



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**FERMENTASI MANITOL MENGGUNAKAN KHAMIR  
METILOTROP ISOLAT LOKAL DAN KOLEKSI UICC**

**SKRIPSI**

**KHAIRUL BASYAR**

**0806315635**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**PROGRAM STUDI FARMASI**

**DEPOK**

**JULI2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**FERMENTASI MANITOL MENGGUNAKAN KHAMIR  
METILOTROP ISOLAT LOKAL DAN KOLEKSI UICC**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Farmasi**

**KHAIRUL BASYAR**

**0806315635**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**PROGRAM STUDI FARMASI**

**DEPOK**

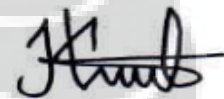
**JULI2012**

## SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa skripsi ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

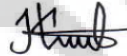
Depok, Juli 2012



Khairul Basyar

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Khairul Basyar  
NPM : 0806315635  
Tanda tangan :   
Tanggal : 12 Juli 2012

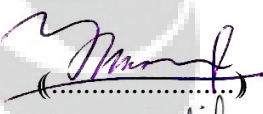
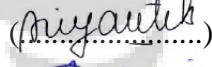

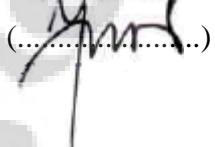
## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh:

Nama : Khairul Basyar  
NPM : 0806315635  
Program Studi : Sarjana Farmasi Reguler  
Judul Skripsi : Fermentasi Manitol Menggunakan Khamir Metilotrop  
Isolat Lokal dan Koleksi UICC.


Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Herman Suryadi, M.S., Apt.   
Pembimbing II : Dr. Ariyanti Oetari, M.Phil.   
Penguji I : Dr. Amarila Malik, M.S.   
Penguji II : Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S., Apt. 

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 12 Juli 2012



*“Dan Allah mengeluarkan kamu dari perut ibumu dalam keadaan tidak mengetahui sesuatu pun, dan Dia memberi kamu pendengaran, penglihatan, dan hati agar kamu bersyukur.”*

*(Q.S. An Nahl :78)*

*“Untuk mereka yang senantiasa mengangkat kedua tangannya ke atas dan memohonkan kebaikan untuk ku dalam setiap munajat kepada-Nya”*

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah *subhanahu wa ta'ala* atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi yang berjudul “Fermentasi Manitol Menggunakan Khamir Metilotrop Isolat Lokal dan Koleksi UICC”. Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Penulis menyadari tidak dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik tanpa bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih banyak kepada berbagai pihak yang telah memberikan bantuan baik berupa bantuan moral, teknis, dan material sehingga skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik, khususnya kepada :

1. Prof. Yahdiana Harahap, M.S., selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI beserta seluruh staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI.
2. Dr. Herman Suryadi, M.S., Apt. selaku pembimbing I yang telah bersedia menyediakan waktu, tenaga, dan pikirannya untuk membimbing dan memberikan arahan serta saran yang bermanfaat selama proses penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Dr. Ariyanti Oetari, M.Phil., selaku pembimbing II yang telah bersedia memberikan bantuan saran dan memberikan bantuan isolat khamir koleksi UICC untuk penelitian ini.
4. Dr. Arry Yanuar, M.S., selaku pembimbing akademis yang telah memberikan saran dan dukungan selama penulis menempuh masa pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI.
5. PT Kalbe Farma yang telah memberikan bahan baku manitol untuk penelitian ini.
6. PT Ditek Jaya, terutama Bapak Dian yang telah membantu secara teknis dalam menangani dan memperbaiki kerusakan pada detektor RID.

7. Mba Catur dan Mas Tri, selaku laboran Laboratorium Mikrobiologi Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan bantuan teknis berupa pengarahan dan pembelajaran selama proses penelitian.
8. Mba Lia dan Mba Wulan selaku laboran Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Kuantitatif atas bantuan, saran, dan bimbingan selama proses penelitian.
9. Seluruh laboran, karyawan, dan staf Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah membantu kelancaran dalam masa perkuliahan, penelitian, dan penulisan skripsi.
10. Kedua orang tua dan kedua kakak penulis yang telah memberikan dorongan moral, semangat, hiburan, motivasi, dan doa yang tiada hentinya selama hidup penulis, khususnya selama masa perkuliahan dan penelitian serta penulisan skripsi ini.
11. Teman-teman farmasi angkatan 2008 yang telah membuat masa perkuliahan di farmasi UI menjadi lebih mudah, indah, menyenangkan, dan penuh kebersamaan.
12. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, yang telah memberikan bantuan dan dukungan yang berharga bagi penulis.

Penulis menyadari bahwa penelitian dan penulisan skripsi ini masih banyak kekurangan dan jauh dari sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun dari semua pihak sangat penulis harapkan untuk kebermanfaatannya di masa yang akan datang. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi pembaca dan memberikan sumbangsih bagi ilmu pengetahuan.

Penulis

2012



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Khairul Basyar  
NPM : 0806315635  
Program Studi : Farmasi  
Departemen : Farmasi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

**Fermentasi Manitol Menggunakan Khamir Metilotrop Isolat Lokal dan Koleksi  
UICC**

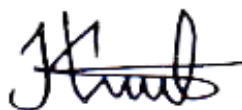
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 12 Juli 2012

Yang menyatakan



(Khairul Basyar)

## ABSTRAK

Nama : Khairul Basyar  
Program Studi : Farmasi  
Judul : Fermentasi Manitol Menggunakan Khamir Metilotrop Isolat Lokal dan Koleksi UICC

Manitol merupakan gula poliol enam karbon yang secara alami terdapat pada sayur dan buah, serta banyak digunakan dalam industri makanan, farmasi, dan kesehatan sebagai pemanis pengganti gula sehingga bermanfaat bagi pasien diabetes. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat khamir metilotrop yang mampu memfermentasi fruktosa menjadi manitol serta mendapatkan kondisi fermentasi yang optimum. Isolat khamir diperoleh dari hasil isolasi dari tanah persawahan dan dari koleksi *University of Indonesia Culture Collection* (UICC). Kondisi terbaik fermentasi manitol dioptimasi dengan cara memvariasikan waktu kultivasi, konsentrasi sumber nitrogen, konsentrasi substrat fruktosa, kondisi aerasi, dan pengaruh penambahan ion logam. Hasil skrining menunjukkan satu isolat khamir metilotrop yang diisolasi dari tanah persawahan mampu menghasilkan manitol, sedangkan khamir *Debaryomyces hansenii* UICC Y-276 memiliki kemampuan menghasilkan manitol terbaik. Kondisi optimum untuk fermentasi manitol menggunakan khamir *Debaryomyces hansenii* UICC Y-276 adalah dengan melakukan kultivasi pada hari ketiga, dengan konsentrasi amonium sulfat 0,5%, substrat fruktosa 10%, penambahan logam  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,01%, dan kondisi aerasi terbatas. Jumlah manitol terbanyak yang didapatkan adalah 13,82 g/L dari total 100 g/L substrat fruktosa.

Kata kunci : manitol, poliol, khamir, metilotrop, *Debaryomyces hansenii* UICC Y-276.  
xvi + 73 halaman : 12 tabel; 21 gambar; 8 lampiran  
Daftar pustaka : 30 (1971- 2012)

## ABSTRACT

Name : Khairul Basyar  
Study Program : Pharmacy  
Title : Mannitol Fermentation by Using Methylophilic Yeast from Local Isolate and UICC Collection.

Mannitol is a six-carbons polyol which found naturally in vegetables and fruits. It is widely used in food, pharmaceutical, and medical industries as a sweetener for sugar substitute which makes it useful for diabetic patients. This study aims to obtain methylophilic yeast that can produce mannitol from fructose and the optimum condition of the fermentation process. The yeast isolate was obtained from isolation from farm soil and collection of University of Indonesia Culture Collection (UICC). The best condition of fermentation process was optimized by varying the cultivating time, concentration of nitrogen source, concentration of substrate, aeration condition, and effect of metal addition. The screening showed that one isolate of methylophilic yeast which was isolated from farm soil has the ability to produce mannitol, while *Debaryomyces hansenii* UICC Y-276 possessed the best ability to produce mannitol. Optimum conditions for mannitol fermentation using this yeast were 3 days cultivating time, 0.5 % ammonium sulfate concentration, 10% fructose concentration, addition of 0.01%  $\text{CuSO}_{4.5}\text{H}_2\text{O}$ , and limited aeration condition. The greatest amount of mannitol obtained was 13.82 g/L from 100 g/L fructose.

Keywords : mannitol, polyol, yeast, methylophilic, *Debaryomyces hansenii* UICC Y-276.  
xvi + 73 pages : 12 tables, 21 figures; 8 appendices  
Bibliography : 30 (1971- 2012)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	ii
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME .....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
HALAMAN PENGESAHAN .....	v
KATA PENGANTAR .....	vii
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH .....	ix
ABSTRAK .....	x
ABSTRACT .....	xi
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR TABEL .....	xv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvi
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	3
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Manitol .....	4
2.1.1 Gambaran Umum Manitol.....	4
2.1.2 Produksi Manitol secara Sintesis Kimia .....	5
2.1.3 Produksi Manitol Menggunakan Mikroorganisme .....	6
2.2 Khamir Metilotrop .....	9
2.2.1 Gambaran Umum Khamir .....	9
2.2.2 Metilotrop.....	10
2.3 Isolasi Khamir Metilotrop dari Tanah .....	12
2.4 Pertumbuhan Khamir.....	13
2.4.1 Gambaran Umum Pertumbuhan Khamir.....	13
2.4.2 Kurva Pertumbuhan .....	14
2.4.3 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Khamir ..	15
2.5 Fermentasi.....	17
2.6 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	17
2.7 Detektor Indeks Bias .....	19
<b>BAB 3 METODE PENELITIAN .....</b>	<b>20</b>
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	21
3.2 Alat .....	21
3.3 Bahan .....	21
3.3.1 Sampel.....	21
3.3.2 Bahan Kimia .....	22
3.4 Prosedur Kerja.....	22
3.4.1 Sterilisasi Alat .....	22
3.4.2 Penyiapan Medium .....	22
3.4.3 Isolasi Khamir Metilotrop dari Tanah .....	24
3.4.4 Pemurnian Isolat Khamir.....	25
3.4.5 Identifikasi Makroskopik dan Mikroskopik Isolat.....	25
3.4.6 Peremajaan Isolat .....	26
3.4.7 Skrining Kemampuan Tumbuh dalam Media yang	

Mengandung Metanol .....	26
3.4.8 Penyiapan Prakultur .....	26
3.4.9 Skrining Kemampuan Fermentasi Manitol .....	27
3.4.10 Optimasi Kondisi Fermentasi .....	27
3.4.11 Penentuan Biomassa Sel secara Turbidimetri .....	28
3.4.12 Pengambilan Sampel Hasil Fermentasi .....	28
3.4.13 Analisis Kadar Hasil Fermentasi secara KCKT .....	28
<b>BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>30</b>
4.1 Isolasi Khamir Metilotrop dari Tanah .....	30
4.2 Skrining Pertumbuhan Isolat Khamir dalam Media yang Mengandung Metanol.....	32
4.3 Skrining Kemampuan Fermentasi Manitol.....	33
4.4 Optimasi Kondisi Fermentasi.....	36
4.4.1 Optimasi Waktu Kultivasi .....	36
4.4.2 Optimasi Konsentrasi Ammonium Sulfat .....	37
4.4.3 Optimasi Konsentrasi Fruktosa .....	38
4.4.4 Optimasi Pengaruh Penambahan Ion Logam .....	39
4.4.5 Optimasi Kondisi Aerasi .....	39
<b>BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>41</b>
5.1 Kesimpulan .....	41
5.2 Saran .....	41
<b>DAFTAR ACUAN .....</b>	<b>42</b>

## DAFTAR GAMBAR

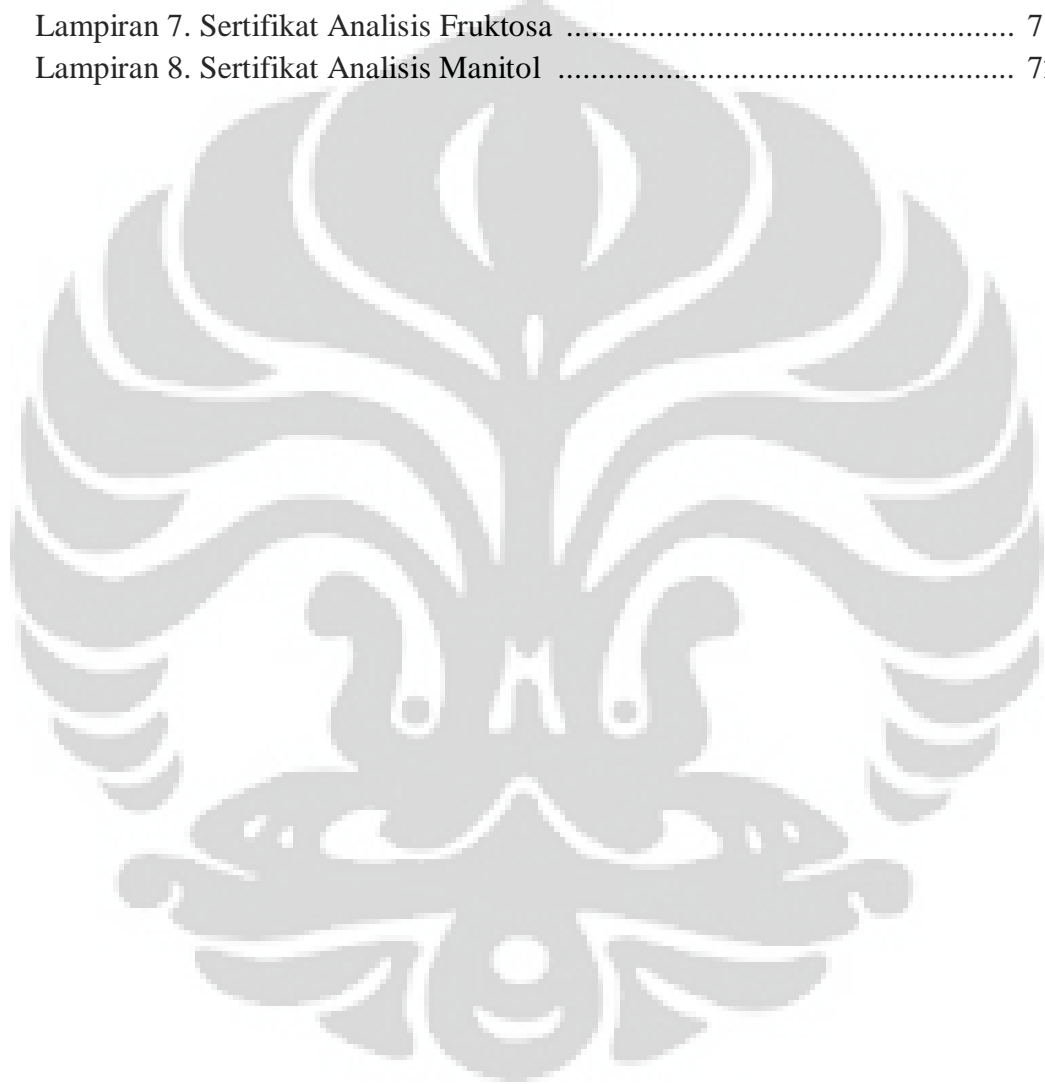
Gambar 2.1 Perbedaan struktur sorbitol dan manitol.....	5
Gambar 2.2 Metabolisme glukosa dan pembentukan manitol pada bakteri asam laktat heterofermentatif .....	7
Gambar 2.3 Metabolisme glukosa dan fruktosa (1:2) pada bakteri asam laktat heterofermentatif .....	8
Gambar 2.4 Pembentukan manitol pada fungi. ....	9
Gambar 2.5 Jalur Metabolisme metanol pada khamir metilotrop .....	11
Gambar 2.6 Kurva Pertumbuhan Fungi .....	15
Gambar 3.1 Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) .....	45
Gambar 4.1 Koloni isolat khamir hasil isolasi pada cawan petri .....	46
Gambar 4.2 Koloni isolat khamir hasil isolasi pada media agar miring .....	46
Gambar 4.3 Koloni khamir isolat A (kuning muda) pada cawan petri .....	47
Gambar 4.4 Koloni khamir isolat B (putih krem) pada cawan petri .....	47
Gambar 4.5 Koloni khamir isolat C (kuning mengkilat) pada cawan petri .....	47
Gambar 4.6 Mikroskopik isolat khamir hasil isolasi dengan perbesaran 100x.....	48
Gambar 4.7 Biakan khamir <i>Debaryomyces hansenii</i> UICC Y-276, <i>Debaryomyces nepalensis</i> UICC Y-328, dan <i>Candida sp.</i> UICC Y-216 pada media agar miring .....	48
Gambar 4.8 Koloni khamir <i>Debaryomyces hansenii</i> UICC Y-276 secara makroskopik pada cawan petri dan secara mikroskopik dengan perbesaran 100x.....	49
Gambar 4.9 Proses fermentasi dengan penggojokan menggunakan <i>shaker</i> dengan kecepatan 175 rpm pada suhu kamar.....	49
Gambar 4.10 Kurva kalibrasi standar fruktosa.....	50
Gambar 4.11 Kurva kalibrasi standar manitol.....	50
Gambar 4.12 Kromatogram standar fruktosa 10.000 ppm.....	51
Gambar 4.13 Kromatogram standar manitol 10.000 ppm.....	52
Gambar 4.14 Kromatogram campuran standar fruktosa dan manitol 10.000 ppm ...	53
Gambar 4.15 Kromatogram fruktosa dan manitol dalam sampel fermentasi pada media fermentasi yang mengandung amonium sulfat 0,5% .....	54

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Hasil Pengukuran Kurva Kalibrasi Standar Fruktosa .....	55
Tabel 4.2	Hasil Pengukuran Kurva Kalibrasi Manitol.....	56
Tabel 4.3	Data Hasil Uji Perolehan Kembali Standar Fruktosa dan Manitol.....	57
Tabel 4.4	Data Hasil Uji Presisi Standar Fruktosa dan Manitol.....	58
Tabel 4.5	Hasil Skrining Pertumbuhan Isolat Khamir dalam Media yang Mengandung Metanol.....	59
Tabel 4.6	Hasil Skrining Kemampuan Fermentasi Manitol dari Masing-masing Isolat Khamir .....	60
Tabel 4.7	Hasil Penentuan Bobot Sel Kering .....	61
Tabel 4.8	Hasil Optimasi Waktu Kultivasi Fermentasi.....	62
Tabel 4.9	Hasil Optimasi Konsentrasi Amonium Sulfat dalam Media Fermentasi	62
Tabel 4.10	Hasil Optimasi Konsentrasi Substrat Fruktosa.....	63
Tabel 4.11	Hasil Optimasi Pengaruh Ion Logam .....	63
Tabel 4.12	Hasil Optimasi Kondisi Aerasi.....	64

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Cara Memperoleh Resolusi .....	65
Lampiran 2. Cara Memperoleh Persamaan Regresi Linier .....	66
Lampiran 3. Cara Perhitungan Uji Perolehan Kembali .....	67
Lampiran 4. Cara Perhitungan Koefisien Variasi .....	68
Lampiran 5. Cara Penentuan Biomassa Sel dan <i>Yield Value</i> Manitol .....	69
Lampiran 6. Skema Kerja Penelitian .....	70
Lampiran 7. Sertifikat Analisis Fruktosa .....	71
Lampiran 8. Sertifikat Analisis Manitol .....	72





# BAB 1

## PENDAHULUAN

### I.1 Latar Belakang

Manitol merupakan salah satu gula poliol dengan enam atom karbon yang banyak terdapat secara alami pada berbagai bahan alam. Manitol memiliki berbagai sifat yang menguntungkan sehingga digunakan secara luas dalam industri makanan, farmasi, dan kesehatan. Manitol banyak digunakan sebagai pemanis pada makanan karena bersifat non toksik, non higroskopik, dan tidak menimbulkan kerusakan pada gigi. Rasanya manis, setengah dari rasa manis sukrosa, dan memberikan rasa dingin. Di dalam tubuh, manitol hanya termetabolisme sebagian dan tidak menyebabkan hiperglikemia, sehingga bermanfaat bagi pasien diabetes. Manitol juga memiliki efek diuretik, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai obat diuretik (Wisselink, 2004).

Selama ini, manitol diproduksi secara komersial di industri dengan metode kimiawi hidrogenasi. Produksi manitol di industri adalah dengan hidrogenasi tekanan tinggi dari campuran fruktosa/glukosa dalam larutan berair pada suhu tinggi (120-160°C) dengan menggunakan Raney nikel sebagai katalis. Pada proses ini,  $\alpha$ -fruktosa dikonversi menjadi sorbitol dan  $\beta$ -fruktosa dikonversi menjadi manitol, sedangkan glukosa secara eksklusif dikonversi menjadi sorbitol (Saha dan Racine, 2011). Namun, produksi manitol dengan proses hidrogenasi kimia ini memiliki beberapa keterbatasan, di antaranya membutuhkan substrat dengan kemurnian yang tinggi, membutuhkan suhu dan tekanan reaksi yang tinggi, dan tahap pemurniannya cukup mahal, serta hasil manitol yang didapatkan kurang baik dengan *yield value* yang rendah. Pada proses ini, manitol hanya merupakan produk sampingan dari reaksi yang sebagian besar menghasilkan sorbitol (Seung dan Vieile, 2009).

Oleh karena itu, perlu dikembangkan metode lain yang lebih baik untuk memproduksi manitol. Fermentasi menggunakan mikroorganisme menjadi suatu alternatif untuk memproduksi manitol. Berbagai mikroorganisme telah dimanfaatkan dalam penelitian untuk menghasilkan manitol, di antaranya berbagai spesies bakteri asam laktat, khamir *Candida*, khamir *Torulopsis*, fungi

*Aspergillus candidus*, dan fungi *Penicillium scabrosum* (Saha dan Racine, 2011). Proses fermentasi memiliki beberapa keuntungan dibandingkan dengan sistesis kimiawi, yaitu konversi sempurna fruktosa menjadi manitol, tidak dihasilkan produk samping (seperti sorbitol) yang sulit untuk dihilangkan, kondisi produksi yang moderat, dan tidak membutuhkan susbtrat dengan kemurnian tinggi (Wisselink, 2004).

