

Growth and Production of Fusan FP4 Inulinase at 0.15% and 0.2% Yeast Extract Concentration

Arifa Rizqi Nafisa^{1*} & Wijanarka²

¹Program Studi Biologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro, Semarang, Jawa Tengah, Indonesia;

²Program Studi Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro, Semarang, Jawa Tengah, Indonesia;

Article History

Received : July 01th, 2025

Revised : July 10th, 2025

Accepted : July 16th, 2025

*Corresponding Author: **Arifa Rizqi Nafisa**, Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro, Semarang, Jawa Tengah, Indonesia;
Email: jb.tropis@unram.ac.id

Abstract: Inulin is a polysaccharide, consisting of fructose units. Inulin has several benefits for our own bodies and for industrial circles. Inulinase E.C.3.2.1.7. is a hydrolytic enzyme that catalyzes the hydrolysis reaction of inulin polysaccharides into fructose and/or fructooligosaccharides. This study aims to determine the growth rate of Fusan FP4 inulinase and the production of Fusan FP4 inulinase at yeast extract concentrations of 0.15% and 0.2%. Conversion of tubers into fructose with enzymatic techniques (inulinase enzyme) can produce 95% fructose. Fusan FP4 is a protoplast fusion of indigenous yeast *Pichia manshurica*. Yeast Extract is a source of Nitrogen for microorganisms in culture media. The concentration of Yeast Extract in the media can affect the growth and metabolic products of microorganisms. Inulinase activity was determined by measuring reducing sugars combined with inulin as a substrate. This activity was measured using a spectrophotometer at a wavelength of 520 nm. The study showed that the specific growth rate at a yeast extract concentration of 0.2% was higher than yeast extract concentration of 0.15%. However, The highest inulinase activity was found at a yeast extract concentration of 0.2%.

Keywords: Fusan FP4, inulin, inulinase, yeast extract.

Pendahuluan

Inulin adalah serat pangan alami yang termasuk dalam kelompok karbohidrat yang dikenal sebagai fruktan. Inulin adalah polisakarida yang tidak dapat dicerna, artinya tidak dapat dipecah oleh enzim pencernaan manusia, melainkan difermentasi oleh bakteri usus (microbiota) di usus besar yang bertindak sebagai prebiotik (Alonso-Allende et al., 2024). Inulin merupakan serat pangan alami yang dapat bertindak sebagai prebiotik, secara selektif mendorong pertumbuhan bakteri usus yang bermanfaat seperti *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus*. Modulasi mikrobioma usus ini dapat meningkatkan kesehatan pencernaan dan fungsi kekebalan tubuh (Guglani et al., 2025).

Inulin ditemukan dalam berbagai sumber nabati, termasuk sawi putih, *artichoke*

jerusalem, bawang putih, daun bawang, dan bawang bombai. Tanaman dahlia (*Dahlia* sp) merupakan tanaman yang tumbuh dengan bentuk perawakan perdu yang membentuk suatu rumpun umbi akar yang terletak pada bagian dasar dari batang tanaman tersebut. Bagian tanaman *Dahlia* sp. yang penting untuk dieksplorasi adalah bagian umbi tanaman tersebut. Umbi tersebut memiliki beberapa manfaat yakni dapat digunakan sebagai pemanis alami seperti sirup fruktosa, sebagai serat yang larut seperti inulin dan fruktooligoakarida. Konversi umbi menjadi fruktosa dengan teknik enzimatik (enzim inulinase) dapat menghasilkan fruktosa 95%.

Salah satu upaya yang digunakan dalam meningkatkan produksi fruktosa adalah dengan cara menemukan mikroba yang paling efektif dalam memproduksi enzim inulinase untuk memecah inulin menjadi fruktosa. Menurut

Laowklom et al., (2012), Enzim inulinase dapat dihasilkan oleh khamir maupun bakteri. Inulinase merupakan suatu enzim yang dapat mengkatalisis hidrolisis inulin menjadi fruktosa dan fructooligosaccharida yang secara luas digunakan sebagai aditif makanan.

Upaya penemuan khamir penghasil inulinase terus dilakukan. Salah satu upaya yang dapat dilakukan yakni menjalankan fusi protoplas untuk mendapatkan *mikroba* baru. Fusi protoplas *Pichia mansuricha* telah dilakukan. Fusi tersebut disebut sebagai Fusan FP4. Hasil fusi tersebut menunjukkan bahwa fusan FP4 mampu menghasilkan inulinase, akan tetapi jumlah produktivitasnya masih rendah (Wijanarka, 2013). Kemampuan produksi enzim pada suatu mikroba dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti komposisi media pertumbuhan. Komposisi media pertumbuhan untuk khamir dapat dibuat dengan penambahan *yeast ekstrak* (Yupanqui-Mendoza et al., 2022).

