

Kemampuan Prospektif Fusan FP4 dalam Memproduksi Inulinase dan Profil Pertumbuhannya

WIJANARKA*, IKA ANGGRAINI

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia

Diterima: 12 Februari 2017 – Disetujui: 25 Maret 2017
© 2017 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Cenderawasih

ABSTRACT

Fusan FP4 is one type fused materials derived from intraspecific fusion of *Pichia manshurca*. The fused materials have superior capabilities compared with other materials, especially in producing inulinase enzyme (E.C. 3.2.1.7). The aims of the study are to determine the production of the enzyme inulinase of fusan FP4 and the growth profile formed. Growth can be detected by the addition of size and cell division. Growth measurements of fusan FP4 was carried out for 24 hours and observation and sampling was done every 6 hours for 24 hours. Observations of growth are conducted qualitatively by using a spectrophotometer, while the production of inulinase done using DNS method. The results of this study showed that the highest inulinase production was 1.948 U/ml and occurred at log phase with 6 hours of incubation time (t_6) to 12 hours (t_{12}).

Key words: inulinase, Fusan FP4, log phase, *P. manshurca*.

PENDAHULUAN

Fenomena penyakit biasanya berasal dari saluran pencernaan yang tidak sehat. Berdasarkan alasan tersebut, maka muncul konsep prebiotik yang digunakan untuk membantu pencernaan manusia. Prebiotik dapat meningkatkan mikroflora yang menguntungkan pada saluran pencernaan manusia. Bahan yang dikenal sebagai prebiotik adalah fruktooligosakarida (FOS). FOS merupakan nutrient selektif yang menguntungkan bagi saluran pencernaan manusia. Menurut Santos & Maugeri (2007), bahwa berbagai bahan organik telah dikenal berfungsi sebagai prebiotik, diantaranya adalah fruktooligosakarida, jenis karbohidrat ini tidak dapat dicerna oleh enzim-enzim pencernaan di dalam tubuh yang

merupakan nutrien selektif untuk pertumbuhan mikrobiota menguntungkan di dalam kolon dan potensial dalam meningkatkan efektivitas produk probiotik.

Ketergantungan gula yang sangat tinggi di Indonesia telah menyebabkan permintaan gula menjadi meningkat. Permintaan gula nasional ternyata tidak seimbang dengan rendahnya produksi gula karena terbatasnya lahan perkebunan tebu dan tingginya biaya produksi. Hal tersebut mendorong perlunya pemanis alami fruktosa sebagai alternatif. Fruktosa dapat dihasilkan dari hasil hidrolisis inulin oleh enzim *inulinase*. Hal ini didukung oleh penelitian Wijanarka *et al.* (2004) bahwa keadaan inilah yang mendorong upaya mencari aneka jenis bahan untuk digunakan sebagai pemanis, sehingga banyak diproduksi pemanis alternatif. Salah satu alternatif yang digunakan sebagai pemanis alami adalah fruktosa.

Fruktooligosakarida dan fruktosa merupakan salah satu produk hasil hidrolisis inulin oleh enzim inulinase. Inulinase dapat dihasilkan oleh tumbuhan atau mikrobia, namun inulinase yang

* Alamat korespondensi:

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika,
Universitas Diponegoro, Jl. Prof. Soedarto, SH, Kampus
Undip Tembalang, Semarang, Indonesia 50275.
e-mail: wikasmara@yahoo.com

dihasilkan oleh mikrobial mampu menunjukkan aktivitas hidrolisis inulin yang tinggi. Inulinase yang dihasilkan oleh parental dari fusan FP4 sedikit, sehingga perlu dilakukan suatu upaya untuk menghasilkan inulinase yang lebih tinggi. Upaya dilakukan dengan cara fusi protoplas parental dari fusan FP4 sehingga menghasilkan fusan FP4 yang diharapkan mampu menghasilkan inulinase yang lebih tinggi.

