

FUSI PROTOPLAS INTERSPECIFIK KHAMIR INULINOLITIK  
TERMOSTABIL *KLUVEROMYCES MARXIANUS* DAN *TORULOSPORA*  
*PRETORIENSIS* ISOLAT LOKAL SERTA APLIKASINYA PADA PRODUKSI  
*HIGH FRUCTOSE SYRUP (HFS)*

Oleh:

<sup>1)</sup>Wijanarka\*, <sup>2)</sup>Arina TL\*, <sup>3)</sup>Hermin PS\*

\* Staf Pengajar Biologi Bagian <sup>1)2)</sup> Lab. Mikrobiologi, <sup>3)</sup> Lab. Genetika FMIPA  
Universitas Diponegoro, Semarang

### ABSTRAK.

Produksi HFS merupakan salah satu industri minuman di Indonesia yang sampai saat ini belum berkembang. Untuk pembuatannya memerlukan enzim inulinase. Enzim ini mampu diproduksi oleh *Torulospora pretoriensis* yang merupakan khamir alami, namun aktivitasnya sangat rendah, sehingga perlu difusikan dengan *Kluveromyces marxianus*. Dengan harapan nantinya akan menghasilkan HFS yang lebih higienis dan mampu menggantikan gula sintetis yang sangat berbahaya bagi kesehatan.

Tujuan dari penelitian ini untuk mendapatkan fusan baru yang unggul dan kompetitif melalui teknik fusi protoplas. Sehingga fusan tersebut mampu menghasilkan enzim inulinase dalam jumlah tinggi serta dapat diaplikasikan pada proses pembuatan HFS.

Hasil penelitian menunjukkan teknik fusi protoplas telah berhasil mendapatkan fusan baru (Fusan 3) yang mampu menghasilkan aktivitas enzim yang lebih tinggi (0,1298 IU/ml) dibanding induk *Torulospora pretoriensis* (0,1045 IU). Pada konsentrasi substrat 2,2% produksi HFS dihasilkan aktivitas enzim 2,806 IU, gula reduksi 10,111 mg/ml, nilai DE 18,71% (DP = 5,34), kadar fruktosa 0,1724 mg/ml dan uji organoleptik untuk rasa dan warna (netral-agak suka), untuk bau (suka-sangat suka).

**Kata kunci:** HFS, inulinase

### PENDAHULUAN

Skala produksi gula nasional ternyata belum dapat memenuhi tingkat konsumsi gula di Indonesia. Hal ini terbukti dengan import gula oleh pemerintah, berupa gula cair dan gula kristal (Tjokroadikoesoemo, 1986; Manganwijaya, 1993). Sehingga kemudian banyak diproduksi pemanis sintetis yang mempunyai tingkat kemanisan lebih tinggi dari pemanis alami, namun membahayakan bagi kesehatan karena bersifat karsinogenik. Upaya mengatasi masalah ini, akhir-akhir ini perhatian dipusatkan terhadap sumber pemanis alami hasil biosintesis dari mikroorganisme dengan alasan mudah dimanipulasi genetik dan murah operasionalnya. Pemanis alami tersebut

adalah Sirup fruktosa atau *High Fructose Syrup (HFS)*, yang dihasilkan oleh khamir inulinolitik. Khamir tersebut mempunyai enzim inulinase yang mampu mengubah inulin menjadi fruktosa sebagai bahan dasar pembuatan HFS.

Produksi HFS merupakan salah satu industri pangan dan minuman di Indonesia yang sampai saat ini belum berkembang. Hal ini disebabkan ada beberapa kendala, 1) belum adanya produsen enzim inulinase, 2) biaya untuk mengimport enzim ini yang sangat mahal, 3) enzim yang dihasilkan sangat sedikit 4) hidrolisis inulin menjadi fruktosa dengan menggunakan asam (pH 1 – 2) pada suhu tinggi (80<sup>o</sup> - 100<sup>o</sup> C) akan menghasilkan fraksi warna yang gelap serta hasil samping yang tak diinginkan seperti difruktofuranoanhidrida (Allais *et al.*, 1986; Xiao *et al.*, 1988). Untuk mengatasi hal tersebut diatas maka perlu digunakan suatu teknik rekayasa genetik seperti seperti fusi protoplas yang mampu menghasilkan inulinase tinggi dan bersifat termostabil pada suhu tinggi. Teknik fusi protoplas dipilih secara intensif untuk meningkatkan kemampuan strain khamir karena mereka umumnya bersifat poliploidi sehingga tidak mudah dilakukan hibridi seksual, mutagenesis maupun aplikasi teknologi DNA rekombinan. Dengan demikian akan diperoleh strain unggul baru yang diharapkan mempunyai produksi inulinase tinggi.

