

Isolasi dan Karakterisasi Inulinase dari *Aspergillus niger* Gmn11.1 Galur Lokal

Saryono

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Pekanbaru 28293

Diterima 27-04-2008 Disetujui 27-09-2008

ABSTRACT

Inulin is a naturally potential polysaccharide used to produced fructose and fructooligosaccharide. Inulinase known also as β -fructosidase can hydrolise inulin to fructose or fructooligosaccharide. Inulinase production from *Aspergillus niger* Gmn11.1 isolated from dahlia tubers is conducted using medium containing 1% inulin and 0,2% yeast extract. The crude enzyme (filtrate culture) is purified by means of ammonium sulphate salt precipitation, followed by Sephadex G25 gel filtration column chromatography and DEAE cellulose anion exchanger column chromatography. The result indicated that the enzyme had optimum pH and temperature of 4,6 and 45°C, respectively with incubation time of 15 hours. The Km and Vmax values obtained from this experiment are 20 mg/ml and 0,769 mg/ml/hours, respectively. Whereas the relative molecular weight of inulinase was monitored by SDS PAGE is 63 KDa.

Keywords: inulinase, inulin, *Aspergillus niger*

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara tropis yang subur dan kaya akan sumberdaya alam flora, fauna maupun mikroorganisme, yang tentunya dapat dijadikan sebagai obyek penelitian yang cukup potensial. Terkadang, karena banyaknya obyek penelitian yang tersedia masih banyak pula hal-hal yang bermanfaat, namun luput dari pengamatan dan belum tersentuh untuk dijadikan obyek penelitian. Seperti kekayaan alam yang dapat digunakan sebagai sumber enzim yang saat ini aplikasinya semakin banyak diminati. Namun ironisnya sampai saat ini Indonesia masih belum dapat memproduksi sendiri dan sepenuhnya masih tergantung kepada impor. Salah satunya adalah inulinase.

Inulinase adalah enzim hidrolitik yang mengkatalisis reaksi hidrolisis polisakarida inulin menjadi fruktosa dan atau fruktooligosakarida. Saat ini inulinase belum ada tersedia di pasaran dan masih merupakan dalam pengembangan riset. Enzim ini dapat dihasilkan oleh bakteri, jamur, maupun tumbuh-tumbuhan. Namun demikian penggunaan enzim mikroba dan aplikasi biokatalisnya banyak mendapatkan perhatian khususnya pada bidang bioteknologi mikroba saat ini (Vandamme & Derycke 1983).

Inulin adalah suatu polifruktan yang terbentuk sebagai karbohidrat cadangan pada umbi dan akar beberapa tanaman seperti jerusalem artichoke, chicory, dan dahlia. Senyawa polimer ini memiliki derajat polimerisasi (DP) lebih dari 30 dengan diawali oleh satu molekul glukosa (Worman & Day 1983; Gupta *et al*, 1992). Dari ketiga jenis tanaman ini hanya dahlia yang ada di Indonesia. Hasil survei di Lembang Jawa Barat, terungkap bahwa potensi dahlia sebagai bunga potong maupun sebagai bunga pot tidak begitu menguntungkan, karena seperti di Bandung misalnya, harga bunga dahlia dari petani hanya Rp25-35/kuntum. Harga ini hanya untuk dahlia putih yang digunakan sebagai bunga duka cita, sedangkan jenis bunga yang lain tidak begitu laku dijual. Selain itu dahlia pot harganya berkisar antara Rp100-1500/pot.

Hidrolisis inulin menjadi fruktosa dapat dilakukan dengan inulinase. sedangkan hidrolisis parsialnya akan menghasilkan fruktooligosakarida, yaitu suatu oligosakarida yang tidak dapat dicerna oleh usus manusia namu sangat baik untuk menjaga kestabilan flora normal usus dan juga berperan sebagai serat yang larut (*soluble dietary fiber*). Menurut Pool-Jobel (2005), senyawa polifruktan juga dapat berperan sebagai prebiotik dan memiliki sifat antikarsinogenik. Produksi sirup fruktosa secara konvensional dari pati memerlukan tiga tahap reaksi enzimatik dengan rendemen hanya 45% sementara produksi sirup fruktosa dari hidrolisis

inulin hanya memerlukan satu tahap reaksi enzimatis dengan rendemen bisa mencapai 90-95%. Sirup fruktosa dapat digunakan sebagai pemanis rendah kalori karena fruktosa dua kali lebih manis dari sukrosa dengan organoleptik yang disukai (Nakamura *et al*, 1995; Roberfroid & Dezenne, 1998).

