

NICHE Journal of Tropical Biology

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

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

The ability of yeast isolates from isolation of Nira Siwalan (*Borassus flabellifer* L.) with various concentrations

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

ABSTRACT

Microbial inulinase is one of the most interesting enzymes, especially the ones produced by yeast. Yeast is commonly found in sugar-containing materials, such as Nira Siwalan (*Borassus flabellifer* L). Yeast uses simple sugar compounds in foods to obtain its energy. If the nira is stored, the fermentation begins to occur, carried by the natural microorganism of Nira Siwalan which causes sour taste as acetic acid is started to be formed. This condition is ideal for the microorganisms (such as yeast) to grow. This research aims to analyze the impact of the best calcium concentration towards the production of inulinase by indigenous yeast in Nira Siwalan (*Borassus flabellifer* L). The research was done in biotechnology laboratory, Biology Department, Faculty of Science and Mathematics, Diponegoro University. The activity of inulinase was determined using DNS method. The research was designed using Randomized Factorial Design with concentration of CaCl₂ and incubation time as the factors. The CaCl₂ concentration was differentiated into four categories: Ca₀, Ca_{0.5}, Ca_{1.0}, and Ca_{1.5}, while the incubation time was differentiated into 5 categories: T₀, T₄, T₈, T₁₂, T₁₆, and T₂₀. Each treatment is repeated three times. After that, the data obtained from the observation analyzed using ANOVA. The result shows that the addition of 0.5 mM CaCl₂ with inulinase activity 0.555 IU/mL gives the best result.

Keywords: inulinase, yeast, Nira Siwalan (*Borassus flabellifer* L), CaCl₂.

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 indogenous 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 CaCl₂ (Ca₀, Ca_{0.5}, Ca_{1.0}, dan Ca_{1.5}) dan faktor II waktu inkubasi (T₀, T₄, T₈, T₁₂, T₁₆, dan T₂₀). Masing – masing perlakuan diulang sebanyak tiga kali. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan metode ANOVA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi CaCl₂ 0.5 mM dengan aktivitas inulinase 0.555 IU/mL memberikan pengaruh terbaik.

Kata Kunci : inulinase, khamir, nira siwalan (*Borassus flabellifer* L.), CaCl₂

*Penulis korespondensi: wijanarka1810@gmail.com

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). Produksi fruktosa dapat berasal dari inulin dengan adanya bantuan inulinase hanya memerlukan satu tahap reaksi enzimatik dan dapat menghasilkan 95% fruktosa. Enzim inulinase ini dapat dihasilkan oleh beberapa jenis tumbuhan maupun mikroorganisme. Mendapatkan enzim inulinase dalam jumlah yang cukup dari tumbuhan, cukup sulit. Oleh sebab itu, diperlukan penelitian mengenai inulinase mikrobal (Kaur *et al*, 1992).

Enzim inulinase dapat berasal dari golongan jamur *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Chrysosporium* sp, Khamir (yeast) *Kluyveromyces* sp, *Candida* sp, *Debaromyces* dan *Saccharomyces* sp dari golongan bakteri *Arthrobacter* sp, *Flavobacterium* sp dan *Bacillus* sp (Allais *et al.*, 1986 ; Xiao *et al.*, 1989). 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 enzimatik inulin.

Ada dua spesies khamir yang dapat tumbuh pada nira siwalan, tetapi yang merupakan khamir utama dalam proses fermentasi nira adalah *Saccharomyces cerevisiae* dan *Saccharomyces carlbergensis*. Kedua *Saccharomyces* tersebut merupakan khamir utama dalam proses fermentasi nira dan dapat tumbuh dan berkembang dengan baik pada pH 4,4 – 4,6 dan suhu 21-25°C (Prescott, 1949). Nutrien yang dibutuhkan oleh genus *Saccharomyces* adalah C, H, O, N, S, P, Mg, Fe, Ca. Penelitian lain mengatakan bahwa khamir dapat tumbuh pada pH 4 – 5 dan dapat tumbuh pada kisaran pH 2,5 – 8,5 (Rahayu, 1989). nira dari tanaman siwalan (*Borassus flabellifer* L) menurut Tuntiwongwanich, S. & B. Leenanon. (2009) *Candida tropicalis* ditemukan juga pada nira *Borassus flabellifer* L. dari Thailand bersama dengan *Kloeckera apiculata*, *Kloeckera japonica*, *Candida krusei*, dan *Candida valida*.