### TUJUAN PENELITIAN

Untuk mendapatkan fusan baru yang unggul dan kompetitif, sehingga fusan tersebut mampu menghasilkan enzim inulinase dalam jumlah tinggi serta dapat diaplikasikan pada proses pembuatan HFS.

### METODE PENELITIAN

#### 1. Mikroorganisme

*Kluveromyces marxianus* dan *Torulospora pretoriensis* (hasil isolasi dari umbi ketela rambat. Wijanarka dkk., 2001). Khamir ini ditumbuhkan dan disimpan dalam medium dengan komposisi sebagai berikut: glukosa 10 g/l, pepton 5 mg/l, ekstrak yeast 3 g/l dan agar 20 g/l. Suhu penyimpanan 4°C. Apabila akan digunakan untuk produksi enzim, maka kedua khamir tersebut harus ditumbuhkan pada media produksi (gr / L) sebagai berikut: inulin 2,5 g; yeast ekstrak 2,5 g;

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g;  $\text{NaNO}_3$  1,5 g;  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  2,0 g;  $\text{KCl}$  0,5 g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1 g dan pH 4,0 (Allains *et al.*, 1986).

## 2. Isolasi protoplas

Protoplas diisolasi dengan menggunakan metode modifikasi Chun (1992). Sel khamir dengan kepadatan  $10^7$  direndam dalam larutan buffer sodium suksinat (pH 4,5); 0,7 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,6 M  $\text{KCl}$  dan 0,1 M 2-mercaptoethanol. Protoplas diperoleh dengan menambahkan 2-3 mg/ml Glukanex selama 2-3 jam.

## 3. Fusi protoplas

Protoplas kedua sel khamir difusikan dengan cara dicampur dalam larutan buffer fosfat (pH 6) yang mengandung 35% polyethylene glycol 0.1  $\text{CaCl}_2$  selanjutnya diinkubasi selama 45 menit. Setelah inkubasi, suspensi disentrifugasi 700 X g selama 5 menit untuk menghilangkan PEG, selanjutnya dilakukan pencucian dan resuspensi dua kali dengan larutan penyangga buffer pospat. Pelet protoplas yang terbentuk selanjutnya dilarutkan kembali dalam larutan penyangga yang sama, kemudian diinokulasikan secara *pour plate* pada medium PDA dan cawan petri disimpan sampai tumbuh fusan pada suhu  $28^\circ\text{C}$ .

## 4. Regenerasi protoplas

Regenerasi protoplas dilakukan dengan menumbuhkan hybrid pada medium agar lunak (PDA *semi solid*). Setelah diinkubasi selama 5-7 hari koloni yang muncul dianalisis lebih lanjut.

## 5. Analisis hybrid hasil fusi

Setelah diperoleh fusan, selanjutnya diuji terhadap fusan yang dicurigai. Uji yang dilakukan adalah uji secara biokemis yaitu mengukur aktivitas enzim inulinase secara kuantitatif. Secara lengkap pengujian fusan seperti berikut ini:

## 6. Aktivitas enzim (Xiao *et al.*, 1988)

Enzim kasar yang diperoleh dari beberapa isolat di ambil 1ml dan direaksikan dengan 1 ml substrat dan inkubasi pada suhu  $50^\circ\text{C}$  selama 10 menit. Reaksi dihentikan

dengan jalan memasukkan tabung sampel kedalam air yang mendidih selama 5 menit. Aktivitas inulinase ditentukan berdasarkan sejumlah 1  $\mu\text{mol}$  gula reduksi yang dibebaskan permenit pada kondisi tertentu. Dari pengujian ini, nantinya akan diperoleh isolat yang mampu menghasilkan aktivitas enzim tertinggi. Gula reduksi yang dihasilkan diukur dengan menggunakan metode Nelson-Somogy. Pembacaan absorbansi menggunakan spektrometer dengan panjang gelombang 550 nm (Chaplin, 1994). Pengukuran aktivitas enzim ditentukan berdasarkan formulasi berikut:

$$\text{Aktivitas enzim} = P (X_s - X_b) / (\text{BM fruktosa} \times 10)$$

P : faktor pengenceran

$X_s$  : kadar fruktosa sampel

$X_b$  : kadar fruktosa blangko

## 7. Pertumbuhan sel (Byun dan Nahm, 1978)

Yaitu dengan mengukur berat sel kering, diambil 10 ml cairan kultur dan disentrifugasi, endapan yang diperoleh dicuci dengan air destilasi dan kemudian dikeringkan pada suhu  $70^\circ\text{C}$  sampai konstan.

