

Analisis Fusan Hasil Fusi Protoplas Intraspesies *Pichia manshurica* DUCC-015

(Analysis of Fusant from Protoplast Fusion Intraspecies of *Pichia manshurica* DUCC-015)

¹Roslenawati, ¹Hermin Pancasakti Kusumaningrum, and ²Sri Pujiyanto

¹Laboratorium Genetika

²Laboratorium Mikrobiologi

Jurusan Biologi, Fakultas Sains & Matematika, Universitas Diponegoro

Tembalang, Semarang – 50275

Telepon (024) 7474754; Fax. (024) 76480690

Email : roslenawati90@yahoo.co.id

ABSTRACT

The intraspecies protoplast fusion of *P. manshurica* DUCC-015 was conducted in searching the fusant with greater inulinase production. Inulinase on *Dahlia variabilis* Willd tuber from Baturraden-Purwokerto showed inulinase activity 0,683 IU/mL. Inulinase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis reaction of inulin polysaccharides into fructose and or fructooligosaccharides. The aims of this research was revealing fusant from intraspecies protoplast fusion process of *P. manshurica* DUCC-015 followed by analyzing of their inulinase productivity and activity. The research methodology protoplast fusion process consist of lysis of cell wall, protoplast fusion and regeneration of intraspecies fusant *P. manshurica* DUCC-015. Analysis of fusant were done by Schiff Basic Fuchsin staining of fusant nuclei, also measuring the inulinase activity and inulinase production comparing with their parent. The inulinase activity will be analyzed by T-Test Independent Two Sample on 95% Confidence interval of the difference use Statistical Product and Service Solution programme (SPSS). The result of experiment gaining fusant with regeneration capability, ploidi diversity of fusant, inulinase activity about 0,965 IU/mL while their parent 0,622 IU/mL and inulinase production 0,736 IU/mL comparing with 0,731 IU/mL during 42 hours incubations. The fusant indicated the increase of inulinase activity and production compared with their parent.

Keywords: Pichia manshurica DUCC-015, fusant, inulinase

ABSTRAK

Fusi protoplas intraspesies *Pichia manshurica* DUCC-015 telah dilakukan untuk mencari fusan dengan produksi inulinase yang lebih tinggi. Inulinase pada umbi tanaman *Dahlia variabilis* Willd dari Baturraden-Purwokerto memperlihatkan aktivitas sebesar 0,683 IU/mL. Inulinase merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis polisakarida inulin menjadi fruktosa dan atau fruktooligosakarida. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan fusan hasil fusi protoplas intraspesies *P. manshurica* DUCC-015 yang memiliki aktivitas inulinase lebih tinggi. Rancangan percobaan fusi protoplas terdiri dari isolasi protoplas, fusi protoplas dan regenerasi fusan. Analisis fusan menggunakan pewarnaan Fuchsin pada inti sel, mengukur aktivitas dan produksi inulinase fusan. Aktivitas inulinase dianalisis dengan Uji T Test Dua Sampel Independen pada taraf kepercayaan 95% menggunakan program Statistical Product and Service Solution (SPSS). Hasil penelitian menunjukkan fusi protoplas intraspesies *P. manshurica* DUCC-015 menghasilkan aktivitas inulinase mencapai 0,965 IU/mL dibandingkan induk sebesar 0,622 IU/mL dan produksi inulinase 0,736 IU/mL pada inkubasi selama 42 jam. Fusan mengindikasikan kenaikan aktivitas dan produksi inulinase dibandingkan induk.

Kata kunci : Pichia manshurica DUCC-015, fusan, inulinase.

PENDAHULUAN

Umbi Dahlia mempunyai kandungan inulin berkisar 65,7% dalam 100 gr umbi (Rukmana, 2000; Tungland, 2000). Inulin merupakan polisakarida yang akan dipecah oleh enzim hidrolitik Inulinase pada ujung unit fruktosa non reduktif (eksoinulinase) sehingga menghasilkan monomer fruktosa yang dimanfaatkan dalam pembuatan HFS (*High Fructose Syrup*). Hasil hidrolisis inulin lainnya dapat ditemukan dalam bentuk fruktooligosakarida (FOS) atau inulooligosakarida (IOS). FOS atau IOS dihasilkan dari proses hidrolisis inulin oleh endoinulinase yang memecah bagian tengah rantai inulin secara acak. FOS digunakan sebagai pengganti lemak atau gula karena kalorinya yang lebih rendah, yaitu 1 gram FOS akan menghasilkan kalori sebesar 1,5 kkal (Tungland, 2000; Widowati, 2005).