Salah satu jenis mikroorganisme yang dapat menjadi alternatif untuk memproduksi manitol adalah khamir metilotrop. Khamir metilotrop merupakan golongan khamir yang mampu memetabolisme senyawa monokarbon seperti metanol dan formaldehid (Negruta, 2010). Di antara khamir yang dikumpulkan sebagai khamir metilotrop adalah sejumlah spesies khamir yang termasuk ke dalam genus *Candida*, *Torulopsis*, *Pichia*, dan *Hansenula*. Khamir tersebut memiliki jalur metabolisme spesifik yang menyebabkan mereka mampu menggunakan metanol sebagai sumber karbon satu-satunya (Kavanagh, 2005). Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa jenis khamir yang mengkonsumsi metanol sebagai sumber karbon dapat digunakan untuk menghasilkan gula poliol, seperti xilitol dari xilosa (Suryadi *et al.*, 2000). Penelitian yang dilakukan oleh Song Kyung Hwa *et al.* juga telah membuktikan bahwa khamir *Candida magnoliae* dapat digunakan untuk menghasilkan manitol dengan *yield value* yang cukup tinggi, yaitu sebesar 83%. Khamir jenis ini juga mampu menghasilkan manitol dengan produk samping seperti gliserol, eritritol, dan asam organik dengan kadar yang kecil, sehingga potensial untuk digunakan memproduksi manitol dalam skala industri (Song Kyung Hwa *et al.*, 2002).

Pada penelitian kali ini, peneliti mencoba melakukan penelitian untuk mendapatkan manitol dari hasil fermentasi fruktosa menggunakan isolat khamir metilotrop yang diisolasi dari tanah persawahan, serta beberapa spesies khamir koleksi *University of Indonesia Culture Collection* (UICC). Peneliti juga berusaha untuk mendapatkan kondisi fermentasi manitol yang paling optimal, sehingga diharapkan dapat menghasilkan manitol dengan nilai produktivitas (*yield value*) yang tinggi dan proses yang lebih efisien.

### 1.2 Tujuan Penelitian

1. Mendapatkan isolat khamir metilotrop terpilih yang mampu menghasilkan manitol dari hasil fermentasi fruktosa.
2. Memperoleh kondisi optimum fermentasi manitol dengan menggunakan isolat khamir metilotrop.



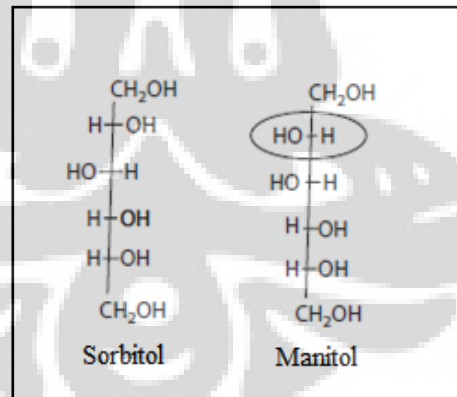
## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Manitol

##### 2.1.1 Gambaran Umum Manitol

Manitol merupakan gula poliol enam karbon yang paling banyak terdapat di alam. Manitol secara alami terdapat pada bunga dan daun manna, buah zaitun, dan alga (Wisselink, 2004). Manitol dan sorbitol sama-sama mempunyai enam gugus hidroksil, dengan rumus molekul  $C_6H_{14}O_6$ . Keduanya merupakan isomer, namun memiliki perbedaan konfigurasi molekular. Perbedaan antara manitol dan sorbitol terdapat pada orientasi planar dari gugus  $-OH$  pada atom C nomor 2. Perbedaan ini mempunyai pengaruh yang besar dan menyebabkan sifat dan karakteristik yang tersendiri pada masing-masing isomer. Perbedaan sifat utama antara kedua isomer ini adalah sorbitol bersifat higroskopik, sedangkan manitol bersifat nonhigroskopik. Oleh sebab itu, sorbitol digunakan sebagai humektan karena afinitasnya terhadap kelembaban dan manitol digunakan sebagai eksipien tablet karena bersifat inert dan stabil terhadap kelembaban (Jamieson, 2012). Struktur manitol dan sorbitol dapat dilihat pada Gambar 2.1.



[Sumber : Jamieson, 2012, telah diolah kembali]

**Gambar 2.1**Perbedaan struktur sorbitol dan manitol

Pemerian manitol berupa serbuk hablur atau granul mengalir bebas, tidak berbau, dan memiliki rasa manis. Manitol mudah larut dalam air, larut dalam larutan basa, sukar larut dalam piridin, sangat sukar larut dalam etanol, dan praktis

tidak larut dalam eter. Manitol memiliki jarak lebur antara  $165^{\circ}$  dan  $169^{\circ}\text{C}$  dan rotasi jenis antara  $+137^{\circ}$  dan  $+145^{\circ}$  (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995).

Manitol memiliki berbagai sifat yang menguntungkan sehingga digunakan secara luas dalam industri makanan, farmasi, dan kesehatan. Manitol banyak digunakan sebagai pemanis pada makanan karena bersifat non toksik, non higroskopik, dan tidak menimbulkan kerusakan pada gigi. Rasanya manis, setengah dari rasa manis sukrosa, dan memberikan rasa dingin. Manitol hanya termetabolisme sebagian dan tidak menyebabkan hiperglikemia, sehingga bermanfaat bagi pasien diabetes. Manitol juga memiliki efek diuretik, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai obat diuretik (Wisselink, 2004).

### 2.1.2 Produksi Manitol secara Sintesis Kimia

Manitol dapat dihasilkan dengan hidrogenasi dari mannosa, suatu komponen dari mannan dan hemiselulosa, tetapi di dalam industri diproduksi melalui hidrogenasi dari fruktosa. Fruktosa didapatkan dari proses isomerisasi glukosa atau melalui hidrolisis sukrosa. Apabila fruktosa dihidrogenasi, maka akan didapatkan suatu campuran 50 : 50 dari sorbitol dan manitol. Manitol sedikit kurang larut dibandingkan sorbitol, dan dipisahkan dengan kristalisasi diferensial (Bornet, 1994). Proses hidrogenasi ini dilakukan pada tekanan tinggi dari campuran fruktosa/glukosa dalam larutan berair pada suhu tinggi ( $120\text{-}160^{\circ}\text{C}$ ) dengan menggunakan Raney nikel sebagai katalis. Pada proses ini,  $\alpha$ -fruktosa dikonversi menjadi sorbitol dan  $\beta$ -fruktosa dikonversi menjadi manitol, sedangkan glukosa secara eksklusif dikonversi menjadi sorbitol (Saha dan Racine, 2011).

Hidrogenasi katalitik dari gula akan mengubah gugus aldehid menjadi gugus alkohol primer dan gugus keton menjadi gugus alkohol sekunder. Proses hidrogenasi dapat meluruskan struktur kimia dari gula, meningkatkan kestabilan kimia, dan memodifikasi sifat fungsional dan fisikokimianya. Hidrogenasi dari gula juga dapat mengurangi bioavailabilitasnya dalam saluran cerna bagian atas dan mengubahnya menjadi gula yang sebagian tidak tercerna (Bornet, 1994).

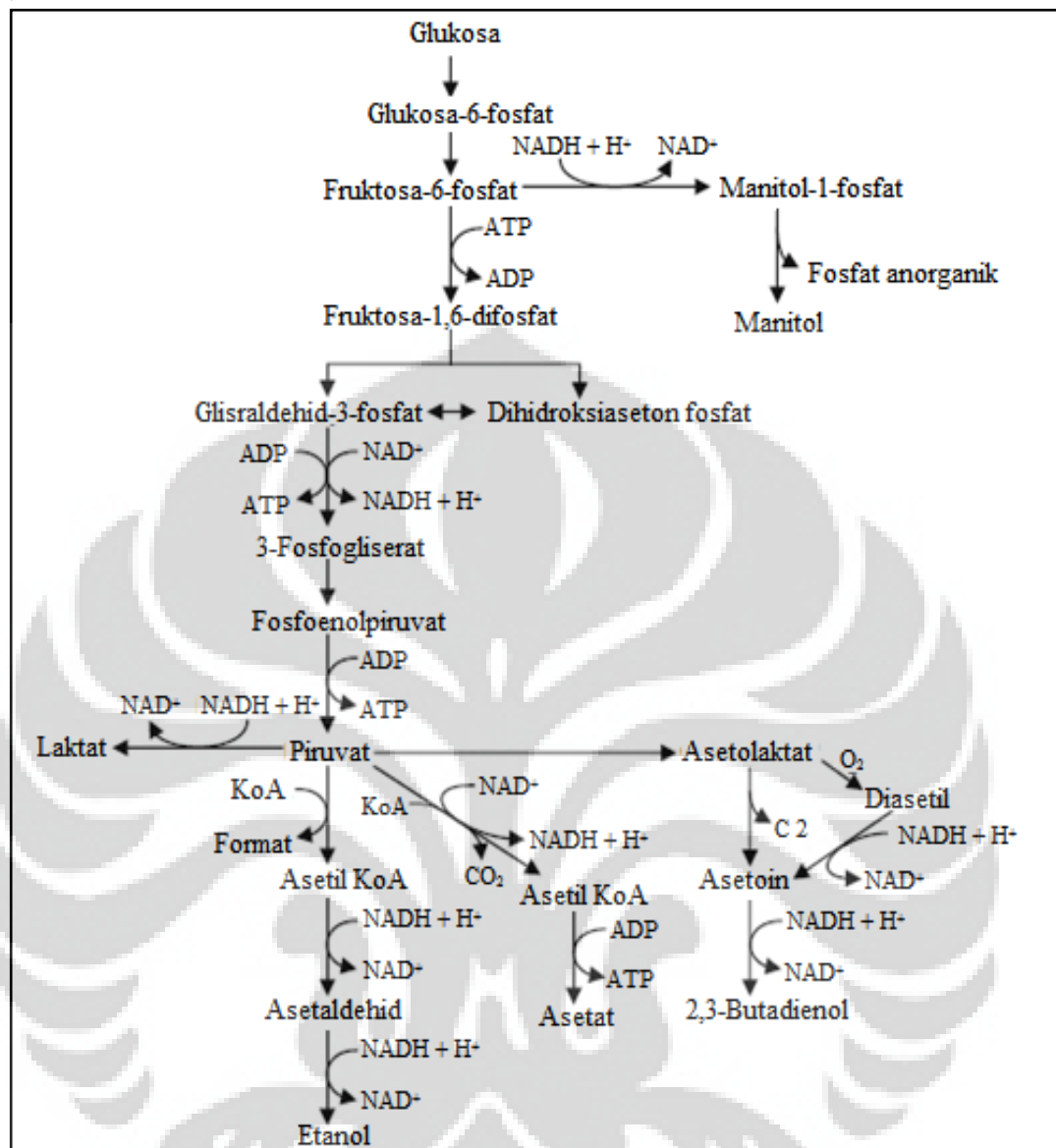
Namun, produksi manitol dengan proses hidrogenasi kimia memiliki beberapa keterbatasan, di antaranya membutuhkan substrat dengan kemurnian

tinggi, membutuhkan suhu dan tekanan reaksi yang tinggi, dan tahap pemurniannya cukup mahal, serta hasil manitol yang didapatkan memiliki *yield value* yang rendah. Pada proses ini, manitol hanya merupakan produk sampingan dari reaksi yang sebagian besar menghasilkan sorbitol (Seung dan Vieille, 2009).

### 2.1.3 Produksi Manitol Menggunakan Mikroorganisme

Berbagai mikroorganisme telah dimanfaatkan untuk menghasilkan manitol melalui proses fermentasi, di antaranya berbagai spesies bakteri asam laktat, khamir *Candida sp.*, khamir *Torulopsis sp.*, fungi *Aspergillus candidus*, dan fungi *Penicillium scabrosum* (Saha dan Racine, 2011). Bakteri asam laktat menghasilkan manitol melalui dua cara. Cara pertama, yaitu dengan mereduksi fruktosa secara langsung menjadi manitol oleh enzim manitol dehidrogenase terkait NAD(P)H. Cara lainnya adalah dengan pembentukan fruktosa-6-fosfat dari fruktosa oleh fruktokinase dan reduksi menjadi manitol-1-fosfat oleh enzim manitol-1-fosfat dehidrogenase terkait NAD(P)H. Manitol-1-fosfat kemudian mengalami defosforilasi menjadi manitol dan fosfat anorganik oleh enzim manitol-1-fosfatase. Proses pertama terjadi pada bakteri asam laktat heterofermentatif, sedangkan proses kedua terjadi pada bakteri asam laktat homofermentatif (Wisselink, 2004). Proses pembentukan manitol pada bakteri asam laktat homofermentatif dan heterofermentatif dapat dilihat pada Gambar 2.2 dan Gambar 2.3.

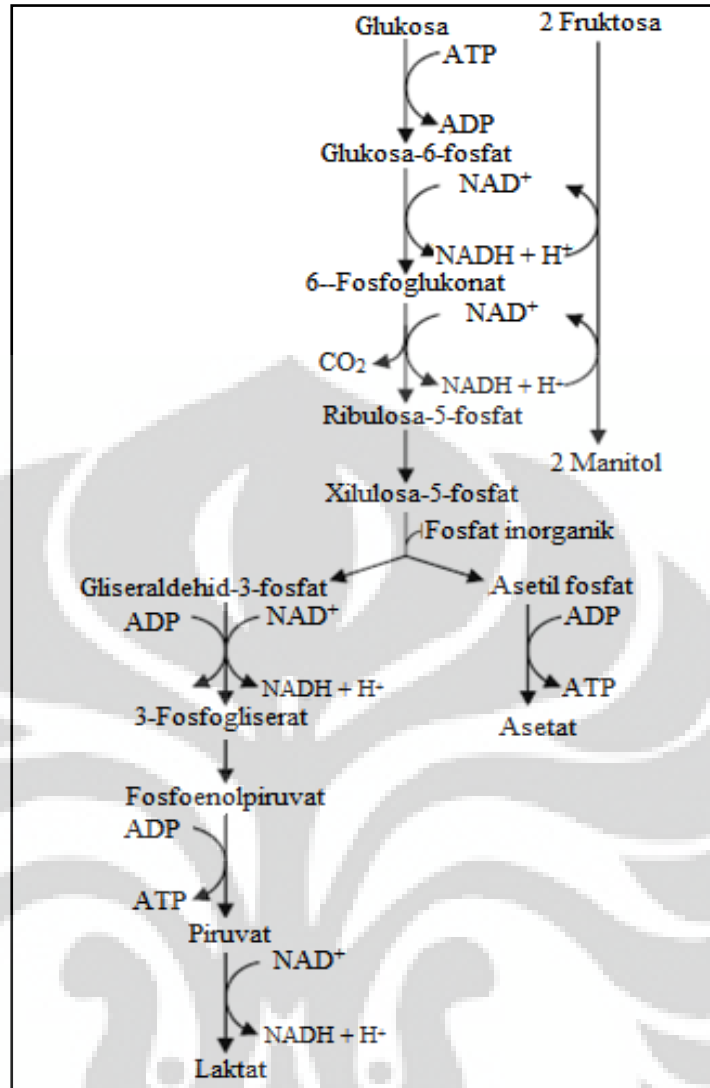
Pada fungi, telah diketahui ada 2 jalur metabolisme manitol. Pada *Agaricus bisporus*, jamur *Shiitake*, dan *Dendryphiella salina*, fruktosa dihasilkan dari fruktosa-6-fosfat, kemudian manitol disintesis dengan reduksi langsung dari fruktosa oleh manitol-2-dehidrogenase. Akumulasi manitol didegradasi melalui jalur yang sama dengan arah berlawanan sehingga menghasilkan fruktosa-6-fosfat oleh manitol-2-dehidrogenase dan heksokinase. Pada *D. salina* jalur alternatif manitol disebut siklus manitol, yaitu manitol disintesis dari fruktosa-6-fosfat melalui manitol-1-fosfat oleh manitol-1-fosfat dehidrogenase dan manitol-1-fosfatase. Ketika didegradasi, manitol didekomposisi menjadi fruktosa-6-fosfat melalui fruktosa oleh manitol-2-dehidrogenase dan heksokinase. Pembentukan manitol pada fungi dapat dilihat pada Gambar 2.4.



[Sumber : Saha, 2011, telah diolah kembali]

**Gambar 2.2** Metabolisme glukosa dan pembentukan manitol pada bakteri asam laktat homofermentatif



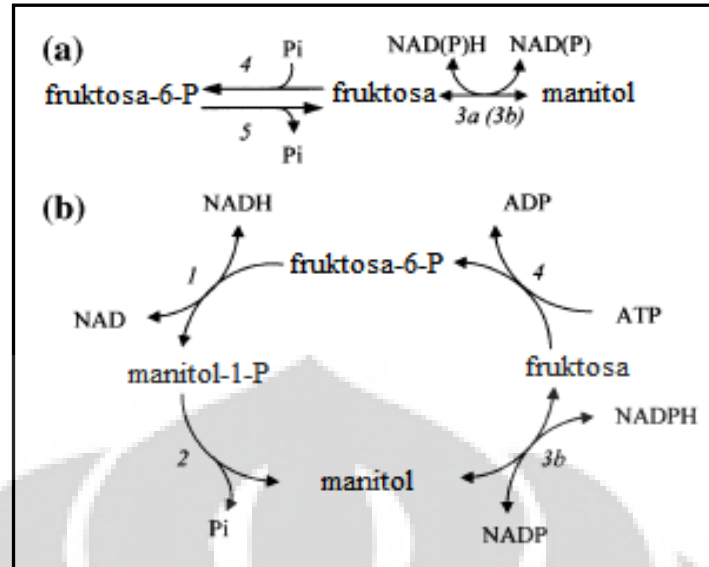


[Sumber : Saha, 2011, telah diolah kembali]

**Gambar 2.3** Metabolisme glukosa dan fruktosa (1:2) pada bakteri asam laktat heterofermentatif.

Sejumlah bakteri asam laktat heterofermentatif dari genus *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, dan *Oenococcus* mampu memproduksi manitol secara langsung dari fruktosa. Selain manitol, bakteri jenis ini juga menghasilkan asam laktat, asam asetat, karbon dioksida, dan etanol (Saha dan Racine, 2011). Pada bakteri asam laktat heterofermentatif, manitol dihasilkan langsung dari fruktosa, bukan dari fruktosa-6-fosfat. Reduksi fruktosa menjadi manitol dikatalisis oleh enzim manitol dehidrogenase terkait NADH, yang secara eksklusif mereduksi fruktosa menjadi manitol (Seung dan Vieille, 2009).





[Sumber :Koji Iwamoto dan Yoshihiro Shiraiwa, 2005, telah diolah kembali]

Keterangan :

1= manitol-1-fosfatdehidrogenase (M1PDH), 2= manitol-1-fosfatase (M1Pase),  
 3a= manitol-2-dehidrogenase (M2DH), 3b= manitol-2-dehidrogenase terkait  
 NADP, 4= heksokinase, 5 =fruktosafosfatase.

**Gambar 2.4** Pembentukan manitol pada fungi

## 2.2 Khamir Metilotrop

### 2.2.1 Gambaran Umum Khamir

Khamir (*yeast*) adalah fungi uniseluler yang menempati habitat cair dan lembab, yang terutama bereproduksi secara aseksual dengan pembelahan sel sederhana atau dengan pemisahan dari sel induk. Beberapa khamir bereproduksi secara seksual dengan cara membentuk aski atau basidia, dan dikelompokkan ke dalam Askomikota atau Basidiomikota (Campbell, Reece, dan Mitchel, 2003). Pada proses pertunasan (*budding*), tumbuh sebuah sel baru yang kecil dari sel yang tua (induk), kemudian tumbuh membesar dan memisahkan diri dari sel induk. Sel khamir secara khas berukuran lebih besar daripada sel bakteri dan dapat dibedakan dengan jelas secara mikroskopik dengan sel bakteri melalui ukurannya yang lebih besar dan keberadaan organel sel internal, seperti nukleus dan vakuola sitoplasmik yang terlihat dengan jelas. Khamir tumbuh dengan baik pada habitat yang mengandung gula, seperti buah, bunga, dan kulit batang pohon (Madigan, Martinko, Stahl, dan Clark, 2011). Bentuk sel khamir dapat berupa sferis, elips,

atau oval, dan biasanya tidak membentuk hifa (fungi berfilamen) dengan ukuran 5-10 kali lebih besar dari sel bakteri (Harley dan Prescott, 2002). Ukuran khamir secara individual bervariasi dengan panjang 2-3  $\mu\text{m}$  sampai 20-50  $\mu\text{m}$  dan lebar 1-10  $\mu\text{m}$ . *S.cerevisiae*, khamir yang paling terkenal, memiliki bentuk elips dengan diameter besar 5-10  $\mu\text{m}$  dan diameter kecil 1-7  $\mu\text{m}$  (Kavanagh, 2005).

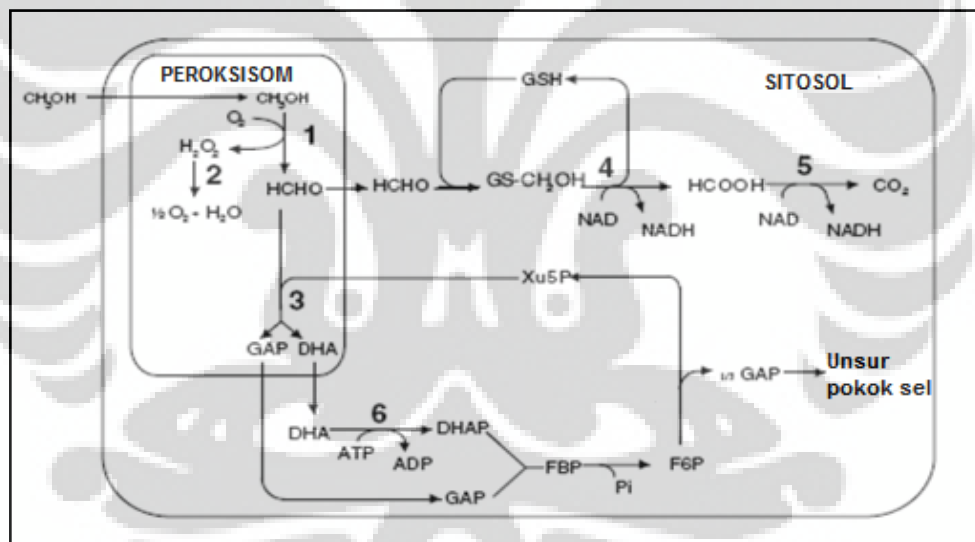
### 2.2.2 Metilotrop

Khamir metilotrop merupakan golongan khamir yang mampu memetabolisme senyawa monokarbon seperti metanol dan formaldehid. Khamir ini umum ditemukan di alam, khususnya pada buah dan sayuran, getah pohon, dan kulit kayu. Penjelasan yang mungkin mengenai keberadaan khamir metilotrop pada habitat seperti ini adalah karena metanol dapat terbentuk dari rantai metoksi yang terdapat pada lignin kayu (Negruta, 2010). Di antara khamir yang dikumpulkan sebagai khamir metilotrop adalah sejumlah spesies khamir yang termasuk ke dalam genus *Candida*, *Torulopsis*, *Pichia*, dan *Hansenula*. Khamir tersebut memiliki jalur metabolisme spesifik yang menyebabkan mereka mampu menggunakan metanol sebagai sumber karbon satu-satunya (Kavanagh, 2005).