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. MATERI DAN METODE

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.

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.

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).

Pertumbuhan Sel

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 (Wijanarka, *et al.*, 2008).

Produksi Enzim

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 (Wijanarka, *et al.*, 2008).

Pengukuran Aktivitas Inulinase

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 μmol gula reduksi yang dibebaskan per menit pada kondisi tertentu (Xiao *et al.*, 1998; Wijanarka *et al.*, 2008).

Aktivitas inulinase dianalisis dengan metode DNS (Chaplin dan Kennedy, 1994) dan ditentukan berdasarkan sejumlah 1 μmol 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),

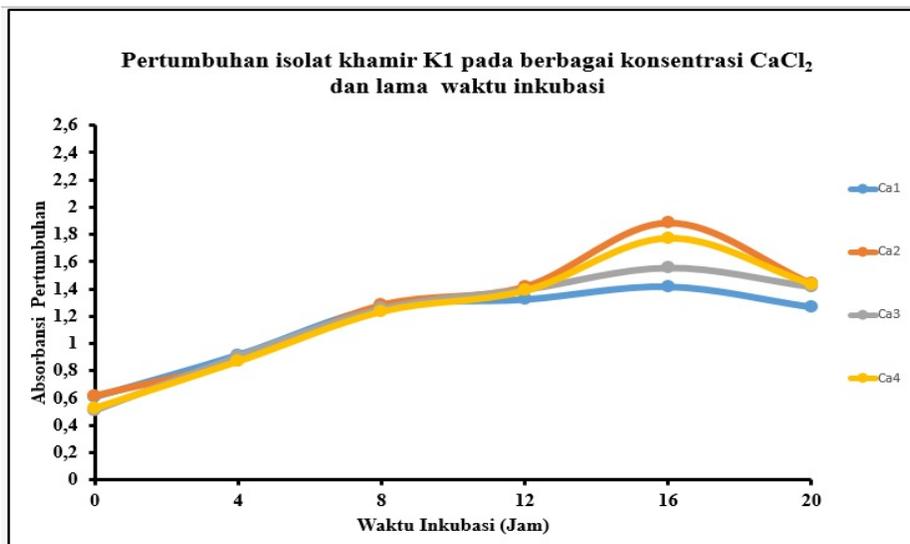
P= faktor pengenceran.

Rancangan Percobaan dan Analisis Data

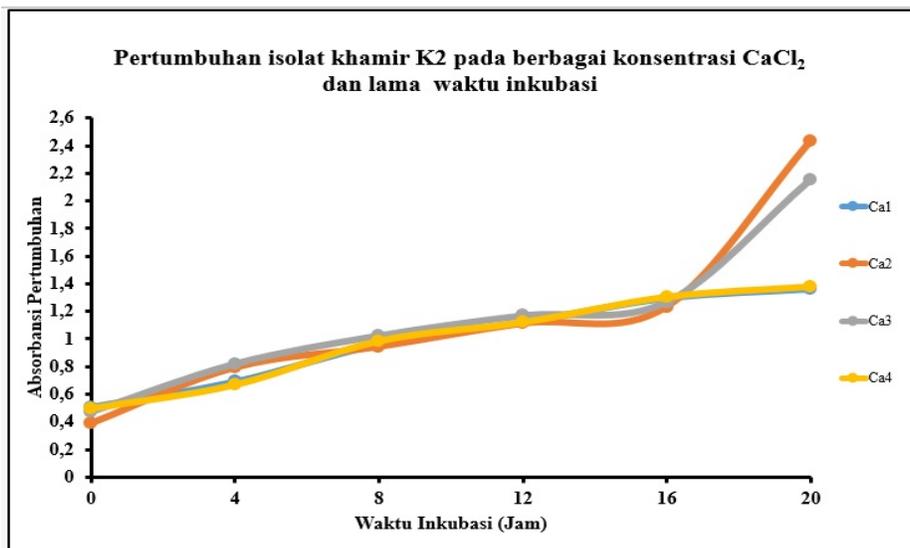
Analisis statistik menggunakan Rancangan Acak Lengkap faktorial dengan 2 faktor yang dicoba yaitu faktor I konsentrasi CaCl_2 (Ca_0 , $\text{Ca}_{0,5}$, $\text{Ca}_{1,0}$, dan $\text{Ca}_{1,5}$) dan faktor II waktu inkubasi (T_0 , T_4 , T_8 , T_{12} , T_{16} , dan T_{20}). Masing – masing percobaan diulang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