Yeast extract adalah autolisa dari sel *yeast* yang digunakan sebagai media kultur. *Yeast ekstrak* mengandung vitamin, nitrogen, asam amino dan karbon dalam kultur media untuk mikroorganisme. *Yeast ekstrak* digunakan dalam kultur sel dan sangat baik dalam menstimulasi pertumbuhan bakteri atau mikroorganisme. *Yeast ekstrak* biasa digunakan pada konsentrasi 3g/L (Phukoetphim et al., 2019). Berdasarkan uraian tersebut, maka penelitian ini dilaksanakan dengan tujuan untuk menemukan kondisi media pertumbuhan yang optimal dalam mendukung peningkatan produktivitas inulinase oleh Fusan FP4.

Bahan dan Metode

Pembuatan Media Produksi Inulinase

Tepung dahlia 3% (3,75 g), NH₄NO₃ (0,23%) (0,29 g), (NH₄)₂HPO₄ (0,37%) (0,46 g), K₂HPO₄ (0,1%) 0,125 g, MgSO₄.7H₂O (0,05%) (0,0625 g), ekstrak ragi (0,15%) 0,19 g, dan pH 5 semuanya dimasukkan ke dalam setiap 125 ml media produksi. Setelah melarutkan tepung dahlia dalam 125 mililiter air, campuran dididihkan dan warnanya berubah menjadi bening. Kertas saring, corong, dan Erlenmeyer siap digunakan. Setelah menyaring tepung dahlia yang mendidih, gelas ukur digunakan untuk mengukur 125 mililiter. Setelah ditimbang, bahan tersebut ditambahkan ke dalam larutan

tepung dahlia dan diaduk hingga tercampur rata. Strip pH digunakan untuk menguji pH, kemudian HCL ditambahkan secara bertahap hingga pH mencapai 5.

Pembuatan DNS

Pembuatan DNS 250 ml dilakukan dengan cara menyiapkan bahan diantaranya adalah DNS 0.25gr, Sodium potassium 75gr, NaOH 4gr, Aquades 250 ml. NaOH dilarutkan dalam air 50ml, sodium potassium dilarutkan kedalam NaOH kemudian ditambah 200ml aquades, diaduk hingga homogen. DNS ditambahkan kedalam larutan tersebut kemudian diaduk hingga merata (Wijanarka & Sarsa, 2019).

Pembuatan Buffer Sodium Acetat pH5 0.1 M

Pembuatan Buffer sodium acetat pH 5 0.1 M dilakukan dengan cara sodium acetat 1.64gr ditimbang. Kemudian, dilarutkan kedalam aquades 200ml dan diaduk hingga rata. PH diukur dengan pH strip, kemudian pH diatur dengan menggunakan asam asetat galsial hingga mencapai pH 5.

Inokulasi

Inokulasi dilakukan dengan cara 10% Fusan FP4 dimasukkan kedalam 5 ml media pada konsentrasi *yeast ekstrak* 0.15% dan media dengan konsentrasi *yeast ekstrak* 0.2 %. Kemudian, dishaker dengan rotary shaker selama 22 jam dengan kecepatan 90 rpm. Setelah 22 jam starter dimasukkan kedalam media 50 ml (Wijanarka et al., 2014).

Pengukuran Pertumbuhan

Setelah 5 ml starter ditambahkan ke dalam medium, T₀ dihitung untuk pertumbuhan. Terdapat enam sesi pengambilan sampel dan pengukuran pertumbuhan dilakukan setiap enam jam. T₀, T₆, T₁₂, T₁₈, T₂₄, dan T₃₀ adalah hasilnya. Spektrofotometer digunakan untuk pengukuran pertumbuhan, dan pengukuran absorbansi pada 570 nm dilakukan setelahnya.

Pengukuran Gula Reduksi

Sebuah tabung mikro berisi sampel 1 ml disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 50 rpm. Cairan di bagian atas sentrifugasi, yang digunakan untuk mengukur aktivitas inulinase, diekstraksi menggunakan mikropipet sesuai volume yang ditentukan. Setelah itu, tabung

diatur seperti yang ditunjukkan pada tabel di bawah ini, dan spektrofotometer yang diatur untuk mengukur absorbansi pada 520 nm digunakan.