Keberadaan peroksisom (diinduksi oleh adanya metanol dalam medium), yang mengandung enzim untuk memetabolisme metanol seperti alkohol oksidase (AOX), dihidroksiaseton sintase (DHAS) dan katalase (CAT), merupakan ciri penting dari khamir metilotrop. Enzim yang pertama terlibat dalam metabolisme metanol pada khamir metilotrop adalah enzim alkohol oksidase (AOX), yang secara khusus terdapat di peroksisom. Enzim alkohol oksidase mengoksidasi metanol menjadi formaldehid dan hidrogen peroksida. Sebagai enzim kunci dalam penggunaan metanol, enzim AOX terdapat di semua jenis khamir metilotrop (Negruta, 2010).

Semua khamir metilotrop menggunakan suatu jalur metabolisme metanol yang umum. Gambaran mengenai metabolisme pada khamir metilotrop dapat dilihat pada Gambar 2.4. Metanol pertama kali dioksidasi oleh enzim alkohol oksidase membentuk formaldehid dan hidrogen peroksida, yang keduanya merupakan senyawa toksik. Formaldehid berada pada pertengahan cabang jalur asimilasi dan disimilasi. Sebagian formaldehid terikat dengan xilulosa-5-fosfat

(Xu5P) oleh dihidroksiaseton sintase (DAS) membentuk dihidroksi aseton (DHA) dan gliseraldehid-3-fosfat (GAP), yang digunakan untuk sintesis komponen pokok sel dan regenerasi Xu5P. Alkohol oksidase dan dihidroksiaseton sintase berada dalam peroksisom bersama dengan katalase, yang menguraikan hidrogen peroksida. DHA dan GAP selanjutnya diasimilasi di dalam sitosol. DHA mengalami fosforilasi oleh dihidroksiaseton kinase (DHAK) membentuk dihidroksiaseton fosfat (DHAP). Selanjutnya DHAP dan GAP membentuk fruktosa-1,6-bisfosfat yang digunakan untuk meregenerasi Xu5P dan untuk sintesis komponen pokok sel. Sebagian lain dari formaldehid dioksidasi lebih lanjut menjadi CO<sub>2</sub> melalui jalur disimilasi sitosol. Formaldehid dehidrogenase mengoksidasi formaldehid menjadi format. Enzim format dehidrogenase terkait NAD<sup>+</sup> merupakan enzim terakhir yang terlibat dalam jalur metabolisme metanol dan menghasilkan CO<sub>2</sub> dan NADH dari hasil oksidasi format (Hiroya Y., Masahide O., dan Yasuyoshi S., 2011).



[Sumber : Negruta, 2010, telah diolah kembali]

**1** = alkohol oksidase, **2** = katalase, **3** = dihidroksiaseton sintase, **4** = formaldehid dehidrogenase, **5** = format dehidrogenase, **6** = dihidroksiaseton kinase, **GSH** = Glutation, **Xu5P** = Xilulosa-5-fosfat, **DHA** = Dihidroksi aseton, **FBP** = Fruktosa-1,6-bisfosfatase.

**Gambar 2.5** Jalur metabolisme metanol pada khamir metilotrop

### 2.3 Isolasi Khamir Metilotrop dari Tanah

Apabila hendak mengisolasi khamir dari tanah, maka sebaiknya sampel tanah diambil dari kedalaman 2-10 cm. Keberadaan khamir umumnya semakin kecil bahkan tidak ada pada kedalaman 30 cm. Sampel tanah dapat langsung disebarakan secara aseptis menggunakan spatula steril ke atas medium *Yeast Malt Agar* (YMA) dalam cawan petri, kemudian diinkubasi pada suhu 28°C atau suhu ruang selama 2-3 hari. Sampel tanah dapat pula diencerkan menggunakan akuades steril atau garam fisiologis, sehingga koloni yang diperoleh dapat dihitung dengan metode *colony forming unit* (CFU). Sampel tanah dapat juga dimasukkan ke dalam medium *Yeast Malt Broth* (YMB) dalam labu erlenmeyer, kemudian diinkubasi seperti cara sebelumnya. Khamir yang tumbuh dalam YMB dapat langsung diisolasi menggunakan jarum ose yang digoreskan pada medium YMA dalam cawan petri dan diinkubasi seperti sebelumnya. Isolasi dapat pula dilakukan dengan cara pengenceran dari medium YMB yang telah ditumbuhi khamir menggunakan akuades steril atau larutan fisiologis. Untuk menghindari atau mengurangi pertumbuhan bakteri pada medium isolasi dapat ditambahkan antibiotika tetrasiklin sebanyak 250-500 mg per liter medium atau 50-500 mg kloramfenikol per liter medium. Penambahan antibiotika dilakukan setelah medium disterilisasi, yaitu saat medium bersuhu sekitar 45°C (Gandjar, Sjamsuridzal, dan Oetari, 2006).

Isolasi khamir metilotrop dari tanah dapat dilakukan dengan menggunakan teknik pengkayaan dengan media yang mengandung metanol sebagai sumber karbon. Pada penelitian yang dilakukan oleh Asthana dkk (1971) untuk mengisolasi khamir yang mampu menggunakan metanol dari tanah digunakan medium dengan komposisi sebagai berikut :

metanol	1 ml
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,35 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3 g
Ekstrak khamir	0,01 g
Tetrasiklin	10,0 ug

Aquadest ad 100 ml

pH diatur hingga 4,5 (Asthana, Humphrey, dan Moritz, 1971).

Metode isolasi yang umum digunakan untuk memperoleh biakan murni adalah penanaman di atas media agar menurut metode lempeng gores (*streak plate method*). Sengkelit inokulasi digunakan untuk membuat goresan di atas media dengan sedemikian rupa sehingga setelah diinkubasi akan menghasilkan pertumbuhan koloni yang terpisah-pisah. Koloni yang terpisah tersebut dipindahkan ke dalam media baru sehingga diperoleh biakan murni yang hanya terdiri dari satu jenis mikroorganisme (Radji, 2011).

## 2.4 Pertumbuhan Khamir

### 2.4.1 Gambaran Umum Pertumbuhan Khamir

Definisi pertumbuhan dalam mikrobiologi adalah pertambahan volume sel karena adanya pertambahan protoplasma dan senyawa asam nukleat yang melibatkan sintesis DNA dan pembelahan mitosis. Pertambahan volume sel tersebut bersifat irreversibel, artinya tidak dapat kembali ke volume semula. Pertumbuhan khamir hingga tampak sebagai suatu koloni disebabkan oleh pembagian sel-sel khamir menjadi sejumlah anak sel. Koloni tersebut terbentuk karena pertambahan populasi dan sebenarnya merupakan suatu proses reproduksi (Gandjar, Sjamsuridzal, dan Oetari, 2006).

Penampakan pertumbuhan khamir berbeda dengan kapang. Umumnya fenomena yang terlihat mirip sekali dengan pertumbuhan bakteri. Berikut adalah cara mempelajari pertumbuhan khamir pada laboratorium :

- a. Khamir yang diinokulasi pada medium cair tanpa digoyang  
Medium dalam labu erlenmeyer yang sudah diinokulasi dengan suspensi khamir akan menunjukkan pertumbuhan khamir berupa kekeruhan medium yang semakin lama akan mengendap sebagai lapisan putih pada dasar labu. Lapisan putih tersebut adalah massa sel khamir. Pemisahan massa khamir dari medium harus melalui perlakuan sentrifugasi, baru kemudian dapat diukur pertumbuhannya dengan menentukan berat kering massa sel. Apabila tanpa sentrifugasi, kekeruhan medium diukur dengan spektrofotometer.
- b. Khamir yang diinokulasi pada medium cair dengan digoyang

Labu erlenmeyer yang berisi medium yang sudah diinokulasi dengan suspensi khamir ditempatkan pada alat pengocok. Adanya pertumbuhan dapat dilihat berupa kekeruhan medium yang semakin lama semakin keruh dibandingkan keadaan medium pada awal. Pertumbuhan dapat diukur dengan menentukan *Optical Density* dari mediumnya menggunakan spektrofotometer atau dapat juga dengan menentukan berat sel kering apabila massa selnya banyak sekali.

- c. Khamir yang diinokulasi pada medium padat tanpa penggoyangan  
Adanya pertumbuhan pada substrat dapat dilihat karena timbul bercak-bercak licin yang agak basah, yaitu koloni-koloni khamir.
- d. Khamir yang diinokulasi pada medium padat dengan wadah yang digoyang  
Dengan cara ini akan menunjukkan pertumbuhan koloni di permukaan substrat yang berlendir dan basah. Perlakuan khamir dengan cara ini tidak lazim dilakukan (Gandjar, Sjamsuridzal, dan Oetari, 2006).

#### 2.4.2 Kurva Pertumbuhan

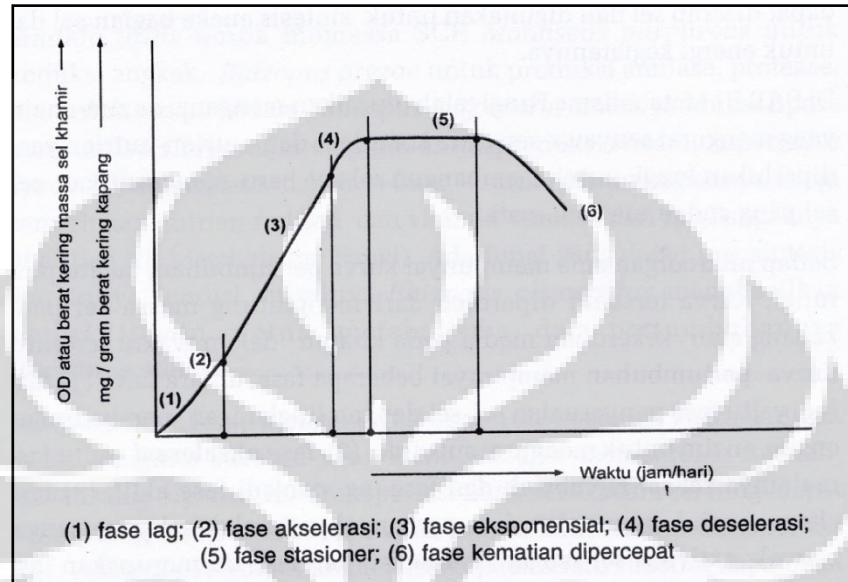
Pertumbuhan pada fungi dapat digambarkan melalui suatu kurva pertumbuhan. Kurva tersebut diperoleh dari menghitung massa sel pada kapang atau kekeruhan media pada khamir dalam waktu tertentu. Kurva pertumbuhan fungi (Gambar 2.5) memiliki beberapa fase, antara lain :

- a. **fase lag**, yaitu fase penyesuaian sel-sel dengan lingkungan, pembentukan enzim-enzim untuk mengurai substrat.
- b. **fase akselerasi**, yaitu fase mulainya sel-sel membelah dan fase lag menjadi fase aktif.
- c. **fase eksponensial**, merupakan fase perbanyak jumlah sel yang sangat banyak, aktivitas sel meningkat, dan fase ini merupakan fase yang penting dalam kehidupan fungi. Pada awal fase ini kita dapat memanen enzim-enzim.
- d. **fase deselerasi**, merupakan akhir dari fase eksponensial, yaitu waktu sel-sel mulai kurang aktif membelah. Pada fase ini, dapat dipanen biomassa sel atau senyawa-senyawa yang tidak diperlukan lagi oleh sel
- e. **fase stasioner**, yaitu fase ketika jumlah sel yang bertambah dan jumlah sel yang mati relatif seimbang. Kurva pada fase ini merupakan garis lurus yang



horizontal. Banyak senyawa metabolit sekunder dapat dipanen pada fase stasioner.

- f. **fase kematian dipercepat**, yaitu ketika jumlah sel-sel yang mati atau tidak aktif sama sekali lebih banyak daripada sel-sel yang masih hidup (Gandjar, Sjamsuridzal, dan Oetari, 2006).



[Sumber : Gandjar, Sjamsuridzal, dan Oetari, 2006]

**Gambar 2.6** Kurva Pertumbuhan Fungi

#### 2.4.3 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Khamir

Pertumbuhan khamir pada lingkungan maupun medium pertumbuhan dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain :

a. **Nutrien**

Khamir membutuhkan sumber karbon, nitrogen, garam mineral, dan vitamin tertentu untuk pertumbuhan. Sumber karbon dan energi yang paling utama adalah karbohidrat, umumnya berupa gula seperti heksosa dan oligosakarida. Glukosa dan sejumlah gula sederhana lain dapat digunakan oleh khamir secara fermentatif ataupun oksidatif. Khamir dapat menggunakan sumber nitrogen anorganik, seperti garam amonium dan garam nitrat. Asam amino, urea, dan sumber nitrogen organik lainnya dapat digunakan oleh sejumlah spesies. Tidak semua khamir membutuhkan vitamin eksternal, namun beberapa khamir membutuhkan biotin, tiamin, asam nikotinat, dan vitamin

lainnya. Garam-garam fosfat dan sulfat juga dibutuhkan untuk pertumbuhan khamir. Sejumlah senyawa anorganik seperti potasium, magnesium, besi, dan zink dibutuhkan dalam konsentrasi rendah (Deak, 2006).

b. Suhu

Batas rentang suhu untuk pertumbuhan khamir cukup bervariasi antar spesies. Kebanyakan khamir bersifat mesofilik, dan tumbuh paling baik pada suhu berkisar antara 20-30°C. Khamir seperti *Leucosporidium scottii* dan *Mrakia frigida* dapat dianggap bersifat psikrofilik yang memiliki suhu minimum untuk tumbuh antara 1-4°C. Pada suhu 37°C, hanya sedikit spesies khamir yang dapat tumbuh baik, kebanyakan adalah khamir yang berhubungan dengan hewan berdarah panas, seperti *Candida albicans* dan sejumlah khamir patogen oportunistik lainnya. Khamir *Kluyveromyces marxianus* bersifat termofilik dan dapat tumbuh sampai pada suhu 45-47°C, bahkan beberapa strain ditemukan sebagai termotoleran yang mampu tumbuh pada suhu 52°C. Suhu di atas 50°C bersifat letal bagi khamir, namun spora seksualnya dapat tahan pada suhu lebih tinggi (Deak, 2006).

c. Derajat keasaman (pH)

pH substrat sangat penting bagi pertumbuhan fungi, karena enzim-enzim tertentu hanya akan mengurai substrat sesuai dengan aktivitasnya pada pH tertentu. Umumnya fungi menyukai pH di bawah 7. Jenis-jenis khamir tertentu bahkan dapat tumbuh pada pH yang cukup rendah, yaitu pH 4,5-5,5 (Gandjar, Sjamsuridzal, dan Oetari, 2006).

d. Air

Air dibutuhkan oleh khamir karena nutrien-nutrien diserap oleh sel khamir dalam bentuk larutan dan air sendiri merupakan kebutuhan esensial untuk kehidupan (Deak, 2006).

e. Bahan Kimia

Selain asam asetat dan asam laktat, beberapa asam organik lain dapat menghambat pertumbuhan khamir seperti asam benzoat dan asam sorbat (Deak, 2006).



## 2.5 Fermentasi

Istilah fermentasi berasal dari bahasa latin “*fervere*” yang artinya mendidih, yang menggambarkan kerja khamir pada ekstrak buah-buahan atau biji gandum. Kondisi mendidih ini disebabkan karena terbentuknya gelembung-gelembung gas karbon dioksida akibat peristiwa katabolisme anaerobik yang terjadi pada ekstrak. Namun demikian, fermentasi memiliki arti yang berbeda dalam biokimia dan mikrobiologi industri. Secara biokimia, fermentasi berkaitan dengan proses menghasilkan energi melalui katabolisme senyawa organik, sedangkan secara mikrobiologi, fermentasi menggambarkan berbagai proses yang menghasilkan produk (metabolit) dari kultur massa mikroorganisme. Fermentasi yang penting secara komersial meliputi lima hal, yaitu : fermentasi menghasilkan sel mikroba (biomassa), fermentasi menghasilkan enzim mikroba, fermentasi menghasilkan metabolit mikroba, fermentasi menghasilkan produk rekombinan, dan fermentasi yang memodifikasi senyawa atau proses transformasi (Stanbury, Whitaker, dan Hall, 1995).

Tanpa memperhatikan jenis fermentasi, maka proses fermentasi dapat dibagi menjadi 6 bagian, yaitu :

- a. Formulasi medium yang akan digunakan untuk mengkultur organisme selama persiapan inokulum dan produksi.
- b. Sterilisasi medium, fermentor, dan alat-alat yang akan digunakan.
- c. Produksi kultur yang aktif dan murni dalam jumlah yang cukup untuk diinokulasi ke dalam media produksi.
- d. Pertumbuhan organisme dalam fermentor produksi pada kondisi yang optimum untuk pembentukan produk.
- e. Ekstraksi dan pemurnian produk
- f. Pembuangan hasil samping yang dihasilkan selama proses (Stanbury, Whitaker, dan Hall, 1995).

## 2.6 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran yang didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut di antara dua fase, yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas). Bila fase

diam berupa zat padat yang aktif, maka dikenal dengan istilah kromatografi penyerapan (*adsorption chromatography*). Bila fase diam berupa zat cair, maka teknik ini disebut kromatografi pembagian (*partition chromatography*). Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) merupakan teknik analisis yang paling cepat berkembang dalam kimia analitik. Penggunaannya sangat banyak terdiri atas berbagai metode dalam kromatografi cair. Metode kromatografi cair dibagi atas dua macam, yaitu : (1) kromatografi cair retensif, dan (2) kromatografi cair non-retensif. Pemisahan pada kromatografi cair retensif dicapai melalui interaksi antara zat terlarut dengan fase diam. Tipe ini mencakup fase normal, fase terbalik, dan kromatografi ion. Sedangkan pada kromatografi cair non-retensif pemisahan dicapai bergantung pada perbedaan besar molekul zat terlarut dimana terjadi interaksi antara zat terlarut dengan pori-pori yang terdapat pada permukaan fase diam. Tipe ini dikenal sebagai kromatografi eksklusi (Harmita, 2006)

Analisis menggunakan KCKT memiliki banyak keuntungan, antara lain :

- a. Kecepatan; waktu analisis umumnya kurang dari 1 jam. Banyak analisis yang dapat diselesaikan sekitar 15-30 menit. Untuk analisis yang tidak rumit, waktu analisis dapat dicapai kurang dari 5 menit.
- b. Resolusi atau daya pisahnya baik.
- c. Kepekaan; pada KCKT bergantung pada jenis detektor dan eluen yang digunakan.
- d. Kolom dapat digunakan kembali.
- e. Pemilihan kolom dan eluen sangat bervariasi.
- f. Dapat digunakan untuk molekul besar dan ion; KCKT dalam ragam eksklusi dan pertukaran ion ideal untuk menganalisis molekul besar dan ion
- g. Mudah untuk memperoleh kembali cuplikan; sebagian besar detektor yang dipakai pada KCKT tidak merusak komponen zat yang dianalisis, sehingga zat yang telah dielusi dapat dikumpulkan dengan mudah setelah melewati detektor (Johnson dan Stevenson, 1991).

Alat instrumentasi KCKT terdiri dari beberapa bagian, yaitu :

- a. Pompa

Pompa berfungsi untuk mengalirkan eluen ke dalam kolom. Pompa, segel-segel pompa dan semua penghubung dalam sistem kromatografi harus terbuat

dari bahan yang secara kimiawi tahan terhadap fase gerak. Bahan yang umum digunakan adalah gelas, baja nirkarat, teflon, dan batu nilam. Pada sistem kromatografi cair yang relatif murah membutuhkan pompa yang dapat menghasilkan tekanan minimal 103 atmosfer.

b. Injektor

Injektor berfungsi untuk memasukkan cuplikan ke dalam kolom. Pada saat penyuntikan, katup diputar sehingga fase gerak mengalir melewati keluk sampel dan memasukkan sampel ke kolom.

c. Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen. Kolom merupakan bagian penting dalam KCKT, karena ikut menentukan keberhasilan analisis. Dalam memilih kolom perlu diperhatikan panjang kolom, diameter kolom, bahan pengisi kolom, fase gerak yang digunakan, dan tekanan kolom.

d. Detektor

Detektor berfungsi untuk mendeteksi atau mengidentifikasi komponen yang ada dalam eluat dan mengukur jumlahnya. Ada beberapa jenis detektor yang biasa digunakan dalam KCKT, yaitu detektor serapan optik, detektor indeks bias, detektor fluoresensi, detektor elektrokimia, detektor ionisasi nyala, detektor *evaporation light scattering*, dan detektor radioaktif.

e. Integrator

Integrator berfungsi untuk menghitung luas puncak spektrum serapan zat yang dianalisis (Harmita, 2006).