Khamir *Pichia manshurica* DUCC-015 telah diisolasi dari umbi Dahlia (*Dahlia variabilis* Willd) dari Baturraden-Purwokerto dan mempunyai kemampuan menghasilkan inulinase yang mampu tumbuh dalam medium yang mengandung inulin sebagai sumber karbon utama dengan aktivitas inulinase sebesar 0,683 IU/mL. Hidrolisis inulin secara enzimatis lebih menguntungkan karena lebih murah, mudah diekstraksi, produk yang dihasilkan jernih dan lebih manis (Allais *et al.*, 1986, Lunggani dkk, 2009).

Inulinase khamir indigenous *Pichia manshurica* DUCC-015 dari umbi Dahlia ingin ditingkatkan kemampuannya. Salah satu teknik yang digunakan untuk peningkatan kemampuan khamir yaitu teknik fusi protoplas. Teknik fusi protoplas dipilih secara intensif untuk meningkatkan kemampuan strain khamir karena umumnya bersifat poliploidi sehingga tidak mudah dilakukan hibridisasi seksual dan mutagenesis secara alami. Teknik fusi yang dilakukan dalam penelitian yaitu fusi protoplas dengan bahan kimiawi penginduksi fusi yaitu *Poly Ethylene Glycol* (PEG). Khamir dapat melakukan fusi protoplas secara intraspesies karena memiliki kemampuan meregenerasi selnya (Kusumaningrum dkk., 2003). Protoplas dari dua sel atau lebih dapat digabung dan dinding sel kemudian diregenerasi kembali (Prentis, 1990). Fusi protoplas intraspesies *P. manshurica* DUCC-015 akan memberikan

peluang didapatkannya fusan yang memiliki kualitas unggul dalam produksi inulinase dibandingkan induk (kontrol). Oleh karena itu, fusan perlu dianalisis untuk mendeteksi potensinya dari dalam produksi dan aktivitas inulinase.

METODOLOGI

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret-Agustus 2013 di Laboratorium Genetika, Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro, Semarang.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan meliputi biakan khamir *P. manshurica* DUCC-015 yang diisolasi dari umbi Dahlia asal Purwokerto (Lunggani dkk., 2009), *Dinitrosalicylic Acid* (DNS), tepung umbi Dahlia, *Novozyme-234* (enzim dari *Trichoderma harzianum* TM 234), 35% PEG 6000, 0,6 M KCL, 0,1 M bufer fosfat pH 6, glisin, 0,1 M CaCl₂, YEPD (*Yeast Extract Pepton Dextrose Broth*), HCl pekat, *fuchsin basis*, NaHSO₃, etanol absolut, media inulin Agar dan cair, NH₄NO₃ 0,23%, (NH₄)₂HPO₄ 0,37%, K₂HPO₄ 0,1%, MgSO₄.7H₂O 0,05%, FeSO₄.7H₂O 0,001%, *yeast extract* 0,15%, fruktosa, bufer sodium asetat 0,1 M pH 5, inulin murni, sukrosa, etanol 70%, akuades steril.

Produksi Sel *P. manshurica* DUCC-015

Isolat *P. manshurica* DUCC-015 diinokulasikan dalam medium YEPD pH 5 dan diinkubasi dengan penggojokan menggunakan *rotary shaker* pada suhu ruang selama 48 jam (Santopietro *et al.*, 1997). Pengambilan kultur sebanyak 5% dilakukan setiap interval waktu tertentu (6 jam sekali) selama 48 jam. Lalu dilakukan penghitungan kepadatan sel. Kepadatan sel yang telah mencapai fase logaritmik akhir yakni jumlah sel 10⁷-10⁸ sel/mL digunakan pada tahapan selanjutnya. Kepadatan sel yang diperoleh sebesar 1,4 x 10⁸ sel/mL.

Isolasi Protoplas

Biomassa sel khamir diperoleh dari pertumbuhan fase logaritmik akhir dengan jumlah sel 1,4 x 10⁸ sel/mL selama waktu inkubasi 18 jam. Isolasi protoplas dilakukan dengan metode modifikasi Chun *et al.* (1992). Sel khamir direndam dalam

larutan 0,6 M KCl dalam bufer fosfat 0,1 M (pH 6) (150 μ L). Protoplas diperoleh dengan menambahkan 2 mg/ml *Novozyme-234* (250 μ L) kemudian diinkubasi dengan penggojokan menggunakan *rotary shaker* pada kecepatan 120 rpm pada suhu ruang selama 2 jam (Santopeitro *et al.*, 1997; Wijanarka *dkk.*, 2008).

Pemanenan protoplas khamir dilakukan dengan sentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit. Pelet protoplas yang terendapkan dipisahkan dari supernatan, kemudian dicuci dengan menggunakan larutan buffer fosfat 0,1 M (pH 6) kembali dan protoplas yang diperoleh dapat digunakan untuk proses fusi protoplas.