## 8. Kadar protein enzim (Lowry)

Sampel diambil 1 ml, kemudian ditambah 5 ml larutan Lowry B. Campuran divortek dan dibiarkan selama 10 menit. Larutan tersebut ditambahkan 0,5 ml Lowry A dan dibiarkan selama 20 menit. Selanjutnya larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm.

## 9. Aplikasi pada HFS

Tepung umbi dahlia sebanyak 25 gr dimasukkan kedalam air 75 ml pH 6,0. Setelah itu ditambahkan enzim inulinase sebanyak 0,0375 ml atau 0,15 U gr bahan dan diinkubasi pada suhu  $50^\circ\text{C}$  selama 48 jam atau 100 jam tergantung dari jumlah enzim yang ditambahkan. Agar sirup berwarna putih, biasanya ditambahkan  $\text{CaCO}_3$  atau arang aktif sebanyak 2 gr untuk 100 ml larutan sirup. Selanjutnya larutan sirup hasil pemurnian ini diuapkan hingga mencapai 70 – 71% bahan kering. Hasil akhir dari proses ini adalah sirup fruktosa (HFS). Pada tahap ini juga akan dilakukan penelitian mengenai perbedaan konsentrasi enzim inulinase yang ditambahkan pada

PEG menyebabkan pelekatan antara satu sel dengan sel yang lainnya sehingga terbentuk agregat protoplas. Protoplas yang telah kehilangan dinding selnya diharapkan mampu berfusi dengan sesamanya melalui penambahan agen penginduksi yaitu PEG (*Polyethylene glycol*).

#### D. Regenerasi Protoplas

Penggunaan protoplas mikrobia dalam rekayasa genetik sangat dimungkinkan, karena adanya kemampuan dari mikrobia tersebut untuk dapat kembali ke bentuk normalnya (Peberdy, 1979); Santiago, 1982).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa regenerasi protoplas untuk *Kluveromyces marxianus* dengan menggunakan lizing enzyme sebesar 8 mg/ml memeberikan hasil yang maksimal yaitu sebesar 35,21%. Sedang untuk *Torulospora pretoriensis* lising enzyme konsentrasi 8 mg/ml memberikan hasil maksimal sebesar 40,59%. Dengan demikian *Torulospora pretoriensis* mempunyai kemampuan regenerasi lebih tinggi dibanding dengan *Kluveromyces marxianus*. Penyebab rendahnya persentase regenerasi protoplas belum sepenuhnya diketahui, pada umumnya dihubungkan dengan ketiadaan inti dalam protoplas dan ketidak mampuan proplas yang keluar dari sel untuk melakukan regenerasi.

#### E. Analisis Fusan

Pada penelitian pendahuluan ini telah ditemukan 5 fusan (Tabel 1). Dari ke-5 fusan tersebut, semua fusan dapat tumbuh pada media produksi enzim, kecuali fusan 9. Setelah dilakukan uji lanjut, ternyata fusan 3 mempunyai kemampuan pertumbuhan yang lebih cepat dan baik dibandingkan keempat fusan lainnya. Berdasarkan uji aktivitas enzim inulinase dengan menggunakan inulin 0,5% sebagai satu satunya sumber karbon dan dan diamati pertumbuhannya selama 34 jam ternyata pada jam ke-12 menghasilkan aktivitas enzim sebesar 0,1298 IU.

Tabel 1. Ciri ciri morfologi koloni fusan

Fusan ke-	Ciri Koloni
3	Lonjong, cembung
6	Bulat, cembung
7	Bulat, bening

9	Bulat, pinggir transparan
10	Cembung, pinggir transparan

Aktivitas inulinase untuk fusan 3 ternyata lebih tinggi dari dengan induk *Torulospora pretoriensis* (0,1045 IU), sedang dibandingkan dengan induk *Kluveromyces marxianus* sedikit lebih rendah (0,1492 IU). Hal ini seperti dikemukakan oleh Crueger and Crueger (1984), bahwa dengan teknik fusi protoplas perolehan strain dengan kombinasi hasil tertinggi dari kedua induk hanya dalam jumlah yang sedikit. Kebanyakan produktivitas selalu berada diantara kedua nilai dari strain induk. Walaupun demikian, teknik ini masih banyak digunakan dalam perbaikan strain, karena dengan fusi protoplas efek kumulatif dan rekombinasi lebih besar.