## 2.7 Detektor Indeks Bias

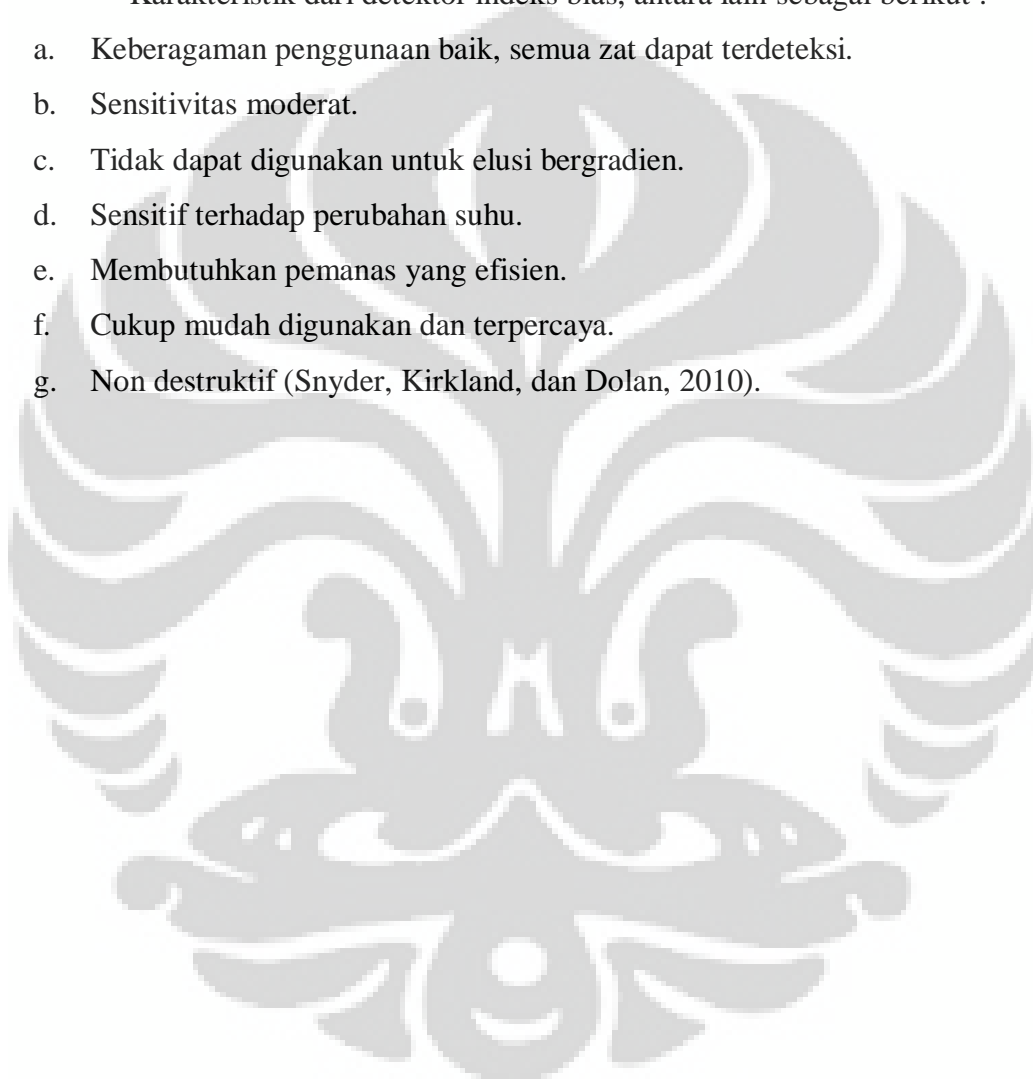
Detektor indeks bias merupakan detektor yang bersifat universal yang mampu memberikan respon (*signal*) pada setiap zat yang terlarut. Detektor ini akan merespon setiap perbedaan indeks bias antara analit (zat terlarut) dengan pelarutnya (fase geraknya). Kelemahan yang utama detektor ini adalah bahwa indeks bias dipengaruhi oleh suhu, oleh karena itu suhu fase gerak, kolom, dan detektor harus dikendalikan secara seksama (Gandjar dan Rohman, 2007).

Indeks bias pada kedua sel (sampel dan pembanding) harus sama persis agar didapatkan garis dasar (*background*) yang stabil. Karena alasan ini maka detektor ini tidak dianjurkan untuk elusi bergradien. Komposisi fase gerak juga

harus dikendalikan secara seksama karenanya penguapan fase gerak atau penyerapan air oleh fase gerak harus dicegah. Penggunaan detektor ini terutama untuk senyawa-senyawa yang tidak mempunyai kromofor. Sebagai contoh penggunaannya adalah untuk deteksi karbohidrat baik dalam bahan tambahan tablet atau dalam bahan makanan serta untuk deteksi asetilkolin dalam sediaan optalmik (Gandjar dan Rohman, 2007).

Karakteristik dari detektor indeks bias, antara lain sebagai berikut :

- a. Keberagaman penggunaan baik, semua zat dapat terdeteksi.
- b. Sensitivitas moderat.
- c. Tidak dapat digunakan untuk elusi bergradien.
- d. Sensitif terhadap perubahan suhu.
- e. Membutuhkan pemanas yang efisien.
- f. Cukup mudah digunakan dan terpercaya.
- g. Non destruktif (Snyder, Kirkland, dan Dolan, 2010).



## **BAB 3**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi dan Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Kuantitatif, Lantai 3 Gedung F, Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Depok. Waktu penelitian berkisar antara bulan Februari sampai dengan Mei 2012.

#### **3.2 Alat**

*Laminar air flow* (Esco), Autoklaf (Hirayama), *shakingbath incubator* (Labline), *vortex mixer* (Barnstead), timbangan analitik (Acculab), *hot plate* (Corning), pH meter (Eutech), mikroskop cahaya (Euromex), sentrifugator (Kubota 6800), oven (WTB Binder), penyaring bakteri 0,22  $\mu\text{m}$ , spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu UV 1601), kromatografi cair kinerja tinggi (Shimadzu model LC-20AD), detektor indeks bias (Shimadzu RID-10A), degasser DGU-20A5, oven kolom CTU-6AS, kolom *Waters Carbohydrate Analysis* (3,9 mm x 300 mm, 10  $\mu\text{m}$ ), mat pipet, cawan petri, erlenmeyer, dan alat-alat gelas lain yang biasa digunakan dalam laboratorium mikrobiologi.

#### **3.3 Bahan**

##### **3.3.1 Sampel**

Sampel uji yang digunakan dalam penelitian ini berupa isolat khamir yang diisolasi dari tanah persawahan. Tanah diperoleh dari lahan persawahan yang masih ditumbuhi padi di Jalan Sindang Barang, Darmaga, Bogor Barat, Bogor, Jawa Barat. Selain itu digunakan juga isolat khamir koleksi UICC (*University of Indonesia Culture Colection*), yaitu spesies khamir *Candida sp.* UICC Y-216, *Debaryomyces hansenii* UICCY-276, dan *Debaryomyces nepalensis* UICC Y-328.

### 3.3.2 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah fruktosa (Merck), manitol (Kalbe Farma), kalsium klorida (Merck), tembaga sulfat (Merck), besi sulfat (Merck), zink sulfat (Merck), amonium sulfat (Merck), kalium dihidrogen fosfat (Merck), dinatrium hidrogen fosfat (Merck), magnesium sulfat (Merck), ekstrak khamir (Bacto), pepton (Liofilchem), agar (Wako), kloramfenikol (Nanjing), aquadest steril, aquabidestilata (Widatra), asetonitril (JT Baker), dan metanol (JT Baker).

## 3.4 Prosedur Kerja

### 3.4.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian dicuci bersih dengan air dan dikeringkan, kemudian disterilkan. Sterilisasi dilakukan dengan cara panas basah menggunakan autoklaf dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

### 3.4.2 Penyiapan Medium

#### 3.4.2.1 Medium Isolasi

Medium isolasi yang digunakan adalah medium selektif untuk pertumbuhan khamir metilotrop yang mengandung metanol 1 % dan kloramfenikol 0,05%. Komposisi medium isolasi yang digunakan sebagai berikut:

Metanol	1 mL
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,35 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,3 g
Ekstrak khamir	0,01 g
Kloramfenikol	0,05 g
Agar	1,5 g
Aquadest ad	100 mL

Cara pembuatan medium :

Semua bahan medium yang dibutuhkan ditimbang secara seksama, kemudian dilarutkan dengan aquadest di dalam labu bulat, kecuali kloramfenikol dan

metanol. Larutan tersebut kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan di atas *hot plate*, lalu disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Kloramfenikol dilarutkan dengan aquadest steril. Larutan kloramfenikol dan metanol disterilkan dengan cara disaring menggunakan penyaring bakteri 0,22 µm, kemudian ditambahkan ke dalam larutan medium yang telah disterilisasi ketika suhu medium telah dingin secara aseptis.

#### 3.4.2.2 Medium Peremajaan Isolat

Media yang digunakan untuk peremajaan isolat adalah media YPDA (*Yeast Pepton Dextrose Agar*) dengan komposisi sebagai berikut:

Glukosa	2 g
Pepton	2 g
Ekstrak khamir	1 g
Agar	1,5 g
Aquadest	ad 100 mL

Cara pembuatan medium :

Semua bahan yang dibutuhkan ditimbang seksama, kemudian dilarutkan dengan aquadest di dalam labu bulat, dan dicukupkan volumenya hingga 100 mL. Larutan tersebut kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan di atas *hot plate*, lalu disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Sebanyak 5,0 ml medium yang telah disterilisasi dan masih cair dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril secara aseptis. Kemudian tabung diletakkan pada posisi miring kurang lebih 30 derajat dan dibiarkan hingga medium membeku.

#### 3.4.2.3 Medium Prakultur

Komposisi media prakultur yang digunakan adalah sebagai berikut :

Fruktosa	1%
Metanol	1 mL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05 g



Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,35 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3 g
Ekstrak khamir	0,01 g
Aquadest ad	100 mL

#### 3.4.2.4 Medium Fermentasi

Komposisi medium fermentasi adalah sebagai berikut :

Fruktosa	5 %
Metanol	1 mL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,35 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3 g
Ekstrak khamir	0,01 g
Aquadest ad	100 mL

Cara pembuatan media prakultur dan fermentasi :

Semua bahan yang dibutuhkan ditimbang seksama, kemudian dilarutkan dengan aquadest di dalam labu bulat, kecuali metanol, lalu dicukupkan volumenya hingga 100 mL. Larutan tersebut kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan diatas *hot plate*, lalu disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Metanol disterilkan dengan cara disaring menggunakan penyaring bakteri 0,22 µm, kemudian ditambahkan ke dalam larutan medium yang telah disterilisasi ketika suhu medium telah dingin secara aseptis.

#### 3.4.3 Isolasi Khamir Metilotrop dari Tanah

Sampel tanah yang telah diambil kemudian ditimbang sebanyak 1 gram, dan disuspensikan dalam 9 mL aquadest steril. Selanjutnya, dari suspensi tersebut dilakukan pengenceran berseri 10 dalam tabung reaksi hingga pengenceran 10<sup>-4</sup>. Kemudian 0,1 mL cairan dari pengenceran 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, dan 10<sup>-4</sup> diinokulasikan ke dalam medium isolasi padat yang tidak mengandung metanol dan diinkubasi pada



suhu ruang selama 2-3 hari. Selanjutnya khamir yang tumbuh pada media isolasi padat tanpa metanol ditumbuhkan dalam media isolasi padat yang telah ditambahkan metanol pada cawan petri, dan diinkubasi pada suhu kamar selama 2-3 hari.

#### **3.4.4 Pemurnian Isolat Khamir**

Koloni-koloni khamir yang tumbuh pada media isolasi padat selanjutnya dimurnikan dengan diinokulasikan ke dalam media padat YPD pada cawan petri lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 2-3 hari. Hal yang sama dilakukan sebanyak 3-4 kali agar didapatkan isolat yang murni. Selanjutnya isolat khamir yang telah murni diamati secara makroskopik dan mikroskopik. Kemudian dipindahkan ke media agar miring YPD untuk digunakan sebagai *working culture* dan yang lain digunakan sebagai *stock culture*.

#### **3.4.5 Pengamatan Makroskopik dan Mikroskopik Isolat**

##### **3.4.5.1 Pengamatan Makroskopik**

Pengamatan makroskopik isolat khamir dilakukan dengan pengamatan bentuk dan morfologi koloni, tekstur koloni, diameter koloni, dan warna koloni khamir yang tumbuh pada media dalam cawan petri.

##### **3.4.5.2 Pengamatan Mikroskopik**

Pengamatan mikroskopik isolat khamir dilakukan dengan melakukan pemeriksaan dan pengamatan preparat khamir di bawah mikroskop cahaya. Caranya adalah, kaca objek dan kaca penutup dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol 70%, kemudian ditetaskan 1 tetes minyak imersi di atas kaca objek. Isolat khamir diambil dari inokulum dengan menggunakan ose steril dan dioleskan pada kaca objek, lalu ditutup dengan kaca penutup. Kemudian dilakukan pengamatan di bawah mikroskop cahaya. Pengamatan yang dilakukan berupa bentuk dan morfologi sel khamir.

### 3.4.6 Peremajaan Isolat

Media yang digunakan untuk peremajaan isolat adalah media *Yeast Pepton Dextrose Agar* (YPDA). Sebanyak sekitar 5 mL media YPDA yang telah disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan masih cair dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril secara aseptis. Kemudian tabung diletakkan pada posisi miring dengan sudut kemiringan sekitar 30° dan medium dibiarkan sampai membeku hingga menjadi agar miring. Isolat digoreskan pada agar miring dengan menggunakan ose secara aseptis dan diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam, kemudian dapat disimpan di dalam lemari pendingin sebagai *stock culture*.

### 3.4.7 Skrining Kemampuan Tumbuh dalam Media yang Mengandung Metanol

Isolat khamir pada agar miring diambil sebanyak 1 ose runcing dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 10 mL media cair yang mengandung metanol 1% dan dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Kemudian suspensi khamir tersebut dipipet 5 mL untuk dipindahkan ke dalam tabung reaksi lainnya. Satu tabung reaksi segera diukur kekeruhannya untuk mengetahui nilai *Optical Density* sebelum diinkubasi ( $OD_0$ ), sedangkan satu tabung reaksi lainnya diinkubasi selama 2 hari pada suhu kamar dan selanjutnya diukur kekeruhan suspensi selnya untuk mengetahui nilai *Optical Density* setelah diinkubasi ( $OD_t$ ). Pertumbuhan sel dapat diketahui dengan adanya pertambahan nilai *Optical Density* ( $\Delta OD$ ) setelah suspensi sel diinkubasi dan sebelum diinkubasi. Isolat khamir yang mengalami pertumbuhan paling baik dapat dipertimbangkan sebagai khamir dengan sifat metilotrop terbaik.

### 3.4.8 Penyiapan Prakultur

Isolat khamir dari media agar miring dimasukkan sebanyak 3 ose ke dalam erlenmeyer 100 mL yang berisi 50 mL media prakultur yang mengandung fruktosa 1%. Kemudian dilakukan penggojokan menggunakan *shaker* berkecepatan 175 rpm selama 48 jam pada suhu kamar.

### 3.4.9 Skrining Kemampuan Fermentasi Manitol

Sebanyak 10 mL hasil fermentasi prakultur dipipet dan dipindahkan ke dalam erlenmeyer 250 mL yang berisi 100 mL media fermentasi dengan substrat fruktosa 5%. Selanjutnya dilakukan penggojokan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 175 rpm selama 3 hari pada suhu kamar. Kemudian dilakukan pengambilan sampel hasil fermentasi sebanyak 5 mL pada hari ketiga untuk dilakukan analisis kadar manitol yang dihasilkan secara KCKT. Isolat khamir yang menghasilkan manitol dengan *yield value* paling besar dari proses fermentasi ini kemudian digunakan untuk percobaan optimasi kondisi fermentasi pada tahap penelitian selanjutnya.

### 3.4.10 Optimasi Kondisi Fermentasi

#### 3.4.10.1 Optimasi Waktu Fermentasi

Pada percobaan ini dilakukan fermentasi selama 4 hari dengan waktu kultivasi atau pengambilan sampel fermentasi pada hari kedua, ketiga, dan keempat. Waktu pengambilan sampel fermentasi yang menghasilkan kadar manitol terbesar selanjutnya digunakan untuk tahap percobaan selanjutnya.

#### 3.4.10.2 Optimasi Konsentrasi Sumber Nitrogen

Pada percobaan ini dilakukan optimasi fermentasi dengan menggunakan sumber nitrogen anorganik, yaitu ammonium sulfat dengan kadar 0,25%, 0,5 %, dan 0,75%.

#### 3.4.10.3 Optimasi Konsentrasi Substrat

Pada percobaan ini dilakukan optimasi konsentrasi substrat dalam media fermentasi, yaitu menggunakan fruktosa konsentrasi sebesar 2,5%, 5 %, 7,5 %, dan 10 %.

#### 3.4.10.4 Optimasi Pengaruh Penambahan Ion Logam

Pada percobaan ini dilakukan optimasi penambahan ion logam dalam media fermentasi, yaitu dengan menggunakan  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,01%,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,01%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,01%, dan  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,01%.

#### 3.4.10.5 Optimasi Kondisi Aerasi

Pada percobaan ini dilakukan optimasi kondisi aerasi fermentasi, yaitu dengan menggunakan volume medium fermentasi 75 mL, 100 mL, dan 150 mL yang ditempatkan dalam wadah erlenmeyer 250 mL.

#### 3.4.11 Penentuan Biomassa Sel secara Turbidimetri

Konsentrasi sel ditentukan secara turbidimetri dengan mengukur kekeruhan sel pada panjang gelombang 600 nm. Dipipet 1,0 mL sampel dari kultur fermentasi dan dimasukkan pada labu ukur 10,0 mL, lalu diencerkan sampai tanda batas. Selanjutnya diukur kekeruhannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm. Berat sel kering ditentukan dengan cara 10 mL medium fermentasi dipipet, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 15 menit. Bagian residunya dicuci dengan aquadest steril, kemudian dikeringkan pada suhu 110°C selama 8 jam. Lalu ditimbang sampai didapat bobot yang konstan. Biomassa sel dapat diketahui dengan mengkonversi nilai OD (*Optical Density*) yang diperoleh dengan nilai perbandingan 1 unit OD setara dengan berat sel kering/mL yang didapat.

#### 3.4.12 Pengambilan Sampel Hasil Fermentasi

Pengamatan dilakukan selama 4 hari dengan mengambil 5 mL dari tiap media fermentasi. Untuk pengamatan konsentrasi sel, diambil 2 mL dari sampel, lalu diencerkan 10x dan dianalisis secara turbidimetri. Sementara untuk pengamatan hasil fermentasi, diambil 3 mL dari sampel. Kemudian disentrifugasi dan diambil supernatannya, disaring dengan penyaring bakteri 0,22  $\mu\text{m}$  dan diencerkan 10x, lalu dianalisis menggunakan KCKT.

#### 3.4.13 Analisis Kuantitatif Hasil Fermentasi secara KCKT

##### 3.4.13.1 Pembuatan Kurva Kalibrasi Fruktosa

Standar fruktosa ditimbang dan dibuat larutan standar dengan konsentrasi yang berbeda, yaitu 1.000, 2.000, 4.000, 6.000, 8.000, dan 10.000 ppm, lalu

disuntikkan sebanyak 20  $\mu$ L. Setelah itu dibuat kurva kalibrasi dengan memplot konsentrasi larutan standar dengan luas puncak yang didapat.

#### 3.4.13.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi Manitol

Standar manitol ditimbang dan dibuat larutan standar dengan konsentrasi yang berbeda, yaitu 200, 500, 1.000, 2.000, 4.000, 6.000, 8.000, dan 10.000 ppm, lalu disuntikkan sebanyak 20  $\mu$ L. Setelah itu dibuat kurva kalibrasi dengan memplot konsentrasi larutan standar dengan luas puncak yang didapat.

#### 3.4.13.3. Uji Perolehan Kembali

Uji perolehan kembali dilakukan pada kadar fruktosa dan manitol sebesar 10000 ppm. Ditimbang sejumlah standar fruktosa dan manitol sebanyak 6 kali penimbangan. Masing-masing larutan disuntikkan satu kali sebanyak 20,0 $\mu$ l ke alat KCKT. Lalu dihitung nilai % perolehan kembali (% *recovery*).

#### 3.4.13.4. Uji Presisi

Uji presisi dilakukan dengan enam kali penyuntikan pada kadar fruktosa dan manitol sebesar 10000 ppm dari hasil satu kali penimbangan. Selanjutnya dihitung nilai koefisien variasi (KV).

#### 3.4.13.5 Pengukuran Konsentrasi Fruktosa dan Manitol

Sampel dari kultur fermentasi pada hari ketiga dipipet sebanyak 3 mL, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 15 menit. Diambil bagian supernatannya dan disaring dengan menggunakan penyaring bakteri 0,22  $\mu$ m. Supernatan ini lalu dianalisis dengan KCKT menggunakan kolom Waters@ *carbohydrate analysis* (10 $\mu$ m, 300 x 3,9 mm), fase gerak asetonitril-air (93:7), laju aliran 1,0 ml/menit, suhu 40° C, dideteksi dengan detektor indeks bias. Volume yang disuntikkan sebanyak 20  $\mu$ L. Selanjutnya dilakukan perhitungan kadar fruktosa dan manitol dengan cara memasukkan luas puncak yang diperoleh ke dalam persamaan kurva kalibrasi yang telah didapat sebelumnya.

## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini secara garis besar dibagi menjadi tiga tahap, yaitu tahap isolasi khamir metilotrop dari tanah, tahap skrining kemampuan tumbuh isolat khamir dalam media yang mengandung metanol dan skrining kemampuan fermentasi manitol, serta tahap optimasi kondisi fermentasi manitol.

#### 4.1 Isolasi Khamir Metilotrop dari Tanah

Pada tahap awal, dilakukan isolasi khamir metilotrop dari sampel tanah. Sampel tanah didapatkan dari lahan persawahan yang masih ditumbuhi padi di Jalan Sindang Barang, Darmaga, Bogor, Jawa Barat. Isolasi khamir dari tanah sawah dilakukan karena tanah telah diketahui merupakan media yang kaya akan nutrisi dan bahan-bahan organik sehingga banyak mengandung berbagai jenis mikroorganisme (Botha, 2006). Pada penelitian terdahulu telah diketahui bahwa pada tanah sawah banyak terdapat bakteri metanotrof yang mengoksidasi metan pada lapisan permukaan sedimen sawah menjadi metanol (Hanson dan Hanson, 1996). Hal ini menyebabkan tanah sawah cukup banyak mengandung metanol, yang merupakan substrat bagi khamir metilotrop sehingga pada penelitian ini isolasi khamir metilotrop dilakukan dari tanah persawahan.