III. HASIL

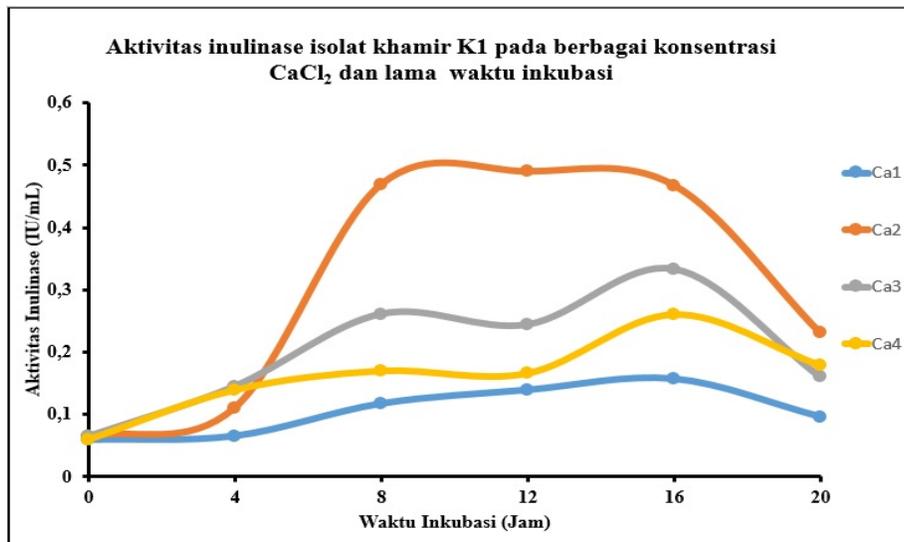
Penelitian mengenai kemampuan memproduksi inulinase isolat khamir hasil isolasi dari Nira Siwalan (*Borassus flabellifer* L.) dengan variasi konsentrasi CaCl_2 didapatkan hasil pertumbuhan yang diukur dengan spektrofotometer pada $\lambda 520$ (Gambar 1; Gambar 2) dan aktivitas inulinase pada $\lambda 570$ (Gambar 3; Gambar 4).



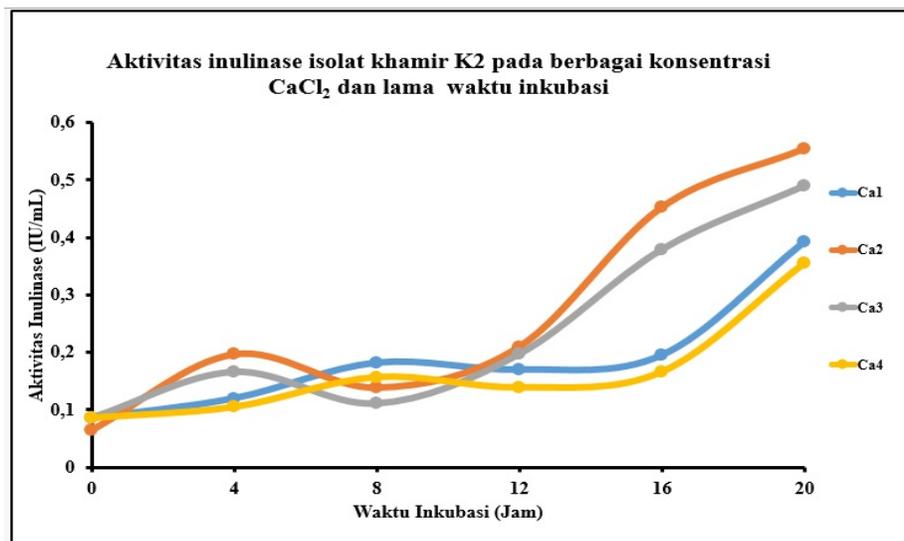
Gambar 1. Kurva pertumbuhan isolat khamir K1 dalam medium produksi dengan penambahan CaCl_2 pada berbagai konsentrasi selama waktu pertumbuhan inkubasi 20 jam.



