



UNIVERSITAS INDONESIA

**BIOKONVERSI FRUKTOSA MENJADI MANITOL MENGGUNAKAN *RESTING CELL*
KHAMIR METILOTROP ISOLAT LOKAL**

SKRIPSI

**NISA YULIANTI SUPRAHMAN
0806327944**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JUNI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**BIOKONVERSI FRUKTOSA MENJADI MANITOL MENGGUNAKAN *RESTING CELL*
KHAMIR METILOTROP ISOLAT LOKAL**

SKRIPSI

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

**NISA YULIANTI SUPRAHMAN
0806327944**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JUNI 2012**

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, 12 Juli 2012



Nisa Yulianti Suprahman

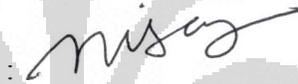
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Nisa Yulianti Suprahman

NPM : 0806327944

Tanda Tangan :



Tanggal : 12 Juli 2012

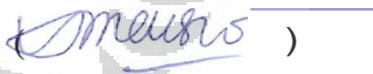
HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Nisa Yulianti Suprahman
NPM : 0806327944
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Biokonversi Fruktosa Menjadi Manito)
Menggunakan *Resting Cell* Khamir Metilotrop Isolat Lokal

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

DEWAN PENGUII

Pembimbing I : Dr. Herman Suryadi, M.S., Apt ()
Pembimbing II : Dr. Harmita Apt ()
Penguji I : Dr. Amarila Malik, M.Si., Apt ()
Penguji II : Dr. Berna Elya, M.Si ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal



“... untuk Ibunda dan Ayahanda tercinta, yang selalu melukis namaku dengan indah dalam setiap sujud dan doa mereka”

KATA PENGANTAR

Puja dan Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah *subhanahu wa ta'ala*, karena atas rahmat, cinta dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini adalah dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat pencapaian gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Dalam proses penelitian sampai penulisan skripsi ini, penulis telah banyak mendapatkan berbagai dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada :

- (1) Bapak Dr. Herman Suryadi, M.S., Apt selaku dosen pembimbing I yang telah membimbing penulis dalam penelitian dan penulisan skripsi serta banyak memberikan dukungan dan bantuan yang sangat bermanfaat berupa nasehat, ilmu, dan motivasi.
- (2) Bapak Dr. Harmita Apt selaku dosen pembimbing II yang membimbing penulis serta memberikan ilmu dan nasihat selama penelitian dan penyusunan skripsi.
- (3) PT. Kalbe Farma atas pemberian standar manitol yang digunakan dalam penelitian ini.
- (4) Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
- (5) Seluruh Staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia atas ilmu pengetahuan, pengalaman, nasihat serta motivasi yang diberikan kepada penulis.
- (6) Seluruh laboran serta staf karyawan Farmasi terutama Mbak Catur, Mas Tri, Mba Lia, Mas Ardi dan Mba Vindi yang telah banyak membantu penulis selama masa pendidikan, penelitian dan skripsi.
- (7) Mama dan Papa untuk setiap doa yang diuraikan dalam diam dan sholatnya, cinta dalam setiap untaian kata dan gerak langkah serta kepercayaan yang telah mengokohkan keteguhan penulis.
- (8) Tete, Mas Andi dan Aa untuk setiap doa dan tawa canda yang kita urai bersama, serta Keisha untuk gelak dan diamnya yang menggemaskan.

- (9) Rekan Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi yaitu Basyar, Mei, Rahmi, Ola, Merri, Adi, Neti, Editha, Lina dan Furqon serta Rekan Laboratorium Kimia Farmasi Analisis yaitu Yogo, Nurul, Citra dan Cyntiani.
- (10) Sahabat-sahabat terkasih, yaitu Dian, Neti, Nurlisa dan Seruni serta Keluarga PPSDMS NF atas setiap cinta, motivasi dan doa yang diberikan kepada penulis.
- (11) Seluruh Mahasiswa Farmasi atas kerjasama, suka duka, motivasi, dan bantuan yang diberikan kepada penulis.
- (12) Serta seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah berjasa dan berarti bagi penulis.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini jauh dari sempurna, dan penulis mengharapkan saran serta kritik yang membangun. Akhir kata, penulis berharap Allah *subhanahu wa ta'ala* membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi perkembangan 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 : Nisa Yulianti Suprahman
NPM : 0806327944
Program Studi : Satjana
Departemen : Farmasi
Fakultas : MIPA
Jenis karya : Skripsi

demikian pengernbangan ilmu pengetahuan, rnenyetujui untuk rnenberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Biokonversi Fruktosa Menjadi Manitol Menggunakan *Resting Cell* Khamir Metilotrop Isolat Lokal

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ml Universitas Indonesia berhak rnenytrnpan, rnenalih rnedialformat-kan, rnenelola dalam bentuk pangkalan data (database), rnerawat, dan rmenublikasikan 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



(Nisa Yulianti Suprahman)

ABSTRAK

Nama : Nisa Yulianti Suprahman
Program Studi : Farmasi
Judul : Biokonversi Fruktosa Menjadi Manitol Menggunakan *Resting Cell*
Khamir Metilotrop Isolat Lokal

Manitol adalah gula poliol yang digunakan secara luas sebagai bahan tambahan makanan dan eksipien farmasetika yang juga memiliki beberapa manfaat kesehatan. Manitol dapat diproduksi baik melalui ekstraksi dari tumbuhan *Fraxinus ornus*; proses hidrogenasi kimiawi; maupun biokonversi menggunakan mikroorganisme. Proses biokonversi menggunakan mikroorganisme lebih banyak dipilih terutama karena tidak dihasilkan sorbitol yang sulit dipisahkan. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi optimum produksi manitol dengan menggunakan *resting cell* khamir metilotrop isolat terpilih. Isolasi khamir dilakukan dari tanah untuk mendapatkan khamir metilotrop yang berpotensi menghasilkan manitol. Kemudian dilakukan skrining terhadap isolat yang didapatkan dan tiga isolat UICC, yaitu *Candida sp*, *Debaryomyces nepalensis* dan *Debaryomyces hansenii*. Optimasi fermentasi dilakukan dengan menetapkan variasi terhadap waktu kultivasi, konsentrasi *resting cell*, konsentrasi substrat, penambahan ammonium sulfat dan kondisi aerasi. Analisis produk dilakukan menggunakan KCKT dengan kolom Waters dan detektor indeks bias (RID) dengan laju alir 1,0 mL/menit dan volume injeksi 20 μ L. Hasil skrining menunjukkan bahwa *Debaryomyces hansenii* adalah galur terpilih untuk biokonversi manitol. Kondisi optimum biokonversi manitol dari setiap variabel adalah fermentasi dengan 140 mg/mL *resting cell* selama 3 hari; penggunaan fruktosa 10%; penambahan Ammonium Sulfat 0,75%; dan fermentasi menggunakan volume media 15 ml dalam erlenmeyer 50 mL, dengan *yield value* terbaik yang didapatkan adalah 61,15%.

Kata Kunci : Khamir, Mannitol, *Resting Cell*, Fermentasi, Optimasi
xiv+71 halaman; 11 Gambar, 9 Tabel
Daftar Pustaka :31(1955-2012)

ABSTRACT

Name : Nisa Yulianti Suprahman
Program Study : Pharmacy
Title : Bioconversion of Fructose to Mannitol by *Resting Cell* of Local Isolated Methylophilic Yeast

Mannitol is a polyol sugar widely used as food additive *and* pharmaceutical excipient which also has health benefits. Mannitol can be produced by various ways, such as the extraction from plant, *Fraxinus ornus*; the conversion of fructose into mannitol by enzymatic process; and also bioconversion by microorganism. Bioconversion by microorganism is widely chosen mainly because it does not produce sorbitol which is hard to be separated. The objective of this study was obtaining optimum condition for the production of mannitol by using resting cell of selected local isolated methylophilic yeast. Isolation from soil is done to get methylophilic yeasts that have ability to produce mannitol. After that, screening was done over the isolated yeast and UICC isolate, *Candida sp*, *Debaryomyces nepalensis* dan *Debaryomyces hansenii*. From that procedure, *Debaryomyces hansenii* was known to be able to produce mannitol with highest value. Optimization of fermentation was done by varying the cultivation time, resting cell concentration, substrate concentration, ammonium sulphate addition and aeration condition. Product analysis conducted using HPLC with Waters column and refractive index detector (RID). It was showed that the optimum condition of each variables are reached by fermentation of 140 mg/mL resting cell for three days; fermentation with fructose 10%; fermentation with the addition of Ammonium Sulphate 0,75%; and fermentation with the use of 15 ml media in erlenmeyer flask 50 mL, with the highest yield value 61,15%