Sampel tanah diambil dengan menggunakan sekop pada kedalaman sekitar 2-10 cm dari permukaan tanah. Sampel tanah yang telah diambil kemudian ditimbang sebanyak 1 gram dan disuspensikan ke dalam 9 mL aquadest steril. Selanjutnya dilakukan pengenceran dari suspensi tanah tersebut dengan aquadest steril secara aseptis hingga pengenceran  $10^{-4}$ . Tujuan dari pengenceran ini adalah untuk mengurangi kepadatan jumlah mikroorganisme yang terdapat dalam suspensi tanah.

Proses isolasi khamir metilotrop dilakukan dengan menggunakan media selektif yang memiliki kandungan nutrisi yang cukup untuk menunjang pertumbuhan khamir, namun dapat menghambat atau mengurangi kemungkinan tumbuhnya mikroorganisme kontaminan lainnya. Untuk mencegah adanya pertumbuhan bakteri, ke dalam media isolasi ditambahkan antibiotik



kloramfenikol sebanyak 0,05%. Selain itu, untuk mendapatkan isolat khamir metilotrop, maka ke dalam media ditambahkan metanol sebagai sumber karbon tunggal sebanyak 1%. Proses isolasi dilakukan pada media padat dalam cawan petri dengan metode *spread plate*. Pada metode ini, sejumlah kecil suspensi cairan yang mengandung mikroorganisme dipipet ke bagian tengah cawan petri berisi media agar padat, kemudian cairan tersebut disebarkan secara merata ke seluruh permukaan media dengan menggunakan batang kaca berbentuk L yang steril (Harley dan Prescott, 2002).

Suspensi tanah dengan pengenceran  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , dan  $10^{-4}$  diinokulasikan ke dalam media isolasi padat dalam cawan petri dan dilakukan masing-masing sebanyak dua kali atau duplo dan diinkubasi selama 2-4 hari serta diamati adanya pertumbuhan koloni khamir. Berdasarkan pengamatan, terlihat adanya pertumbuhan koloni berupa bulatan-bulatan pada cawan petri yang diinokulasi dengan suspensi tanah pengenceran  $10^{-3}$  pada hari ketiga, yaitu munculnya 3 jenis koloni yang berbeda yang diduga sebagai koloni isolat khamir, yaitu koloni A, B, dan C. Ketiga koloni tersebut dipindahkan ke media isolasi padat yang baru untuk mendapatkan koloni isolat yang murni dan selanjutnya dipindahkan ke media agar miring. Pertumbuhan koloni isolat pada media isolasi padat dapat dilihat pada Gambar 4.1.

Berdasarkan pengamatan makroskopik, koloni isolat A berbentuk bulat dengan tepi rata dan berwarna kuning muda, serta secara mikroskopik terlihat organisme uniseluler dengan bentuk sel bulat. Koloni isolat B berbentuk bulat, tepi rata, berwarna putih agak krem, tebal, dan menggunung. Pengamatan mikroskopik isolat B menunjukkan organisme uniseluler dan berbentuk oval. Koloni isolat C berbentuk bulat bulat dengan tepi rata, berwarna kuning mengkilat koloni tebal, dan menyerupai lendir, sedangkan secara mikroskopik terlihat bahwa isolat A merupakan organisme uniseluler dengan sel berbentuk bulat. Hasil pengamatan makroskopik koloni isolat khamir pada cawan petri dapat dilihat pada Gambar 4.3, 4.4 dan 4.5, sedangkan hasil pengamatan mikroskopik isolat khamir dapat dilihat pada Gambar 4.6.

#### 4.2. Skrining Pertumbuhan Isolat Khamir dalam Media yang Mengandung Metanol

Pada tahap ini, 3 isolat khamir hasil isolasi (isolat A, B, dan C) dan 3 isolat koleksi UICC (*Candida sp.* UICC Y-216, *Debaryomyces hansenii* UICCY-276, dan *Debaryomyces nepalensis* UICC Y-328) ditumbuhkan dalam media cair yang mengandung metanol 1% sebagai sumber karbon tunggal. Hal ini dilakukan untuk mengetahui sifat metilotrop dari isolat khamir, yaitu mampu menggunakan metanol sebagai sumber karbon tunggal. Konsentrasi metanol dalam medium digunakan sebanyak 1%, karena berdasarkan penelitian sebelumnya diketahui bahwa konsentrasi metanol 1% merupakan konsentrasi optimum agar khamir dapat tumbuh baik, sedangkan konsentrasi metanol lebih tinggi dapat menghambat pertumbuhan khamir (Asthana, Humphrey, dan Moritz, 1971). Oleh sebab itu, metanol merupakan faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan khamir pada tahap skrining pertumbuhan ini. Pertumbuhan sel khamir dalam medium diamati berdasarkan pertambahan kekeruhan pada medium atau kerapatan optik (*Optical Density*) secara turbidimetri menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Medium yang telah diinokulasi isolat khamir dan diinkubasi selama 2 hari terlihat lebih keruh dibandingkan medium awal.

Berdasarkan Tabel 4.5, dapat diketahui pertambahan nilai kerapatan optik dari 6 isolat khamir yang diuji. Pertambahan nilai kerapatan optik yang signifikan dialami oleh isolat A dan isolat C. Isolat A mengalami pertambahan kerapatan optik sebesar 0,0272 dan 0,0154, sementara isolat C mengalami pertumbuhan kerapatan optik sebesar 0,0209 dan 0,0263. Hasil ini menunjukkan bahwa kedua isolat khamir tersebut memiliki kemampuan yang baik untuk tumbuh dalam media yang mengandung metanol sebagai sumber karbon satu-satunya. Hal ini dapat terjadi dimungkinkan karena kedua isolat tersebut sejak tahap awal isolasi telah dapat beradaptasi dengan baik dalam media yang mengandung metanol, sehingga telah mampu memproduksi enzim-enzim yang diperlukan untuk memetabolisme metanol. Pertumbuhan yang rendah dari setiap isolat khamir disebabkan karena pada percobaan pengamatan pertumbuhan isolat khamir ini dilakukan



menggunakan medium cair dalam tabung reaksi sehingga kondisi aerasinya terbatas dan menyebabkan pertumbuhan khamir menjadi tidak maksimal.

### **4.3 Skrining Kemampuan Fermentasi Manitol**

Setelah dilakukan skrining pertumbuhan isolat khamir dalam media yang mengandung metanol, selanjutnya dilakukan skrining kemampuan fermentasi khamir untuk menghasilkan manitol. Pada tahap ini, 6 isolat khamir diuji kemampuan fermentasi manitol agardapat diketahui isolat khamir yang paling baik dalam memfermentasi fruktosa menjadi manitol. Pada media fermentasi digunakan juga metanol 1% yang berperan sebagai kosubstrat dalam produksi manitol. Proses fermentasi dilakukan dalam erlenmeyer dengan menggunakan penggojokan dengan kecepatan 175 rpm dan dikultivasi selama 3 hari. Sebelumnya, khamir terlebih dahulu ditumbuhkan dalam media prakultur yang mengandung substrat fruktosa 1% dan metanol 1% selama 2 hari dengan tujuan untuk memperbanyak jumlah sel khamir. Kultivasi khamir dalam media prakultur juga bertujuan untuk mengkondisikan sel khamir terhadap media yang mengandung metanol, sehingga sel khamir dapat membentuk enzim-enzim yang penting untuk memetabolisme metanol seperti alkohol oksidase (AOX), dihidroksiaseton sintase (DHAS) dan katalase (CAT) yang merupakan ciri penting dari khamir metilotrop (Negruta, 2010).

Khamir yang telah dioptimasi kondisinya dalam media prakultur kemudian diinokulasikan ke dalam media fermentasi. Pengamatan pertumbuhan sel dan pengukuran kadar manitol yang terbentuk dilakukan pada hari ketiga. Hal ini dikarenakan, pada hari pertama dan kedua sel khamir belum banyak menghasilkan manitol, sehingga tidak terjadi perbedaan kadar fruktosa dan manitol yang signifikan pada tiap-tiap media fermentasi.

Sampel hasil fermentasi diambil sebanyak 3 ml pada hari ketiga, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 15 menit. Sentrifugasi ini bertujuan untuk memisahkan massa sel yang akan mengendap sebagai residu dengan supernatan yang merupakan medium fermentasi yang mengandung manitol, sehingga manitol dapat diperoleh dan dianalisis kadarnya. Cairan supernatan selanjutnya disaring dengan penyaring bakteri 0,22  $\mu\text{m}$  untuk menyaring sel khamir dan pengotor lain yang mungkin masih terdapat dalam

supernatan. Supernatan kemudian diencerkan 10x dan dilakukan pengukuran kadar fruktosa yang tersisa dan manitol yang terbentuk.

Penetapan kadar fruktosa dan manitol dalam supernatan media fermentasi dilakukan secara kromatografi cair kinerja tinggi menggunakan kolom silika dengan ikatan propilamin (*Carbohydrate Analysis-Waters*). Detektor yang digunakan untuk mendeteksi adanya analit dalam sampel adalah detektor indeks bias. Senyawa karbohidrat seperti fruktosa dan manitol tidak memiliki gugus kromofor atau fluorofor yang dapat dideteksi pada panjang gelombang UV, visibel, atau floresensi sehingga tidak dapat dideteksi dengan detektor UV-Vis atau fluoresensi. Detektor indeks bias adalah detektor yang merespon perbedaan indeks bias apabila suatu zat melewatinya. Detektor indeks bias dapat mendeteksi semua larutan yang berbeda komposisinya dengan komposisi fase gerak yang digunakan (Snyder, Kirkland, dan Dolan, 2010). Analisis zat aktif dengan menggunakan detektor indeks bias selain kurang spesifik dan sangat peka terhadap temperatur juga dipengaruhi oleh pelarut yang digunakan (Gandjar dan Rohman, 2007). Hal ini menyebabkan, aquabidest yang digunakan sebagai pelarut dan pengencer supernatan hasil fermentasi juga memberikan respon pada detektor, namun tidak mengganggu kromatogram fruktosa dan manitol yang dianalisis.

Untuk memperoleh pemisahan antara fruktosa dan manitol dalam sampel, maka pada tahap awal digunakan eluen asetonitril-air dengan perbandingan 85:15. Namun, pemisahan antara fruktosa dan manitol yang diperoleh kurang baik sehingga perbandingan asetonitril dan air perlu divariasikan. Perubahan komposisi fase gerak akan menyebabkan perubahan resolusi dan waktu retensi zat. Penambahan asetonitril dalam komposisi eluen akan meningkatkan resolusi antara analit, namun akan memperlambat waktu retensinya. Hal ini disebabkan karena zat analit, yaitu fruktosa dan manitol merupakan senyawa yang polar sehingga akan sulit terelusi oleh eluen yang komposisinya banyak mengandung asetonitril yang bersifat semipolar.

Analisis kadar fruktosa dan manitol dalam sampel fermentasi akhirnya dilakukan dengan menggunakan eluen asetonitril dan air dengan perbandingan 97 : 3. Setelah dilakukan analisis terhadap larutan standar fruktosa dan manitol, dapat diketahui bahwa puncak kromatogram fruktosa muncul pada sekitar menit ke-9,

sedangkan puncak kromatogram manitol muncul pada sekitar menit ke-14. Waktu retensi kedua zat cukup berbeda jauh. Dari waktu retensi ini dapat diketahui nilai resolusi atau daya pisah kedua zat, yaitu sebesar 2,648. Nilai resolusi ini melebihi nilai 1,5 yang merupakan syarat nilai resolusi agar 2 zat yang dianalisis dapat dikatakan terpisah dengan baik. Pemisahan inilah yang paling baik didapatkan dengan analisis menggunakan beberapa variasi komposisi eluen yang telah dilakukan. Oleh karena itu, analisis kadar fruktosa dan manitol dari hasil fermentasi dapat dilakukan dengan metode ini.

Penetapan kadar fruktosa yang tersisa dan manitol yang terbentuk dari hasil fermentasi dapat dilakukan dengan menggunakan kurva kalibrasi standar fruktosa dan manitol yang telah dibuat sebelumnya. Kurva kalibrasi dapat diperoleh dari hubungan antara konsentrasi zat standar dengan luas puncak kromatogram yang didapatkan dari hasil analisis. Persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi standar fruktosa adalah  $y = 190,02x - 125382,29$  dengan nilai  $r$  sebesar 0,99919, sedangkan persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi standar manitol adalah  $y = 172,23x - 17686,96$  dengan nilai  $r$  sebesar 0,99974.

Sementara itu, pengukuran biomassa sel pada hari kultivasi pada seluruh media fermentasi dilakukan dengan mengkonversi nilai serapan (*Optical Density*) dengan nilai kesetaraan bobot sel kering per mL. Medium prakultur yang telah diinkubasi 2 hari diukur kekeruhannya pada panjang gelombang 600 nm dan dilakukan penentuan bobot sel keringnya. Pada percobaan, didapatkan bahwa medium prakultur dengan kekeruhan 1,229 OD memiliki kandungan bobot sel kering rata-rata sebesar 2,93 mg/mL, sehingga didapatkan kesetaraan 1 OD = 2,25 mg/mL. Nilai OD yang diperoleh dari tiap kultur media fermentasi selanjutnya dikonversikan berdasarkan persamaan di atas sehingga dapat diketahui biomassa sel yang terbentuk berdasarkan banyaknya mg sel kering dalam tiap mL media.

Berdasarkan hasil pengukuran fruktosa dan manitol pada supernatan media fermentasi pada hari ketiga diketahui bahwa isolat khamir *Debaryomyces hansenii* UICC Y-276 memiliki kemampuan paling baik dalam menghasilkan manitol, yaitu sebesar 11,12 g/L dari total substrat fruktosa dalam media fermentasi sebanyak 50 g/L. Khamir *Candida sp.* UICC Y-216, *Debaryomyces nepalensis* UICC Y-328, dan khamir isolat A dapat menghasilkan manitol berturut-turut

sebesar 2,16 g/L, 3,10 g/L, dan 3,06 g/L. Sementara khamir isolat B dan C tidak dapat menghasilkan manitol. Rincian hasil skrining fermentasi manitol dari beberapa isolat khamir dapat dilihat pada Tabel 4.6. Berdasarkan hasil tersebut, maka khamir *Debaryomyces hansenii* UICC Y-276 dipilih untuk digunakan pada percobaan optimasi kondisi fermentasi pada tahap selanjutnya.

*Debaryomyces hansenii* merupakan khamir yang telah diketahui memiliki potensi yang menjanjikan secara genetis dan biokimia untuk dimanfaatkan dalam bioteknologi. Salah satu potensi tersebut adalah menghasilkan gula alditol. Kemampuannya untuk menghasilkan xilitol dari xilosa dan hidrolisat kayu telah dieksplorasi selama beberapa dekade. Sebagai khamir osmotoleran, *Debaryomyces hansenii* juga memiliki potensi yang menarik untuk menghasilkan gula alditol lainnya (Breuer dan Harms, 2006). Dengan proses skrining kemampuan fermentasi manitol yang dilakukan pada penelitian ini, dapat diketahui bahwa *Debaryomyces hansenii* juga memiliki potensi untuk menghasilkan manitol dari substrat fruktosa.

#### **4.4 Optimasi Kondisi Fermentasi**

##### **4.4.1 Optimasi Waktu Kultivasi**

Pada percobaan optimasi waktu kultivasi fermentasi dilakukan pengambilan sampel hasil fermentasi sebanyak 5 mL pada hari kedua, ketiga, dan keempat. Pada hari pertama tidak dilakukan pengambilan sampel dikarenakan pada hari pertama, sel khamir masih beradaptasi dan belum banyak menghasilkan manitol, sehingga pengamatan dipilih pada hari kedua sampai keempat. Berdasarkan pengamatan, diketahui bahwa manitol yang dihasilkan pada hari kedua, ketiga, dan keempat berturut-turut adalah sebesar 2,29 g/L, 9,44 g/L, dan 4,96 g/L.

Pada hari kedua, jumlah manitol yang dihasilkan masih cukup rendah karena pada hari kedua ini sel masih dalam proses adaptasi sehingga proses biokonversi substrat fruktosa menjadi manitol belum berlangsung optimal. Sementara pada hari keempat, jumlah manitol yang dihasilkan dalam media fermentasi mengalami penurunan dibandingkan hari ketiga. Hal ini terjadi karena

khamir *Debaryomyces hansenii* diketahui juga memiliki kemampuan untuk mengasimilasi manitol, sehingga manitol yang dihasilkan dalam jumlah cukup banyak pada hari ketiga kemungkinan dikonsumsi oleh sel untuk pertumbuhan dan sintesis komponen-komponen sel (Breuer dan Harms, 2006). Berdasarkan percobaan ini, hari ketiga diketahui merupakan waktu kultivasi yang paling optimal sehingga pengambilan sampel hasil fermentasi untuk percobaan selanjutnya dilakukan pada hari ketiga. Hasil lebih rinci dari percobaan optimasi waktu kultivasi dapat dilihat pada Tabel 4.8.

#### 4.4.2 Optimasi Konsentrasi Amonium Sulfat

Pertumbuhan sel dan produksi manitol dapat berlangsung optimum apabila media fermentasi mengandung nutrisi yang dibutuhkan oleh sel khamir, di antaranya adalah sumber nitrogen. Sumber nitrogen dalam fermentasi dapat berupa sumber nitrogen organik ataupun anorganik (Stanbury, Whitaker, dan Hall, 1995). Pada percobaan ini digunakan variasi amonium sulfat 0,25%; 0,5%, dan 0,75% sebagai sumber nitrogen anorganik yang utama dalam media fermentasi. Berdasarkan percobaan, media fermentasi yang mengandung amonium sulfat 0,25%; 0,5%, dan 0,75% dapat menghasilkan manitol berturut-turut sebesar 8,98 g/L, 9,44 g/L, dan 7,07 g/L. Perincian mengenai hasil optimasi konsentrasi amonium sulfat dapat dilihat pada Tabel 4.9. Berdasarkan hasil tersebut, dapat diketahui bahwa konsentrasi amonium sulfat 0,5 % dalam media fermentasi merupakan konsentrasi yang optimal untuk produksi manitol.

Sumber nitrogen berupa garam amonium seperti amonium sulfat dapat menciptakan kondisi asam dalam media fermentasi karena akan melepaskan ion asam bebas ketika ion amonium digunakan oleh sel (Stanbury, Whitaker, dan Hall, 1995). Pelepasan ion asam bebas ke dalam media fermentasi yang menyebabkan kondisi asam dapat menghambat proses pertumbuhan sel. Hal ini dapat terlihat berdasarkan hasil pengamatan pada pertumbuhan sel khamir dalam media fermentasi yang menggunakan amonium sulfat 0,25%; 0,5%, dan 0,75%. Biomassa sel terbesar didapat pada media dengan amonium sulfat 0,25%, yaitu 3,028 mg/mL. Penurunan biomassa sel terjadi seiring dengan penambahan konsentrasi amonium sulfat.



#### 4.4.3 Optimasi Konsentrasi Fruktosa

Fruktosa dalam media fermentasi pada penelitian ini adalah substrat utama yang akan dikonversi menjadi manitol sehingga perlu dioptimasi konsentrasi penggunaan terbaiknya dalam media fermentasi. Konsentrasi fruktosa 2,5% atau 25 g/L dapat menghasilkan manitol sebanyak 6,76 g/L. Konsentrasi fruktosa 5% atau 50 g/L dapat menghasilkan manitol sebesar 10,95 g/L. Konsentrasi fruktosa 7,5% atau 75 g/L dapat menghasilkan manitol sebesar 10,83 g/L. Sementara konsentrasi fruktosa 10% atau 100 g/L dapat menghasilkan manitol sebesar 13,82 g/L. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa konsentrasi fruktosa yang paling optimum sebagai substrat untuk menghasilkan manitol adalah sebesar 10%. Hasil rinci dari percobaan optimasi konsentrasi fruktosa dapat dilihat pada Tabel 4.10.

Namun demikian, kondisi fermentasi dengan menggunakan substrat fruktosa 10% ini kurang efisien karena jumlah fruktosa yang tersisa dalam media fermentasi masih sangat banyak, yaitu 84,63 g/L dari total 100 g/L fruktosa yang digunakan dalam media. Sementara jumlah fruktosa yang dikonsumsi oleh sel hanya sebesar 15,37 g/L. Hal ini dapat terjadi karena jumlah sel khamir yang diinokulasikan dan yang tumbuh dalam media fermentasi masih kurang memadai, sehingga konsumsi fruktosa oleh sel untuk dikonversi menjadi manitol dan juga untuk pertumbuhan sel menjadi lebih sedikit. Akibatnya proses fermentasi menjadi kurang efisien karena menyisakan fruktosa yang cukup banyak dalam media. Oleh sebab itu, jumlah sel awal yang diinokulasikan ke dalam media fermentasi harus cukup banyak agar proses fermentasi berjalan optimal. Pada penelitian fermentasi xilitol oleh khamir *Debaryomyces hansenii*, diketahui bahwa produksi xilitol meningkat apabila densitas sel awal yang diinokulasikan meningkat (Parajo, Dominguez, H., dan Dominguez, J. M., 1996).

Sementara itu, pada percobaan ini juga diketahui bahwa biomassa sel yang terbentuk berkurang seiring dengan pertambahan kadar fruktosa dalam media. Konsentrasi biomassa sel yang terbentuk pada media dengan konsentrasi fruktosa 2,5%; 5%; 7,5%, dan 10 % berturut-turut yaitu 2,508 ; 2,349 ; 2,301 ; dan 2,191 mg/mL. Hal ini disebabkan karena konsentrasi fruktosa yang semakin tinggi

dalam media dapat menyebabkan kenaikan tekanan osmotik yang dapat menghambat pertumbuhan sel.

#### 4.4.4 Optimasi Pengaruh Penambahan Ion Logam

Mineral atau ion logam diketahui dapat mempengaruhi produksi sejumlah gula-gula poliol dan aktivitas enzim yang terlibat dalam sintesis gula poliol (Lee, 2000), sehingga perlu diketahui pula pengaruhnya terhadap proses fermentasi manitol. Berdasarkan percobaan, didapatkan bahwa media dengan penambahan  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,01%,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,01%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,01%, dan  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,01% dapat menghasilkan manitol berturut-turut sebesar 10,45 g/L; 10,96 g/L; 7,63 g/L, dan 6,63g/L. Dari hasil ini diketahui bahwa penambahan logam  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,01%, dan  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,01% memiliki pengaruh yang baik terhadap produksi manitol, sedangkan penambahan logam  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,01% dan  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,01% tidak memiliki pengaruh signifikan terhadap produksi manitol. Hasil lebih lengkap dari percobaan optimasi pengaruh ion logam dapat dilihat pada Tabel 4.11.