Tabel 1. Komposisi Pengukuran Gula Reduksi

No.	Keterangan	ES	S	E	Blanko
1.	Substrat Inulin Murni 1%	0.5	0.5	-	-
2.	Buffer Sodium Asetat	0.4	0.4	0.4	0.4
3.	Enzim (<i>Crude</i>)	0.1	-	0.1	
4.	Aquades	-	0.1	0.5	0.6

Hasil dan Pembahasan

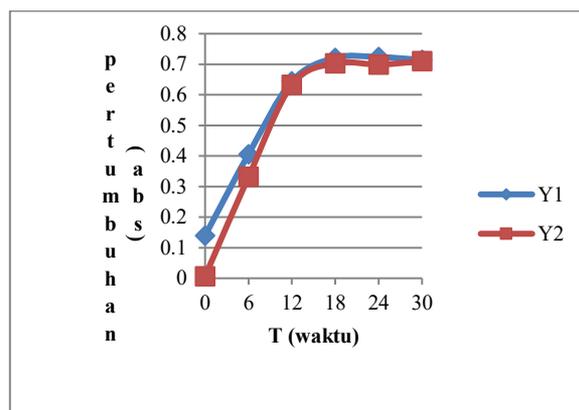
Pertumbuhan Fusan FP4 pada konsentrasi yeast ekstrak 0,15% dan 0,2 %

Perkembangan pada organisme hidup ditandai dengan peningkatan komponen kimianya, yang dapat diukur secara kuantitatif. Mikroskop dapat digunakan untuk mengamati pertumbuhan mikroorganisme, yang juga didefinisikan sebagai peningkatan jumlah sel. Populasi suatu organisme tumbuh sebagai akibat dari proliferasi sel-sel individualnya. Peningkatan jumlah sel atau massa sel yang berkembang biasanya menunjukkan pertumbuhan ini (Wijanarka *et al.*, 2014). Kondisi lingkungan dapat memengaruhi pertumbuhan mikroorganisme. Lebih lanjut, peningkatan jumlah sel khamir dan biomasnya seiring waktu juga dapat disebut sebagai pertumbuhan khamir. Proses ini biasanya dibagi menjadi empat fase: fase lag, fase stasioner, fase logaritma (eksponensial), dan fase kematian (Herricks *et al.*, 2017; Lei *et al.*, 2020a).

Temuan penelitian ini menunjukkan variasi jumlah sel pada setiap tahap perhitungan sampel. Untuk mikroba yang diteliti, Fusan FP4, variasi jumlah sel yang dinyatakan dalam nilai transmitter ini berfungsi sebagai metrik pertumbuhan. Temuan ini menunjukkan kurva sigmoid tanpa fase adaptasi atau fase lag. Karena starter 10% ditambahkan, fase lag tempat terjadinya tidak terlihat dalam temuan. Menurut Wijanarka (2013), tidak ada periode lag dalam pengukuran untuk studi Fusan F4. Tidak ada fase adaptasi setelah fase log (eksponensial), yang dimulai dengan pengukuran pertama, khususnya dari T0 hingga T12.

Fase stasioner, yang relatif konstan, muncul setelah fase log. Keberadaan fase lag dipengaruhi oleh starter yang dimasukkan ke dalam media pertumbuhan, dan perkiraan pertumbuhan akan segera menunjukkan keberadaan fase log (Lei *et al.*, 2020). Menurut Wijanarka (2014), penambahan starter menyebabkan fase log menjadi sangat singkat. Starter ini mempercepat transisi ke fase logaritmik dengan menghapus atau memperpendek fase lag, yang juga dikenal sebagai fase adaptasi.

Hasil penelitian pertumbuhan fusan FP4 yang ditumbuhkan pada media dengan konsentrasi *yeast extract* 0.15 % (Y1) dan *yeast extract* 0.2% (Y2) dapat dilihat pada grafik yang disajikan pada gambar 1. Pengukuran pertumbuhan dilakukan dengan menggunakan nilai transmitter pada panjang gelombang 570 nm yang kemudian dikonservasikan menjadi nilai absorbansi dengan rumus $Abs = 2 - (\log T)$.