Fusan adalah khamir baru yang sudah termutasi. Fusan FP4 dihasilkan dari fusi protoplas khamir *Pichia manshurica*. *P. manshurica* DUCC-015 termasuk dalam kelompok khamir. Khamir merupakan mikroorganisme uniseluler yang masuk ke dalam kingdom fungi. Hal ini didukung oleh pernyataan dari Khurtzman (2000), bahwa *P. manshurica* DUCC-015 merupakan khamir uniseluler berbentuk bulat telur.

METODE PENELITIAN

Persiapan Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian terdiri dari tabung reaksi, cuvet, labu erlenmeyer, autoklaf, gelas beaker, mikropipet, jarum ose, sentrifuge, spektrofotometer, pipet ukur, neraca, *rotary shaker*, rak tabung reaksi, bunsen, batang pengaduk, gelas ukur, inkubator, penangas air, botol sampel sample, tip steril, ependorf steril, pipet ukur, mikropipet, tempat ependorf.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain isolat fusan FP4, tepung dahlia, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, yeast ekstrak, aquades steril, aquades, DNS, substrat inulin murni, buffer sodium asetat 0,1 M pH 5, enzim crude.

Pembuatan Media Produksi Basal dan Sterilisasi

Tahap pembuatan media diawali dengan membuat media produksi yang terdiri dari komponen (pelarut tepung dahlia 37,5 g, NH_4NO_3 0,2875 g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,4625 g, K_2HPO_4 0,125 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0625 g, dan yeast ekstrak 0,1875 g). Semua komponen media tersebut dicampur dan dilarutkan serta di cek pHnya. Jika nilai pH kurang dari 5, maka media perlu

ditambah NaOH sedikit demi sedikit, sedangkan jika lebih besar dari 5 maka media perlu ditambah HCl sedikit demi sedikit. Media dan akuades di sterilisasi dengan menggunakan autoklaf dengan suhu 121 °C dan tekanan 2 atm.

Pembuatan DNS

Komponen DNS dipersiapkan terlebih dahulu yang terdiri dari (DNS 0,25 g, sodium potassium 75 g, NaOH 4 g, aquades 50 ml). Pembuatan DNS dimulai dengan melarutkan 4 g NaOH dalam 50 ml akuades hingga larut. Setelah larut, larutan ditambah 75 g sodium potassium hingga larut. Larutan diaduk dan bersaaman dengan ditambahkan 0,3 g DNS hingga larut. Kemudian larutan ditambah 200 ml akuades dan diaduk kembali hingga larut sehingga tidak ada endapan.

Pengukuran Pertumbuhan Sel

Pengukuran pertumbuhan sel diawali dengan menginokulasikan starter yang berumur 22 jam pada medium produksi basal cair secara aseptis. Inkubasi dilakukan selama 30 jam menggunakan *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Pengambilan sampel dilakukan pada interval 6 jam sekali selama 24 jam yaitu 0 jam (t_0), 6 jam (t_6), 12 jam (t_{12}) dan 18 jam (t_{18}) dengan pengambilan sampel sebanyak 5 ml. Masing-masing sampel diukur pertumbuhan sel dengan menggunakan spektrofotometer pada $\lambda = 520$ nm hingga didapatkan nilai T masing-masing. Masing-masing nilai T diubah kedalam nilai abs yang kemudian digunakan untuk pembuatan kurva pertumbuhan. Masing-masing sampel dari t_0 hingga t_{18} diambil 1,5 ml untuk disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit sehingga didapatkan enzim crude.