Kecilnya aktivitas enzim inulinase ini mungkin disebabkan adanya kandungan substrat atau induser yang relatif sedikit, dengan kata lain belum mencapai kebutuhan optimum. Mengingat enzim ini bersifat inducibel maka perlu adanya induser dari luar. Untuk meningkatkan kemampuannya. Hal ini senada dengan pernyataan (Xiao *et al.*, 1988). bahwa sintesis enzim inulinase dalam sel bersifat inducibel, karena enzim inulinase hanya akan terbentuk apabila ada senyawa atau substrat tertentu yang bertindak sebagai induser. Substrat atau induser yang berperan dalam sintesis inulinase adalah inulin dan tidak oleh sukrosa, glukosa atau fruktosa.

Tabel 2. Pengujian fusan terhadap maltosa 1%, sikloheksamid dan nistatin

Sampel	Maltosa	Sikloheksamid 0.1%	Nistatin 400 ppm
Kontrol <i>T. pretoriensis</i>	+	-	-
Kontrol <i>K. marxianus</i>	-	+	+
Fusan 3	+	++	+
Fusan 6	+	++	+
Fusan 7	+	-	+
Fusan 9	+	-	+
Fusan 10	+	-	-

Keterangan:

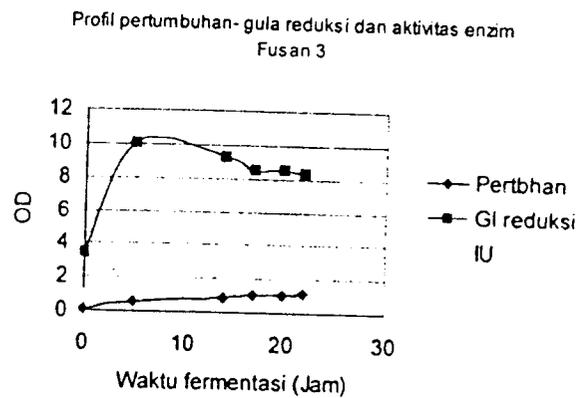
- + : tumbuh
- ++ : tumbuh tapi lemah
- : tak tumbuh

Berdasarkan uji kemampuan dalam menggunakan maltosa sebagai satu-satunya sumber karbon, maka fusan 3 mempunyai banyak kemiripan dengan induk *Torulospira pretoriensis*. Sedangkan uji terhadap sikloheksamid, fusan 3 dapat tumbuh, meskipun lemah. Hal ini mengindikasikan bahwa fusan tersebut mempunyai gabungan dari sifat kedua induknya. Untuk pemilihan penanda dengan menggunakan Nistatin 500 mg (400 ppm), ternyata fusan 3 mampu tumbuh. Hal ini membuktikan bahwa fusan tersebut memiliki sifat seperti *Kluveromyces marxianus* (Tabel 2).

#### F. High Fructose Syrup (HFS)

Pada penelitian berikutnya (utama) fusan 3 digunakan sebagai fusan terpilih. Pada penelitian utama yang dilakukan meliputi pembuatan sirup fruktosa (HFS), pertumbuhan biomasa, kadar gula pereduksi, DE (dektrin ekuivalen) dan uji organoleptik.

Pembuatan sirup fruktosa diawali dengan membuat larutan inulin dengan bahan dasar tepung dahliia. Setelah disterilisasi dan dingin, kemudian diberi starter sebanyak 5% selanjutnya dishaker dengan kecepatan 150 rpm. Sampel diambil dan diamati pertumbuhannya selama 17 jam.