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan Fusan FP4

Pertumbuhan Fusan FP4 yang ditumbuhkan pada media dengan konsentrasi *yeast extract* 0.15% tidak jauh berbeda dibandingkan pada konsentrasi *yeast extract* 0.2%. Kelajuan pertumbuhan pada Y1 yakni sebesar 0.019/jam. Hasil tersebut lebih rendah dibanding pada Y2 yakni sebesar 0.0235/jam. *Yeast extract* merupakan sumber nitrogen kompleks yang kaya akan asam amino, vitamin, dan komponen esensial lainnya yang mendukung pertumbuhan mikroorganisme, termasuk khamir seperti Fusan FP4. Pada penelitian ini, peran *yeast extract* sebagai sumber nitrogen terbukti dalam mempengaruhi laju pertumbuhan Fusan FP4. Tidak ditemukannya fase lag dalam kurva pertumbuhan juga memperkuat dugaan bahwa

kombinasi media yang tepat, termasuk keberadaan starter aktif dan nutrisi esensial dari *yeast extract*, menciptakan kondisi optimal yang memungkinkan sel Fusan FP4 langsung beradaptasi dan berkembang biak secara eksponensial. Secara fisiologis, Fusan FP4 sebagai hasil fusi protoplas dari *Pichia manshurica* mewarisi karakteristik adaptif yang memungkinkan respon cepat terhadap ketersediaan nitrogen organik. Sumber nitrogen organik seperti *yeast extract* tidak hanya meningkatkan pertumbuhan tetapi juga mempercepat regenerasi dan aktivitas enzimatik mikroba.

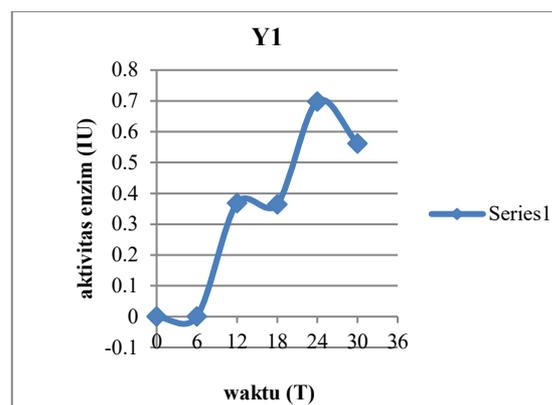
Sekresi produk metabolit dan peningkatan konsentrasi biomassa merupakan karakteristik pertumbuhan mikroba. Menurut penelitian Dinarvand dkk. (2013), elemen paling signifikan yang memengaruhi sintesis enzim, perkembangan sel, dan fisiologi, serta pembentukan bioproduk, adalah komposisi medium kultur. Sumber karbon dalam medium memiliki kemampuan untuk mendorong atau mencegah pembentukan enzim (van Voorhies, 2012; Olivares-Marin *et al.*, 2018). Lebih lanjut, sintesis enzim dapat dipengaruhi secara toksik oleh sumber nitrogen kompleks (ekstrak khamir dan NaNO_3) dalam jumlah yang lebih besar.

Memahami pertumbuhan khamir sangat penting untuk mengoptimalkan proses fermentasi industri, meningkatkan vitalitas khamir, dan meningkatkan produktivitas dalam aplikasi seperti produksi biofuel, pembuatan roti, dan pembuatan bir. Singkatnya, pertumbuhan khamir mencakup berbagai fase yang dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi, kondisi lingkungan, dan keadaan fisiologis, dengan beragam teknik yang tersedia untuk pengukuran dan analisis yang akurat. Pengetahuan ini penting baik untuk penelitian ilmiah maupun aplikasi industri (Guadalupe-Daqui *et al.*, 2023; Poonam *et al.*, 2017).

Aktivitas Inulinase Fusan FP4 pada Media *Yeast Ekstrak* 0.15% dan 0.2%

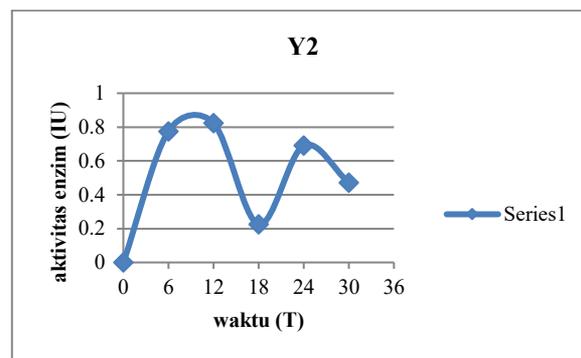
Hasil yang diperoleh dalam aktivitas inulinase berupa nilai transmitter E, ES, dan S. Hasil perhitungan dapat dilihat pada gambar 2 untuk *yeast ekstrak* 0.15% dan gambar 3 untuk *yeast ekstrak* 0.2%. Temuan untuk sampel 1, fusan FP4, yang memiliki konsentrasi ekstrak ragi 0,15%, menunjukkan bahwa pada T0 dan