Fusi Protoplas

Protoplas kedua *P. manshurica* DUCC-015 difusikan dengan cara mencampurkan 35% PEG (350 μ L), CaCl_2 0,1 M (150 μ L), glisin 2% (100 μ L) kemudian diinkubasi selama 20 menit. Suspensi disentrifugasi 3000 rpm selama 5 menit, lalu dicuci dengan larutan bufer fosfat 0,1 M pH 6 (Chun *et al.*, 1992; Wijanarka *dkk.*, 2008). Protoplas diamati dengan mikroskop tanpa pewarnaan dan pewarna *fuchsin* (reagen Schiff) (Jutono *dkk.*, 1980).

Regenerasi Fusan

Pembuatan starter. Medium starter berupa medium inulin pH 5 sebanyak 50 mL. *P. manshurica* DUCC-015 sebagai induk dan fusan hasil fusi protoplas diambil satu ose lalu diinokulasikan ke medium inulin. Suspensi diinkubasi dengan penggojokan menggunakan *rotary shaker* pada kecepatan 120 rpm di suhu ruang selama 18 jam. Kepadatan fusan hasil fusi protoplas intraspesies yang diperoleh sebesar $1,18 \times 10^7$ sel/mL dan induk sebesar $1,15 \times 10^7$ sel/mL.

Starter diambil sebanyak 10% lalu diinokulasikan pada 100 mL medium inulin baru. Pengambilan kultur sebanyak 10 ml dilakukan setiap interval waktu 6 jam sekali selama 48 jam (Panaiotov *et al.*, 2009).

Pertumbuhan diukur menggunakan spektrofotometer OD λ_{520} nm. Data yang diperoleh ditabulasi untuk pembuatan kurva pertumbuhan. Pengamatan mikroskopis dilakukan untuk mencari perbedaan morfologi yang muncul dan penghitungan jumlah sel induk dan fusan untuk melihat aktivitas pertumbuhan

spesifik pada media inulin (Jutono *dkk.*, 1980; Udin *dkk.*, 2002).

Pengujian Aktivitas Enzim

Pengukuran aktivitas Inulinase. Aktivitas *crude enzyme* dilihat berdasarkan gula pereduksi yang terbentuk dan diuji menggunakan prosedur berikut:

Komposisi	ES (mL)	S (mL)	E (mL)	Blangko (mL)
Subtrat inulin 1%	0,5	0,5	-	-
Bufer sodium asetat 0,1 M pH 5	0,4	0,4	0,4	0,4
Crude enzyme	0,1	-	0,1	-
Akuades	-	0,1	0,5	0,6
Total volume	1	1	1	1

Ket. : ES : enzim-substrat, S : substrat, E : enzim

Tabung reaksi (ES, S, E) diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Reaksi enzimatis setiap tabung sampel dihentikan dengan memasukkan tabung reaksi sampel ke dalam air mendidih selama 5 menit. Reagen DNS (*Dinitrosalicylic Acid*) ditambahkan sebanyak 1 mL setelah dingin dan dipanaskan kembali selama 10 menit (Chaplin and Kennedy, 1994). Adanya gula pereduksi ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi merah kecoklatan. Tabung reaksi (ES, S, E) ditambahkan 5 mL akuades diukur menggunakan spektrofotometer pada OD λ_{570} nm (Wijanarka *dkk.*, 2008).

Moriyama *et al.* (2002) menyatakan satu unit aktivitas inulinase sebagai jumlah enzim yang membebaskan 1 μ mol gula reduksi (fruktosa) dari inulin per menit. Konsentrasi fruktosa yang terbentuk dihitung dengan cara memetakan nilai absorbansi yang diperoleh pada kurva standar fruktosa (Sudarmadji *dkk.*, 1989).

Gula reduksi diukur dengan cara menghitung absorbansi ES dikurangi dengan absorbansi S dan E, dengan rumus :

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{(\text{Abs ES} - \text{Abs S} - \text{Abs E}) \text{ fruktosa}}{\text{BM fruktosa} \times 30 \text{ menit}} \times P \times 1000$$

Pengukuran Aktivitas Invertase. Penentuan aktivitas invertase dilakukan sama dengan

aktivitas inulinase, perbedaannya pada substrat yang digunakan berupa larutan sukrosa 1%.

Analisis Data

Unit pengamatan aktivitas inulinase dilakukan antara *P. manshurica* DUCC-015 induk dan fusan sebagai perlakuan. Masing-masing uji dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Data yang diperoleh lalu dianalisis menggunakan *Uji T Test Dua Sampel Independent* pada taraf kepercayaan 95% menggunakan program (SPSS) (Uyanto, 2009).