Gambar 1. Pertumbuhan-gula reduksi (mg/ml) dan aktivitas enzim Fusan 3

Pada Gambar 1 terlihat bahwa produk maksimum dicapai pada fase log. Hubungan kinetika pertumbuhan dan pembentukan produk pada gambar diatas

ternyata mengikuti pola I, yaitu pertumbuhan berasosiasi dengan laju pembentukan produk. Hal ini disebabkan produk yang terbentuk (enzim inulinase) digolongkan sebagai metabolit primer. Menurut Wang *et al.* (1979) hubungan kinetika pertumbuhan dan pembentukan produk bergantung pada peranan produk dalam metabolisme sel. Pola hubungan ini dibagimenjadi tiga. Pola I, pertumbuhan berasosiasi dengan pembentukan produk. Pola II, pembentukan produk tak berasosiasi dengan pertumbuhan dan pola yang ke-III laju pembentukan berbanding terbalik baik dengan konsentrasi sel maupun laju pertumbuhan. Profil produk dan biomasa ini sangat dipengaruhi oleh beberapa fenomena, seperti adanya rewndeman yang tak konstan atau penggunaan substrat secara berantai.

Tabel 3. Data primer Fusan 3 pada produksi HFS

Jam ke-	Absorbansi pertumbuhan	Gula reduksi (mg/ml)	Aktivitas enzim (IU)	Fruktosa (mg/ml)
0	0.121	3.493	0.9	0.01
5	0.6198	10.111	2.806	0.1734
14	0.8239	9.285	2.577	0.1641
17	1.0458	8.503	2.360	0.1393
20	1.0969	8.503	2.360	0.1596
22	1.1249	8.373	2.323	0.1475

Pengukuran aktivitas inulinase dilakukan bersamaan dengan dimulainya suatu proses fermentasi. Aktivitas inulinase diukur sebagai jumlah gula reduksi yang dibebaskan pada hidrolisis inulin persatuan waktu tertentu. Penentuan gula reduksi dilakukan secara spektrofometri dengan metode DNS. Hasil pengukuran aktivitas inulinase disajikan pada Tabel 3

Pada tabel tersebut diatas terlihat jelas bahwa hasil tertinggi dicapai pada jam ke-5 untuk gula reduksi sebesar (10,111 mg/ml) dan aktivitas enzim 2.806 (IU). Fruktosa merupakan komponen terbesar penyusun inulin selain glukosa yang terdapat sebagian kecil. Dengan adanya fruktosa tersebut menandakan bahwa inulin mampu dipecah oleh enzim inulinase pada posisi terminal  $\beta$  2-1. Sedangkan DE-nya yang terbentuk sebesar 18,71% dan DP sebesar 5,34. Menurut Cokroadikusumo (1986) bahwa HFS yang baik memiliki DE (96%), fruktosa (42-80%). Rendahnya nilai DE

dan fruktosa ini, mungkin disebabkan karena penggunaan crude enzim, konsentrasi enzim sedikit, tak dilakukan purifikasi, konsentrasi substrat belum maksimum atau tidak digunakannya bioreactor (fermentor).

Uji organoleptik yang dilakukan menunjukkan nilai tingkat kesukaan terhadap rasa, warna dan bau HFS yang bervariasi. Untuk uji organoleptik terhadap rasa mempunyai tingkat kesukaan antara netral sampai agak suka ( $x = 2,5$ ); warna antara netral sampai agak suka ( $x = 2,75$ ) dan bau antara suka dan sangat suka ( $x = 4,1$ ). Hal ini mungkin disebabkan karena tingkat kesukaan dan sifat sensorik yang berbeda pada konsumen.

## KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa teknik fusi protoplas telah berhasil mendapatkan fusan baru (Fusan 3) yang mampu menghasilkan aktivitas enzim yang lebih tinggi (0,1298 IU/ml) dari dengan induk *Torulospira pretoriensis* (0,1045 IU). Pada konsentrasi substrat 2,2% produksi HFS dihasilkan aktivitas enzim 2,806 IU, gula reduksi 10,111 mg/ml, nilai DE 18,71% (DP = 5,34), kadar fruktosa 0,1724 mg/ml dan uji organoleptik untuk rasa dan warna (netral-agak suka), untuk bau (suka-sangat suka).

Bahwa teknik fusi protoplas dapat digunakan untuk mendapatkan strain baru. Strain baru tersebut dapat diaplikasikan pada pembuatan HFS dari tepung umbi dahlia (pada skala industri atau home industri) yang selama ini hanya dikenal sebagai tanaman hias.