Pada kesempatan ini kami telah melakukan isolasi, pemurnian, dan karakterisasi dari enzim inulinase dari *Aspergillus niger* Gmn11.1. Kapang ini diisolasi dari umbi dahlia yang terdapat di daerah Padang Panjang Sumatra Barat. Strain ini dapat menghasilkan inulinase yang dapat dikembangkan lebih lanjut untuk diaplikasikan pada proses hidrolisis inulin.

BAHAN DAN METODA

Bahan. *Aspergillus niger* Gmn11.1 berasal dari koleksi lab. Biokimia FMIPA Univ. Riau Pekanbaru. Inulin (from dahlia tubers), Sephadex G25 dan DEAE selulosa (Sigma Chemical Co), Ekstrak Yeast (Difco). Media tumbuh jamur terdiri dari 2% inulin dan 0,2% ekstrak ragi. Untuk media agar ditambahkan 2% agar dan semua zat kimia yang digunakan adalah pro analisis.

Isolasi inulinase. *Aspergillus niger* Gmn11.1 ditumbuhkan pada 250 ml media cair dalam erlenmeyer 500 ml. Inkubasi dilakukan pada suhu 40°C dengan kecepatan agitasi 100rpm selama 5 hari. Inulinase ekstraselular dimurnikan dari filtrat kultur dengan fraksinasi amonium sulfat kemudian dilanjutkan dengan kromatografi kolom gel filtrasi sephadex G25 (3 x 70cm) Fraksi ditampung sebanyak 48 tabung masing-masing 5 ml dengan kecepatan alir 1ml/menit dan kromatografi kolom penukar ion DEAE selulosa (2 x 20cm). Fraksi ditampung sebanyak 50 tabung masing-masing 3 ml, dengan kecepatan alir 1 ml/menit. Pemisahan dilakukan dengan gradien konsentrasi memakai larutan NaCl 0,5 M (Alexander *et al*, 1985).

Penentuan aktivitas enzim inulinase. Aktifitas inulinase ditentukan dengan menghidrolisis larutan inulin 1% dengan inulinase (10 : 1) pada suhu 45°C, pH 4,5 selama 15 jam. Gula pereduksi yang terbentuk ditentukan dengan metoda ortotoluidin, yaitu 1 ml larutan sampel ditambahkan 3 ml pereaksi ortotoluidin (94,5 ml Asam asetat glasial 5,5 ml ortotoluidin, dan 0,15 mg tiourea). Campuran dipanaskan dalam air mendidih selama 8 menit dan dinginkan, kemudian

diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 630 nm (Zeily *et al*, 1991).

Penentuan kadar protein. Kadar protein ditentukan dengan metode Lowry *et al*, (1951) menggunakan BSA sebagai protein standar, dan secara langsung menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 280 nm.

Elektroforesis Gel. Elektroforesis SDS gel poliakrilamid (SDS-PAGE) dilakukan untuk melihat pola dan tingkat kemurnian protein dan penentuan berat molekul enzim. Elektroforesis dijalankan dengan memakai bufer Tris glisin pH 8,3 dengan arus konstan 6 mA (Alexander *et al*, 1985).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak enzim kasar (*crude enzymes*) diperoleh dengan sentrifugasi larutan fermentasi 6000 rpm selama 30 menit dan diperoleh larutan enzim kasar 175 ml. Terhadap larutan enzim kasar dilakukan uji aktivitas dan didapat aktivitasnya 0,024 unit/ml di mana satu unit aktivitas didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 mmol fruktosa/jam dengan kadar protein 37,5 mg/ml.