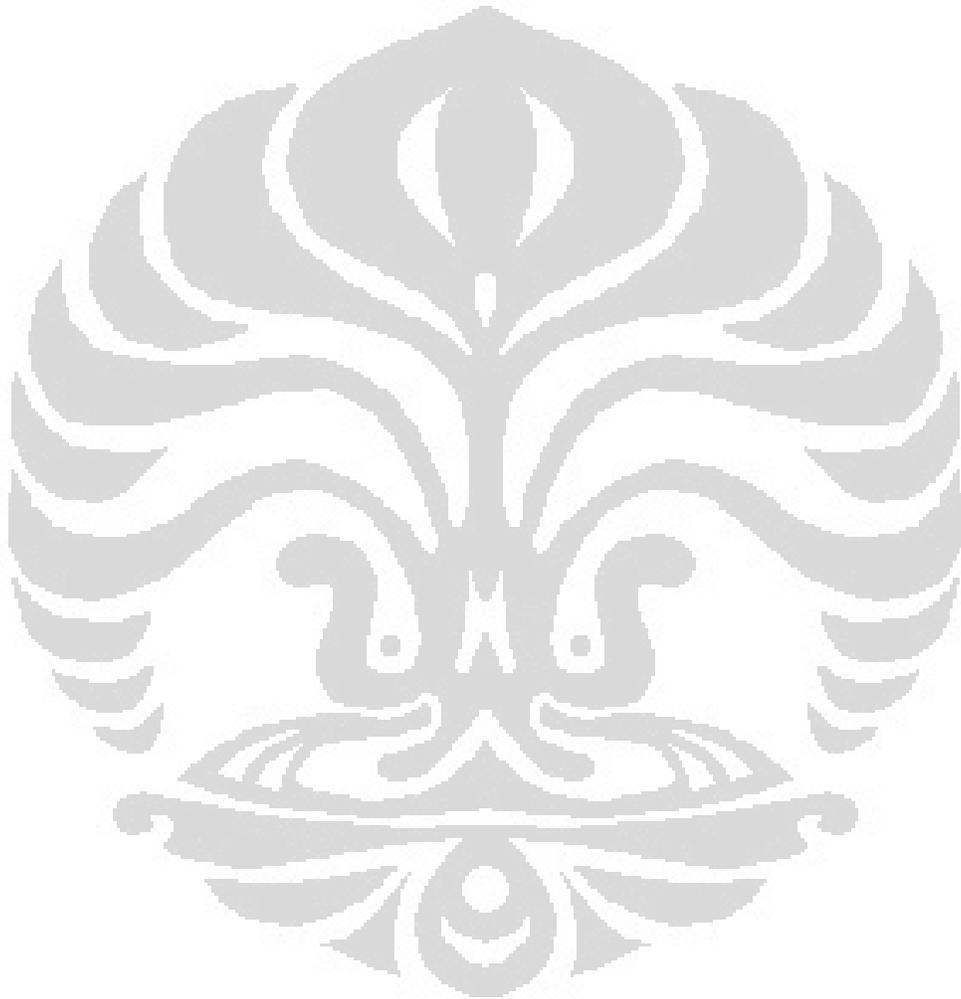
Keywords : mannitol, *resting cell*, fermentation
xiv+ 74 pages : 11 pictures; 9 tables;
Bibliography: 31 (1955-2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR^{g1}xii	
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan.....	2
2 TINJAUAN PUSTAKA.	3
2.1 Manitol.....	3
2.1.1 Gambaran Umum dan Aplikasi Manitol.....	3
2.1.2 Produksi Manitol.....	4
2.2 Khamir	6
2.2.1 Morfologi	6
2.2.2 Nutrisi	8
2.2.3 Metabolisme	10
2.2.4 Pertumbuhan.....	12
2.3 <i>Resting Cell</i>	13
2.4 Khamir Metilotrop.....	14
2.5 Metode Isolasi	15
2.6 Fermentasi.....	17
2.7 Media Kultivasi.....	18
2.8 Pengukuran Massa Sel.....	20
2.8.1 Bobot Sel Kering.....	20
2.8.2 Turbidimetri.....	21
2.9 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	21
3 METODE PENELITIAN.....	23
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	23
3.2 Alat.....	23
3.3 Bahan.....	23
3.3.1 Sampel.....	23
3.3.2 Bahan Kimia.....	24
3.4 Cara Kerja.....	24
3.4.1 Sterilisasi Alat	25
3.4.2 Penyiapan Media.....	25
3.4.2.1 Media Isolasi	25
3.4.2.2 Media Peremajaan	25

3.4.2.3 Media Prakultur	26
3.4.2.4 Media Skrining Kemampuan Fermentasi Manitol	27
3.4.2.5 Media Optimasi Fermentasi	27
3.4.3 Isolasi Khamir Metilotrop dari tanah Sawah.....	28
3.4.4 Pemurnian Isolat Khamir	28
3.4.5 Pengamatan Makroskopik dan Mikroskopik	28
3.4.5.1 Pengamatan Makroskopik	28
3.4.5.2 Pengamatan Mikroskopik.....	29
3.4.6 Peremajaan Isolat	29
3.4.7 Penyiapan Prakultur	29
3.4.8 Skrening Kemampuan Tumbuh dalam Metanol sebagai Sumber Karbon Tunggal.....	29
3.4.9 Skrining Kemampuan Biokonversi Manitol	30
3.4.10 Pembuatan <i>Resting Cell</i>	30
3.4.11 Optimasi Kondisi Biokonversi Manitol	30
3.4.11.1 Optimasi Waktu Fermentasi.....	30
3.4.11.2 Optimasi Konsentrasi <i>Resting Cell</i>	31
3.4.11.3 Optimasi Konsentrasi Fruktosa	31
3.4.11.4 Optimasi Penambahan Ammonium Sulfat	31
3.4.11.5 Optimasi Kondisi Aerasi.....	32
3.4.12 Pengukuran Biomassa Sel secara Turbidimetri dan Bobot Sel Kering	32
3.4.13 Analisis Kuantitatif Secara KCKT	33
3.4.13.1 Pembuatan Kurva Kalibrasi Fruktosa	33
3.4.13.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi Manitol	33
3.4.13.3 Analisis Sisa Substrat dan Produk	33
4 HASIL DAN PEMBAHASAN	34
4.1 Isolasi Khamir Metilotrop dari Tanah.	34
4.1.1 Dekskripsi Makroskopik	35
4.1.2 Dekskripsi Mikroskopik.....	37
4.2 Skrining Kemampuan Tumbuh dalam Metanol Sebagai Sumber Karbon Tunggal.....	38
4.3 Skrening Kemampuan Fermentasi Manitol	39
4.4 Pengukuran Biomassa Sel	41
4.5 Optimasi Kondisi Biokonversi Manitol	42
4.5.1 Optimasi Waktu Fermentasi	42
4.5.2 Optimasi Konsentrasi <i>Resting Cell</i>	46
4.5.3 Optimasi Konsentrasi Fruktosa	47
4.5.4 Optimasi Penambahan Ammonium Sulfat	49
4.5.5 Optimasi Kondisi Aerasi	51
4.6 Analisis Hasil Fermentasi	53
5 KESIMPULAN DAN SARAN	54
5.1 Kesimpulan.	54
5.2 Saran	54

DAFTAR ACUAN	55
LAMPIRAN	57



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur kimia manitol.....	3
Gambar 2.2 Jalur biosintesis manitol pada fungi	5
Gambar 2.3 Scanning Electron Micrograph pada suatu sel khamir	8
Gambar 2.4 Glikolisis pada khamir	11
Gambar 2.5 Pembelahan pada sel khamir	12
Gambar 2.6 Jalur metabolisme metanol pada khamir metilotrop	15
Gambar 2.7 Grafik nilai hasil pengukuran turbidimetri dan pertumbuhan sel ...	21
Gambar 3.1 Skema Kerja.....	24
Gambar 4.1 Pengamatan makroskopik hasil isolasi.....	35
Gambar 4.2 Pengamatan Makroskopik Isolat A.....	36
Gambar 4.3 Pengamatan Makroskopik Isolat B.....	36
Gambar 4.4 Pengamatan Makroskopik Isolat C.....	37
Gambar 4.5 Pengamatan mikroskopik Isolat.....	37
Gambar 4.6 Perhitungan kesetaraan <i>optical densiy</i> dan bobot sel kering	41
Gambar 4.7 Grafik produksi manitol dan fruktosa yang digunakan pada konsentrasi resting cell 140 mg/mL	43
Gambar 4.8 Grafik produksi manitol dengan variasi konsentrasi <i>resting cell</i>	44
Gambar 4.9 Grafik Pertumbuhan biomassa sel.....	44
Gambar 4.10 Grafik <i>yield value</i> manitol dan pertumbuhan biomassa sel.....	45
Gambar 4.11 Grafik <i>yield value</i> manitol dengan variasi penambahan ammonium Sulfat	50

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Variasi bentuk sel khamir	7
Tabel 2.2 Nutrisi yang dibutuhkan oleh khamir, serta sumber dan fungsinya	9
Tabel 4.1 Hasil skrining kemampuan tumbuh dalam media dengan metanol sebagai sumber karbon tunggal	39
Tabel 4.2 Hasil skrining kemampuan fermentasi manitol	40
Tabel 4.3 Hasil pengukuran bobot sel kering	41
Tabel 4.4 Hasil optimasi waktu fermentasi dengan konsentrasi resting cell 140 mg/ml	43
Tabel 4.5 Hasil pengukuran konsentrasi manitol dengan variasi konsentrasi resting cell.....	44
Tabel 4.6 Hasil optimasi jumlah <i>resting cell</i>	47
Tabel 4.7 Hasil optimasi konsentrasi fruktosa	48
Tabel 4.8 Hasil optimasi penambahan Ammonium Sulfat.....	50
Tabel 4.9 Hasil optimasi kondisi aerasi.....	51

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Hasil Pengukuran Kurva Kalibrasi Standar Fruktosa	58
Lampiran 2 Data Hasil Pengukuran Kurva Kalibrasi Manitol	59
Lampiran 3 Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)	60
Lampiran 4 Gambar Makroskopik Koloni <i>Debaryomyces hansenii</i>	61
Lampiran 5 Gambar Mikroskopik <i>Debaryomyces hansenii</i>	62
Lampiran 6 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	63
Lampiran 7 Proses fermentasi dengan penggojokan menggunakan <i>shaker</i> dengan kecepatan 175 rpm pada suhu kamar	64
Lampiran 8 Kurva kalibrasi standar fruktosa	65
Lampiran 9 Kurva kalibrasi standar manitol	66
Lampiran 10 Kromatogram standar fruktosa 10.000 ppm	67
Lampiran 11 Kromatogram standar manitol 10.000 ppm	68
Lampiran 12 Kromatogram campuran standar fruktosa dan manitol 8.000 ppm.....	69
Lampiran 13 Kromatogram fruktosa dan manitol dalam sampel fermentasi pada media fermentasi dengan konsentrasi fruktosa 10%.....	70
Lampiran 14 Sertifikat Analisis Fruktosa	71
Lampiran 15 Sertifikat Analisis Manitol	72

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Manitol adalah gula polioll yang digunakan secara luas sebagai bahan tambahan makanan yang juga memiliki manfaat kesehatan. Hal ini dikarenakan Manitol memiliki kemampuan sebagai pemanis sekaligus pelindung terhadap sel hidup. Sebagai pemanis, manitol bersifat non-toksik, tidak memberikan efek kerusakan pada gigi serta memiliki kandungan kalori yang lebih rendah dibandingkan gula lainnya seperti sukrosa, laktosa, glukosa dan fruktosa. Salah satu efek perlindungan manitol terhadap sel hidup adalah fungsinya sebagai anti oksidan yang terutama efektif untuk mencegah kerusakan oksidatif oleh radikal hidroksil. (Wisselink, 2004)

Manitol digunakan secara luas dalam formulasi farmasetika sebagai bahan tambahan dalam pembuatan *chewing gum* dan serbuk granulasi. Hal ini disebabkan oleh sifatnya yang menguntungkan yaitu inert terhadap zat aktif, memiliki higroskopisitas yang sangat rendah serta memberikan sifat mekanis yang sangat baik pada pengempaan. Secara medis manitol digunakan sebagai diuretik osmotik kuat. Manitol heksanitrat digunakan sebagai vasodilator dalam penanganan penyakit hipertensi (Saha dan Nakamura, 2004).