Pengukuran Aktivitas Enzim Inulinase

Bahan yang disiapkan yaitu substrat inulin dalam buffer sodium asetat, buffer sodium asetat murni, enzim crude hasil sentrifugasi, aquades steril, aquades, dan DNS. Substrat inulin 1 % (sigma) dicampur dengan buffer sodium asetat 0,1 M pH: 5 namun tetap disisakan buffer sodium asetat murni, 13 tabung reaksi dipersiapkan dimana masing-masing waktu inkubasi (t) terdiri

dari 3 tabung reaksi (ES, S, E) dan 1 tabung reaksi untuk blangko. Masing-masing tabung reaksi ES dari t_0 hingga t_{18} diisi dengan komponen 0,9 substrat inulin dalam buffer sodium asetat dan 0,1 0,1 enzim crude. Masing-masing tabung reaksi S dari t_0 hingga t_{18} diisi dengan komponen 0,9 substrat inulin dalam buffer sodium asetat dan 0,1 aquades steril. Masing-masing tabung reaksi E dari t_0 hingga t_{18} diisi dengan komponen 0,4 buffer sodium asetat murni, 0,1 enzim crude dan 0,5 aquades steril. Tabung reaksi untuk blangko diisi dengan 0,4 buffer sodium asetat dan 0,6 aquades setril. Semua tabung reaksi tersebut dikocok dan diinkubasi pada suhu 50 °C selama 30 menit. Untuk mematikan reaksi kimiawi, semua tabung reaksi dididihkan dan ditunggu sampai dingin. Semua tabung reaksi ditambah 1 ml DNS dan dipanaskan selama 2 menit lalu didinginkan. Selanjutnya aktivitas enzim diukur dengan spektrofotometer pada $\lambda = 570$ nm berdasarkan gula reduksi (fruktosa) yang terbentuk. Aktivitas enzim adalah sejumlah enzim yang mampu merombak 1 mikromol substrat per menit dalam kondisi tertentu.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan Fusan FP4

Pertumbuhan adalah proses bertambahnya ukuran, volume atau massa sel. Pertumbuhan khamir dapat terjadi karena nutrisi yang tersedia dalam media yang digunakannya untuk proses tumbuh dan berkembang. Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Roslenawati *et al.* (2014), bahwa pertumbuhan khamir digambarkan sebagai pertambahan jumlah sel sehingga terjadi pertambahan populasi.

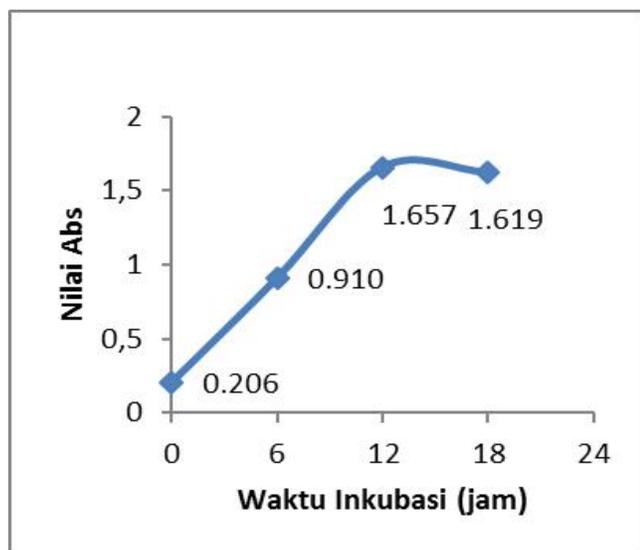
Pertumbuhan fusan FP4 tergolong dinamik. Pertumbuhan fusan FP4 dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah adanya sumber karbon yang berupa inulin sehingga fusan FP4 dapat memproduksi inulinase. Inulin yang digunakan dalam penelitian ini adalah inulin yang berasal dari umbi dahlia karena umbi dahlia memiliki kadar inulin lebih tinggi dibandingkan tanaman yang lain. Hal ini sesuai dengan

pernyataan dari Mangunwidjaja *et al.* (2014), bahwa tepung inulin dengan kadar paling tinggi diperoleh dari tepung inulin umbi dahlia yaitu sebesar 80,09%. Pada gembili walaupun kadar karbohidratnya lebih tinggi dari pada umbi dahlia, namun kadar inulinnya jauh lebih kecil yaitu sebesar 4,02%. Hal ini juga didukung oleh pernyataan dari Waluyo (2004), bahwa penggunaan tepung umbi dahlia dan ekstrak inulin dalam media kultur berperan sebagai sumber karbon bagi pertumbuhan khamir. Karbon merupakan elemen makronutrien utama yang berperan penting bagi sistem metabolisme khususnya sebagai kerangka makromolekul seluler dari khamir.