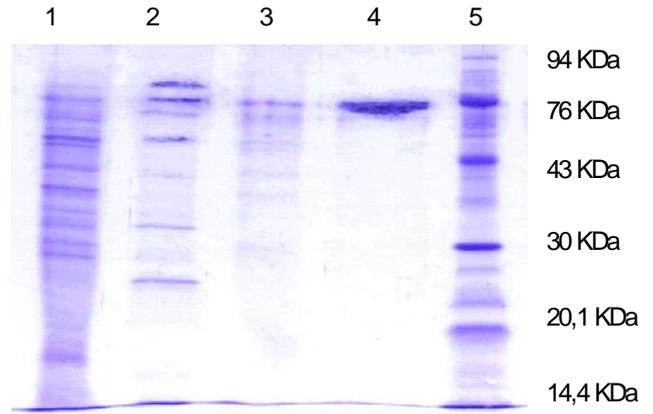
Terhadap ekstrak enzim kasar dilakukan fraksinasi dengan menggunakan garam ammonium sulfat pada kejenuhan 0-25%, 25-50%, 50-75% dan 75-100%. Dari hasil fraksinasi ditemukan enzim inulinase berada pada fraksi 50-75%. Endapan hasil fraksinasi ini dilarutkan dalam bufer fosfat pH 7 selanjutnya didialisis selama 24 jam memakai membran semipermeabel (selophan) pada suhu 5°C untuk menghilangkan garam yang tersisa pada enzim. Larutan hasil dialisis ini memiliki total aktivitas 0,33 unit dengan kadar protein 42,1 mg/ml.

Pemurnian lebih lanjut dilakukan dengan kromatografi kolom gel filtrasi sephadex G25. Aktivitas inulinase berada pada fraksi 14-18 (Gambar 1), dan dipekatkan menjadi 6 ml. Fraksi ini memiliki aktivitas 0.54 unit dan kadar protein 45,8 mg/ml.

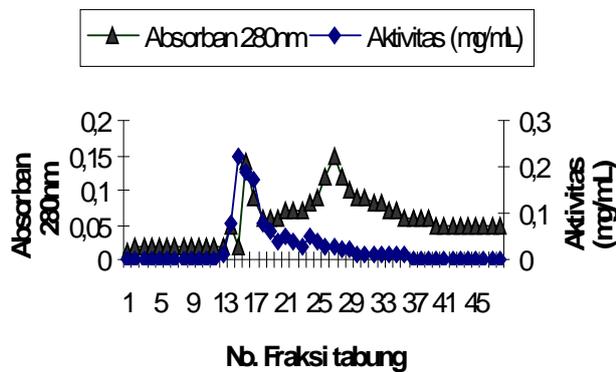
Fraksi hasil kromatografi kolom gel filtrasi dimurnikan lebih lanjut dengan kromatografi kolom penukar anion memakai DEAE selulosa sebagai matrik. Fraksi aktif terdapat pada fraksi 40-44 seperti terlihat pada Gambar 2. Fraksi aktif ini dipekatkan kembali menjadi 4 ml dengan aktivitas 0,72 U dan kadar protein 59,8 mg/ml (Tabel 1).

Fraksi hasil kromatografi kolom gel filtrasi dimurnikan lebih lanjut dengan kromatografi kolom penukar anion memakai DEAE selulosa sebagai matrik. Fraksi aktif terdapat pada fraksi 40-44 (Gambar 2). Fraksi aktif ini dipekatkan kembali menjadi 4 ml dengan aktivitas 0,72 U dan kadar protein 59,8 mg/ml.