## DAFTAR PUSTAKA

- Allains, J.J. S. Kammou; P. Blanc; C. Girard dan J. Baratti. 1986. Isolation and Characteristic of Bacterial Strains with Inulinase Activity. Appl. Environ. Microbiol. 52 (50): 1086-1090.
- \_\_\_\_\_; G. Hoyos-Lopez; S. Kammoun dan J. Baratti. 1987. Isolation and Characterization of Thermophilic Bacterial Strains with Inulinase Activity. Appl. Environ. Microbiol. 53 (5): 942-945
- Bajpai, P. dan A. Margaritis. 1987. Characterization of Molecular Sieve-Bound Inulinase. J. Ferment Technol. 65 (2): 239-247.
- Bucke, C. 1988. Enzymes in Fructose Manufacture. Dalam. Enzymes and food Processing. Applied. Science. Pub. Ltd.

- Byun, S.M. dan B.H. Nahm. 1987. Production of Fructose from Jerusalem artichoke by Enzymatic Hydrolysis J. Food sci. 43: 1871-1873.
- Doty, T. dan Vaninen. 1979. The Properties, manufacture and uses as an Industrial Raw Material. Dalam: C.G. Birch dan K.J. Parker (ed) Sugar: Science and Technology Appl. Sci Publ. London
- Dixon, M and Webb, E. 1979. Enzymes. Logman Group Ltd London
- Deutscher, M. 1990. Guide To Protein Purification. Methods In Enzymology Vol. 182. Academic Press. Inc. Boston. Toronto. Tokyo.
- Hartiko, H. 1994. Biologi Organisme Termofilik. PAU-Bioteknologi UGM. Jogyakarta.
- Holz, G and Saunders G. 1985. Genetic Modification of Industrial Microorganisms. Didalam Comprehensive Biotechnology. The Principles, Application and Regulation of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine. Moo-Young, M (Ed) Pergamon Press.
- Iwasaki R and M. Murakoshi. 1992. Palm oil yields carotene for world markets. Inform. vol 3 No 2 :210-217
- Javadekar, V.S., H. SivaRaman and D. Gokhale, 1995. Industrial yeast strain Improvement construction of a highly flocculent yeast with a killer character by protoplast fusion. Jou. Indst. Microbiology 15: 94-102
- Kreger-van Rij, N.J.W. 1984. The yeast, A Taxonomic Study. Third revised and Enlarged Ed., Elsevier sci. publ. B.v., Amsterdam.
- Krismundari, K.I. 1991. Fusi Protoplas *B.t* var. *israelensis* var. *kurstaki* Untuk memperbesar Daya Bunuh. Tesis UGM
- Lutony, T.L. 1993. Tanaman Sumber Pemanis. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Matsushima, R and Baltz R.H. 1986. Protoplas Fusion didalam Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Demain, A.L. and Solomon, N.A. American Society for Microbiology. Washington DC.
- Nagy IZ, Palagyi, C. Vagvolgyi & L. Ferenczy. 1994. Genomic Comparison among Wild-type and Mutant Strains of *P. rhodozyma*. FEMS Microbiology. Lett. 123: 315-318
- Park, J.P and J.W. Yun. 2001. Utilization of Chicory roots for Microbial Endoinulinase Production. Letters In Applied Microbiology. 2001 (33): 183-187
- Peberdy, J.F. 1989. Genetic Manipulation dalam Physiology of Industrial Microorganism. Berry D.R. (Ed). Blackwell Scientific Publ. Oxford.
- Perkins, S. 1984. Biotechnology: A New Industrial Revolution. Orbis Publishing. London.
- Rouwenhorst, R.J.; L.E. Visser; A.A van Derbaan; W.A. Scheffer dan J.P. van Dijken. 1988. Production, Distribution and Kinetic Properties of inulinase in Continuous Culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. Appl environ. Microbiol. 54(5): 1131-1137.

saat penebaran yaitu 0,0075, 0,015 dan 0,1125 ml 1% larutan sirup, dan juga pengujian organoleptik untuk rasa, warna dan bau (Seokarto, 1985).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Pemilihan Marker

Marker dalam berbagai proses rekombinasi genetik sangat diperlukan untuk mengetahui dan menyeleksi terjadinya rekombinasi genetik yang baru. Sifat auksotrof dan antibiotik atau fungisida sering dipergunakan sebagai marker (Hocart and Peberdy, 1990).