Kurva pertumbuhan fusan FP4 menunjukkan bahwa pada waktu inkubasi 6 jam (t_6) sampai 12 jam (t_{12}) mengalami fase logaritmik. Fase ini terbentuk karena fusan FP4 mengalami pertumbuhan yang pesat dan terjadi proses hidrolisis inulin dalam medium. Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Pessoni *et al.* (2007), bahwa meningkatnya reduksi gula bertepatan dengan fase eksponensial dari kultur yang mengindikasikan hidrolisis ekstraseluler dari substrat.

Fase lag atau fase adaptasi, tidak terjadi karena sudah adanya penyesuaian pada saat starter dishaker selama 22 jam sebelum akhirnya dicampurkan pada media produksi. Fase stationer terjadi pada waktu inkubasi 12 jam (t_{12}) hingga 18 jam (t_{18}) dengan nilai absorbansi yang hampir berdekatan yaitu 1.657 dan 1.619. Fase stationer ini disebabkan karena berkurangnya jumlah nutrisi dalam medium sehingga pertumbuhan fusan menjadi terganggu. Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Pessoni *et al.* (2007), bahwa fase pertumbuhan stasioner mulai ketika gula bebas eksogen tidak lagi tersedia.

Fase pertumbuhan FP4 tidak tetap atau dinamik karena nilai *optical density* (OD) pada setiap waktu inkubasi berbeda-beda. Pertumbuhan optimal terjadi pada waktu inkubasi 12 jam (t_{12}) dengan nilai OD sebesar 1,657. Fase stationer terjadi pada waktu inkubasi 12 jam (t_{12}) hingga 18 jam (t_{18}). Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Wijanarka *et al.* (2013), bahwa Proses pertumbuhan suatu mikrobia merupakan suatu proses yang



Gambar 1. Kurva pertumbuhan fusan FP4.

Tabel 1. Rata-rata nilai *Optical Density* (OD) pertumbuhan Fusan FP4.

Waktu Inkubasi (jam)	Nilai OD (Abs)
0	0,206
6	0,910
12	1,657
18	1,619

dinamik. Pertumbuhan suatu mikrobia pada umumnya mengikuti pola fase stasioner (lag phase), fase pertumbuhan dipercepat, fase eksponensial, fase pertumbuhan diperlambat dan fase kematian.

Aktivitas Enzim Inulinase dari Fusan FP4

Enzim inulinase adalah enzim ekstraseluler yang mampu menghidrolisis inulin menjadi fruktosa dan fruktooligosakarida (FOS). Enzim ini dapat dihasilkan oleh tanaman, bakteri maupun khamir. Keunggulan dari enzim inulinase adalah dapat diterapkan dalam industri. Hal ini didukung oleh pernyataan dari Karatop & Sanal (2013), bahwa salah satu enzim yang memiliki daerah yang luas dari penggunaan dalam industri adalah inulinase. Enzim inulinase adalah

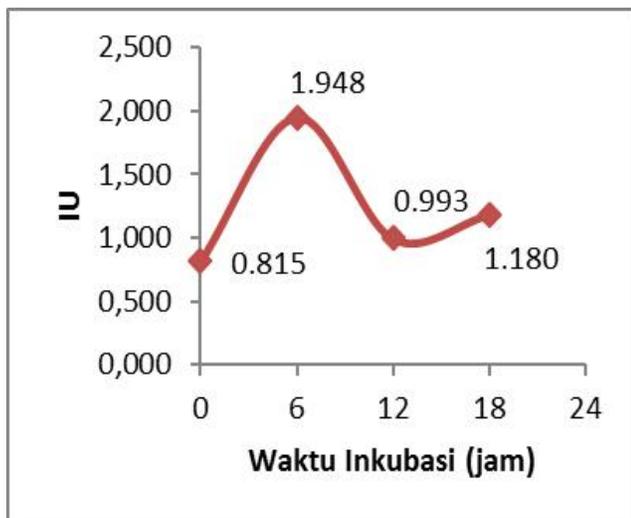
digunakan dalam proses industri seperti produksi inulooligosakarida, asam glukonat dan frukto-oligosakarida, yang merupakan pemanis rendah kalori. Inulinase diproduksi oleh fermentasi, jamur filamen dan bakteri. Enzim yang dihasilkan oleh jamur memiliki keunggulan industri, karena ekstraseluler dan mudah mendapatkan kembali pada lingkungan terfermentasi.