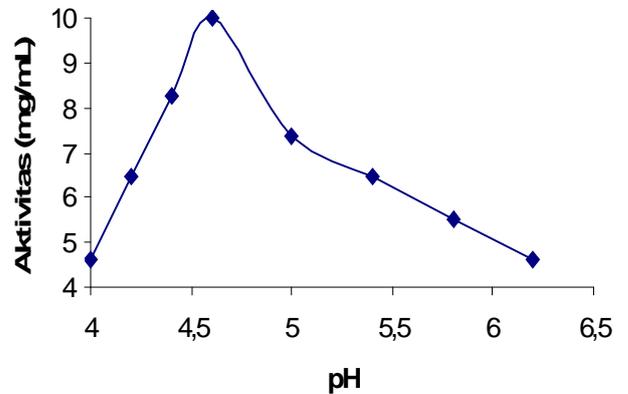
Untuk melihat tingkat kemurnian inulinase yang sedang diisolasi serta berat molekul relatifnya dilakukan dengan elektroforesis gel SDS dengan matrik gel poliakrilamida (SDS PAGE) (Gambar 3). Pada Gambar 3 tersebut setelah dihitung dengan cara



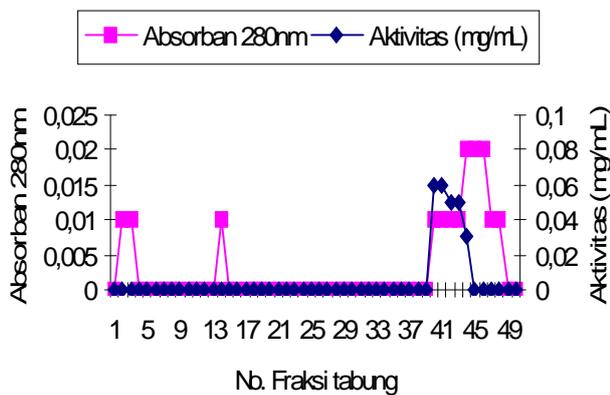
Gambar 3. Hasil elektroforesis gel SDS: 1=Ekstrak kasar; 2=Fraksi amonium sulfat; 3=fraksi gel filtrasi dan 4=fraksi kolom penukar ion, Standar BSA.



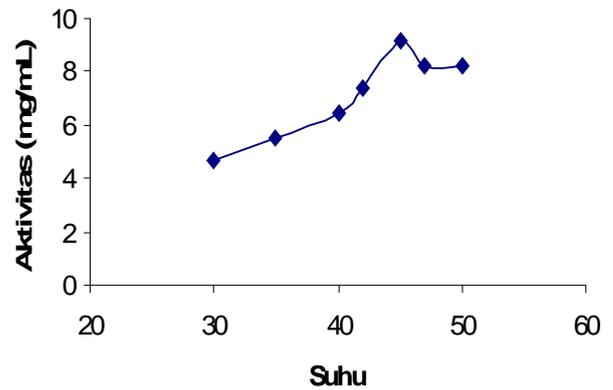
Gambar 1. Kurva pola protein hasil pemisahan inulinase dari *A. niger* Gmn11.1 dengan kromatografi kolom gel filtrasi sephadex G25



Gambar 4. Kurva hubungan pH dengan aktivitas inulinase dari *A. niger* Gmn 11.1



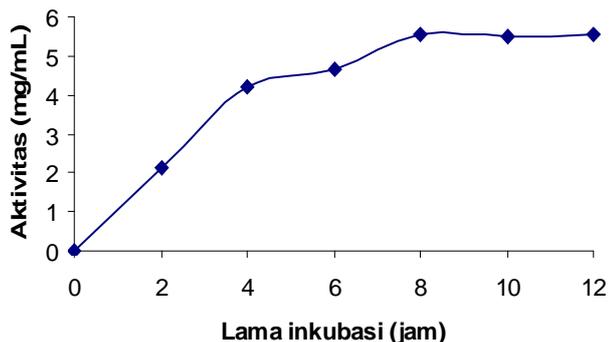
Gambar 2. Kurva pola protein hasil pemisahan inulinase dari *A. niger* Gmn11.1 dengan kromatografi kolom penukar ion DEAE Selulosa