Selama bertahun-tahun sejak tahun 1920an Manitol diproduksi dari eksudat yang dihasilkan oleh tumbuhan *Fraxinus ornus*, yaitu Manna. Saat ini, mannitol dihasilkan dalam skala industri melalui hidrogenasi katalitik campuran glukosa/fruktosa (1:1) menggunakan katalis nikel dan gas hidrogen pada suhu dan tekanan tinggi. Pada reaksi ini, seluruh glukosa dikonversi menjadi sorbitol, sementara fruktosa dikonversi menjadi manitol yang merupakan isomer dari sorbitol. Komposisi campuran yang dihasilkan adalah 25% manitol dan 75% sorbitol. Hal ini dikarenakan rendahnya selektivitas katalis nikel yang digunakan. Pemisahan manitol pada proses ini menyebabkan biaya produksi manitol relatif tinggi (Saha dan Racine, 2010). Produksi manitol secara enzimatik dari fruktosa menggunakan manitol dehidrogenase juga dapat dilakukan, namun hal ini dapat menyebabkan konversi yang tidak sempurna misalnya karena inhibisi produk.

Selain itu, produksi enzimatis juga membutuhkan biaya besar karena mahalnya kofaktor, misalnya NAD(P)H (Wisselink, 2004).

Fermentasi manitol menggunakan mikroorganisme dapat menjadi alternatif yang menarik pada produksi manitol. Hal ini disebabkan proses tersebut dapat memberikan berbagai keuntungan, misalnya tidak adanya hasil samping yang sulit dipisahkan seperti sorbitol serta kondisi produksi yang sederhana serta tidak diperlukannya substrat dengan kemurnian tinggi (Wisselink, 2004).

Fermentasi manitol dapat dilakukan melalui fermentasi bakteri, jamur atau pun khamir. Pada fermentasi dengan menggunakan substrat heksosa, sebagian heksosa digunakan untuk menghasilkan energi untuk pertumbuhan mikroorganisme. Hal ini akan mengurangi jumlah manitol yang didapat sebagai produk fermentasi. Namun, pada fermentasi menggunakan mikroorganisme metilotrop yang mampu mengasimilasi metanol untuk menghasilkan NAD(P)H diharapkan penggunaan substrat lebih efisien. Hal ini serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Vongsuvanlert dan Tani (1988) bahwa produksi xylitol oleh *Candida boidinii* meningkat dengan adanya 2% metanol (Suryadi, 2000). Pada penelitian ini, akan dilakukan fermentasi menggunakan *resting cell* khamir metilotrop hasil skrining, yaitu dengan variasi kondisi fermentasi untuk optimasi biokonversi manitol.

I.2 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mendapatkan isolat khamir metilotrop terpilih dari skrining hasil isolasi dan koleksi UICC (Universitas Indonesia Culture Collection)
2. Mendapatkan kondisi optimum biokonversi manitol menggunakan *resting cell* khamir metilotrop

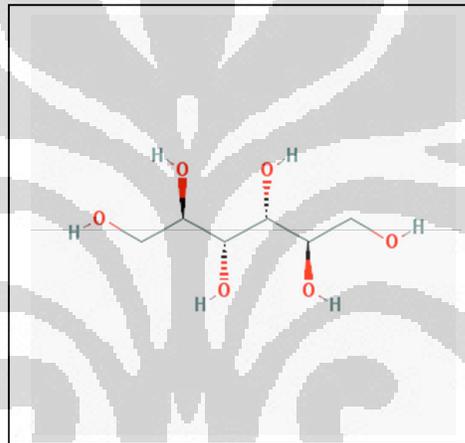
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Manitol

2.1.1 Gambaran Umum dan Aplikasi Manitol

Manitol adalah poliol alami yang digunakan secara luas dalam industri makanan, farmasetika dan medis. Berdasarkan Farmakope Indonesia IV (1995), pemerian manitol berupa serbuk halus atau granul mengalir bebas, berwarna putih, tidak berbau dan rasanya manis.



[sumber: NCBI, 2004]

Gambar 2.1 Struktur kimia manitol

Manitol dapat ditemukan pada labu, jamur, bawang, sayuran dan algae laut, terutama rumput laut coklat. Sejumlah bakteri asam laktat, khamir, dan fungi berfilamen adalah penghasil manitol (Saha dan Racine, 2010).

Diantara berbagai struktur manitol, D-Manitol adalah struktur manitol yang paling banyak digunakan di pasaran. D-Manitol banyak digunakan dalam berbagai aplikasi pemanis (42%), perawatan oral (15,7%), farmasetika (13,3%), makanan (8,6%), industri (5,4%), surfaktan (2,6%) dan kosmetik (1,0%). Pasar global manitol diperkirakan setiap tahunnya memiliki penjualan sekitar \$100 juta. Pada kisaran tahun 2005-2009 produksi manitol meningkat 5,6 % per tahun (Saha dan Racine, 2010).

Manitol digunakan sebagai pemanis dan *texturing agent*. Manitol dapat juga digunakan untuk mengurangi kecendrungan gula untuk mengkristal. Manitol kristal bersifat higroskopis sehingga lebih stabil dalam kelembapan. Rasa manis manitol setengah dari sukrosa. Kalori manitol (1,6 kkal/g) setengah kali lebih rendah dari sukrosa (4 kkal/g). Manitol memiliki kelarutan yang rendah dalam air yaitu 18% (w/w) pada 25°C dan 13% (w/w) pada 14°C. Jika dibandingkan, batas kelarutan sorbitol dalam air adalah 70% (w/v) pada 25°C. Manitol digunakan secara luas pada permen karet. Manitol inert secara kimia dan sering digunakan pada formulasi farmasetika pada tablet chewable dan serbuk tergranulasi. Manitol mencegah penyerapan kelembapan di udara, memberikan sifat kompresi mekanis tinggi dan memiliki rasa manis dingin yang menutupi rasa tidak enak dari banyak obat. Kompleks asam borat dan manitol digunakan pada produksi kapasitor elektrolitik kering. Manitol merupakan poliol yang digunakan secara luas dalam produksi resin dan surfaktan (Saha dan Racine, 2010).

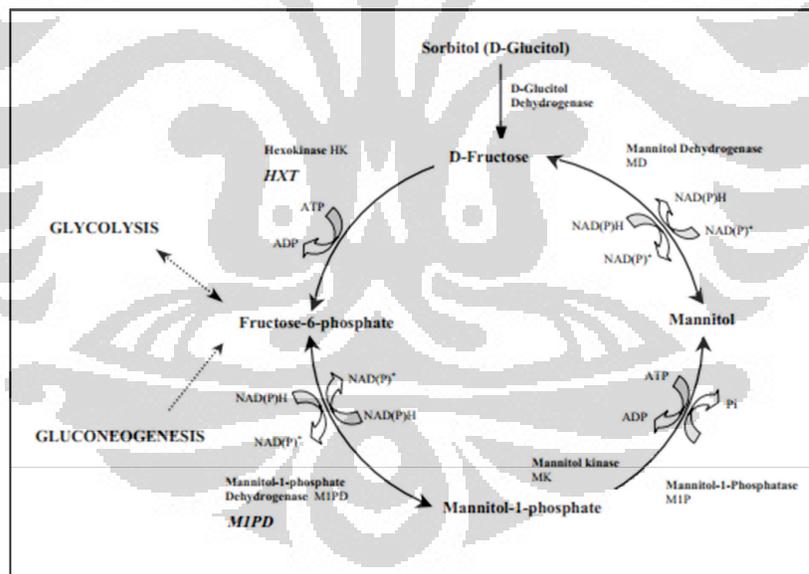
Dalam dunia medis, manitol digunakan sebagai diuretik osmotik kuat (meningkatkan pembentukan urin untuk mencegah dan menangani gagal ginjal akut dan juga pengeluaran senyawa toksik dari tubuh) serta pada banyak tipe operasi untuk mencegah gagal ginjal (untuk memberikan osmolaritas filtrat glomerulus) dan untuk mengurangi udem otak. Manitol hipertonis dapat meningkatkan perpindahan obat melalui sawar darah otak untuk penanganan penyakit otak yang mengancam hidup. Manitol inhalasi meningkatkan hidrasi dan sifat permukaan sputum pada pasien dengan sistik fibrosis. Manitol heksanitrat adalah vasodilator yang terkenal pada penanganan hipertensi. Manitol juga merupakan antioksidan untuk radikal hidroksil (Saha dan Racine, 2010).