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Lee J.K. dkk. menunjukkan bahwa penambahan ion logam  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Cu}^{2+}$  pada fermentasi manitol menggunakan khamir *Candida magnoliae* dapat meningkatkan produksi manitol. Hal ini disebabkan karena  $\text{Ca}^{2+}$  dapat mempengaruhi permeabilitas sel terhadap manitol dan  $\text{Cu}^{2+}$  dapat meningkatkan aktivitas enzim manitol dehidrogenase di dalam sel. Hasil yang lebih baik bisa didapatkan dengan efek sinergis dari  $\text{Ca}^{2+}$  terhadap permeabilitas sel  $\text{Cu}^{2+}$  terhadap aktivitas enzim manitol dehidrogenase (Lee J.K et. al, 2007). Hal ini bersesuaian dengan proses fermentasi manitol menggunakan *Debaryomyces hansenii* UICC Y-276 pada penelitian ini, yaitu penambahan ion logam  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Cu}^{2+}$  menyebabkan peningkatan produksi manitol.

#### 4.5 Optimasi Kondisi Aerasi

Kondisi aerasi merupakan faktor penting fermentasi karena berkaitan dengan suplai udara dan oksigen ke dalam media fermentasi. Pada penelitian ini, dilakukan optimasi kondisi aerasi dengan menggunakan labu erlenmeyer 250 mL yang diisi dengan media fermentasi sebanyak 75 mL, 100 mL, 150 mL. Dari hasil

pengamatan didapatkan bahwa kondisi aerasi terbaik dihasilkan pada volume media fermentasi 150 mL yang menghasilkan manitol 8,18 g/L, sedangkan kondisi aerasi dengan volume media 100 mL dan 75 mL menghasilkan manitol sebesar 7,32 g/L dan 4,13 g/L. Pada percobaan ini, kondisi aerasi yang terbatas dapat menghasilkan manitol dengan kadar yang paling besar. Hasil lengkap dari percobaan optimasi kondisi aerasi dapat dilihat pada Tabel 4.12.

Khamir *Debaryomyces hansenii* dapat menghasilkan xilitol dari xilosa pada kondisi yang sangat dipengaruhi oleh keberadaan oksigen. Pada kondisi sangat anaerob, biokonversi xilosa menjadi xilitol tidak dapat berlangsung. Sedangkan pada kondisi sangat aerob, substrat yang ada digunakan untuk produksi biomassa sel, sehingga laju biokonversi xilitol menjadi rendah. Pada proses produksi xilitol ini, akumulasi produk xilitol akan meningkat pada kondisi aerasi yang terbatas, yaitu ketika terdapat sejumlah oksigen yang cukup yang dapat digunakan untuk meregenerasi NADH untuk tahap oksidatif kedua, sehingga NAD(P)H digunakan untuk mereduksi xilosa menjadi xilitol (Breuer dan Harms, 2006). Kondisi serupa juga dimungkinkan terjadi pada proses biokonversi manitol dari fruktosa oleh sel khamir *Debaryomyces hansenii*, sehingga kondisi yang paling optimal untuk fermentasi manitol adalah dengan aerasi terbatas.

Sementara itu, pertumbuhan biomassa sel sebanding dengan kondisi aerasi yang baik. Kondisi fermentasi dengan aerasi yang besar menghasilkan pertumbuhan sel yang lebih besar. Hal ini dapat diketahui berdasarkan percobaan bahwa pada volume media 75 mL, biomassa sel yang diperoleh paling banyak, yaitu sebesar 2,461 mg/mL, sedangkan fermentasi dengan volume media 150 mL menghasilkan biomassa sel yang terkecil yaitu 2,349 mg/mL. Hal ini terjadi karena kondisi aerasi yang cukup baik akan memberikan suplai oksigen yang cukup untuk pertumbuhan sel. Kondisi kekurangan atau ketiadaan oksigen dapat menyebabkan pertumbuhan khamir jenis *Debaryomyces hansenii* ini menjadi kurang optimal (Breuer dan Harms, 2006).



## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

1. Pada penelitian ini telah didapatkan isolat khamir metilotrop dari tanah persawahan yang mampu menghasilkan manitol dari fruktosa, yaitu isolat A yang mampu menghasilkan manitol sebesar 3,06 g/L dari total substrat fruktosa sebesar 50 g/L. Sementara itu, khamir terbaik yang dapat menghasilkan manitol adalah *Debaryomyces hansenii* UICC Y-276, yaitu sebanyak 11,12 g/L dari total substrat fruktosa dalam media fermentasi sebanyak 50 g/L.
2. Kondisi optimum fermentasi manitol yang didapatkan pada penelitian ini yaitu dengan melakukan kultivasi pada hari ketiga, konsentrasi amonium sulfat 0,5 %, konsentrasi substrat fruktosa 10 %, penambahan logam  $\text{CuSO}_{4.5\text{H}_2\text{O}}$  0,01%, dan kondisi aerasi dengan menggunakan volume media 150 mL dalam wadah erlenmeyer 250 mL.

#### 5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian untuk mengidentifikasi lebih lanjut isolat khamir metilotrop yang didapat yang mampu menghasilkan manitol hingga diketahui spesiesnya.
2. Perlu dilakukan optimasi kondisi fermentasi lainnya agar dapat menghasilkan manitol lebih optimum dengan *yield value* yang tinggi.

## DAFTAR ACUAN

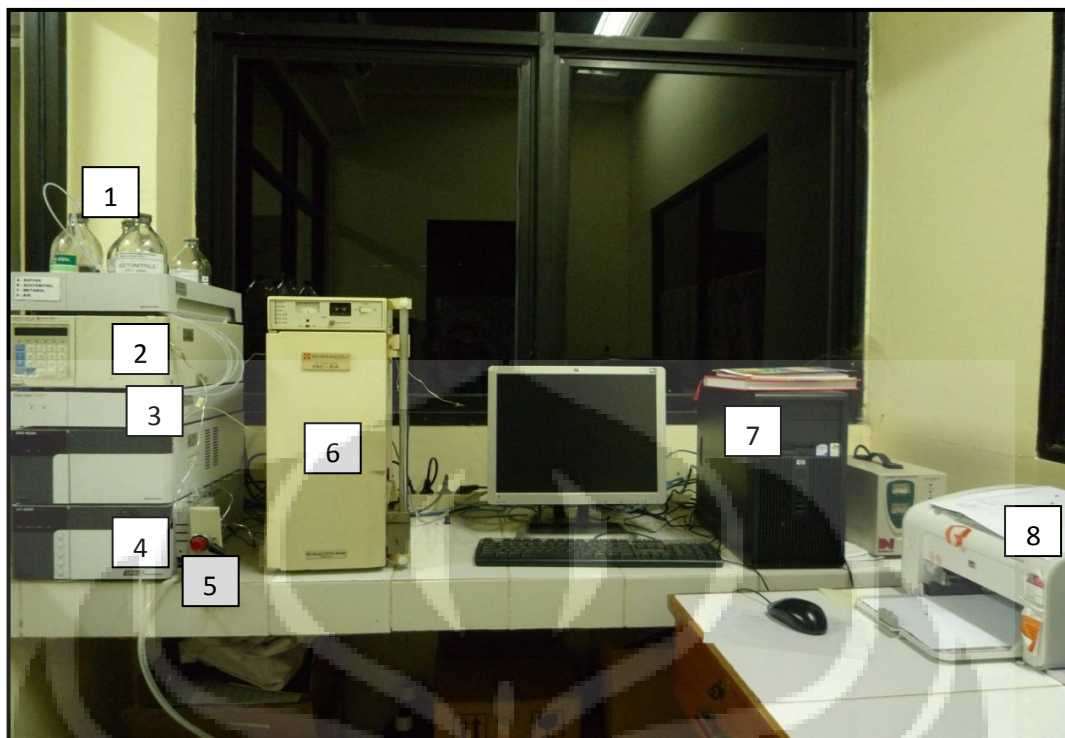
- Asthana, H., Humphrey, A. E., dan Moritz, V. (1971). Growth of Yeast on Methanol as the Sole Carbon Substrate. *J. Biotechnol. Bioeng.*, 13 : 923-929.
- Bornet, F. R. J. (1994). Undigestible sugar in food products. *Am. J. Clin. Nutr.*, 59 (suppl), 763S-769S.
- Botha, A. (2006). Yeast in Soil. In Carlos Rosa & Gabor Peter (Ed.). *Biodiversity and Ecophysiology of Yeast*. Germany : Springer Verlag, 222.
- Breuer, U. dan Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii* -an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Wiley InterScience* 23: 415–437.
- Campbel, N. A, Reece, J. B., dan Mitchell, L. G. (2003). *Biologi*. Jilid 2. (Ed. Ke-5). (Wasmen Manalu, Penerjemah). Jakarta : Penerbit Erlangga, 193.
- Deak, T. (2006). Environmental Factors Influencing Yeasts. In Carlos Rosa & Gabor Peter (Ed.). *Biodiversity and Ecophysiology of Yeast*. Germany : Springer Verlag, 155-162.
- Departemen Kesehatan. (1995). *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta : Departemen Kesehatan RI, 519.
- Gandjar, I., Sjamsuridzal, W., dan Oetari, A. (2006). *Mikologi Dasar dan Terapan*. Jakarta : Yayasan Obor Indonesia, 39-45, 165-166.
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar, 392-393.
- Hanson, R. dan Hanson, T.E. (1996). Methanotrophic Bacteria. *J. Microbiol. Reviews*, 60 : 439-471.
- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok : Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia, 101, 115-128.
- Harley, J.P., dan Prescott, L.M. (2002). *Laboratory Exercise in Microbiology*. (5th ed.). USA : The Mc. Graw-Hill Companies, 368.

- Hiroya Y., Masahide O., dan Yasuyoshi S. (2011). Yeast Methylo-trophy : Metabolism, Gene Regulation, and Peroxisome Homeostasis. *Int. J. Microbiol.*, 1-8.
- Jamieson, P. R. (2012). Sorbitol and Mannitol. In O' Brien Nabors (Ed.). *Alternative Sweetener*. (4th ed.). New York : CRC Press, 334-335.
- Johnson, E.L., dan Stevenson, R. (1991). *Dasar Kromatografi Cair*. (Kosasih Padmawinata, Penerjemah). Bandung : Institut Teknologi Bandung, 9-10.
- Kavanagh, K. (2005). *Fungi : Biology and Applications*. England : John Wiley & Son, 3, 155.
- Koji I. dan Yoshihiro S. (2005). Salt-Regulated Mannitol Metabolism in Algae. *J. Mar. Biotechnol.*, 7 : 407-415.
- Lee J.K, Ha S.J., Kim S.Y., dan Oh D.K. (2000). Increased erythritol production in *Torula sp.* by  $Mn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$ . *Biotechnol. Lett.*, 22 : 983-986.
- Lee J.K, Oh D.K, Song H.Y., dan Kim I.W. (2007).  $Ca^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  supplementation increases mannitol production by *Candida magnoliae*. *Biotechnol. Lett.*, 29:291-294.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., dan Clark, D. P. (2011). *Biology of Microorganisms*. (13th ed.). San Fransisco : Benjamin Cummings, 605.
- Negruta, O., Csutak, O., Stoica, I., Rusu, E., dan Vassu, T. (2010). Methylo-trophic yeasts: diversity and methanol metabolism. *Romanian Biotechnol. Lett.*, 15 : 5369-5375.
- Parajo, J. C., Dominguez, H., and Dominguez, J. M. (1996). Production of xylitol from concentrated wood hydrolysates by *Debaryomyces hansenii* : effect of the initial cell concentration. *Biotechnol. Lett.*, 18 : 593-598.
- Radji, M. (2011). *Buku Ajar Mikrobiologi : Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Jakarta : Penerbit EGC, 33.

- Saha, B. C., dan Racine, F. M. (2011). Biotechnological production of manitol and its applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89 : 879–891.
- Seung H. S. dan Vieille, C. (2009). Recent advances in the biological production of manitol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84 : 55–62.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., dan Dolan, J. W. (2010). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. (3rd ed.). USA : John Wiley & Son, 177-179.
- Song K. H, *et al.* (2002). Production of manitol by a novel strain of *Candida magnoliae*. *Biotechnol. Lett.*, 24: 9–12.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., dan Hall, S. J. (1995). *Principles of Fermentation Technology*. (2nd ed.). Great Britain : Elsevier, 1, 9, 101.
- Suryadi, H., Tohoru K., Nobuyuki Y., Shinsuke S., dan Yoshiki T. (2000). Polyol Production by Culture of Methanol-Utilizing Yeast. *J. Biosc. Bioeng.*, 89 : 236-240.
- Wisselink, H. W. (2004). Metabolic Engineering of Manitol Production in *Lactococcus lactis*. Thesis Wageningen University, Netherlands, 14, 19-24.



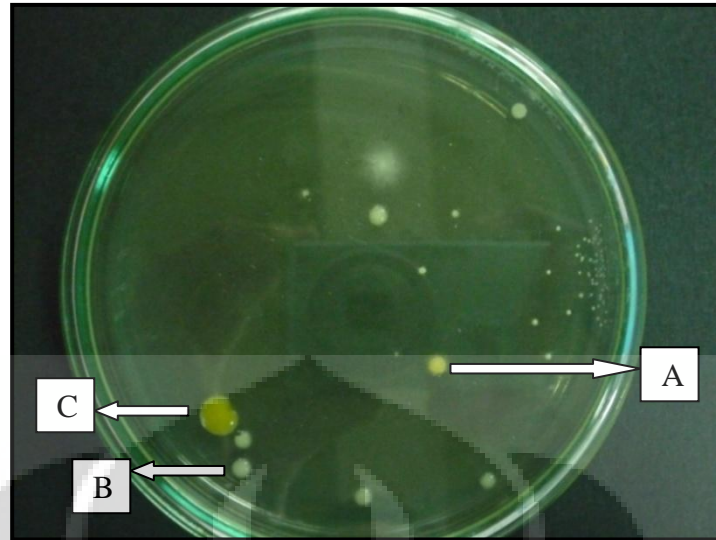
# GAMBAR



Keterangan :

1. Wadah penampung fase gerak
2. Detektor Indeks Bias (Shimadzu RID-10A)
3. Degasser (Shimadzu DGU-20A5)
4. Pompa (Shimadzu LC-20AD)
5. Injektor
6. Oven kolom (Shimadzu CTO-6AS)
7. Komputer untuk memproses data
8. Printer

**Gambar 3.1** Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)



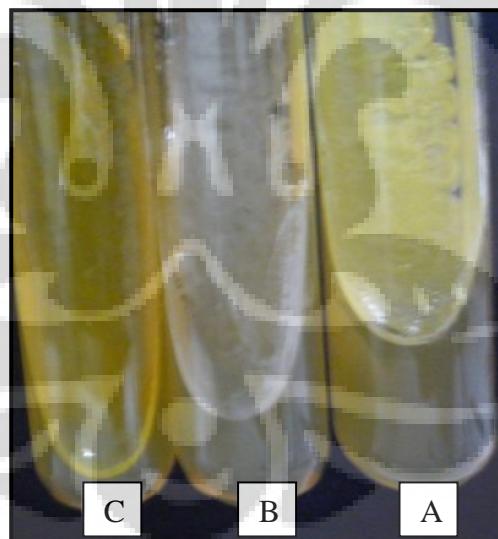
Keterangan :

A = Isolat A (kuning muda)

B = Isolat B (putih krem)

C = Isolat C (kuning mengkilat)

**Gambar 4.1** Koloni isolat khamir hasil isolasi pada cawan petri



Keterangan :

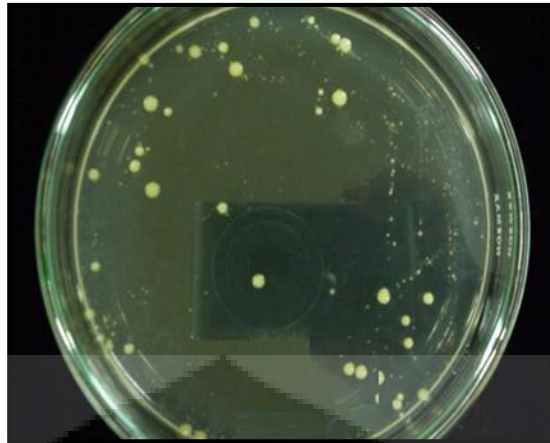
A = Isolat A (kuning muda)

B = Isolat B (putih krem)

C = Isolat C (kuning mengkilat)

**Gambar 4.2** Koloni isolat khamir hasil isolasi pada media agar miring

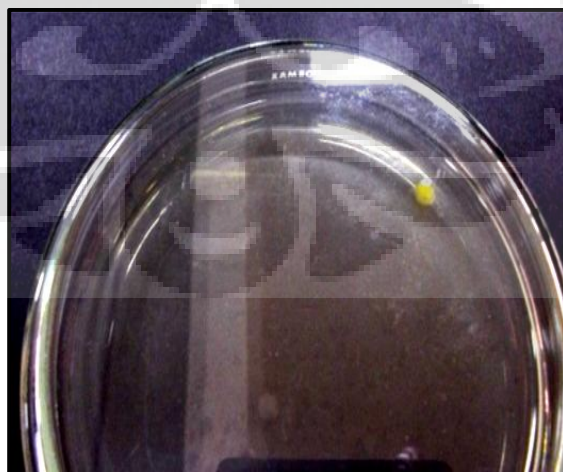




**Gambar 4.3** Koloni khamir isolat A (kuning muda) pada cawan petri

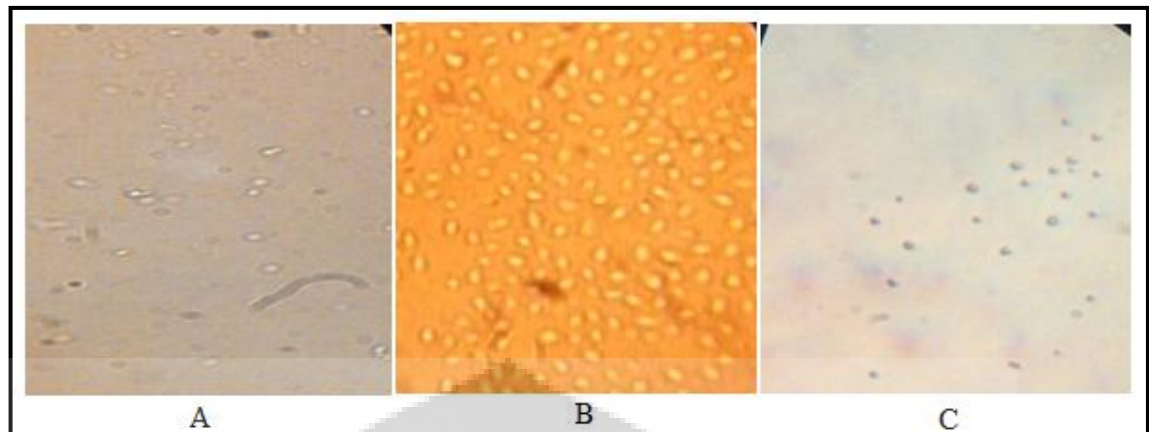


**Gambar 4.4** Koloni khamir isolat B (putih krem) pada cawan petri



**Gambar 4.5** Koloni khamir isolat B (kuning mengkilat) pada cawan petri





Keterangan :

A = Isolat A (kuning muda)

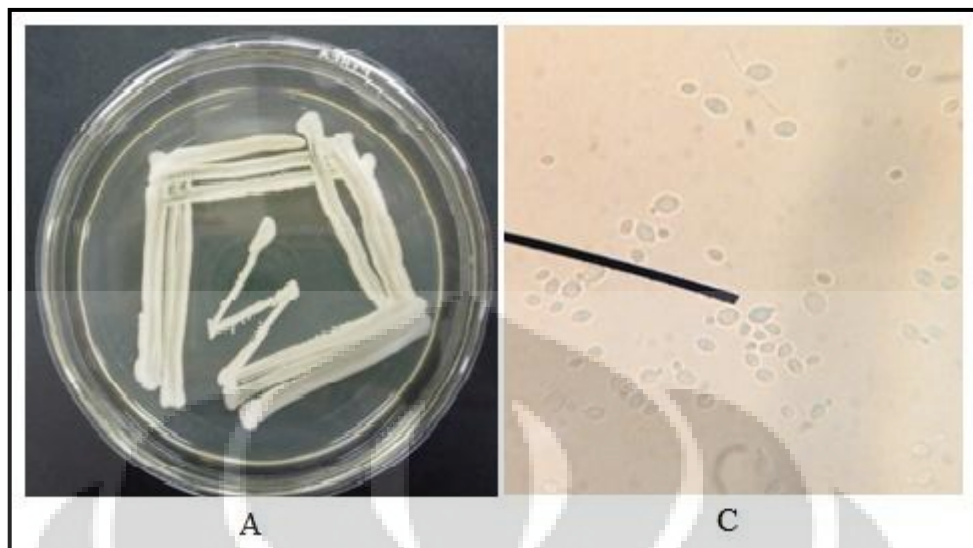
B = Isolat B (putih krem)

C = Isolat C (kuning mengkilat)

**Gambar 4.6** Mikroskopik isolat khamir hasil isolasi dengan perbesaran 100x



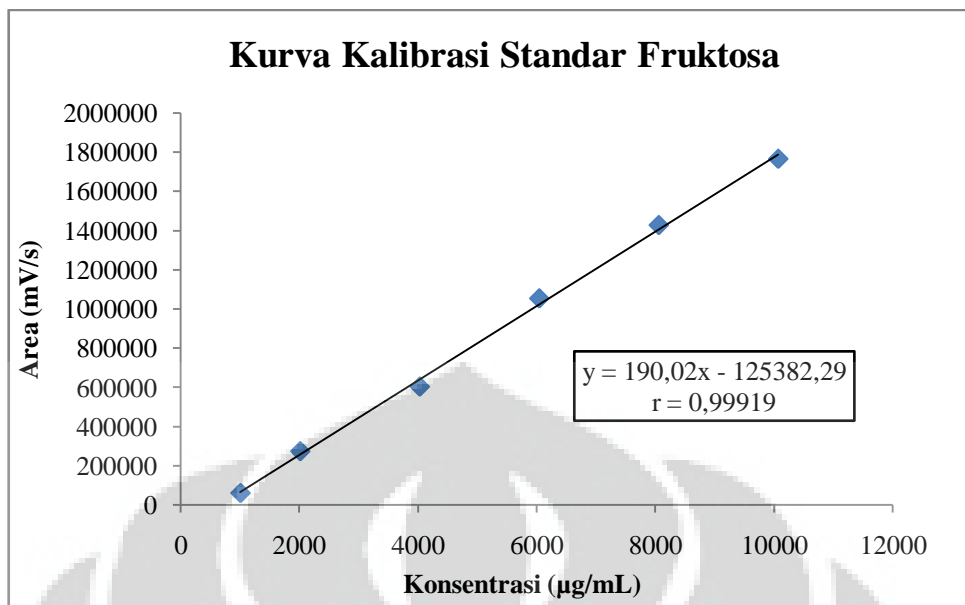
**Gambar 4.7** Biakan khamir *Debaryomyces hansenii* UICC Y-276, *Debaryomyces nepalensis* UICC Y-328, dan *Candida sp.* UICC Y-216 pada media agar miring.