Hasil uji konsentrasi penghambatan minimal bahwa konsentrasi penghambatan minimum nistatin untuk *Torulospora pretoriensis* sebesar 400 ppm. Sedangkan untuk *Kluveromyces marxianus*, penghambatan minimum 500 ppm. Oleh karena itu, konsentrasi yang dipakai sebagai penanda *Torulospora pretoriensis* adalah 400 ppm nistatin, sedangkan untuk *Kluveromyces marxianus* 500 ppm nistatin 500 mg.

### B. Isolasi Protoplas

Isolasi protoplas tingkat keberhasilannya sangat ditentukan oleh berbagai faktor, diantaranya umur kultur dan jenis enzim litik yang dipergunakan. Fase pertumbuhan mikrobia pada saat dilakukan isolasi protoplas sangat mempengaruhi keberhasilan pada langkah berikutnya. Peberdy (1980) dan Santiago (1982) mengatkan bahwa kultur mikrobia pada fase eksponensial akan menghasilkan jumlah protoplas yang baik, sedangkan menurut Santopeitro *et al.* (1997) pada saat memasuki fase log, tepatnya pada fase mid log.

Pada penelitian ini, khamir *Kluveromyces marxianus* dan *Torulospora pretoriensis* telah memasuki fase log pada umur atau jam ke- 4 – 20, sehingga bila digunakan untuk mengisolasi protoplas pada fase mid log yaitu jam ke-12 untuk *Torulospora pretoriensis*, sedangkan jam ke – 8 untuk jenis *Kluveromyces marxianus*. Perbedaan fase mid log ini mungkin disebabkan adanya perbedaan species sehingga akan menyebabkan perbedaan umur kultur. Akibat selanjutnya, bahwa kedua kultur tersebut mempunyai fase mid log yang berbeda.

Enzim litik yang dipergunakan dalam isolasi proplis tergantung pada komponen penyusun dinding sel mikrobia dalam hal ini khamir. Pada golongan Ascomycetes dinding sel tersusun atas kitin dan glukukan (Bartnicki – Garcia, 1968). Menurut Pelczar and Chan (1986), bahwa penyusun dinding sel kapang kitin, selulosa dan glukukan. Sedangkan menurut Jutono dkk. (1980), bahwa dinding sel khamir terdiri dari atas kitin.

Dalam penelitian ini digunakan enzim litik Glucanex yang berasal dari *Trichoderma harzianum* yang mengandung selulase, protease dan kitinase. Enzim ini ternyata mempunyai keidentikan dengan Novozyme 234 yang dikenal sebagai enzim litik (Sigma, 1995; Sigma, 2004). Oleh karena itu, enzim litik ini dapat dipergunakan untuk memecah komponen dinding sel, sehingga akan menghasilkan protoplas. Isolasi protoplas dengan menggunakan enzim litik, dihasilkan protoplas sebesar  $2,0 - 2,24 \times 10^7$  protoplas/ ml untuk *Torulospora pretoriensis*, sedangkan untuk *Kluveromyces marxianus* sebesar  $1,36 - 2,6 \times 10^7$  protoplas/ ml.

Konsentrasi enzim litik yang digunakan dalam penelitian ini sangat bervariasi, hal ini dilakukan untuk mencari konsentrasi yang optimum dalam proses isolasi protoplas. Semakin pekat konsentrasi enzim litik yang dipergunakan dalam proses isolasi protoplas pada *Torulospora pretoriensis* dan *Kluveromyces marxianus*, ada kecenderungan semakin besar pula jumlah proplis yang akan dihasilkan dibanding dengan kontrol. Hal ini membuktikan bahwa enzim litik tersebut mampu bekerja memecah dinding sel khamir tersebut yang umumnya terdiri selulosa, kitin atau gabungan keduanya.

### C. Fusi Protoplas

Teknik fusi protoplas dapat diterapkan pada berbagai mikrobia termasuk genus *Torulospora* dan *Kluveromyces*. Pada fusi protoplas menggunakan PEG 6000 terdapat dua atau lebih protoplas terlihat membentuk agregat. Pada penelitian ini, frekuensi antara *Torulospora pretoriensis* dan *Kluveromyces marxianus* dengan menggunakan PEG 35 % selama 45 menit sebesar 44,32%. Nilai frekuensi ini ternyata cukup besar. Bila dilihat dari kandungan enzim litik yang digunakan, maka makin besar enzim litik yang digunakan maka makin besar pula frekuensi fusi ini. Menurut Frehel *et al.* (1979) dalam Krismunandari (1991) bahwa proses aktivasi memberan yang diinduksi dengan