2.1.2 Produksi Mannitol

Manitol diproduksi dalam skala industri dengan hidrogenasi tekanan tinggi campuran fruktosa/glukosa pada larutan air dengan temperatur tinggi (120-160°C) menggunakan katalis Raney Nickel. α -fruktosa dikonversi menjadi manitol dan β -fruktosa dikonversi menjadi sorbitol. Glukosa di-hidrogenasi secara eksklusif menjadi sorbitol. Rendahnya selektivitas katalis nikel menyebabkan hidrogenasi campuran 50:50 fruktosa/glukosa menghasilkan campuran 25:75 manitol dan

sorbitol. Pemisahan manitol dan sorbitol sulit dilakukan sehingga membutuhkan biaya produksi yang tinggi dalam pemisahannya dan jumlah produk yang sedikit (Saha dan Racine, 2010).

Bakteri asam laktat (Bal) homofermentative maupun heterofermentative dapat memproduksi manitol. Beberapa BAL homofermentative seperti *Streptococcus mutants* dan *Lactobscillus leishmanii* memproduksi sejumlah kecil manitol dari glukosa. Sejumlah bakteri asam laktat heterofermentative dapat memproduksi manitol langsung dari fruktosa. Selain itu, bakteri ini juga memproduksi asam laktat, asam asetat, karbon dioksida, dan etanol. Proses yang terjadi adalah berdasarkan kemampuan Bakteri asam laktat (Bal) untuk menggunakan fruktosa sebagai akseptor elektron dan mereduksinya menjadi manitol menggunakan enzim manitol 2-dehidrogenase (MDH). Selain produksi secara kimia dan fermentasi Bakteri Asam Laktat, Manitol juga dapat didapatkan melalui fermentasi jamur (Wisselink, 2004).



[sumber: Lewis dan Smith, 1967]

Gambar 2.2 Jalur biosintesis manitol pada fungi

Dua jalur biosintesis manitol pada fungi pertama kali dilaporkan oleh Lewis and Smith (1967). Pada jalur yang pertama, fruktosa direduksi secara langsung menjadi manitol dengan adanya NADH atau NADPH oleh manitol

oksidoreduktase dengan nama trivial manitol dehydrogenase (MD). Pada jalur kedua, Fruktosa-6-fosfat direduksi menjadi manitol-1-fosfat dengan adanya NADH oleh manitol-1-fosfat oksidoreduktase, dengan nama trivial manitol-1-P dehidrogenase (M1PD). M1-P kemudian di hidrolisis oleh manitol-1-fosfatase menjadi manitol. Jalur tersebut dapat dilihat pada gambar 2.2

Manitol dapat dipisahkan dari agar fermentasi melalui kristalisasi pendinginan. Kristal jarum putih kecil dari manitol akan terlihat pada pendinginan 4°C agar fermentasi bebas-sel. Penggunaan elektrodialisis yang diikuti dengan kristalisasi menghasilkan pemisahan kemurnian manitol yang lebih tinggi dengan asam laktat yang lebih efektif dalam segi biaya (Saha dan Racine, 2010).

2.2 Khamir

2.2.1 Morfologi

Ukuran sel bervariasi dengan panjang mulai dari 2–3 μm sampai 20–50 μm dan lebar 1-10 μm (Kavanagh, 2005). Pseudomiselium dan true miselium memiliki diameter yang dapat meningkat hingga 70 μm . Ukuran sel vegetatif pada strain yang sama meningkat seiring dengan jumlah kromosom. Mundkur (1954) menetapkan volume rata-rata sel haploid adalah 4,64-14,42 μm^3 , sel diploid 18,73-37,71 μm^3 , sel triploid 19,38-48,01 μm^3 dan sel tetraploid 24,01-53,81 μm^3 . (Becze dan George, 1955).

Sebagian sel memiliki pigmen sehingga tampak berwarna, misalnya krem (*S. cerevisiae*); putih (*Geotrichum candidum*); hitam (*Aureobasidium pullulans*); merah muda (*Phaffia rhodozyma*); merah (*Rhodotorula rubra*); jingga (*Rhodospiridium spp.*) dan kuning (*Cryptococcus laurentii*) (Kavanagh, 2005).

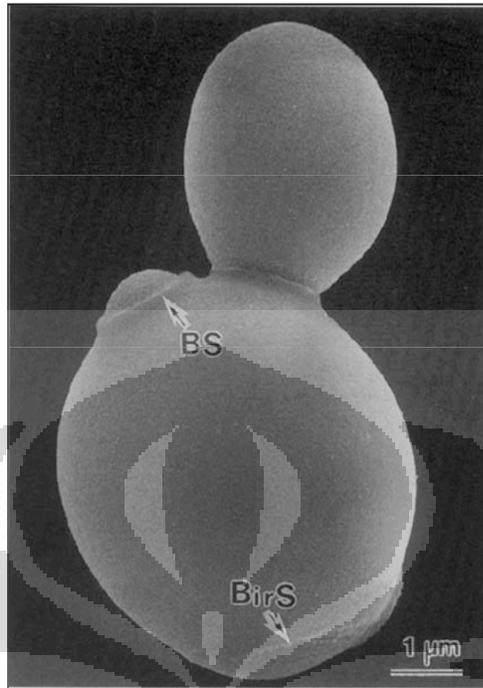
Beberapa strain memproduksi satu bentuk sel dalam jumlah besar. Strain lainnya dapat memperbanyak diri dalam beberapa bentuk (Becze dan George, 1955). Bentuk sel khamir sangat bervariasi. Variasi tersebut dapat dilihat pada tabel 2.1 (Kavanagh, 2005).

Tabel 2.1 Variasi bentuk sel khamir

Bentuk Sel	Dekskripsi	Contoh Khamir
Ellips	Sel berbentuk oval	<i>Saccharomyces</i>
Silindris	Sel memanjang dengan ujung setengah bola	<i>Schizosaccharomyces</i>
Apikulat	Sel berbentuk lemon	<i>Hanseniaspora</i> , <i>Saccharomycodes</i>
Ogival	Sel memanjang yang membulat pada satu ujung dan meruncing pada ujung yang lain	<i>Dekkera</i> , <i>Brettanomyces</i>
Bentuk Botol (<i>Flask shaped</i>)	Sel yang sedang membelah dengan pertunasan	<i>Pityrosporum</i>
Bentuk <i>Misscellaneous</i>	Segitiga Kurva Sferis Batang	<i>Trigonopsis</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Sterigmatomyces</i>
Pseudohifa	Rantai pada sel khamir yang sedang mengalami pertunasan serta telah memanjang tanpa terjadi pelepasan	<i>Candida</i>
Hifa	Sel berfilamen yang bercabang ataupun tidak yang terbentuk dari germ tube.	<i>Candida albicans</i>
Dimorfik	Khamir yang tumbuh secara vegetatif baik sebagai khamir maupun fungi berfilamen (hifa atau pseudohifa)	<i>Candida albicans</i> <i>Saccharomyces fibuligera</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Malassezia furfur</i> <i>Yarrowia lipopytica</i> <i>Histoplasma capsulatum</i>

[sumber: Kavanagh, 2005]

Ukuran dan bentuk sel diantara strain khamir adalah sama pada kondisi yang identik dan dapat berubah dengan perubahan nutrisi dan lingkungan (Becze dan George, 1955). Salah satu bentuk sel khamir adalah seperti terlihat pada Gambar 2.3



[sumber: Kavanagh, 2005]

Gambar 2.3 : Scanning Electron Micrograph pada suatu sel khamir

Interior dari sel khamir yang aktif tidak tampak tanpa pewarnaan. Sementara, sel yang lebih tua, *resting cell* (klamidospora), dan sel yang membentuk atau mengandung askospora (spora seksual) menunjukkan beberapa struktur internal tanpa pewarnaan. Tiga bagian utama dari sel adalah dinding sel, sitoplasma, dan nukleus. Dinding sel, kulit pelindung, licin dan fleksibel pada sel yang muda, namun tebal dan lebih kaku pada sel yang lebih tua menempel pada sitoplasma (Becze dan George, 1955).

2.2.2 Nutrisi

Khamir tidak memiliki kemampuan fotosintesis dan bersifat saprofit atau parasitik. Khamir bergantung pada sumber karbon organik dari organisme lain (Labeda, 1990). Karena itulah, khamir pertama kali di dapatkan dari substrat alami yang mengandung gula seperti buah-buahan. Khamir juga ditemukan pada bagian lain tumbuhan dan telah ditemukan di tanah dan lingkungan akuatik, dimanapun sumber karbon organik tersedia (Rehm dan Reed, 1993). Tempat hidup khamir bergantung pada kemampuannya menggunakan sumber karbon

yang tersedia dan sensitifitasnya terhadap beberapa senyawa seperti antibiotik dan senyawa fenolik. (Ernst,1989)

Kebutuhan nutrisi khamir cukup sederhana. Makronutrien (Sumber karbon, nitrogen, sulfur, fosfor, potassium, dan magnesium) diperlukan dalam konsentrasi milimolar sedangkan mikronutrien (kalsium, tembaga, besi, mangan dan zink) diperlukan dalam konsentrasi mikromolar. Nutrisi yang dibutuhkan oleh khamir secara lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Nutrisi yang dibutuhkan oleh khamir, serta sumber dan fungsinya

Elemen	Sumber	Fungsi Seluler
Karbon	Gula	Elemen struktural sel dengan kombinasi dengan hidrogen, oksigen dan nitrogen. Sumber energi.
Hidrogen	Proton dari lingkungan asam	Gaya penggerak proton transmembran yang penting untuk nutrisi. pH intraseluler asam (5-6) penting untuk metabolisme
Oksigen	Air, Oksigen	Substrat untuk respirasi dan fungsi enzim oksidatif lainnya. Penting untuk sintesis ergosterol dan asam lemak tak jenuh
Nitrogen	Garam ammonium, urea, asam amino	Berperan struktural dan fungsional sebagai amino nitrogen organik pada protein dan enzim.
Posfor	Posfat	Transduksi energi, asam nukleat dan struktur membran
Potassium	Garam K^+	Keseimbangan ionik, aktivitas enzim
Magnesium	Garam Mg^{2+}	Aktivitas enzim, Struktur Sel dan Organel
Sulfur	Sulfat, Metionin	Asam amino sulfhidril dan vitamin
Kalsium	Garam Ca^{2+}	Alternatif <i>Second Messenger</i> pada transduksi sinyal
Tembaga	Garam tembaga	Pigmen redoks
Besi	Garam Ferri, Fe^{3+} dikhelasi sebagai sideofor dan dilepaskan sebagai Fe^{2+} di dalam sel	Protein Hem, sitokrom
Mangan	Garam Mn^{2+}	Aktivitas enzim
Zink	Garam Zn^{2+}	Aktivitas enzim

Nikel	Garam Ni ²⁺	Aktivitas urease
Molibnedum	Na ₂ MoO ₄	Metabolisme nitrat, vitamin B ₁₂

[sumber: Kavanagh, 2005]

Gula digunakan secara luas untuk pertumbuhan. Gula yang digunakan oleh khamir bervariasi yaitu dapat berupa heksosa (misalnya glukosa, fruktosa), pentosa (misalnya xylosa), disakarida (misalnya maltosa, laktosa), trisakarida (misalnya raffinosa), polisakarida (misalnya amilum), alkohol alifatik rendah (misalnya metanol), gula alkohol (misalnya gliserol), asam organik misalnya asetat, asam lemak (misalnya oleat), hidrokarbon (misalnya n-alkana), aromatik (misalnya fenol) dan berbagai sumber lainnya (Walker, 1998).