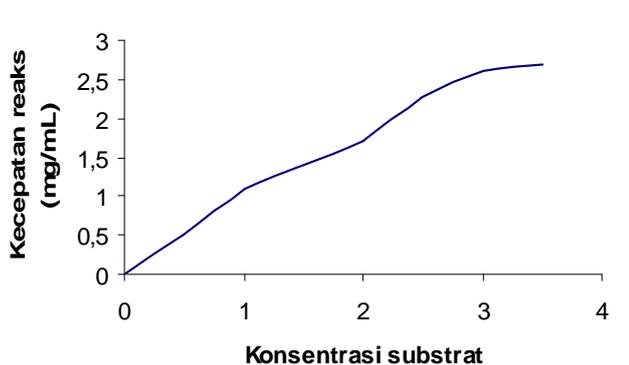
Gambar 5. Kurva hubungan suhu dengan aktivitas inulinase dari *A. niger* Gmn 11.1

Tabel 1. Skema pemurnian enzim

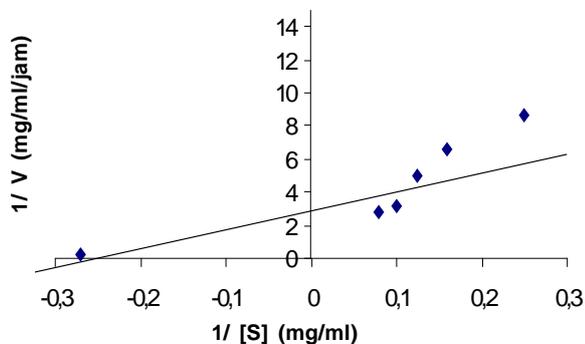
Tahap	Protein			Enzym				
	Vol (ml)	Konst. mg/ml	Total (mg)	Akt. U/ml.	Akt. Sp U/mg prot.	Total Unit	Faktor Kemurnian (kali)	Perolehan (%)
Ekstrak kasar	175	37,5	6562,5	0,024	0,0006	4,2	1,00	100
Frak. Am. Sulfat	10	42,1	421	0,33	0,008	3,3	13,33	78,5
Sephadex G25	6	45,8	274,8	0,54	0,011	3,2	18,33	76,2
DEAE Selulosa	4	59,8	239,2	0,72	0,012	2,8	20	66,6



Gambar 6. Kurva hubungan waktu inkubasi dengan aktivitas inulinase dari *A. niger* Gmn 11.1



Gambar 7. Kurva pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi inulinase dari *A. niger* Gmn11.1



Gambar 8. Kurva pemetaan Lineweaver-Burk yang menggambarkan harga Km dan Vmaks inulinase dari *A. niger* Gmn11.1

membandingkannya dengan kurva standar, maka didapat berat molekul relatif dari enulinase yang sedang diisolasi sekitar 63 KDa.

Inulinase memiliki aktivitas optimum pada pH 4,6 dan suhu inkubasi optimum 45°C dengan lama inkubasi optimum 15 jam ditunjukkan pada Gambar 4, Gambar 5, dan Gambar 6.

Penentuan parameter kinetika reaksi enzim Km dan Vmak mendapatkan hasil 20 mg/ml dan 0,769 mg/ml/jam seperti dapat terlihat pada Gambar 6.

Enzim inulinase yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* Gmn11.1 galur lokal ini merupakan enzim ekstraselular, di mana enzim berada di filtrat medium fermentasi. Setelah dilakukan fraksinasi dengan garam amonium sulfat ternyata enzim inulinase berada pada kejenuhan 50-75%.

Enzim hasil fraksinasi ini selanjutnya dimurnikan dengan kromatografi gel filtrasi memakai sephadex G25. Pada pemisahan ini ditemukan fraksi aktif berada pada tabung no 14-18. Hal ini mengindikasikan bahwa enzim yang sedang diisolasi keluar pada awal atau lebih dahulu, itu berarti bahwa molekul enzim yang sedang diisolasi lebih besar dari pori-pori gel dan tidak dapat memasuki gel. Hal ini sesuai dengan data literatur bahwa sephadex G25 memiliki pori-pori lebih kecil dari 30.000 Dalton sedangkan data elektroforesis menunjukkan berat molekul relatif enzim enulinase yang sedang diisolasi sekitar 63.000 Dalton. Oleh sebab itu agar protein enzim dapat tersaring dengan baik sehingga pemisahan juga akan berjalan dengan lebih baik, maka matrik yang digunakan sebaiknya sephadex G75 yang dapat menyaring molekul dengan BM antara 30.000-70.000 Dalton.