Metode paling baik untuk menghidrolisis inulin menjadi fruktosa adalah dengan metode enzimatik. Metode enzimatik memiliki banyak keunggulan dibanding metode kimia karena dapat menghasilkan fruktosa murni dengan jumlah yang cukup tinggi. Hal ini sesuai didukung oleh penelitian dari Danial *et al.* (2015), bahwa produksi enzimatik produk organik, terutama yang digunakan dalam industri makanan dan farmasi, memiliki banyak keuntungan dibandingkan proses kimia. Metode terbaik untuk menghasilkan fruktosa dalam hasil tinggi adalah melalui reaksi enzimatik (inulinase), dimana 95 % fruktosa murni dapat diproduksi setelah satu langkah dari hidrolisis enzimatik inulin.

Konsentrasi fruktosa diukur untuk menentukan banyaknya degradasi inulin menjadi fruktosa. Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Leva *et al.* (2016), bahwa konsentrasi glukosa dan fruktosa diukur untuk menentukan pemakaian glukosa atau degradasi inulin menjadi fruktosa.

Uji aktivitas enzim ini dilakukan untuk mengetahui banyaknya inulinase yang menghidrolisis inulin secara enzimatik menjadi fruktosa dan FOS. Hal ini sesuai dengan pernyataan Xia Li *et al.* (2012) bahwa, aktivitas inulinase diuji dengan mengukur jumlah gula reduksi yang dilepaskan dari inulin. Satu unit aktivitas inulinase (U) didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang diproduksi gula pereduksi setara dengan 1 μmol fruktosa per menit di bawah kondisi tertentu. Hal ini juga didukung oleh penelitian dari Laowklom *et al.* (2012), bahwa Satu unit inulinase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diproduksi satu mikromol gula pereduksi per menit dalam kondisi tertentu.

Adanya inulin dalam medium, berperan sebagai inducer untuk mendukung pertumbuhan fusan FP4. Enzim Inulinase dari fusan FP4



Gambar 2. Kurva aktivitas enzim inulinase.

Tabel 2. Rata-rata aktivitas enzim inulinase fusan FP4.

Perlakuan (jam)	Rata-rata (U/ml)
0	0,815
6	1,948
12	0,993
18	1,180

merupakan enzim ekstraseluler. Hal ini sesuai dengan pernyataan Roslenawati *et al.* (2014), bahwa dari Inulinase yang dihasilkan khamir adalah enzim ekstraseluler. Hal ini juga didukung oleh penelitian dari Wijanarka *et al.* (2009), bahwa Inulin sangat mempengaruhi produksi inulinase, dan enzim ini hanya dapat dihasilkan apabila ada rangsangan/induser yang berasal dari luar.

Kurva aktivitas enzim inulinase menunjukkan bahwa aktivitas enzim dari fusan FP4 mengalami kenaikan dan penurunan secara tidak teratur. Hal ini disebabkan adanya faktor keakuratan. Aktivitas enzim terendah terletak pada waktu inkubasi 0 jam (t_0) sebesar 0,815 sedangkan rata-rata aktivitas enzim paling tinggi terletak pada waktu inkubasi 6 jam (t_6) sebesar 1,948 U/ml. Aktivitas enzim tertinggi pada t_6 secara bersamaan terjadi pada fase logaritmik. Pada fase ini, terjadi pertumbuhan sel secara cepat dan konstan. Tahap