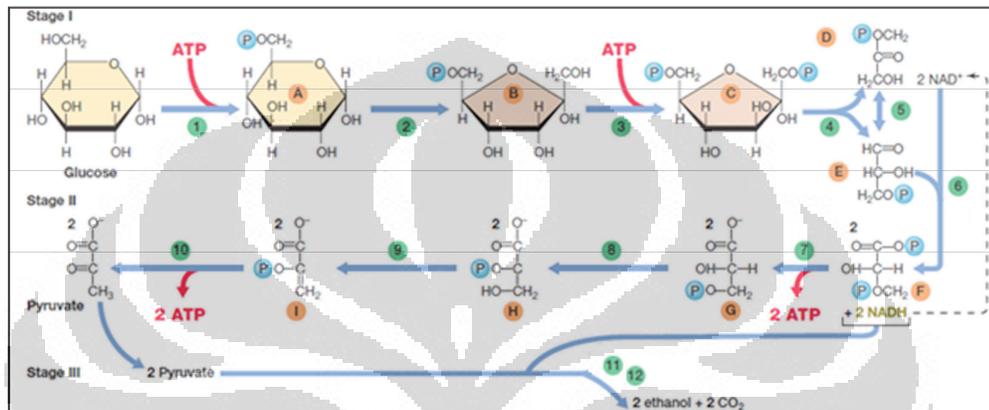
Dalam penggunaan oksigen, sebagian khamir bersifat aerobik sebagian lagi fakultatif anaerob misalnya *S. Cerevisia* yang tidak mampu hidup pada kondisi anaerobik kecuali tersedia asam lemak dan sterol tertentu yang tidak dapat disintesis tanpa adanya oksigen molekular. Pada khamir yang berespirasi secara aerobik, oksigen berperan sebagai akseptor elektron terminal (Kavanagh, 2005).

2.2.3 Metabolisme

Fermentasi dan respirasi adalah reaksi konversi energi pada organisme kemoorganotrof. Fermentasi adalah bentuk katabolisme anaerobik dimana senyawa organik berperan sebagai donor maupun akseptor elektron, dan ATP dihasilkan dari fosforilasi tingkat substrat. Respirasi adalah katabolisme dimana suatu senyawa dioksidasi dengan O₂ atau substituenya sebagai akseptor elektron terminal dan biasanya disertai dengan produksi ATP melalui fosforilasi oksidatif. Khamir dapat melakukan fermentasi dan respirasi. Namun, proses respirasi akan menghasilkan energi lebih banyak dari fermentasi. Sehingga, pada keadaan aerobik dimana oksigen tersedia, sel lebih memilih untuk melakukan proses fermentasi (Madigan, *et. al.*, 2012).

Tidak setiap senyawa dapat menjadi substrat pada proses fermentasi. Glukosa adalah substrat respirasi dan fermentasi yang baik. Baik dalam penggunaan glukosa dalam respirasi maupun fermentasi, keduanya diawali dengan katabolisme glukosa, yaitu proses glikolisis (Madigan, *et. al.*, 2012).

Glikolisis adalah proses dimana terjadi konversi glukosa menjadi 2 molekul piruvat, 2 ATP, 2 NADH dan 1 H⁺. Proses ini terbagi menjadi 3 tahap, yaitu ‘persiapan’, ‘produksi NADH, ATP, Piruvat’ dan ‘Konsumsi NADH dan produksi produk fermentasi’. Proses glikolisis dapat dilihat pada gambar 2.4 (Kavanagh (ed), 2005).



Keterangan : A, Glukosa 6-Fosfat; B, Fruktosa 6-Fosfat; C, Fruktosa-1,6-Fosfat; D, Dihidroksiasetonfosfat; E, Gliseraldehida-3-fosfat; F, 1,3-Bifosfogliserat; G, 3-fosfogliserat; H, 2-fosfogliserat; I, fosfoenolpiruvat; 1, Heksokinase; 2, Isomerase; 3, Fosfofruktokinase; 4, Aldolase; 5, Triosafosfat isomerase; 6, Gliseraldehida-3-fosfat dehidrogenase; 7, Fosfogliserokinase; 8, fosfogliseromutase; 10, Piruvat kinase; 11, Piruvat dekarboksilase; 12, Alkohol dehidrogenase
[sumber: Madigan, *et. al.*, 2012]

Gambar 2.4: Glikolisis pada khamir

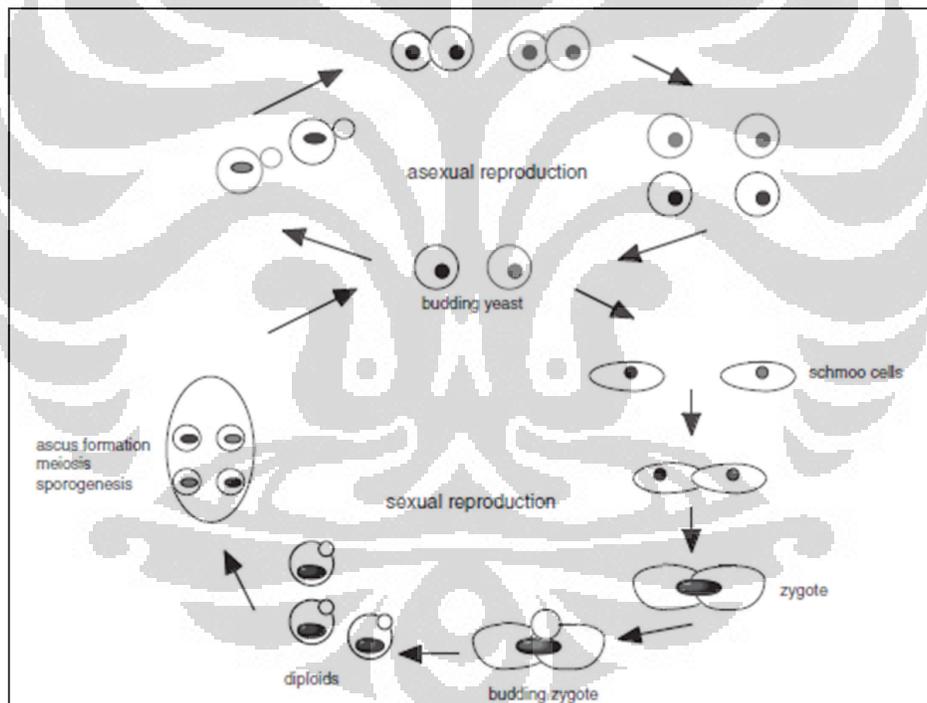
Pada kondisi anaerobik, terjadi proses fermentasi dimana piruvat yang dihasilkan dari proses glikolisis akan mengalami dekarboksilasi dan reduksi sehingga didapatkan etanol (Gambar 2.4). Pada kondisi aerobik, piruvat akan masuk ke mitokondria dan mengalami dekarboksilasi oksidatif dengan dikatalisis oleh piruvat dehidrogenase menjadi Asetil CoA yang merupakan senyawa *intermediate* antara glikolisis dan siklus asam sitrat. Pada siklus asam sitrat, akan dihasilkan 2 molekul CO₂, 2 molekul ATP, 2 molekul NADH dan 1 molekul GTP serta prekursor *intermediate* yang akan digunakan untuk biosintesis asam amino (Madigan, *et. al.*, 2012).

Masuknya NADH menuju mitokondria terjadi melalui *shuttle* dimana NADH teroksidasi selama melewatinya. Pada siklus asam sitrat, NADH berperan

sebagai penerima atom H dari enzim dehidrogenase. NADH kemudian direoksidasi kembali dengan tereduksinya oksigen menjadi air melalui rantai transpor elektron. Energi yang dihasilkan dari rantai transpor akan digunakan untuk sintesis ATP pada fosforilasi oksidatif (Madigan, *et. al.*, 2012).

2.2.4 Pertumbuhan

Khamir adalah fungi yang tidak memproduksi spora aseksual atau struktur aerial, dan berada pada keadaan tunggal setidaknya pada siklus vegetatif. Bentuk pembelahan utama pada khamir adalah pertunasan (*budding*). Namun, dapat pula ditemukan fisi, pertumbuhan miselial dan percabangan atau *branching* (Reed dan Rehm, 1993) (gambar 2.5).



[sumber: Kavanagh (ed), 2005]

Gambar 2.5 Pembelahan pada sel khamir

Pada pertunasan, mula-mula sel khamir mengalami peningkatan volume. Segera ketika peningkatan tersebut terhenti, tunas tumbuh. Selama pertumbuhan

tunas, total volume sel induk dan anak konstan. Sehingga, tunas tumbuh sebagai konsekuensi dari pengurangan volume sel induk (Reed dan Rehm, 1993).