HASIL DAN PEMBAHASAN

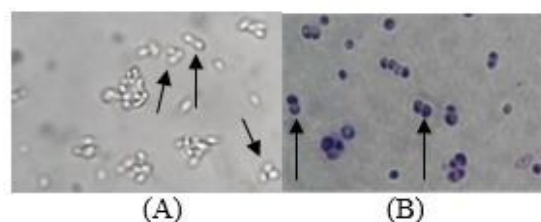
Karakteristik Fusan

Pichia manshurica DUCC-015 merupakan khamir uniseluler berbentuk bulat telur. Genus *Pichia* umumnya adalah mikroorganisme heterotalik yang memiliki tipe *mating* yang berlawanan yaitu tipe *MAT a* dan *MAT α*. Adanya tipe *mating* ini memungkinkan untuk dilakukan fusi protoplas *P. manshurica* DUCC-015 sehingga dapat membentuk sel heteroploid (Kurtzman, 2000; Gandjar dkk., 2006). Panen sel untuk isolasi protoplas dilakukan pada fase logaritmik akhir dengan jumlah sel $1,4 \times 10^8$ sel/mL selama waktu inkubasi 18 jam.

Perolehan protoplas dalam penelitian ini memperlihatkan bahwa proses isolasi protoplas telah berjalan dengan baik. Keberhasilan isolasi protoplas ditentukan oleh berbagai faktor, seperti umur kultur dan jenis enzim litik *Novozyme* yang digunakan utamanya karena penyusun dan kandungan susunan dinding sel serta penggunaan larutan stabilisator osmotik. Selain itu fase pertumbuhan saat dilakukan isolasi protoplas sangat mempengaruhi keberhasilan tahap berikutnya. Santiago (1982) dan Santopietro *et al.* (1997) menyatakan bahwa isolasi protoplas optimal pada fase eksponensial (logaritmik) dan pada fase mid log.

Isolasi protoplas melibatkan mekanisme penghilangan dinding sel oleh aktivitas enzim dalam larutan penstabil osmotik untuk mempertahankan kestabilan protoplas sehingga dihasilkan protoplas utuh. Ketiadaan larutan tersebut menyebabkan lisisnya protoplas karena tekanan osmotik di luar sel lebih kecil daripada di dalam sel lalu air masuk yang menyebabkan sel menggelembung dan pecah. Enzim litik dalam medium yang mengandung konsentrasi gula atau

garam tinggi menyebabkan tekanan di dalam dan di luar sel seimbang sehingga air cenderung tidak dapat memasuki sel. Hilangnya lapisan dinding sel tidak mampu mempertahankan bentuk sel. (Evans, 1981 dalam Kusumaningrum dkk, 1993). Fusi kedua protoplas ditandai dengan terbentuknya agregat protoplas (Gambar 1) dengan bantuan zat penginduksi PEG. Senyawa PEG berfungsi jembatan antarprotoplas serupa dengan fungsi plasmodesmata yang menyebabkan pelekatan sel (adhesi) dan mengganggu kestabilan membran protoplas dengan mengubah penyebaran muatan listrik pada membran. Muatan negatif pada PEG menyebabkan terbentuknya ikatan hidrogen dengan kutub positif molekul air serta molekul karbohidrat dan protein yang terdapat dalam membran protoplas. Adhesi itu dapat mengeliminasi sistem pengenalan antar sel. Hal tersebut memungkinkan terjadinya fusi antara protoplas yang berasal dari satu spesies, berbeda spesies, bahkan berbeda genus (Smith, 1993).

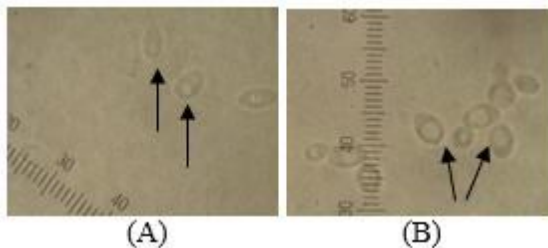


Gambar 1. (A) Pengamatan mikroskopis tanpa pewarnaan dan (B) pewarnaan menggunakan *fuchsin basis* (reaksi Schiff).

Frekuensi fusi protoplas yang diperoleh dari hasil penelitian sebesar 30,88%. Penambahan CaCl_2 dapat meningkatkan efisiensi proses fusi protoplas (Glazer and Nikaido, 1995).

Hasil pengamatan menunjukkan saat fusi protoplas *P. manshurica* DUCC-015 terdapat protoplas yang berfusi satu sama lainnya (Gambar 1). Hasil fusi sel mula-mula merupakan sel dengan lebih dari satu inti. Inti kedua protoplas kemudian mengalami fusi dan terjadi penyusunan kembali dari genom kedua spesies, sehingga terbentuk berbagai kombinasi genetik yang tidak mungkin dihasilkan melalui pemuliaan biasa. Penggunaan fusi protoplas memungkinkan didapatkan hibrida-hibrida dengan tingkat heterozigositas tinggi (Higgins, 1985). Yuwono (2005) memaparkan lebih lanjut bahwa khamir haploid seperti *P. manshurica*