tersebut mendorong Fusan FP4 dalam memenuhi kebutuhan energy dengan cara mengeluarkan inulinase untuk menghidrolisis inulin dalam media sehingga fase pembentukan inulinase meningkat. Sedangkan pada fase stationer t_{12} sampai t_{18} juga seiring dengan menurunnya pembentukan inulinase. Hal ini dikarenakan kebutuhan energy dalam media juga menurun. Semakin lama waktu inkubasi maka semakin besar gula reduksi yang dihasilkan. Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Sari & Hartiko (2005), bahwa inulinase mikrobia dihasilkan pada fase logaritmik. Pada fase logaritmik sel membelah dengan cepat dan konstan. Pada fase ini kebutuhan energi lebih besar dibanding fase lain karena metabolisme berjalan cepat. Untuk memenuhi kebutuhan energi dan sumber karbon maka mikrobia mengeluarkan inulinase untuk menghidrolisis inulin yang terdapat dalam media. Dengan demikian pembentukan inulinase pada fase ini meningkat. Inulinase dapat digolongkan sebagai metabolit primer. Pada fase stasioner aktivitas inulinase menurun. Pada fase stasioner metabolisme berjalan lemah sehingga kebutuhan energi menurun. Biosintesis enzim dihambat katabolit dalam medium disebut represi katabolik. Semakin lama waktu inkubasi semakin besar jumlah gula reduksi sebagai hasil hidrolisis inulin. Gula reduksi ini merupakan katabolit yang dapat menghambat aktivitas inulinase jika dalam jumlah yang besar.

Tabel 2 aktivitas enzim menunjukkan aktivitas enzim inulinase terendah terjadi pada waktu inkubasi 0 jam (t_0) sebesar 0,815 U/ml., sedangkan aktivitas enzim tertinggi terjadi pada waktu inkubasi 6 jam (t_6) sebesar 1,948 U/ml. Aktivitas enzim inulinase tertinggi dari fusan FP4 terjadi pada waktu inkubasi 6 jam (t_6) sebesar 1,948 U/ml. Berdasarkan hasil tersebut, menunjukkan bahwa aktivitas enzim dari fusan FP4 lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas enzim pada parentalnya yaitu *P. manshurica* 0,683 IU. Hal ini menunjukkan bahwa fusan FP4 hasil protoplas dari *P. manshurica* mampu meningkatkan aktivitas enzim inulinase yang lebih tinggi dibanding parentalnya. Hal ini didukung oleh penelitian dari Wijanarka *et al.* (2013), bahwa Khamir *P.*

manshurica mempunyai kemampuan dalam menghasilkan enzim inulinase sebesar 0,683 IU. Hal ini juga sesuai dengan penelitian dari Roslenawati *et al.* (2014), bahwa fusi protoplas intraspesies *P. manshurica* DUCC-015 akan memberikan peluang didapatkannya fusan yang berkualitas unggul dalam produksi inulinase dibandingkan induk (kontrol). Fusan mempunyai aktivitas dan produksi inulinase yang lebih tinggi dibanding induk. Hal ini mengindikasikan teknik fusi protoplas berpotensi mengembangkan kemampuan *P. manshurica* DUCC-015.