Fraksi aktif gel filtrasi diatas selanjutnya dimurnikan dengan kromatografi kolom penukar ion dengan matrik DEAE selulosa. Pemisahan ini mendapatkan fraksi aktif pada tabung 40-44. Hal ini membuktikan bahwa enzim mula-mula terikat dulu pada matrik DEAE selulosa dan baru setelah perubahan gradien konsentrasi enzimnya kembali lepas dan keluar, dengan konduktifitas sekitar 4000-4500 micromho/cm. Karena DEAE selulosa suatu matrik yang bermuatan negatif atau penukar anion, maka ini membuktikan bahwa enzim inulinase yang sedang diisolasi bermuatan positif

Enzim dari setiap tahap pemisahan dielektroforesis untuk melihat pola proteinnya seperti terlihat pada Gambar 3 dimana fraksi dari kromatografi kolom penukar ion telah memperlihatkan satu pita dengan berat molekul relatif 63 KDa. Kazutomo *et al*, (1990) dan Manzoni & Cavazzoni (1991) juga telah melaporkan bahwa inulinase ekstraselular dari *Arthrobacter globiformis* S64-1 dan *Kluyveromyces cicerisporus* memiliki berat molekul 100 KDa, sedangkan laporan lain juga ada yang melaporkan berat molekul inulinase 70 dan 180 KDa. Data ini mengindikasikan bahwa berat molekul inulinase sangat bervariasi. Namun demikian

untuk melihat kemurnian enzim yang diisolasi secara lebih detail, masih perlu diperikasa lagi dengan peralatan yang lebih sensitif seperti HPLC fasa terbalik. Hal ini perlu dilakukan sebelum kita melakukan pemuliaan lebih lanjut terhadap molekul enzim agar dihasilkan suatu enzim yang memiliki arti ekonomis. Sebab walau enzim hasil pemurnian ini telah memiliki aktivitas 0,72 U yang berarti 30 kali lebih tinggi dari ekstrak enzim kasar 0.024 Unit, tapi dari data kinetika reaksinya terlihat spesifisitas enzim ini masih terlalu rendah terhadap substratnya.

Inulinase ekstraselular ini memiliki pH optimum 4,6, suhu optimum 45°C dengan lama inkubasi 15 jam. Nilai Km dan Vmak untuk enzim ini masing-masing 20mg/ml dan 0,769 mg fruktosa/ml/jam. Data ini memperlihatkan kerja enzim ini dalam menghidrolisis inulin menjadi fruktosa masih sangat lambat, seperti lama inkubasi 15 jam dan nilai Km yang masih cukup besar dan Vmak nya masih relatif kecil. Sungguhpun demikian informasi dari hasil penelitian ini sangat berguna untuk proses pemuliaan lebih lanjut untuk mendapatkan enzim yang lebih produktif. Apakah melalui pendekatan modifikasi protein enzim atau melalui rekayasa genetika. Sebab secara umum enzim yang dihasilkan secara alamiah memang masih memiliki aktivitas rendah, enzim-enzim yang berada dipasaran umumnya berasal dari galur yang telah dimodifikasi baik secara fisik maupun kimiawi.

KESIMPULAN

Kapang *Aspergillus niger* Gmn11.1 yang diisolasi dari umbi dahlia dapat menghasilkan enzim inulinase ekstraselular dengan berat molekul sekitar 63.000 dalton. Enzim ini bekerja pada pH optimum 4,6 suhu optimum 45°C dengan lama inkubasi 15 jam.