DUCC-015 memiliki tipe mating (*MAT a* dan *MAT α*) menghasilkan molekul protein yang disekresikan keluar sel. Molekul protein tersebut digunakan sebagai feromon untuk menarik sel sehingga khamir dapat melakukan perkawinan antara sel khamir (proses fusi protoplas). Feromon yang dikeluarkan disesuaikan dengan tipe mating yang dimiliki oleh khamir. Hasil fusi protoplas mula-mula akan mengalami penggabungan sitoplasma yang diikuti dengan penggabungan inti sel dan organel sel lainnya. Inti dari kedua protoplas kemudian mengalami fusi dan terjadi penyusunan kembali genom hasil fusi protoplas (fusan) (Higgins, 1985). Regenerasi dinding sel telah terjadi karena induksi medium inulin yang mengandung unsur makronutrien dan mikronutrien. Husni *dkk.* (2004) dan (Gandjar *dkk.*, 2006) menyatakan bahwa elemen makronutrien adalah C, N, S, P, K, Mg, Na dan Ca. Elemen mikronutrien yaitu Fe, Mn, Zn, Co, Mo dan vitamin.



Gambar 2. Morfologi khamir secara mikroskopis perbesaran 1000x. (A) induk dan (B) fusan.

Hasil pengamatan menunjukkan terdapat perbedaan antara fusan dan induk *P. manshurica* DUCC-015. Kenampakan mikroskopis menunjukkan bahwa fusan cenderung bergerombol dibandingkan induk yang terpisah-pisah. Hal itu diperkirakan hasil fusi telah membentuk ploidi (Kusumaningrum *dkk.*, 2003). Bentuk sel induk umumnya bulat telur sedangkan fusan berbentuk bulat lemon. Schneider (2004) memaparkan bahwa pertumbuhan tunas khamir yang membentuk mating (diploid) dengan tunas aksial dan tunas induk (haploid) dengan tunas radial.

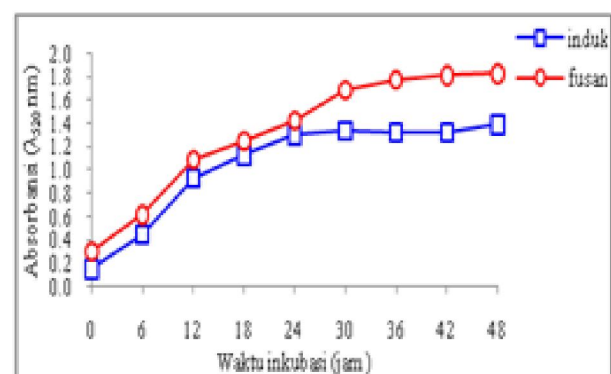
Penggabungan dua sel atau lebih pada *P. manshurica* DUCC-015 hasil fusi protoplas membuat ukuran sel fusan menjadi lebih besar dari induk. Ukuran sel fusan yakni memiliki panjang (6-9 μm) dan lebar (3-5 μm) dibandingkan induk yang memiliki panjang (6-

6,25 μm) dan lebar (2,75-3 μm). Hal itu sesuai dengan hasil penelitian Abosereh *et al.* (2007) bahwa regenerasi protoplas hasil fusi protoplas menghasilkan ukuran sel lebih besar dibandingkan induk.

Loughlin (2002) mengemukakan bahwa stabilitas fusan dan produktivitas biomassa sel yang tinggi menjadi faktor penting dalam pengembangan dan eksploitasi secara komersial produk rekayasa genetika. Faktor-faktor yang mempengaruhi stabilitas fusan antara lain perbedaan rata-rata pertumbuhan spesifik antara induk dan fusan, karakteristik genetik strain, karakteristik struktur fusan dan tekanan nutrisi (Fonseca & Antonio, 2006).

Pertumbuhan Hasil Fusi Protoplas

P. manshurica DUCC-015 merupakan khamir uniseluler yang pertumbuhannya digambarkan sebagai pertambahan jumlah sel sehingga terjadi pertambahan jumlah populasi. *P. manshurica* DUCC-015 induk dan fusan ditumbuhkan pada medium inulin sebagai sumber karbon utama selama 48 jam waktu inkubasi. Kurva pertumbuhan *P. manshurica* DUCC-015 induk dan fusan dari generasi ke-1 sampai ke-4 diukur dengan spektrofotometer pada OD λ_{520} nm.