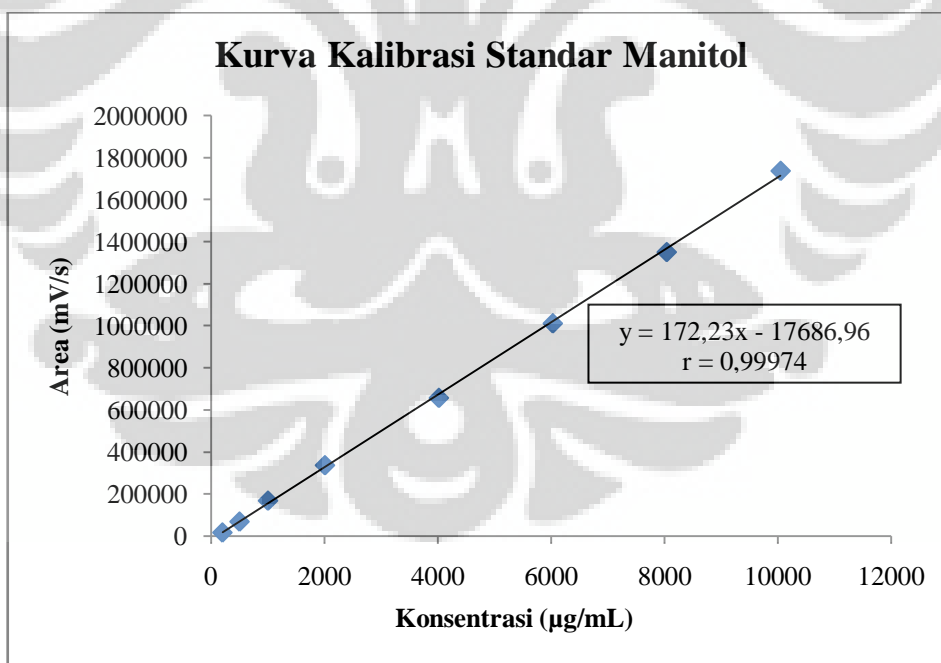
**Gambar 4.8** Koloni khamir *Debaryomyces hansenii* UICC Y-276, (A) secara makroskopik pada cawan petri dan (B) secara mikroskopik dengan perbesaran 100x.



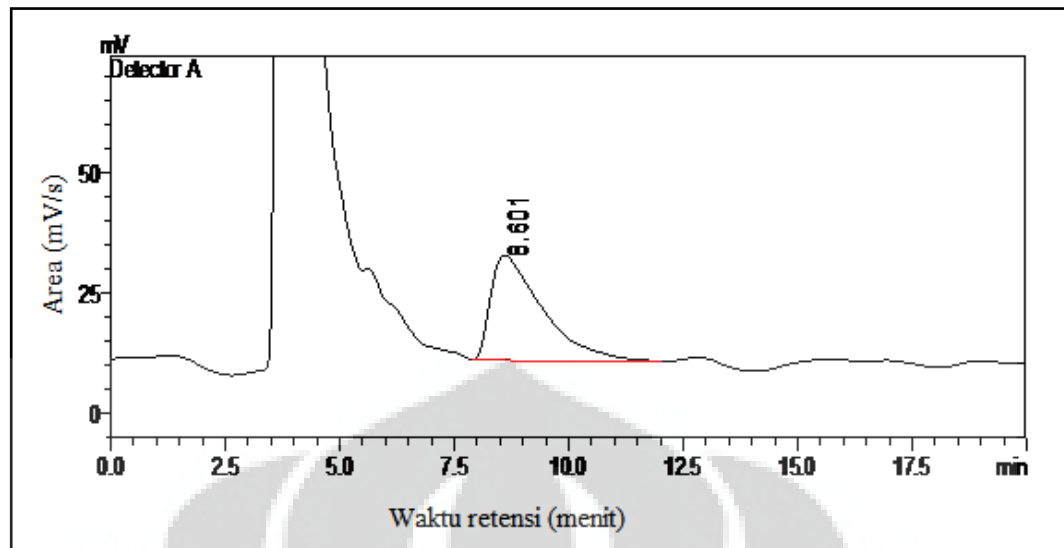
**Gambar 4.9** Proses fermentasi dengan penggojokan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 175 rpm pada suhu kamar.



**Gambar 4.10** Kurva kalibrasi standar fruktosa



**Gambar 4.11** Kurva kalibrasi standar manitol



Keterangan :

Waktu retensi fruktosa = 8,601 menit

Kondisi analisis :

Kondisi analisis

Kolom : Waters® *carbohydrate analysis* 10  $\mu\text{m}$ , 300 x 3,9 mm

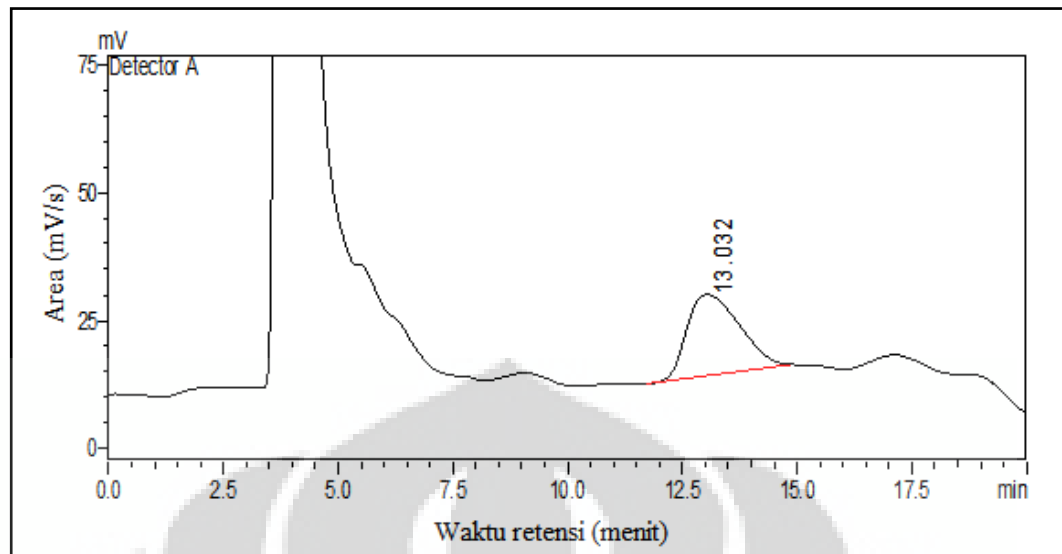
Fase gerak : Asetonitril-air (93:7)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20  $\mu\text{L}$

**Gambar 4.12** Kromatogram standar fruktosa 10.000 ppm



Keterangan :

Waktu retensi manitol = 13,032 menit

Kondisi analisis

Kolom : Waters® *carbohydrate analysis* 10  $\mu\text{m}$ , 300 x 3,9 mm

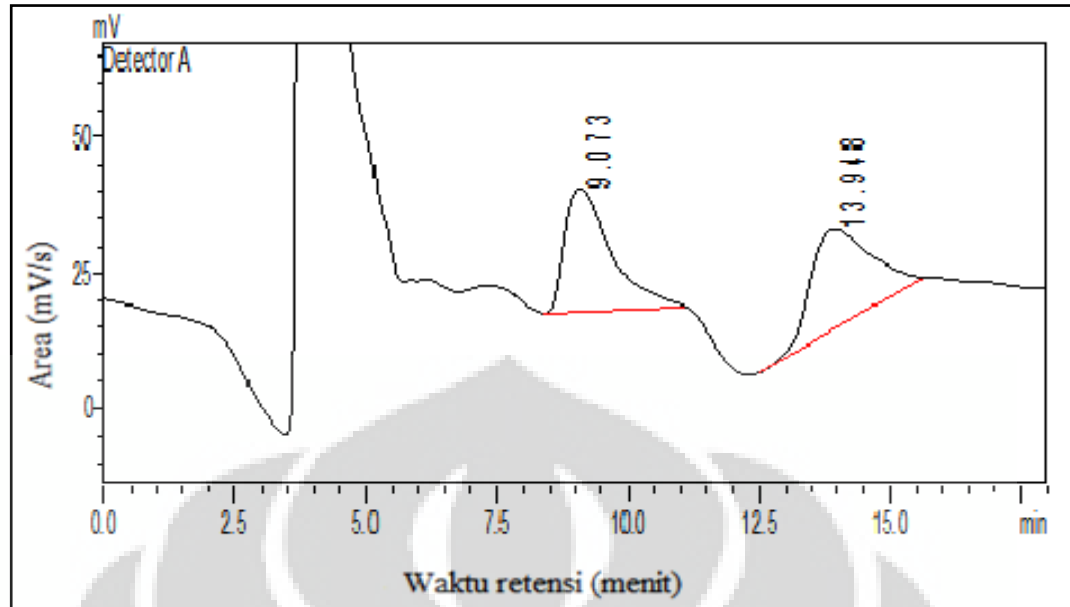
Fase gerak : Asetonitril-air (93:7)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20  $\mu\text{L}$

**Gambar 4.13** Kromatogram standar manitol 10.000 ppm



Keterangan :

waktu retensi fruktosa = 9,073 menit

waktu retensi manitol = 13,948 menit

Kondisi analisis

Kolom : Waters® *carbohydrate analysis* 10  $\mu$ m, 300 x 3,9 mm

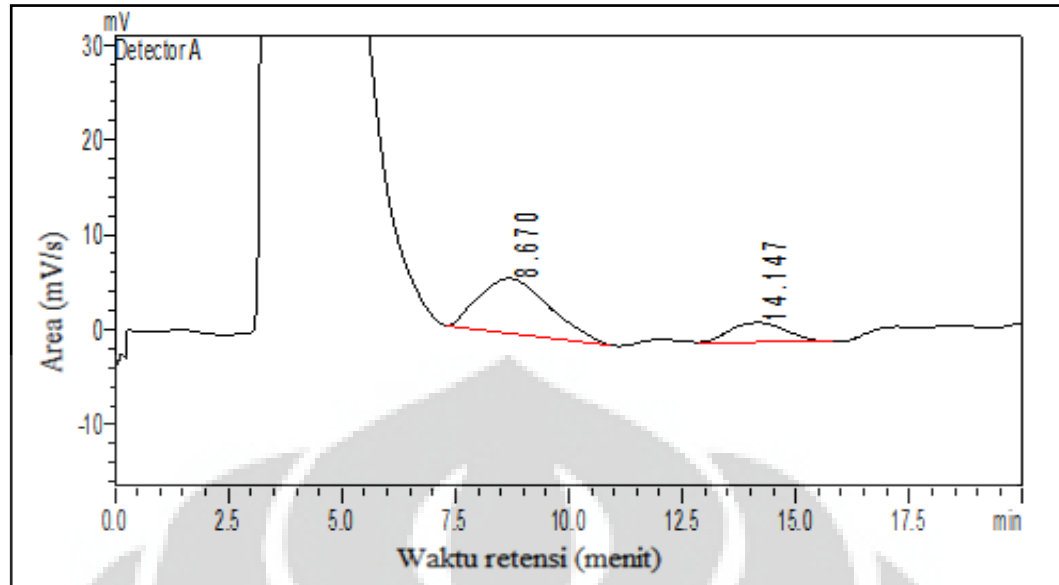
Fase gerak : Asetonitril-air (93:7)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20  $\mu$ L

**Gambar 4.14** Kromatogram campuran standar fruktosa dan manitol 10.000 ppm



Keterangan :

Waktu retensi fruktosa = 8,670

Waktu retensi manitol = 14,147

Kondisi analisis

Kolom : Waters® *carbohydrate analysis* 10  $\mu\text{m}$ , 300 x 3,9 mm

Fase gerak : Asetonitril-air (93:7)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20  $\mu\text{L}$

**Gambar 4.15** Kromatogram fruktosa dan manitol dalam sampel fermentasi pada media fermentasi yang mengandung amonium sulfat 0,5%





**Tabel 4.1** Hasil Pengukuran Kurva Kalibrasi Fruktosa

Konsentrasi Fruktosa ( $\mu\text{g/mL}$ )	Luas Puncak (mV/s)
1006,8	59413
2013,6	272413
4027,2	602087
6040,8	1052794
8054,4	1426834

Keterangan :

$$a = -125382,29$$

$$b = 190,02$$

$$r = 0,99919$$

$$\text{persamaan kurva kalibrasi} = y = 190,02x - 125382,29$$

**Tabel 4.2** Hasil Pengukuran Kurva Kalibrasi Manitol

Konsentrasi Manitol ( $\mu\text{g/mL}$ )	Luas Puncak (mV/s)
200,96	16858
502,4	68688
1004,8	168111
2009,6	336576
4019,2	656879
6028,8	1011061
8038,4	1350128
10048	1736150

Keterangan :

a = -17686,96

b = 172,23

r = 0,99974

Persamaan kurva kalibrasi =  $y = 172,23x - 17686,96$

**Tabel 4.3** Data Hasil Uji Perolehan Kembali Standar Fruktosa dan Manitol

Zat	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Area ( $\text{mV/s}$ )	Perolehan kembali (%)	Rata – rata (%)	Simpangan baku (%)	Koefisien variasi (%)
Fruktosa	9980	1762502	99,54	99,11	0,62	0,63
	10030	1758227	98,82			
	10060	1772802	99,30			
	10220	1783294	98,28			
	10010	1752507	98,72			
	10050	1784376	99,99			
Manitol	10010	1719123	100,74	99,91	0,96	0,96
	9990	1697182	99,66			
	10190	1739670	100,13			
	10140	1743935	100,87			
	10040	1709758	99,89			
	10060	1683962	98,21			

Kondisi analisis

Kolom : Waters® *carbohydrate analysis* 10  $\mu\text{m}$ , 300 x 3,9 mm

Fase gerak : Asetonitril-air (93:7)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20  $\mu\text{L}$

**Tabel 4.4** Data Hasil Uji Presisi Standar Fruktosa dan Manitol

Area (mV/s)		Rata – rata area (mV/s)		Koefisien variasi (%)	
Fruktosa	Manitol	Fruktosa	Manitol	Fruktosa	Manitol
1772802	1690793	1767031	1728163	1,04	1,27
1792291	1726630				
1743446	1747892				
1776146	1743935				
1770064	1715795				
1747439	1743935				

Rata-rata waktu retensi fruktosa = 8,742

Rata-rata waktu retensi manitol = 13,343

Kondisi analisis

Kolom : Waters® *carbohydrate analysis* 10 µm, 300 x 3,9 mm

Fase gerak : Asetonitril-air (93:7)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20 µL

Konsentrasi : Fruktosa = 10060 µg/mL, Manitol= 10190 µg/mL

**Tabel 4.5** Hasil Skrining Pertumbuhan Isolat Khamir dalam Media yang Mengandung Metanol

Isolat Khamir	Tabung	OD <sub>0</sub>	Odt	ΔOD
<i>Candida sp.</i> UICC Y-216	A	0,0160	0,0178	0,0018
	B	0,0182	0,0212	0,0030
<i>Debaryomyces hansenii</i> var <i>hansenii</i> UICC Y-276	A	0,0422	0,0465	0,0033
	B	0,0350	0,0459	0,0109
<i>Debaryomyces nepalensis</i> UICC Y-328	A	0,0118	0,0242	0,0124
	B	0,0151	0,0270	0,0119
Isolat A (Kuning Muda)	A	0,0337	0,0609	0,0272
	B	0,0674	0,0828	0,0154
Isolat B (Putih)	A	0,0237	0,0304	0,0067
	B	0,0121	0,0234	0,0113
Isolat C (Kuning Mengkilat)	A	0,0193	0,0402	0,0209
	B	0,0186	0,0449	0,0263

Keterangan :

OD<sub>0</sub> = Nilai kerapatan optik suspensi isolat khamir pada  $\lambda = 600$  nm sebelum diinkubasi.

Odt = Nilai kerapatan optik suspensi isolat khamir pada  $\lambda = 600$  nm setelah diinkubasi selama 2 hari pada suhu kamar.

ΔOD = Pertambahan nilai kerapatan optik suspensi isolat khamir pada  $\lambda = 600$  nm antara setelah dan sebelum diinkubasi selama 2 hari pada suhu kamar.

**Tabel 4.6** Hasil Skrining Kemampuan Fermentasi Manitol dari Masing-masing Isolat Khamir

<b>Isolat Khamir</b>	<b>Kadar Fruktosa Tersisa (g/L)</b>	<b>Kadar Fruktosa Terkonsumsi (g/L)</b>	<b>Kadar Manitol (g/L)</b>	<b>Yield Value (%)</b>
<i>Candida sp.</i> UICC Y-216	8,77	41,23	2,16	5,24
<i>Debaryomyces hansenii</i> var <i>hansenii</i> UICC Y-276	22,04	27,92	11,12	39,83
<i>Debaryomyces nepalensis</i> UICC Y-328	25,49	24,51	3,10	12,65
Isolat A (kuning muda)	30,03	19,97	3,06	15,32
Isolat B (putih krem)	27,09	22,91	-	0
Isolat C (kuning mengkilat)	36,40	13,6	-	0

Keterangan :

Sampel hasil fermentasi diambil pada hari ketiga dan dianalisis menggunakan KCKT dengan detektor indeks bias, fase gerak asetonitril-air (93:7), laju alir 1,0 ml/menit, dan volume injeksi = 20  $\mu$ L.

**Tabel 4.7** Hasil Penentuan Bobot Sel Kering

No	Volume media (mL)	Bobot Endapan (mg)	Bobot Sel Kering (mg/mL)
1	10	29,6	2,96
2	10	29,2	2,92
3	10	29,2	2,92
Rata-rata bobot sel kering			2,93





**Tabel 4.8** Hasil Optimasi Waktu Kultivasi Fermentasi

<b>Kultivasi</b>	<b>Biomassa sel (mg/mL)</b>	<b>Fruktosa tersisa (g/L)</b>	<b>Fruktosa terkonsumsi (g/L)</b>	<b>Manitol yang dihasilkan (g/L)</b>	<b>Yield value (%)</b>
hari ke 2	2,742	41,91	8,09	2,29	28,30
hari ke 3	2,988	38,76	11,24	9,44	83,98
hari ke 4	3,166	35,22	14,78	4,96	33,55

**Tabel 4.9** Hasil Optimasi Konsentrasi Amonium Sulfat dalam Media Fermentasi

<b>Konsentrasi Amonium Sulfat (%)</b>	<b>Biomassa sel (mg/mL)</b>	<b>Fruktosa Tersisa (g/L)</b>	<b>Fruktosa Terkonsumsi (g/L)</b>	<b>Manitol yang dihasilkan (g/L)</b>	<b>Yield value (%)</b>
0,25%	3,028	33,1	16,9	8,98	53,13
0,50%	2,988	38,76	11,24	9,44	83,98
0,75%	2,900	40,99	9,01	7,07	78,46

**Tabel 4.10** Hasil Optimasi Konsentrasi Substrat Fruktosa

<b>Konsentrasi Fruktosa (g/L)</b>	<b>Biomassa sel (mg/mL)</b>	<b>Fruktosa Tersisa (g/L)</b>	<b>Fruktosa Terkonsumsi (g/L)</b>	<b>Manitol yang Dihasilkan (g/L)</b>	<b>Yield value (%)</b>
25	2,508	15,58	9,42	6,76	71,76
50	2,349	34,93	15,07	10,95	72,66
75	2,301	56,5	18,5	10,83	58,54
100	2,191	84,63	15,37	13,82	89,91

**Tabel 4.11** Hasil Optimasi Pengaruh Ion Logam

<b>Logam</b>	<b>Biomassa sel (mg/mL)</b>	<b>Fruktosa Tersisa (g/L)</b>	<b>Fruktosa Terkonsumsi (g/L)</b>	<b>Manitol yang Dihasilkan (g/L)</b>	<b>Yield value (%)</b>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,01%,	2,999	31,68	18,32	10,46	57,09
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O 0,01%,	0,519	36,86	13,14	10,97	83,48
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,01%,	0,913	31,35	18,65	8,65	46,38
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,01%	2,529	22,17	27,83	7,65	27,48

**Tabel 4.12** Hasil Optimasi Kondisi Aerasi

No	Volume media (mL)	Biomassa sel (mg/mL)	Fruktosa Tersisa (g/L)	Fruktosa Terkonsumsi (g/L)	Manitol yang Dihasilkan (g/L)	Yield value (%)
1	75	2,461	41,49	8,51	4,13	48,53
2	100	2,423	36,15	13,85	7,32	52,85
3	150	2,349	38,65	11,35	8,18	72,07