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



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



Gambar 4. Aktivitas inulinase isolat 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

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).

Vankateshwar *et al.*, (2010), menyatakan bahwa mikronutrien dapat mempengaruhi pertumbuhan dan proses metabolisme khamir selama fermentasi yang berpengaruh terhadap pertumbuhan khamir. Mikronutrien tidak hanya digunakan untuk pertumbuhan saja, CaCl_2 yang terdisosiasi menjadi ion kalsium dan ion klorida didalam air, ion klorida digunakan untuk membantu regulasi osmotik, kesetimbangan asam basa larutan, dan mengatur netralitas elektrokimia dengan pertukaran anion dengan bikarbonat dalam transport CO_2 . Kalsium digunakan dalam persinyalan khamir penting dalam ketahanan selama konjugasi, ion resisten terhadap stress, siklus sel, tekanan osmotik, dan fusi Vakuola (Groppi, *et al.*, 2011).

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.

Pengaruh konsentrasi CaCl_2 terbaik pada aktivitas Inulinase khamir K1 (Gambar 3) dan aktivitas inulinase khamir K2 (Gambar 4) terdapat pada konsentrasi CaCl_2 0.5 mM. Konsentrasi CaCl_2 dapat menjadi aktivator enzim pada konsentrasi rendah. Vyas *et al.* (2005), menyatakan mikronutrien berupa kalsium pada konsentrasi rendah dapat menjadi stimulator enzim, dan menjadi inhibitor pada konsentrasi tinggi. Kalsium merupakan mikronutrien yang keberadaannya diperlukan untuk sebagian besar enzim. Penambahan CaCl_2 yang tepat pada medium fermentasi dapat meningkatkan produksi enzim (Sivaramakrishnan, *et al.*, 2006).

Aktivitas inulinase tertinggi pada isolate khamir K-2 diperoleh pada perlakuan CaCl_2 0,5 mM, dengan nilai 0.555 IU/mL dan isolate khamir K-1 diperoleh pada perlakuan CaCl_2 0,5 mM, dengan nilai 0.468 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 Sivaramakrishnan, 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 TERIMA KASIH

Cicin Dwi Pamungkas, Feri Hardianti, dan Fitri Ulfana Risky yang telah membantu dalam kelancaran penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Allais, J. J.; S. Kammoun ; P. Blanc; C. Girard dan J. Baratti.(1986). Isolation and Characterization 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.
- Ginovart M, Prats C, Portell X, Silbert M (2011). Exploring the lag phase and growth initiation of a yeast culture by means of an individualbased model. *Food Microbiol.* 28: 810-817. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.004>
- Groppi, S., Fiorella, B., Rogelio, L. B., Enzo, M., and Renata T.(2011). Glucose-induced Calcium Influx in Budding Yeast Involves a Novel Calcium Transport System and Can Activate Calcineurin. *J. Cell Calcium Elsevier* 49: 376-386. DOI: [10.1016/j.ceca.2011.03.006](https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.03.006)
- Hanafiah, K. A. (2000). *Rancangan Percobaan : Teori dan Aplikasi.* PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta.

- Kaur, N., Kaur, M., Gupta, A.K. & Singh, R. (1992). Properties of β -fructosidases (invertase and inulinase) of *Fusarium oxysporum* grown on an aqueous extract of *Cichorium intybus* roots. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 53: 279-284. <https://doi.org/10.1002/jctb.280530308>
- 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.
- Prescott, S.C. and C. Gordon. 1949. *Industrial Microbiology*. 2nd ed. Cambridge: Me. Graw-Hill Book Company, Inc.
- Rahayu K.dkk.(1989).*Mikrobiologi Pangan*. Yogyakarta: PAU Pangan Dan Gizi UGM.
- 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.
- Tuntiwongwanich, S. & B. Leenanon. (2009). Morphology and identification of yeasts isolated from toddy palm in Thailand. *Journal of Microscopy Society of Thailand*. 23(1): 34-37.
- 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. DOI: [10.5897/AJB11.2705](https://doi.org/10.5897/AJB11.2705)
- 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