2 Hasil Isolasi dari Jus Buah Sirsak (*Annona muricata* L.). *Jurnal Biologi*. 7 (1): 18-25.
- Richardson, T and D.B. Hyslop. 1985. *Enzymes In Food Chemistry*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker.
- Tomas, V. S., G.Z. Vlatka .Dami Link R S., Slobodan G., and Nada V. 2003. Zinc, Copper, and Manganase Enrichment in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Food Technol. Biotechnol.* 42(2): 115-120.
- Waluyo, L. 2004. *Mikrobiologi Umum*. Malang: Universitas Muhammadiyah Press.
- Wijanarka, Ferniah, S.R., Salamah (2004) Produksi Inulinase *Pichia alni* DUCC-W4 pada Tepung Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis* Wild.) dengan Variasi Konsentrasi Ammonium Nitrat dan Waktu Inkubasi. *BIOMA*. 2(19): 58-64.
- _____, K, E. dan S, H.P., 2008. Produksi Inulinase Fusan 3 Hasil Fusi Protoplast Interspesifik *Kluyveromyces marxianus* dan *Torulospira pretoriensis* Autothonus. *Jurnal Sains dan Matematika*. 16 (2): 88-96.
- _____, Soetarto, E.S., Dewi, K. dan Indrianto, A., 2013. Kinetika Pertumbuhan dan Produksi Inulinase Fusan F7. *BIOMA*, 15(2): 53-57.
- _____, _____, _____ dan _____. 2013. Produksi Inulinase *Pichia manshurica* dan Fusan F4 pada Fermentasi Batch dengan Umbi Dahlia (*Dahlia sp.*) sebagai Substrat. *Reaktor*. 14:187-192.
- Xiao, R., Masatoshi, T. dan Shoici, T. 1988 Inulinase from *Cryosorium pannorum*. *Journal Ferment and Technology* 66 (5) : 244-248.
- Yurliasni dan Zakaria. 2013. Kajian Penambahan Khamir *Kluyveromyces lactis*, *Candida curiosa* dan *Brettanomyces custersii* Asal Dadih Terhadap Konsentrasi Asam-Asam Amino, Lemak, Organik dan Karbohidrat Susu Kerbau Fermentasi (Dadiah). *Bionatura-Jurnal Ilmu-ilmu Hayati dan Fisik*. 15(1): 54 – 59
- Zhang L, Zhao C, Zhu D. 2004. Purification and Characterization of Inulinase from *Aspergillus niger* AF10 Expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Express Purif.* 35:272-275.
- Zhang, T., F. Gong., Y. Peng., and Z. Chi. 2009. Optimization of High Level Expression of the *Pichia guilliermondii* recombinant inulinase in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant inulinase. *Proses Biochemistry*. 44(5): 1335-1339.