Gambar 3. Kurva pertumbuhan fusan *P. manshurica* DUCC-015 hasil fusi protoplas dan induk selama inkubasi 48 jam

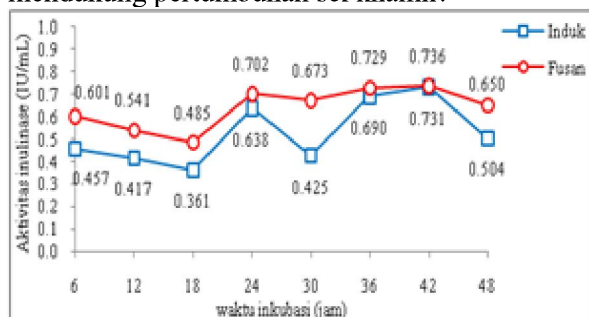
Kurva pertumbuhan menunjukkan pola pertumbuhan yang relatif sama yaitu adanya fase logaritmik dan fase stasioner. Biakan yang diinokulasikan ke dalam medium produksi merupakan starter yang telah memenuhi nilai absorbansi 0,5. Penggunaan starter bertujuan untuk mempersingkat masa adaptasi khamir pada

fase lag sehingga kurva pertumbuhan memperlihatkan pola yang langsung mengarah pada fase logaritmik. Pola pertumbuhan *P. manshurica* DUCC-015 induk dan fusan mencapai fase logaritmik akhir selama waktu inkubasi 18 jam setelah inokulasi.

Hasil uji antara induk dan fusan menunjukkan rata-rata absorbansi pertumbuhan dengan memiliki perbedaan yang kurang nyata atau tidak signifikan. Pola kenaikan kurva pertumbuhan fusan lebih baik dibandingkan dengan induk. Hal ini mengindikasikan bahwa biomassa sel fusan lebih banyak jumlahnya dibandingkan induk karena adanya pembentukan sel ploidi yang menambah massa sel. Schneider (2004) memaparkan bahwa biomassa sel khamir diploid (berat kering sel) memiliki RNA yang lebih tinggi dibandingkan khamir haploid. Hal itu mengindikasikan bahwa ekspresi gen khamir diploid yang berkaitan dengan sintesis enzim relatif lebih tinggi dibandingkan khamir haploid. (Brock and Madigan, 1991).

Aktivitas Inulinase Fusan

Inulinase dihasilkan khamir adalah enzim ekstraseluler. Rouwenhorst *et al.* (1990) memaparkan bahwa sintesis inulinase akan terjadi bila ada substrat tertentu yang berperan sebagai inducer yaitu inulin. Inulinase disekresikan keluar sel dan bercampur dengan medium inulin sehingga aktivitasnya dapat diukur melalui *crude enzyme* hasil sentrifugasi medium yang telah diinokulasikan *P. manshurica* DUCC-015 hasil fusi protoplas dan induk. Adanya inulin umbi Dahlia sebagai inducer memungkinkan nutrisi masuk ke dalam sel sehingga khamir menghasilkan inulinase yang dapat menghidrolisis inulin untuk dapat mendukung pertumbuhan sel khamir.



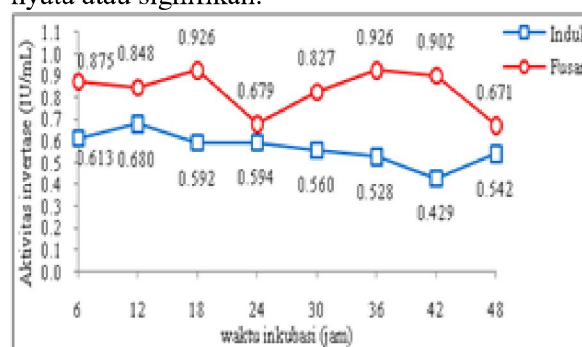
Gambar 4. Kurva aktivitas inulinase fusan dan induk *P. manshurica* DUCC-015 selama inkubasi 48 jam

Hasil penelitian menunjukkan aktivitas inulinase optimal fusan *P. manshurica* DUCC-015 sebesar 0,736 IU/mL dan induk 0,731 IU/mL pada waktu inkubasi 42 jam. Hal itu menunjukkan bahwa adanya peningkatan dalam aktivitas inulinase dibandingkan induk.

Aktivitas Invertase Fusan

Kerja enzim invertase hampir mirip dengan eksoinulinase yang berperan memecah fruktosa pada bagian ujung rantai inulin menjadi glukosa dan fruktosa, sehingga pengujian invertase diperlukan karena berhubungan dengan hidrolisis inulin. Hidrolisis inulin diketahui melibatkan dua enzim yang bekerja secara bersamaan. Enzim tersebut yaitu eksoinulinase yang memecah rantai fruktosa dari ujung non reduktif menjadi monomer-monomer fruktosa dan endoinulinase yang memecah inulin dari bagian tengah rantai inulin secara acak menjadi IOS (Ertan *et al.*, 2003).

Hasil penelitian menunjukkan aktivitas invertase fusan *P. manshurica* DUCC-015 sebesar 0,926 IU/mL pada waktu inkubasi 18 jam dan induk 0,680 IU/mL pada waktu inkubasi 12 jam (Gambar 5). Berdasarkan hasil uji statistik, aktivitas invertase fusan dan induk memperlihatkan perbedaan yang berpengaruh nyata atau signifikan.