KESIMPULAN

Aktivitas enzim inulinase tertinggi pada t_6 sebesar 1,948 U/ml sedangkan terendah terjadi pada t_0 sebesar 0,815 U/ml. Aktivitas enzim inulinase seiring dengan fase pertumbuhan fusan FP4. Fase logaritmik terjadi peningkatan pembentukan enzim sedangkan fase stationer terjadi penurunan pembentukan enzim. Semakin lama waktu inkubasi maka semakin besar gula reduksi yang dihasilkan. Fusan FP4 memiliki aktivitas enzim inulinase yang lebih tinggi dibanding *P. manshurica* DUCC-015 sebagai parentalnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Danial, E.N, N.O.A. Ayaz, and H.S.O. Alnahdi. 2015. Production of inulinase by free and immobilized cells of *Penicillium funiculosum*. *Braz Arch Bio Technol.* 58(4): 36.
- Karatop. R., and F. Sanal. 2013. A potential resource in fructose production from inulin: *Aspergillus wentii* inulinase. *Journal of Cell and Molecular Biology.* 11(1&2): 21-28.
- Khurtzman, C.P. 2000. Four new yeasts in the *Pichia anomala* clade. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 50: 395-404.
- Laowklom, N, R. Chantanapan, and P. Pinphanichakarn. 2012. Production, purification and characterization of inulinase from a newly isolated *Streptomyces* sp. CP01. *Natural Resource.* 3: 137-144.
- Leva, L.A.G., S.R. Hughes, J.C.L. Nunez, J.M. Jarodsky, A. Erickson, M.R. Lindquist, L.J. Cox, K.M. Bischoff, E.C. Hoecker, S. Liu, N. Qureshi, and M.A. Jones. 2016. Growth ethanol production and inulinase activity on various inulin substrate by mutant *Kluyveromyces marxianus* Strain NRRL Y-50798 and NRRL Y-50799. *J Ind Microbiol Technol.* 43: 927-939.
- Mangunwidjaja, D, M. Rahayuningsih, dan R. Suparwati. 2014. Pengaruh konsentrasi enzim dan waktu hidrolisis enzimatis terhadap mutu frukto-oligosakarida dari inulin umbi Dahlia (*Dahlia pinnata*). *E-Jurnal Agroindustri Indonesia* 3(1): 189-199.
- Pessoni, R.A.B, M.R. Braga, and R.D.C.L.F. Ribeiro. 2007. Purification and properties of exo-Inulinase from *penicillium janczewskii* growing on distinct carbon sources. *Mycologia* 99 (4): 493-503.
- Roslenawati, H. P. Kusumaningrum, dan S. Pujiyanto. 2014. Analisis fusan hasil fusi protoplas intraspesies *Pichia manshurica* DUCC-015. *Jurnal Sains dan Matematika* 22(1): 7-14.
- Santos, A.M.P. and F. Maugeri. 007. Synthesis of fructooligosaccharides from sucrose using inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. *J. Food Technol and Biotechnol.* 45(2): 181-186.
- Sari, S.L.A, dan H. Hartiko. 2005. Aktivitas inulinase jamur yang diisolasi dari tanah sekitar umbi dahlia (*Dahlia pinnata* cav). *Biosmart.* 7(5): 1-5.
- Waluyo, L. 2004. *Mikrobiologi umum*. Universitas Muhammadiyah Press. Malang.
- Wijanarka, R.S Ferniah, dan Salamah. 2004. Produksi inulinase *Pichia alni* DUCC-W4 pada tepung umbi dahlia (*Dahlia Variabilis* Willd) dengan variasi konsentrasi ammonium nitrat dan waktu inkubasi. *Bioma.* 10(2): 58-64.
- Wijanarka, E. Kusdiyantini, dan Hermin. 2009. Identifikasi dan karakterisasi isolat 23 Ducc serta kemampuannya dalam memproduksi enzim inulinase. *Biosfera.* 26(3): 108-114.
- Wijanarka, E.S. Soetarto, K. Dewi, dan A. Indrianto. 2013. Aktivitas inulinase oleh *Pichia manshurica* dan Fusan F4 pada fermentasi batch dengan umbi dahlia (*Dahlia* sp) sebagai substrat. *Reaktor.* 14(3): 187-192.
- Wijanarka, E.S. Soetarto, K. Dewi, dan A. Indrianto. 2013. Kinetika pertumbuhan dan produksi inulinase Fusan 7. *Bioma.* 15(2): 53-57.
- Xia, Li. A, L.Z. Guo, and W.D. Lu. 2012. Alkaline inulinase production by a newly isolated bacterium *Marinimicrobium* sp. LS-A18 and inulin hidrolisis by the enzyme. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 81-89.