# LAMPIRAN

Lampiran 1  
Cara Memperoleh Resolusi

Resolusi atau daya pisah :

$$R = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2} \quad (4.1)$$

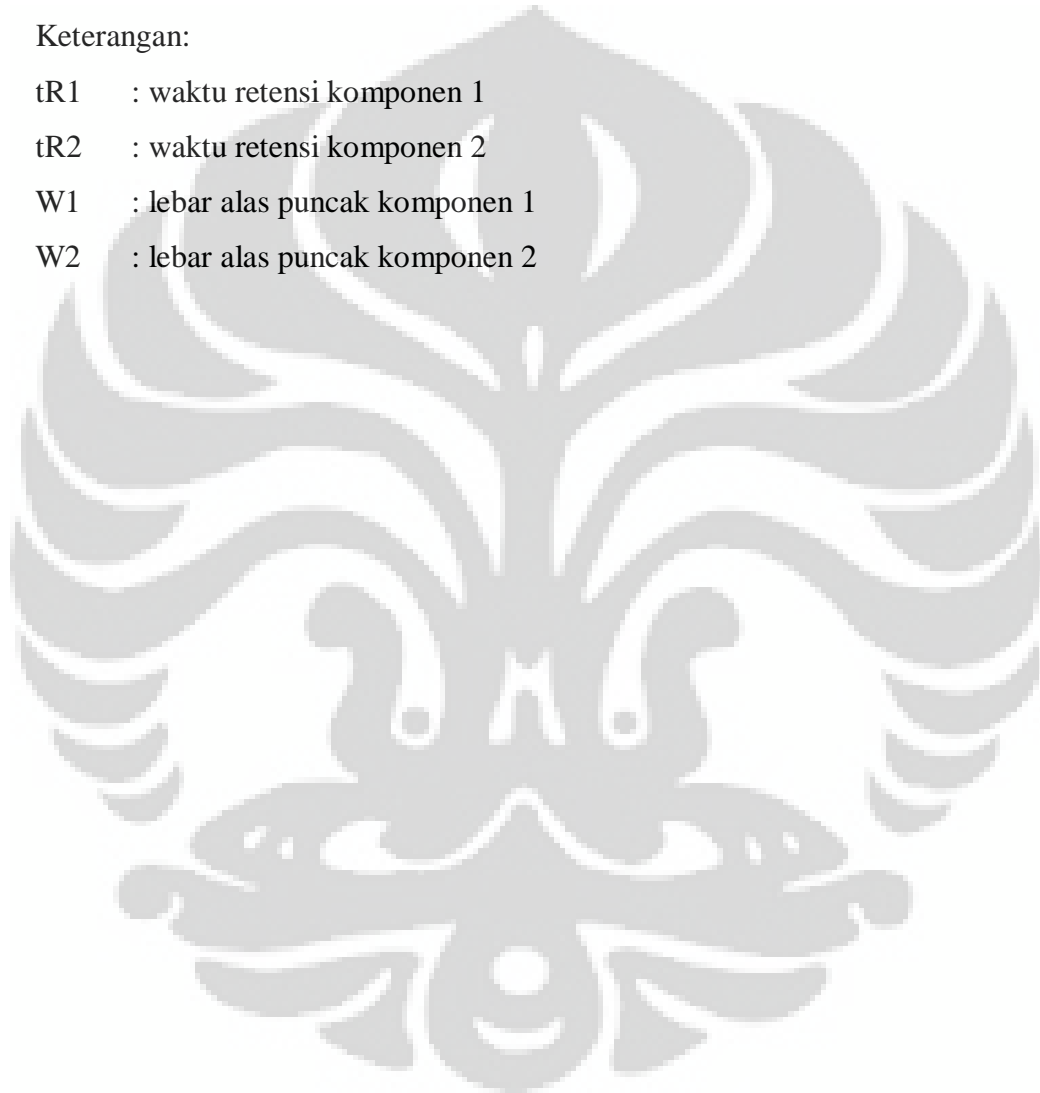
Keterangan:

$t_{R1}$  : waktu retensi komponen 1

$t_{R2}$  : waktu retensi komponen 2

$W_1$  : lebar alas puncak komponen 1

$W_2$  : lebar alas puncak komponen 2



Lampiran 2  
Cara Memperoleh Persamaan Regresi Linier

Persamaan garis  $y = a + bx$

Untuk memperoleh nilai  $a$  dan  $b$  digunakan metode kuadrat terkecil (*least square*)

$$a = \frac{(\sum yi)(\sum xi^2) - (\sum xi)(\sum xi \cdot yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2} \quad (4.2)$$

$$b = \frac{N(\sum xi \cdot yi) - (\sum xi)(\sum yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2} \quad (4.3)$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi ( $r$ )

$$r = \frac{N(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{[N(\sum x^2) - (\sum x)^2 \times N(\sum y^2) - (\sum y)^2]^{1/2}} \quad (4.4)$$

Lampiran 3  
Cara Perhitungan Uji Perolehan Kembali

Persen perolehan kembali :

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{B}{A} \times 100\% \quad (4.5)$$

Keterangan:

A = Konsentrasi hasil penimbangan

B = Konsentrasi hasil penyuntikan





Lampiran 4  
Cara Perhitungan Koefisien Variasi

Rata – rata :

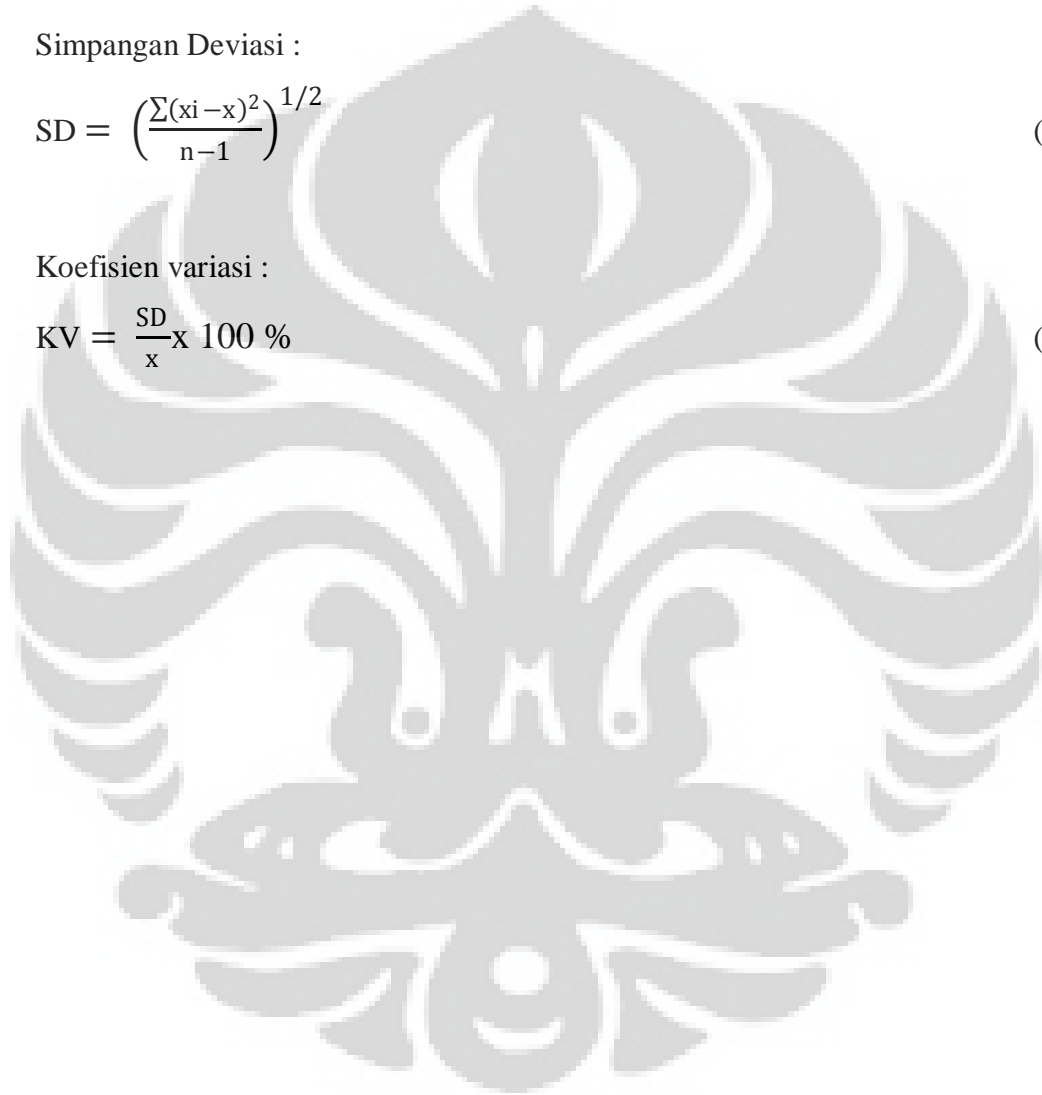
$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} \quad (4.6)$$

Simpangan Deviasi :

$$SD = \left( \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \right)^{1/2} \quad (4.7)$$

Koefisien variasi :

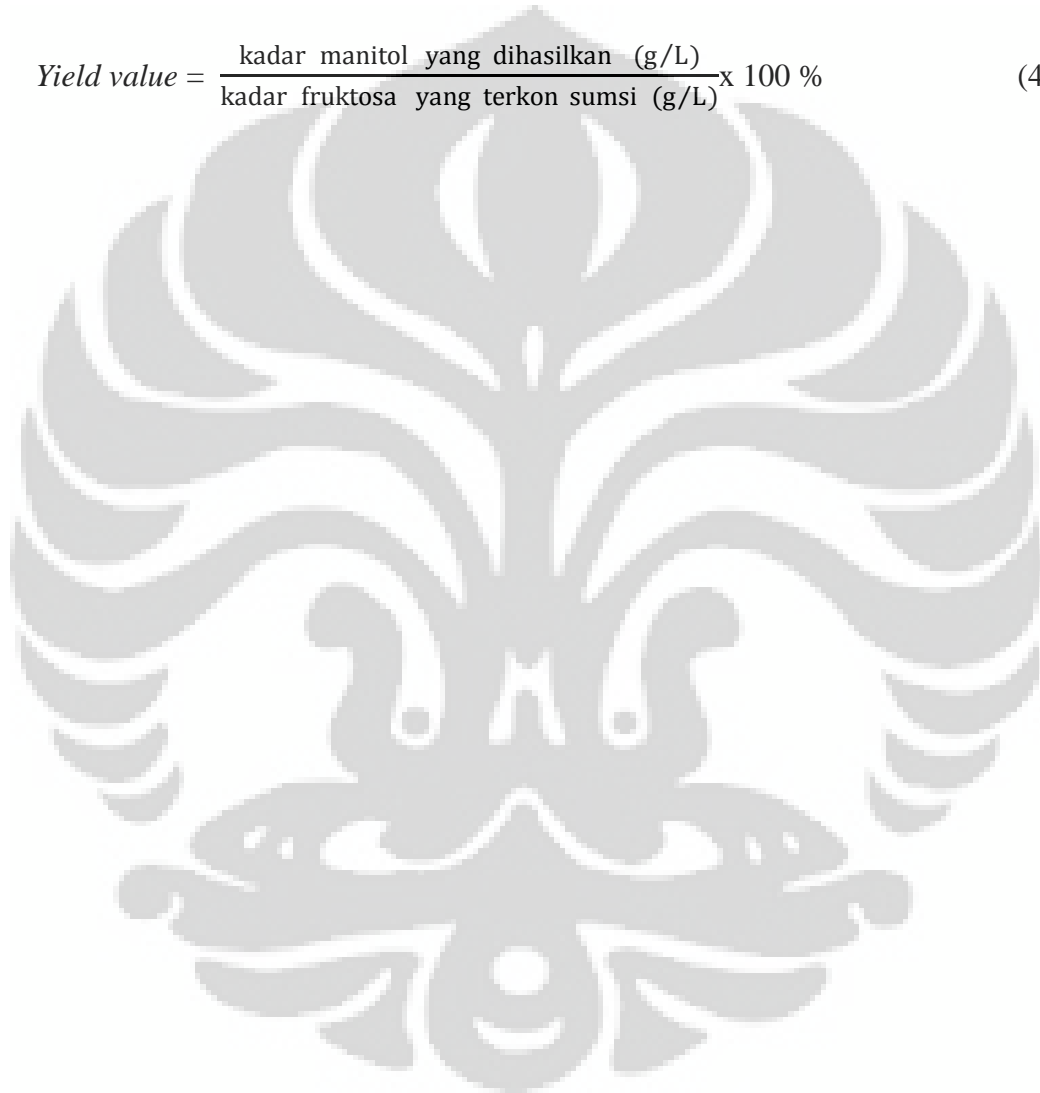
$$KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \% \quad (4.8)$$



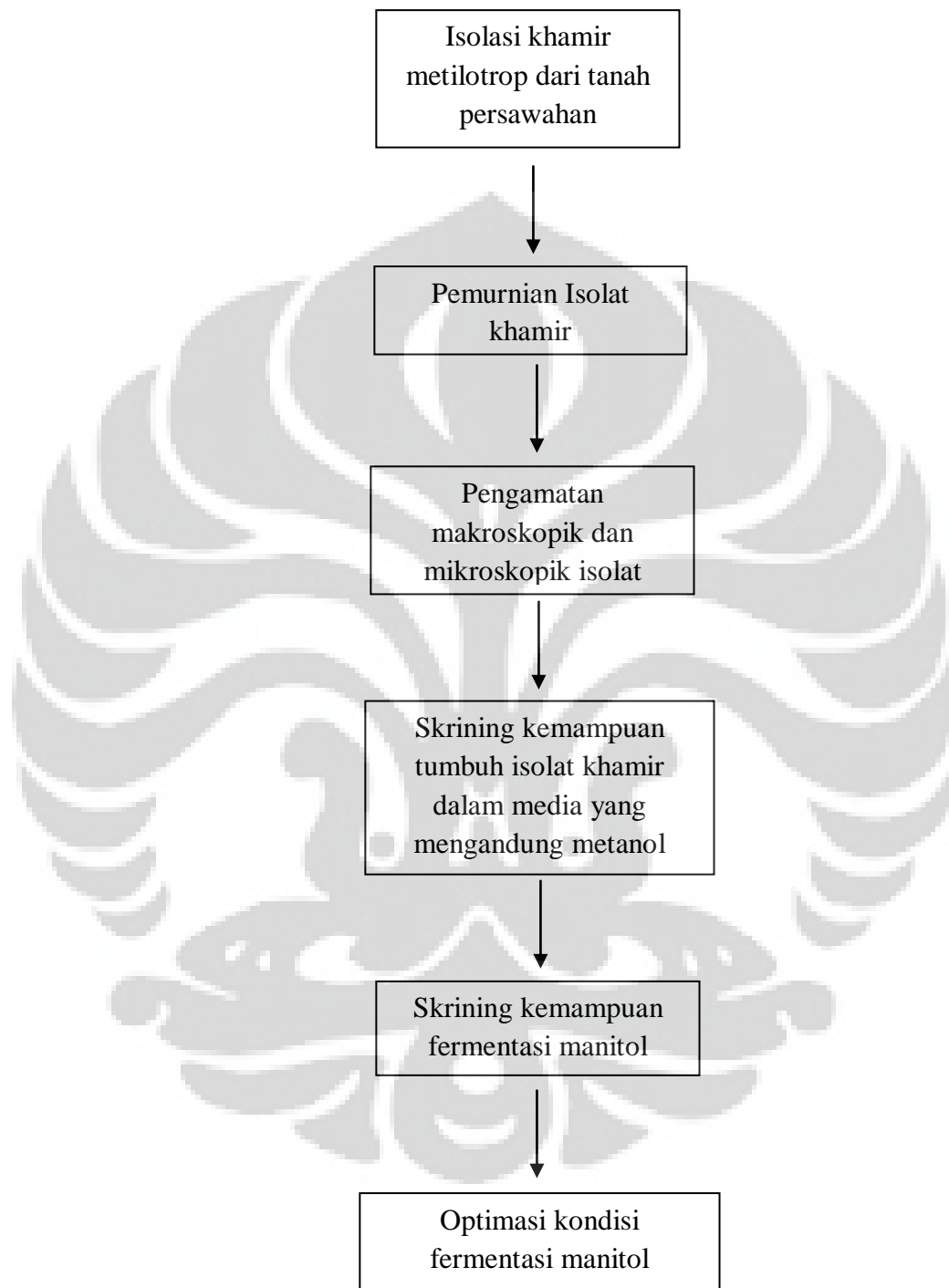
Lampiran 5  
Cara Penentuan Biomassa Sel dan *Yield Value* Manitol

$$\text{Biomassa sel (mg/mL)} = \text{OD}_{600 \text{ nm}} \times 10 \times 2,25 \text{ mg/MI} \quad (4.9)$$


$$\text{Yield value} = \frac{\text{kadar manitol yang dihasilkan (g/L)}}{\text{kadar fruktosa yang terkonsumsi (g/L)}} \times 100 \% \quad (4.10)$$



Lampiran 6  
Skema Kerja Penelitian



Lampiran 7  
Sertifikat Analisis Fruktosa



## Certificate of Analysis

---

1.05323.0000 D(-)Fructose for microbiology  
Batch K38461623

---

	Batch Values
Identity (IR-spectrum)	conforms
Spec. rotation ( $\alpha$ 20/D, 10 %, water)	-93 °
Heavy metals (as Pb)	$\leq 0.001$ %
TLC-Test	conforms
Water	$\leq 0.5$ %
Suitability for microbiology	conforms

Test date (DD.MM.YYYY):	15.08.2010
Expiry date (DD.MM.YYYY):	31.05.2013

Dr. Tanja Wagner  
\_\_\_\_\_  
responsible laboratory manager quality control

*This document has been produced electronically and is valid without a signature*

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany): +49 6151 72-0  
84-7 20842710512300000 V 099 Date 17.12.2010

Page 1 of 1

Lampiran 8  
Sertifikat Analisis Manitol

18 Aug 2011 15:21 (+0100) GMT Pages 1 of 3

**gill**

14AM00700  
B/03/12/0359

CARGILL SRL-DIV AMIDI DERIV. SPECIALITA  
VIA CERESTAR, 1  
RO ROVIGO  
I-45035 CASTELMASSA

542 Fax: 00492151575939

### Certificate of Analysis/Conformity

---

Product : C\*PharmMannidex 16700 Volume (kg) : 11000.0  
 Product description : Mannitol Order number : 17559400  
 Lot number : 05065153 ✓ Packing description : 70025 M/0025  
 Number of units : 440 Shipment date : 18-aug-2011  
 Production date : 18 JUL 2011 ✓

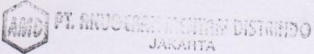
Producing Plant: Cargill srl Div.Amidi-Der-Spec - Via Cerestar 1 - 45035 CastelmaSSa (RO) Italy - Tel: +39 0425 84850  
 Fax: +39 0425 848410

---

**Analysis**

Parameter	Unit	Result	Min	Max
Tot. aerobic microbial count Ph.Eur. /g		3 ✓		1000
Tot. combined yeasts/moulds count Ph.Eur		3 ✓		100
E. coli Ph.Eur. /g		absent	absent	absent
Salmonella Ph.Eur. /10g		absent	absent	absent
Identification C Ph.Eur. IR		pass test ✓	pass test	pass test
Appearance of solution Ph.Eur.		pass test ✓	pass test	pass test
Conductivity Ph.Eur.	µS/cm	0.9 ✓		20.0
Red. sugars Ph.Eur.	%	<0.20 ✓		0.20
Related substances Ph.Eur. on d.b.	%	pass test ✓	pass test	pass test
Related substances, disregard limit Ph.E	%	0.05 ✓		0.05
Related substances, total Ph.Eur. on d.b	%	0.94 ✓		2.00
Related substances, unspecified Ph.Eur.	%	<0.05 ✓		0.10
Impurity, isomalt Ph.Eur. on d.b.	%	0.13 ✓		2.00
Impurity, maltitol Ph.Eur. on d.b.	%	<0.05 ✓		2.00
Impurity, sorbitol Ph.Eur. on d.b.	%	0.81 ✓		2.00
Water Ph.Eur.	%	0.13 ✓		0.50
Mannitol, assay Ph.Eur. on d.b.	%	98.1 ✓	93.0	102.0
Tot. aerobic microbial count Ph.Eur. /g		3 ✓		1000
Tot. combined yeasts/moulds count Ph.Eur		3 ✓		100
E. coli Ph.Eur. /g		absent	absent	absent
Salmonella Ph.Eur. /10g		absent	absent	absent
Lead Ph.Eur.	ppm	<0.5 ✓		0.5
Nickel Ph.Eur.	ppm	<1 ✓		1

We herewith confirm that this batch has been tested to the quality requirements. Test results are within the agreed limits.

 PT. ANSO CORP. INDONESIA DISTRICTO  
JAKARTA

Page 1 / 3

Date: 18-aug-2

(lanjutan)

18 Aug 2011 15:21 (+0100) GMT Pages 2 of 3

CARGILL SRL-DIV AMIDI OLEFINI S.P.A. GALLIA  
VIA CERESTAR, 1  
PO ROVIGO  
31044 GALLIA (TV) ITALIA

**gill**

Conformity

Parameter	Unit	Min	Max
Identification A Ph.Eur. sp.opt.rot.	°	23	25
Identification B Ph.Eur. melt.point	°C	165	170
Identification D Ph.Eur. HLC		pass test	pass test
Characters Ph.Eur.		pass test	pass test
Identification USP/NF IR		pass test	pass test
Acidity USP/NF	ml		0.3
Chloride USP/NF	%		0.007
Loss on drying USP/NF	%		0.3
Specific rotation USP/NF	°	137	145
Reducing sugars USP/NF	ml	pass test	pass test
Mannitol, assay USP/NF on d.b.	%	96.0	101.5
Melting range USP/NF	°C	164	169
Sulfate USP/NF	%		0.01
Tot. aerobic microbial count USP/NF /g			1000
Tot. combined yeasts/moulds count USP/NF			170
E. coli USP/NF /g		absent	absent
Salmonella USP/NF /10g		absent	absent
Arsenic USP/NF	ppm		1
Identification 1 JP/JPE		pass test	pass test
Identification 2 JP/JPE		pass test	pass test
Chloride JP/JPE	%		0.007
Sulfate JP/JPE	%		0.01
Mannitol, assay JP/JPE on d.b.	%	98.0	
Clarity and color of solution JP/JPE		pass test	pass test
Acid JP/JPE		pass test	pass test
Loss on drying JP/JPE	%		0.3
Melting Point JP/JPE	°C	166	169
Optical rotation JP/JPE	°	137	145
Residue on ignition JP/JPE	%		0.10
Sugars JP/JPE	ml		1.0
Heavy metals JPE	ppm		10
Arsenic JPE	ppm		1.3
Nickel JP/JPE		pass test	pass test

We herewith confirm that this batch is in compliance with the quality requirements.

This product is in compliance with:  
 European Pharmacopoeia 7 (Ph.Eur.7)  
 Japanese Pharmacopoeia XV  
 United States Pharmacopoeia 34 / National Formulary 29 (USP34/NF29)  
 Best before date for packed product = production date + 24 months.

PT. MANUCORPERSA SUDIRMAN DISTINDO  
JASARITA

Order number :17559400 Lot number :05063699 Page 2 / 3 Date : 18-08-2011