Tunas terpisah sebagai sel tunggal namun lebih kecil dari sel induk. Ketika terpisah, sel anak dan sel induk tumbuh dan mencapai ukuran yang sama pada saat yang sama. Hal ini menunjukkan bahwa kecepatan pertumbuhan sel anak lebih besar dari sel induk. Berbeda dengan bakteri, sel induk dan sel anak memiliki kecepatan pertumbuhan dan permukaan sel yang berbeda (Reed dan Rehm, 1993).

Terpisahnya sel anak dari sel induk menyebabkan munculnya *bud scar* pada permukaan sel induk. Jika sel anak tidak terpisah dari sel induk, maka sel disebut pseudomiselium (Reed dan Rehm, 1993).

2.3 *Resting Cell*

Beberapa sel ketika diinduksi oleh kondisi lingkungan akan mengkonversi dirinya sendiri menjadi *resting cell* (sel istirahat) yang biasanya disebut “klamidospora” (Becze dan George, 1955). Dalam keadaan ini, sel berada dalam fase stasioner (Rehm and Reed, 1993). *Resting Cell* sangat mudah terlihat karena ukurannya yang besar, dinding selnya yang besar dan adanya kultur gelembung minyak yang dapat merefraksi. *Resting Cell* dapat bertahan pada kondisi yang merugikan lebih baik dari sel vegetatif. Sel tersebut akan bergerminasi dan bereproduksi dengan pertunasan ketika diletakkan pada lingkungan yang diinginkan (Becze dan George, 1955).

Resting Cell memiliki vakuola dengan ukuran yang lebih besar dan jelas terlihat dibandingkan pada sel muda. Vakuola dapat berjumlah satu, dua, atau tiga, berbentuk sferis atau wadah sferis terdistorsi yang berisi bodies yang dapat terlihat dengan pewarnaan khusus (Becze dan George, 1955).

Mitokondria adalah granula kecil yang terdiri dari RNA dengan sejumlah kecil DNA selain beberapa senyawa lipoidal. Jumlah mitokondria pada *Resting Cell* dapat mencapai 50 namun hilang sebelum pembelahan sel (Becze dan George, 1955).

Khan et al., (2009) melakukan penyiapan *resting cell* khamir *Candida magnoliae* dengan cara mensentrifugasi suspensi inokulum khamir secara aseptik pada 10.000 rpm pada suhu 5°C selama 10 menit. Butiran sel kemudian disuspensi

pada larutan salin fisiologis steril. Kemudian sel dipisahkan dengan sentrifugasi. Prosedur ini diulang sekali lagi untuk mendapatkan *resting cell* yang bersih.

Resting cell dari khamir *S. Cerevisiae* menunjukkan laju keseluruhan fosforilasi oksidatif yang terkontrol dalam jangka pendek, yaitu (1) kontrol pada hilir dari ATP sintase dengan pergantian ATP sitosolik, (2) kontrol pada hulu dari rantai respirasi melalui penurunan availabilitas ekuivalen dan aktivasi alosterik dehidrogenase dan (3) melalui permeabilitas ionik di dalam membran mitokondria (Beuvoit *et. al.*, 1993)

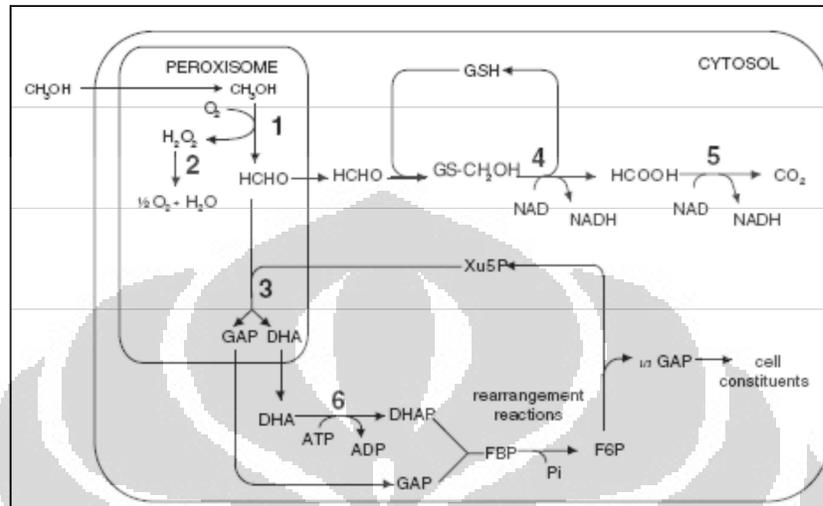
2.4 Khamir Metilotrop

Yeast (Khamir) secara bahasa berasal dari Bahasa Jerman, yaitu *gist* yang menunjukkan busa yang terbentuk pada fermentasi. Metilotrop adalah organisme yang menggunakan senyawa organik karbon tunggal baik sebagai donor elektron maupun sebagai sumber karbon bagi sel. Organisme ini memiliki persebaran tinggi karena keberadaan substratnya yang luas. Khamir metilotrop adalah metilotrop eukaritik. Berbeda dengan metilotrop prokariot yang dapat menggunakan berbagai jenis senyawa karbon tunggal (misalnya metan, metanol, metilamin), metilotrop eukaritik hanya dapat menggunakan metanol sebagai sumber karbon, dan metilamin sebagai sumber nitrogen (bukan sumber karbon). Khamir metilotrop diantaranya *Candida*, *Pichia*, dan beberapa genus yang baru-baru ini dipisahkan dari *Pichia* *Ogataea*, *Kuraishia*, dan *Komagataella* (Klei *et al.*, 2006).

Khamir Metilotrop berada dalam jumlah yang melimpah di alam pada buah dan produk sayuran, eksudat pohon dan kulit kayunya. Hal ini dapat disebabkan metanol dapat dibentuk dari rantai metoksi pada lignin dari kayu. Hampir semua khamir metilotrop yang diuji dapat tumbuh pada medium pectic, yaitu polimer yang kaya akan rantai metoksi, dan dapat ditemukan terutama pada buah. Beberapa faktor seperti lokasi geografis dan kondisi iklim dapat mempengaruhi keanekaragaman khamir (Negruta *et al.*, 2010).

Keberadaan peroksisom yang mengandung enzim-enzim yang berperan dalam metabolisme metanol, seperti alcohol oxidase (AOX), dihydroxyacetone sintase (DHAS) dan catalase (CAT). Peroksisom ini adalah ciri penting dari

khamir metilotrop (Negruta et al., 2010). Berikut adalah jalur metabolisme metanol pada khamir metilotrop.



[sumber: Negruta et al., 2010]

Gambar 2.6 : Jalur metabolisme metanol pada khamir metilotrop

Metanol terlebih dahulu mengalami oksidasi oleh enzim Alkohol Oksidase (AOX) menjadi formaldehida dan hidrogen peroksida. Sebagian Formaldehida kemudian diikat oleh enzim dehidroksiaseton sintase (DHAS) untuk kemudian bereaksi dengan xylulosa 5-fosfat pada siklus xylulosa monofosfat. Reaksi tersebut akan membentuk dihidroksiaseton fosfat (DHAS) dan gliseraldehida fosfat yang akan mengalami reaksi selanjutnya untuk menghasilkan energi. Sebagian lainnya selanjutnya mengalami oksidasi menjadi CO_2 dalam jalur disimilasi sitosolik yang menghasilkan NADH. (Negruta et al., 2010).

Hidrogen peroksida yang dihasilkan oleh reaksi awal akan dipecah menjadi oksigen dan air oleh Enzim katalase (CAT). Enzim tersebut berada diantara bentuk protein AOX dan membran peroksizom untuk menghindari bocornya hidrogen peroksida menuju sitosol (Klei et al, 2006).

2.5 Metode Isolasi

Isolasi dapat dilakukan dari sumber alam yang diperkirakan kaya akan organisme yang diinginkan. Biasanya digunakan tanah. Tanah tersebut diinokulasi

pada kondisi kultur yang spesifik untuk mendukung pertumbuhan organisme tersebut atau mencegah pertumbuhan organisme lain. Hal ini dapat dilakukan dengan kultur pengkayaan yang mengandung substrat khas atau inkubator tertentu. Sebelumnya dapat juga diberikan perlakuan yang dapat menyokong organisme yang diinginkan untuk dapat mempertahankan hidupnya, misalnya pengeringan akan menyokong Actinomycetes untuk mempertahankan hidupnya (Stanbury, 1995).

Meskipun begitu, pertumbuhan organisme yang diinginkan dari inokulum campuran dapat menghasilkan perubahan pada gaya selektif yang dapat menyebabkan pertumbuhan organisme lain. Gaya selektif ini dapat dibangun kembali dengan menginokulasi kultur diperkaya tersebut ke dalam media segar yang identik. Sub-kultur ini dapat diulang berkali-kali sebelum organisme tersebut tumbuh dominan pada penyebaran sejumlah kecil inokulum dari kultur pengkayaan ke medium padat (Stanbury, 1995).