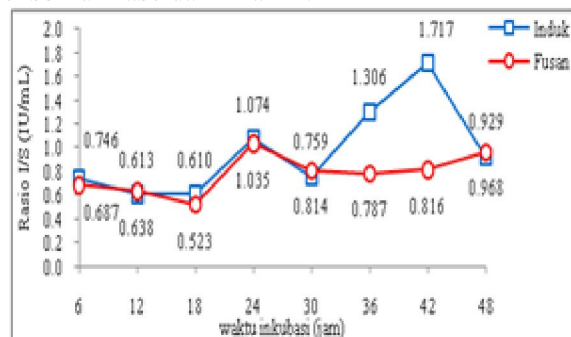


Gambar 5. Kurva aktivitas invertase fusan *P. manshurica* DUCC-015 hasil fusi protoplas dan induk selama inkubasi 48 jam

Rasio I/S Hasil Fusi Protoplas

Hasil penelitian pada Gambar 6. menunjukkan bahwa nilai rasio I/S rendah fusan intraspecies *P. manshurica* DUCC-015 sebesar 0,523 IU/mL dan induk 0,610 IU/mL pada waktu inkubasi 18 jam. Semakin kecil rasio I/S menunjukkan bahwa aktivitas inulinase semakin tinggi sedangkan aktivitasinvertase semakin rendah. Rasio I/S pada

kisaran 0,02-2,0 dilaporkan oleh Moriyama *et al.* (2002) bahwa enzim yang bekerja yaitu eksoinulinase dari khamir.



Gambar 6. Kurva rasio I/S fusan *P. manshurica* DUCC-015 dan induk selama inkubasi 48 jam

Rasio I/S fusan menunjukkan nilai kurang dari 2,0 maka dapat diketahui bahwa enzim yang bekerja lebih dominan dalam reaksi hidrolisis inulin yaitu inulinase. Hal ini disebabkan dampak regulasi kromosom pada tingkat ploidi.

Hasil penelitian secara keseluruhan mengindikasikan fusan mempunyai aktivitas dan produksi inulinase yang lebih tinggi dibandingkan induk. Hal ini mengindikasikan teknik fusi protoplas berpotensi mengembangkan kemampuan *P. manshurica* DUCC-015.

KESIMPULAN

Fusi protoplas intraspecies *Pichia manshurica* DUCC-015 telah memperoleh fusan dengan a menghasilkan aktivitas inulinase tinggi mencapai 0,965 IU/mL dibandingkan induk yang mencapai 0,622 IU/mL pada generasi ke-4. Hasil penelitian menunjukkan fusi protoplas intraspecies *P. manshurica* DUCC-015 menghasilkan aktivitas inulinase mencapai 0,965 IU/mL dibandingkan induk sebesar 0,622 IU/mL dan produksi inulinase 0,736 IU/mL pada inkubasi selama 42 jam.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Abosereh, N.A., Mohamed. H.A. L. A, and Abd El-Chalk A.B. 2007. Genetic Construction of Potentially Probiotic *Saccharomyces boulardii* Yeast Strains Using Intraspecific Protoplast Fusion. *J. Appl. Sci.* 3(3): 209-217.
- [2] Allais, J.J, G.H. Lopez, S. Kammoun, and J.C. Baratti. 1987. Isolation and

Characterization of Thermophilic Bacterial Strains with Inulinase Activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 5(53): 942-945.

- [3] Brock, T.D. and M.T. Madigan. 1991. *Biology of Microorganisms* Sixth Edition. Prentice-Hall International, Inc. United States of America.
- [4] Chaplin, M.F. and J.F. Kennedy. 1994. *Carbohydrate Analysis, a Practical Approach* Second Edition. Oxford University Press. New York.
- [5] Chun, S.B, J.E. Chin, S. Bai, and Gil-Hwan An. 1992. Strain Improvement of *Phaffia rhodozyma* by Protoplast Fusion. *Microbiol. Lett.* 93:221-226.
- [6] 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*. *Pakis. J. Biol. Sci.* 6(16): 1386-1388.
- [7] Fonseca, G. G. and R.V. Antonio. 2006. Plasmid stability in PHA Producing Recombinant *Escherichia coli* Strains. *J. Biol. Sci.* 6(5): 893-898.
- [8] Gandjar, I., W. Sjamsuridzal dan A. Oetari. 2006. *Mikologi Dasar dan Terapan*. Penerbit Yayasan Obor Indonesia. Jakarta.
- [9] Glazer, A.N and H. Nikaido. 1995. *Microbial Biotechnology Fundamentals of Applied Microbiology*. W.H. Freeman and Company. New York.
- [10] Higgins, I.J., DJ. Best and J. Jones. 1985. *Biotechnology Principles And Applications*. Blackwell Scientific Publ. Oxford London Edinburgh Boston Palo Alto Melbourne.
- [11] Husni A., I. Mariska, G.A. Wattimena, dan A. Purwito. 2004. Keragaman Genetik Tanaman Terung Hasil Kultur Protoplas. *Jurnal Bioteknologi Pertanian*. 8(2): 52-59.
- [12] Jutono, J. Soedarsono, S. Hartadi, S. Kabirun S, Suhadi D, dan Soesanto. 1980. *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum untuk Perguruan Tinggi*. Penerbit UGM. Yogyakarta.
- [13] Kurtzman, C.P. 2000. Four New Yeasts in the *Pichia anomala* Clade. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50: 395-404.
- [14] Kusumaningrum, H.P., E. Kusdiyantini, and Wijanarka. 2003. Improvement of Astaxanthin Production from *Phaffia*