T6, sintesis inulinase belum mencapai puncaknya. Sebaliknya, nilai pada T12 dan T18 lebih tinggi daripada pada T0 dan T6, masing-masing mencapai 0,368 U/ml dan 0,364 U/ml. Terdapat penurunan sebesar 0,002 U/ml dari T12 ke T18, yang merupakan penurunan kecil dan tetap stabil di sekitar 0,3%. Seiring dengan penurunan pertumbuhan fusan FP4, yang mencapai 0,562 U/ml pada T30, produksi inulinase maksimum tercatat pada T24, yaitu 0,698 U/ml.



Gambar 2. Aktivitas Inulinase Y1

Mikroba memproduksi inulinase selama fase logaritmik. Selama fase logaritmik, sel membelah secara stabil dan cepat (Germeç & Turhan, 2020). Karena proses metabolisme yang dipercepat, kebutuhan energi meningkat. Mikroba melepaskan inulinase untuk menghidrolisis inulin dalam medium guna memenuhi kebutuhan energi dan karbon mereka. Dengan demikian, selama tahap ini, produksi inulinase meningkat. Inulinase dapat diklasifikasikan sebagai metabolit utama. Karena metabolisme yang lemah dan kebutuhan energi yang menurun, aktivitas inulinase menurun selama fase stasioner (Singh *et al.*, 2020).



Gambar 3. Aktivitas Inulinase Y2

Hasil pada sampel kedua yakni fusan FP4 dengan konsentrasi *yeast ekstrak* 0.2% adalah pada T0, pada T6 mengalami kenaikan yang sangat signifikan yakni 0.775 U/ml dan T12 0.823 U/ml. Akan tetapi pada T18 terjadi penurunan signifikan yakni 0.224 U/ml, T24 terjadi kenaikan yakni 0.690 U/ml dan T30 0.471 U/ml berarti mengalami penurunan. Ada perbedaan produksi enzim inulinase pada fusan FP4 dari kedua sampel yang diujikan. Produksi Fusan FP4 yang ditumbuhkan pada media dengan konsentrasi *yeast ekstrak* 0.15% cenderung memiliki kenaikan lebih stabil dibandingkan pada konsentrasi *yeast ekstrak* 0.2%. Akan tetapi nilai aktivitas inulinase pada konsentrasi *Yeast Ekstrak* 0.2% lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi *Yeast Ekstrak* 0.15%. Hal tersebut dikarenakan rata – rata kelajuan dari perlakuan ke-2 lebih tinggi dibandingkan perlakuan pertama yakni kelajuan perlakuan ke-1 sebesar 0.019159/jam dan perlakuan ke-2 sebesar 0.023461/jam. Berdasarkan hasil tersebut, pada sampel kedua produksi inulinase tertinggi pada T12. Peningkatan aktivitas enzim dan biokatalisator dapat dipengaruhi oleh sumber nitrogen dan mineral, sehingga proses regenerasinya pun menjadi lebih cepat.

Penambahan konsentrasi Nitrogen mempengaruhi aktivitas inulinase. Jumlah nitrogen dalam media memengaruhi enzim pendegradasi lignin yang dihasilkan jamur (de Oliveira *et al.*, 2016). Produksi enzim akan dirangsang oleh konsentrasi nitrogen yang rendah dan ditekan oleh konsentrasi nitrogen yang tinggi. Antara sumber nitrogen organik yang diuji untuk produksi enzimatik *A. wentii*, kasein memberi aktivitas inulinase tertinggi (Karatop, 2013). Dilaporkan bahwa setiap spesies jamur memiliki preferensi khusus untuk sumber nitrogen organik atau anorganik untuk produksi maksimum inulinase. Aktivitas inulinase dapat dipengaruhi oleh konsentrasi substrat. Konsentrasi substrat yang tinggi dapat menyebabkan penghambatan substrat, yang merupakan fenomena umum dalam kinetika enzim (Wu, 2011). Aktivitas enzim secara signifikan lebih tinggi dengan adanya inulin dibandingkan dengan sukrosa, yang menunjukkan spesifisitas substrat (Duca *et al.*, 2009).