Penelitian yang dilakukan oleh Asthana dkk (1971) melakukan isolasi khamir metolotrop dengan menggunakan medium isolasi dengan komposisi sebagai berikut, yaitu :

Metanol	1 mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
Na ₂ HOP ₄ ·7H ₂ O	0,35 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
Ekstrak khamir	0,01 g
Tetrasiklin	10,0 µg
Aquadest	ad 100 mL
Adjust pH hingga 4,5	

Pada penelitian tersebut, dari 5 g tanah yang diinokulasi dalam medium isolasi tersebut dan diinkubasi selama 4-5 hari pada suhu 30°C didapatkan 4 actinomycetes dan 2 spesies khamir yang menggunakan metanol (Asthana at al, 1971)

2.6 Fermentasi

Secara biokimia, fermentasi dapat diartikan sebagai proses pemangkitan energi dimana senyawa organik berperan sebagai donor elektron dan akseptor elektron akhir. Namun definisi fermentasi juga secara luas dapat diartikan sebagai setiap proses produksi dengan kultur massa mikroorganisme (Stanburry et al., 1995). Fermentasi dapat dikelompokkan menjadi 5, yaitu :

- a. Fermentasi yang memproduksi sel mikroba (biomassa)
- b. Fermentasi yang memproduksi enzim mikroba
- c. Fermentasi yang memproduksi metabolit mikroban
- d. Fermentasi yang memproduksi produk rekominan
- e. Fermentasi yang memodifikasi senyawa yang ditambahkan ke fermentasi (proses biokonversi)

Dalam melakukan fermentasi, khususnya fermentasi yang memproduksi metabolit, penting untuk memperhatikan kurva pertumbuhan mikroba. Pada awal fase pertumbuhan, mikroba mengalami fase lag, dimana pertumbuhan mikroba belum terlihat. Kemudian mikroba memasuki fase log atau eksponensial dimana pertumbuhan sel meningkat konstan. Pada fase ini mikroba menghasilkan metabolit primer yang penting untuk pertumbuhannya, diantaranya asam amino, nukleotida, asam nukleat, lipid, dan lain-lain. Fase tersebut disebut juga tropophase. Setelah itu, mikroba mengalami penurunan pertumbuhan serta fase stasioner yang disebut juga dengan idiofase. Pada fase ini dihasilkan metabolit sekunder. Jenis metabolit sekunder hanya dapat dihasilkan oleh sebagian kecil mikroba (Stanburry et al., 1995).

Pertumbuhan yang terus berlangsung akan menyebabkan penggunaan nutrisi dan ekskresi produk mikroba. Karena itulah, setelah beberapa waktu, laju pertumbuhan kultur akan menurun hingga pertumbuhan terhenti. Penghentian ini dapat disebabkan oleh habisnya nutrisi esensial tertentu di dalam medium (keterbatasan substrat) atau akumulasi beberapa produk autotoksik oleh organisme dalam medium (keterbatasan toksin) atau kombinasi keduanya (Stanburry et al., 1995).

Proses fermentasi secara umum dapat terdiri dari 6 bagian, yaitu :

- a. Formulasi media yang akan digunakan untuk kultur selama penyiapan inokulum dan pada fermenter produksi
- b. Sterilisasi medium, fermenter dan alat tambahan
- c. Produksi kultur aktif dan murni dengan kuantitas yang memadai untuk diinokulasi pada fermenter produksi
- d. Penumbuhan organisme pada fermenter produksi di bawah kondisi optimum untuk pembentukan produk
- e. Ekstraksi dan pemurnian produk
- f. Pemindahan hasil samping

2.7 Media Kultivasi

Komposisi media akan mempengaruhi hasil analisis strain dan kemampuan strain dalam aplikasi industri. Medium kultivasi dirancang untuk merefleksikan komposisi elemental dan kapasitas biosintesis dari sel mikroba (Hagerdal, et al, 2005).

Secara umum, mikroorganisme tumbuh lebih cepat pada media kaya daripada media mineral. Hal ini disebabkan media kaya mengandung prekursor biosintetik yang dapat langsung dihubungkan pada jalur anabolik, yang akan menurunkan kebutuhan untuk memproduksi prekursor biosintetik dan menghemat energi metabolik. Hal ini memberikan ciri khas pada pertumbuhan dan produksi (Hagerdal, et al, 2005).

Medium mengandung komponen-komponen yang dibutuhkan untuk metabolisme mikroorganisme, diantaranya (McNeil and Harvey(ed), 2008) :

a. Sumber Karbon

Sumber karbon penting baik untuk mensuplay energy maupun untuk pertumbuhan dan sintesis metabolit primer dan sekunder. Contoh sumber C adalah glukosa, sukrosa, laktosa, gula lain, dan minyak.

b. Sumber Nitrogen

Jumlah nitrogen yang tersedia dalam medium akan sangat menentukan jumlah biomassa yang akan dihasilkan jika jumlah Karbon, dan nutrien yang lainnya memadai. Nitrogen diperlukan untuk pertumbuhan dan sintesis, misalnya sintesis asam nukleat dan protein. Contoh sumber

nitrogen adalah ammonia, garam nitrogen (ammonium sulfat, ammonium klorida, dan lain-lain) dan sumber nitrogen kompleks, misalnya ekstrak khamir.

c. Substrat Lain

Substrat lainnya yang diperlukan yaitu elemen, trace element dan faktor pertumbuhan. Substrat Terdapat beberapa elemen yang penting untuk pertumbuhan mikroorganisme, yaitu Kalsium (diperlukan untuk stabilitas dinding sel, dan secara khusus penting jika sel membentuk endospor yang mengandung banyak kalsium dipikolinat), Magnesium (sering berperan sebagai kofaktor untuk aktivitas enzim, dapat berperan signifikan terhadap struktur dan fungsi membran), Fosfor (diperlukan untuk produksi fosfolipid, asam nukleat dan pembentukan energi (ATP, ADP)), Potassium (berperan dalam banyak reaksi dalam sel), Sodium (beberapa spesies memerlukan sodium, beberapa lainnya tidak), dan Sulfur (diperlukan untuk sintesis asam amino (sistein, sistin dan metionin), untuk produksi beberapa vitamin misalnya biotin dan sebagai koenzim). Pada media kompleks, elemen-elemen tersebut dapat dikurangi atau tidak disertai.

d. Inhibitor

Inhibitor diperlukan untuk membebaskan medium dari senyawa yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang diinginkan.

Terdapat 4 medium yang sering digunakan pada pertumbuhan dan pembentukan produk dibawah kondisi aerobik dan kondisi dengan oksigen terbatas, yaitu *yeast-extract peptone* (YP), *define medium* (DM), *yeast nitrogen base* (YNB) dan *synthete complete* (SC) yang sama dengan YNB tersuplementasi. YP adalah medium kompleks kaya yang tak terdefinisi yang mengandung ekstrak khamir (YE) dan pepton. YE dibuat dengan autolisis seluruh sel khamir pada sekitar 50°C dan pepton adalah hidrolisate asam atau enzimatik dari produk sampingan kaya protein dari industri makanan. YP mengandung seluruh komponen yang penting untuk perkembangbiakan sel khamir, termasuk bahan-bahan pembangun pada biosintesis. YP sering digunakan pada tahap inisial pada fermentasi ketika digunakan inokulum dalam jumlah besar (Hagerdal, et al, 2005).

YNB adalah medium yang secara kimia terdefinisi. YNB dapat disuplementasi untuk memenuhi persyaratan auksotropik. YNB yang tersuplementasi ini selanjutnya disebut Medium SC. Medium DM mengandung hampir seluruh komponen pada medium YNB namun beberapa komponen berada dalam jumlah lebih besar. Medium DM dan variasinya sering digunakan untuk mendapatkan data fisiologis kuantitatif dari strain khamir. DM dirancang untuk meyakinkan bahwa konsentrasi vitamin dan elemen-elemen sisa tidak menyebabkan batasan pada pertumbuhan (Hagerdal, et al, 2005).

Ketika mikroorganisme tumbuh pada medium dengan mineral terdefinisi dengan ammonium sebagai satu-satunya sumber nitrogen, medium tersebut dengan cepat akan menjadi asam karena pelepasan proton selama transpor aktif nutrisi ke dalam sel. Pengasaman ini dengan cepat akan menghambat pertumbuhan sel dan metabolismenya. Karena itulah, medium tersebut harus diberi buffer pada pH sekitar pH optimal (Hagerdal, et al, 2005).

2.8 Pengukuran Massa Sel

2.8.1 Bobot Sel Kering

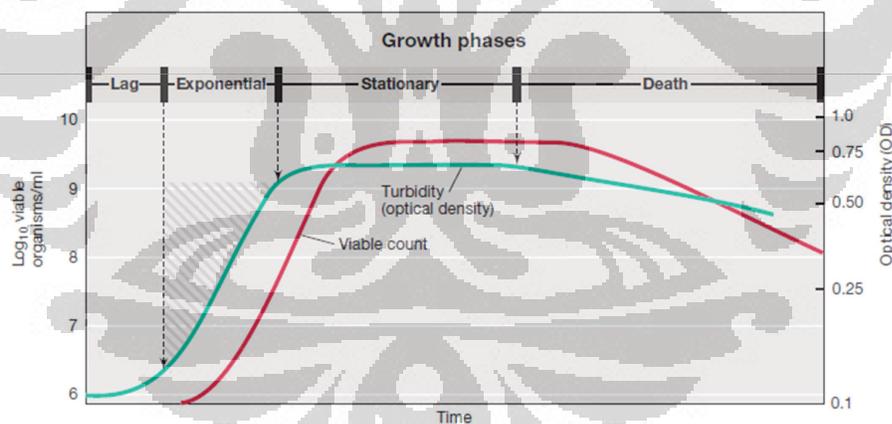
Bobot sel kering (DCW) digunakan untuk merefleksikan kalkulasi spesifik kecepatan pertumbuhan, sintesis produk dan penggunaan energi. Nilai ini tidaklah sama dengan massa sel yang sesungguhnya karena sel mengandung 80% air. Nilai DCW dapat merepresentasikan 30% dari massa sel sesungguhnya. Namun, DCW merepresentasikan jumlah sel yang ada, hidup ataupun mati dan tidak menghitung massa sel yang terbentuk atau hilang karena lisis (Rehm dan Reed, 1993).

Pengambilan sampel harus mewakili keseluruhan media fermentasi. DCW didapatkan dengan terlebih dahulu memisahkan sel dari media fermentasi dengan sentrifugasi atau filtrasi. Kedua teknik tersebut dapat memisahkan tidak hanya sel namun juga zat-zat yang tidak larut air. Untuk itu, perlu dilakukan pencucian dengan air kembali, buffer atau asam. Teknik pencucian harus dilakukan dengan hati-hati agar tidak terjadi penghilangan materi sel yang larut air dan memiliki berat molekul rendah. Hal tersebut dapat terjadi pada pencucian yang terlalu sering. Jika hal itu terjadi, hasilnya dapat merupakan 5-10% dari berat sel (Rehm dan Reed, 1993).