- rhodozyma* by Protoplasma Fusion. *Indonesian Journal of Biotechnology*. ISSN : 0853 – 8654.
- [15] Lunggani, A. T., Wijanarka, dan E. Kusdiyantini. 2009. Produksi IOS Prebiotik Berbasis Pemanfaatan Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis*) oleh Khamir Inulinolitik dan Pengujian Antimikrobanya secara Invitro. *Laporan Hibah Penelitian Multi Tahun (Desentralisasi)*. Jurusan Biologi Fakultas FSM Universitas Diponegoro. Semarang.
- [16] Moriyama, S., H. Akimoto, N. Suetsugu, S. Kawasaki, T. Nakamura, and K. Ohta. 2002. Purification and Properties of an Extracellular Exoinulinase from *Penicillium* sp. Strain TN-88 and Sequence Analysis of the Encoding Gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66(9):1887-1896.
- [17] Panaiotov, S., Y. Evstatieva, S. Ilieva, V. Levterova, N. Brankova, D. Nikolova, A. Ivanova, V. Stefanova, K. Tankova and A. Atev. 2009. Quantitative Assessment of the Dominant Genome in Fusant Cultures. *Biotechnol and Biotechnol EQ.* 23: 892-895.
- [18] Prentis, S. 1990. *Bioteknologi, Suatu Revolusi yang Baru*. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- [19] Rouwenhorst, R.J., M. Hensing, J. Verbakel, W. A. Scheffers and J. P. Van Dijken. 1990. Structure and Properties of the Extracellular Inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.* 11(56): 3337-3345.
- [20] Rukmana, R. 2000. *Dahlia: Prospek Agribisnis dan Teknik Budidaya*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- [21] Santiago, C.M. 1982. Protoplast Fusion A New Tecnique for Genetic Manipulation and Breeding of Industrial Microorganisme. *I. C. Biotech.* 5: 435-440.
- [22] Santopietro, L.M.D., J.F.T. Spencer, D.M. Spencer and Sineriz. 1997. Characterization of Intergeneric Hybrids Obtained by Protoplast Fusion between *Phaffia rhodozyma*, *Cryptococcus laurentii* and *S. cerevisiae*. *Biotechnol. Tech.* 10(11): 769-771.
- [23] Schneiter, R. 2004. *Genetics, Molecular and Cell Biology of Yeast*. Universite de Fribourg Suisse Switzerland.
- [24] Singh, P. and P.K. Gill. 2006. Production of Inulinases: Recent Advances. *Food Technol. Biotechnol.* 44(2): 151-162.
- [25] Smith, J.E. 1993. *Biotechnology principle. Alih bahasa: Sumo, U.F., B. Sumantri dan A. Sumantri*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- [26] Sudarmadji, S. Bambang H. dan Suhardi. 1989. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*, Edisi ke-3. Penerbit Liberty bekerjasama dengan PAU Pangan dan Gizi UGM. Yogyakarta.
- [27] Tunland, B.C. 2000. Inulin A Comprehensive Scientific Review. Duncan Crow Wholistic Consultan. <http://members.shaw.ca/duncancrow/inulinreview.html>. Diunduh tanggal 16 September 2012.
- [28] Udin, L.Z. and A.T. Karossi. 2002. Fusi Protoplas Bakteri *Escherichia coli* dengan *Bacillus cereus*. *Prosiding Seminar Tantangan Penelitian Kimia*. Bandung. pp. 104-118.
- [29] Uyanto, S.S. 2009. *Pedoman Penulisan Data dengan SPSS*. Penerbit Graha Ilmu. Yogyakarta.
- [30] Widowati, S., T. C. Sunarti, dan A. Zaharani. 2005. Ekstraksi, Karakterisasi, dan Kajian Potensi Prebiotik Inulin dari Umbi Dahlia (*Dahlia pinnata* L.). *Seminar Rutin Puslitbang Tanaman Pangan*. Bogor.
- [31] Wijanarka, E. Kusdiyantini, dan H. P. Kusumaningrum. 2008. Produksi Inulinase Fusan 3 Hasil Fusi Protoplas Interspesifik *Kluyveromyces marxianus* dan *Torulospora pretoriensis* Autothonus. *Jurnal Sains dan Matematika*. 2(16): 88-96.
- [32] Yuwono, T. 2005. *Biologi Molekuler*. Erlangga. Yogyakarta.