Walaupun aktivitas enzim telah meningkat dari 0,24 unit pada ekstrak kasar menjadi 0,72 unit setelah pemurnian (30 kali). Namun dari hasil perhitungan kinetika reaksinya enzim inulinase ini memiliki nilai Km 20 mg/ml dan Vmak 0,697 mg/ml/jam. Data ini memperlihatkan spesifisitas atau aktivitas enzim masih rendah terhadap substratnya, terlihat dari nilai Km yang masih besar sedangkan Vmaknya kecil. Namun demikian informasi ini sangat berguna untuk pengembangan penelitian selanjutnya, khususnya dalam rangka mempelajari sifat-sifat fisikokimia dari enzim secara lebih detail. Hal ini sangat diperlukan untuk

pemuliaan molekul enzim kearah yang lebih menguntungkan, seperti melalui modifikasi kimiawi atau genetiknya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Dr. Ukun MS Soedjanaatmaja, MS Dosen Biokimia FMIPA UNPAD dan Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA UNPAD atas bantuannya baik moril maupun fasilitas yang digunakan untuk penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander R. R., J. M. Griffiths & M. L. Wilkinson.** 1985. *Basic Biochemical Methods*. Singapore: John Willey & Sons.
- Beatrice, L. Pool Zobel.** 2005. Inulin-type fructan and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. *British Journal of Nutrition* **93**: 573-590
- Gupta A.K., M.Kaur, N. Kaur, & R. Singh.** 1992. A comparison of properties of Inulinase of *Fusarium oxysporum* immobilized on various supports. *Journal Chem. Tech. Biotechnology* **53**:293-296.
- Gilbert A.** 1957. Colorimetric Analysis Of Sugar. Method in Enzymology. Vol. III. New York: Academic Press, Inc.
- Kazutomo, H., Hayashi K., & Kasumi T.** 1990. Purification and properties of inulinase from *Arthrobacter globiformis* S64-1. *Starch* **42**(1): 28-30
- Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr & J. R. Randall.** 1951. Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- M. Belmari.** 1994. Purification and properties of an extracellular inulinase like β -Fructosidases from *Bacillus stearothermophilus*. *Letter Applied Microboal* **19**(6):410-413
- M. manzoni & Cavazzoni V.** 1991. Purification and caracerization of sxttracellular inulinase from *Kluyveromices cicerisporus*. *Lebensm-Wiss Tecnology, England* **24**(3):236-240.
- Nakamura T., Y. Ogata, A. Shitasa, A. Nakamura & K. Ohta.** 1995. Continuous production of fructose syrups from Inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* Mutan 817. *J. of Fermentation and Bioeng.* **80**(2): 164-169.
- Roberfroid M. B. & N. M. Dezenne.** 1998. Dietary fructans. *Annu. Rev. Nutrition* **18**: 117-143.
- Saryono, Henny Olivia R. M., Elvita Sepriana, Andi Dahliati, & Chainulfiffah A. M.** 2008. Amobilisasi inulinase *Aspergillus clavatus* Gmn11.3 galur lokal Indonesia. *Jurnal Natur Indonesia* **10**(1): 31-35
- Saryono, Chainulfiffah A. M., Silvera Devi Sy., Monalisa H.S., & Dasli.** 1998. Pemanfaatan umbi dahlia (*Dahlia variabilis*) untuk produksi sirup fruktosa (HFS) dan fruktooligosakarida". Seminar Nasional PBBMI XIV. Bandung.
- Saryono, Is Sulistyati P. & Delita Zul.** 1997. Identifikasi Jamur Pemecah Inulin pada Umbi Dahlia. Pekanbaru: Lembaga Penelitian Univ. Riau,
- Vandamme E. J., & D. G. Derycke.** 1983, Microbial inulinase: fermentationprocess, properties and applications. *Advances in Appl. Micro.* **29**: 139-176.
- Workman W.E. & D.F.Day.** 1983, Enzymatic hydrolysis of Inulin tofructose by glutaraldehyde fixed yeast cell. *Biotech. & Bioeng.* **XXVIII**:905-910
- Zeily N, Ukun MS Soedjanaatmadja, & Abubakar Sidik.** 1991. *Penuntun Praktikum Biokimia Lanjut*. PAU Bioteknologi ITB. Bandung: ITB