Kesimpulan

Pertumbuhan Fusan FP4 lebih optimal pada konsentrasi *yeast ekstrak* 0.2 % dengan rata-rata percepatan tumbuh spesifik 0.023461/jam dibandingkan pada konsentrasi *yeast ekstrak* 0.15% dengan rata-rata percepatan tumbuh spesifik 0.019159/jam. Pertumbuhan Fusan FP4 tidak mengalami fase lag (fase adaptasi). Aktivitas Inulinase pada Fusan FP4 lebih optimal pada konsentrasi *yeast ekstrak* 0.2%. Penambahan konsentrasi *yeast ekstrak* sebagai sumber nitrogen meningkatkan kelajuan pertumbuhan mikroorganisme yang akan mempengaruhi hasil aktivitas suatu enzim yang dihasilkan dalam hal ini enzim inulinase yang dihasilkan oleh Fusan FP4.

Referensi

- Alonso-Allende, J., Milagro, F. I., & Aranaz, P. (2024). Health Effects and Mechanisms of Inulin Action in Human Metabolism. *Nutrients*, 16(17). <https://doi.org/10.3390/nu16172935>
- Duca, G., Núñez, C. G., & Rubio, C. M. (2009). Production of extracellular inulinase for the obtainment of fructose syrup | produccion de inulinasa extracelular para la obtencion de jarabe de fructosa. *Acta Cientifica Venezolana*, 60(1–2), 36–39.
- Guadalupe-Daqui, M., Chen, M., Sarnoski, P. J., Goodrich-Schneider, R. M., & MacIntosh, A. J. (2023). Impacts of Reduced (Vacuum) Pressure on Yeast Fermentation as Assessed Using Standard Methods and Automated Image Analysis. *Fermentation*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/fermentation9020155>
- Guglani, A., Shukla, S., & Tripathi, R. (2025). Therapeutic Role of Inulin in Disease Management. In *Inulin for Pharmaceutical Applications A Versatile Biopolymer*. https://doi.org/10.1007/978-981-97-9056-2_14
- Herricks, T., Mast, F. D., Li, S., & Aitchison, J. D. (2017). ODELAY: A large-scale method for multi-parameter quantification of yeast growth. *Journal of Visualized Experiments*, 2017(125). <https://doi.org/10.3791/55879>

- Laowklom, N., Chantanaphan, R., & Pinphanichakarn, P. (2012). Production, Purification and Characterization of Inulinase from a Newly Isolated *Streptomyces* sp. CP01. *Natural Resources*, 03(03), 137–144. <https://doi.org/10.4236/nr.2012.33018>
- Lei, Y., Xie, D., & Xie, Y. (2020). Effects of different sugar sources on yeast growth and sugar utilization. *Journal of Henan University of Technology Natural Science Edition*, 41(1), 65–71. <https://doi.org/10.16433/j.1673-2383.2020.01.011>
- Phukoetphim, N., Chan-U-Tit, P., Laopaiboon, P., & Laopaiboon, L. (2019). Improvement of bioethanol production from sweet sorghum juice under very high gravity fermentation: Effect of nitrogen, osmoprotectant, and aeration. *Energies*, 12(19). <https://doi.org/10.3390/en12193620>
- Poonam, Ghildiyal, R., Bisht, G. S., & Shrivastava, R. (2017). Engineering yeast as cellular factory. In *Metabolic Engineering for Bioactive Compounds Strategies and Processes*. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5511-9_9
- Wijanarka, & Sarsa, A. N. (2019). Inulinokitic Isolation of Yeast in Kersen Fruit (*Muntingia calabura L*) as A Production of Inulinase Enzymes. *Bioma*, 8(2), 414–426.
- Wijanarka, Soetarto, E. S., Dewi, K., & Indrianto, A. (2014). *Kemampuan Fusan FI Dalam Memproduksi Inulinase*. 16(2), 114–118.
- Wu, B. (2011). Substrate inhibition kinetics in drug metabolism reactions. *Drug Metabolism Reviews*, 43(4), 440–456. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.615320>
- Yupanqui-Mendoza, S. L., Vaz de Arruda, P., & Castelo da Silva, G. M. (2022). Statistical sequential optimization of process parameters for inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 in solid-state fermentation using beer residue. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 39. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102252>