Setelah dipisahkan dari media fermentasi, sel kemudian dikeringkan pada 110°C selama 8 jam atau 80°C selama 24 jam. Pengeringan yang kurang akan menyebabkan tertinggalnya air, namun pengeringan yang terlalu sering dapat mengakibatkan pengurangan atau menguapnya material sel. Karena itulah, kondisi pengeringan harus dioptimasi. Nilai hasil pengukuran DCW dapat digunakan untuk melengkapi data fermentasi, yaitu kecepatan spesifik dan hasil spesifik (Rehm dan Reed, 1993).

2.8.2 Turbidimetri

Pengukuran turbidimetri adalah penjumlahan cahaya yang diabsorpsi dan diteruskan oleh medium, sel dan partikel lain. Pengukuran biasanya dilakukan pada panjang gelombang 600-700 nm dimana absorpsi cahaya oleh komponen sel minimum. Pengukuran harus dilakukan menggunakan alat spektrofotometer yang sama. Konversi nilai hasil pengukuran turbidimetri dan bobot sel kering akan memberikan nilai yang bervariasi bergantung pada komposisi dan bentuk sel serta komposisi media (Rehm dan Reed, 1993).



[sumber: Madigan et. Al., 2012]

Gambar 2.7 Grafik nilai hasil pengukuran turbidimetri dan pertumbuhan sel

2.9 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) adalah bentuk kromatografi yang sering digunakan dalam teknik analisis. Pada HPLC, fase gerak adalah cairan, namun fase diam dapat berupa cairan atau padatan. Fase gerak pada HPLC didefinisikan sebagai pengemas pada kolom. HPLC digunakan untuk memisahkan

komponen campuran. Komponen tersebut terlebih dahulu dilarutkan dalam pelarut, kemudian dipaksa untuk mengalir melalui Kolom Kromatografi di bawah tekanan tinggi. Resolusi HPLC ditentukan oleh interaksi antara komponen terlarut dengan fase diam. Interaksi tersebut dapat dimanipulasi melalui pemilihan pelarut dan fase diam (Drenthe College, n.d.).

Proses yang terjadi pada analisis dengan HPLC adalah proses adsorpsi yang dinamik dan kompetitif. Gaya adsorpsi yang terjadi tergantung pada tipe HPLC. Interaksi hidrofobik terutama terjadi pada Kromatografi Fase Terbalik. Interaksi Dipol-Sipol (Polar) umumnya terjadi pada Kromatografi Fase Normal dan Interaksi Ionik terjadi pada Kromatografi Penukar Ion. Kompetisi yang terjadi adalah kompetisi antara molekul analit dengan eluen untuk dapat berinteraksi dengan wilayah adsorpsi. Molekul analit yang lebih kuat akan berinteraksi dengan wilayah adsorpsi. Semakin lemah interaksi eluen, semakin lama analit tertahan di permukaan. Sementara pemisahan dengan *Size-Exclusion Chromatography* terjadi berdasarkan ukuran molekul molekul campuran (Drenthe College, n.d.).

Alat KCKT terdiri dari beberapa bagian, yaitu pompa, injektor, kolom, detektor dan integrator. Detektor berfungsi untuk mendeteksi atau mengidentifikasi dan mengukur jumlah komponen yang terdapat dalam eluat. Detektor Indeks Bias (RID) adalah salah satu macam detektor yang memberikan respon akibat perubahan indeks bias yang disebabkan oleh cuplikan. Sensitivitas deteksi detektor ini sangat rendah dibandingkan dengan detektor lain (umumnya dalam mikrogram) dan sangat peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir. (Harmita, 2006).

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian adalah di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Kuantitatif, Lantai 3 Gedung F, Departemen Farmasi Fakultas MIPA Universitas Indonesia Depok. Penelitian akan dilaksanakan dari bulan Februari sampai Mei 2012.

3.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *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 μm , 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 μm), mat pipet, cawan petri dan alat-alat gelas lain yang biasa digunakan dalam laboratorium mikrobiologi dan laboratorium kimia analisis.

3.3 Bahan

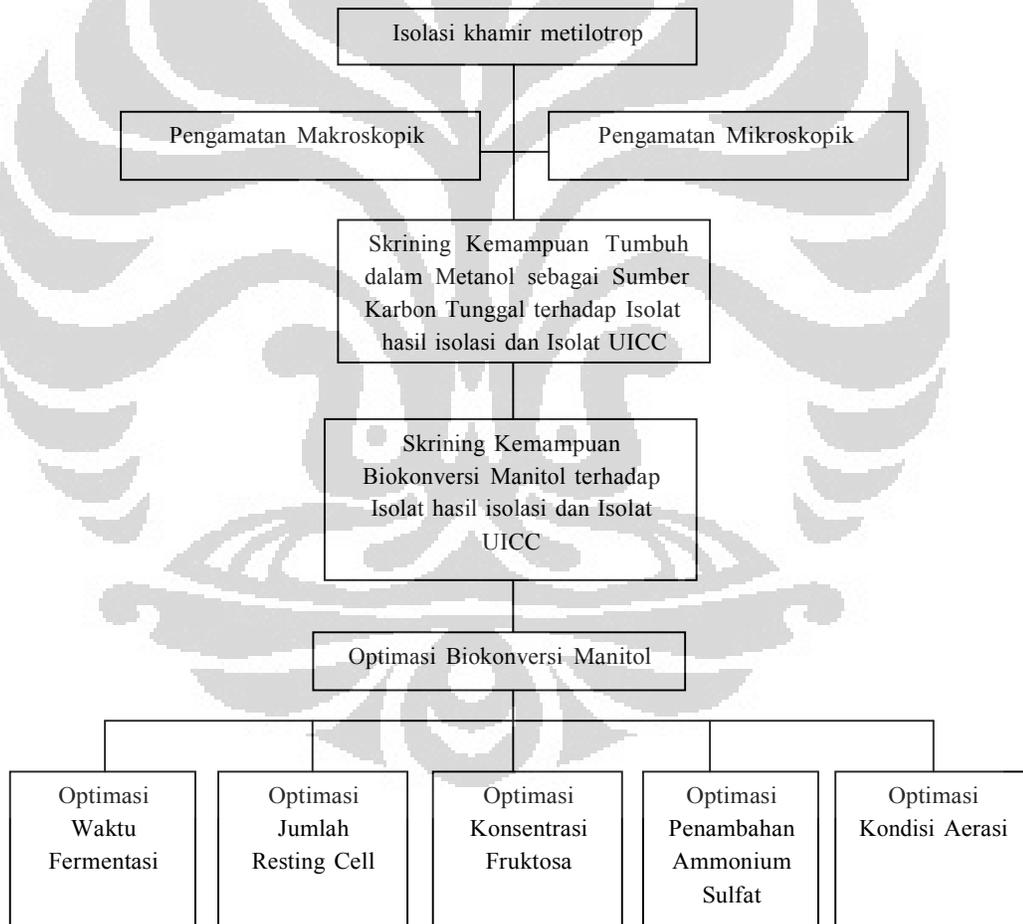
3.3.1 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah khamir hasil isolasi dari tanah yang diambil pada lahan persawahan yang masih ditumbuhi padi di Jl. Sindang Barang, Dramaga, Bogor Barat serta isolat khamir UICC (Universitas Indonesia Culture Collection) yaitu spesies khamir *Candida sp.* UICC Y216, *Debaryomyces hansenii* UICC Y276 dan *Debaryomyces nepalensis* UICC Y328.

3.3.2 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah lactophenol cotton blue, metanol (JT Baker), asetonitril (JT Baker), fruktosa (merck), glukosa (merck), ammonium sulfat (merck), kalium hidrogen posfat (merck), dinatrium hidrogen posfat dihidrat (merck), magnesium sulfat (merck), manitol (merck), aqua destilata steril (widatra), ekstrak khamir (bacto), pepton (liofilchem), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (merck), $FeSO_4 \cdot 2H_2O$ (merck), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (merck), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (merck), dan asetonitril (merck), agar (wako)

3.4. Cara Kerja



Gambar 3.1 Skema Kerja

3.4.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan dicuci bersih dan dikeringkan, kemudian disterilkan. Sterilisasi yang dilakukan adalah sterilisasi cara basah yaitu dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.4.2 Penyiapan Media

3.4.2.1 Media Isolasi

Komposisi media yang digunakan untuk isolasi yakni :

Metanol	1 mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,35 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
Kloramfenikol	0,05 g
Ekstrak khamir	0,01 g
Agar	1,5 g
Aquadest	ad 100 mL

Pembuatan media dilakukan terlebih dahulu dengan menimbang setiap bahan dengan seksama. Kemudian, secara berurutan ammonium sulfat, magnesium sulfat, ekstrak khamir, kalium dihidrogen fosfat, dinatrium hidrogen fosfat, dan agar dilarutkan dalam aquadest. Kemudian larutan ini disterilkan dengan sterilisasi cara basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Larutan kloramfenikol dibuat secara terpisah. Kloramfenikol ditimbang dengan seksama kemudian dilarutkan dengan aquadest dalam labu takar. Larutan kloramfenikol dan metanol disterilkan dengan disaring menggunakan penyaring bakteri 0,22 µm dan ditambahkan ke dalam larutan yang telah dibuat dan telah disterilkan dengan autoklaf sebelumnya serta telah didiamkan hingga suhu menjadi dingin.

3.4.2.2 Media Peremajaan

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

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

Setiap bahan ditimbang dengan seksama kemudian dilarutkan dengan Aquadest dan dicukupkan volumenya hingga 100 mL dengan aquadest. Kemudian media diaduk dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan di atas *hot plate*. Setelah itu, media disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Sebanyak 5 mL media yang telah steril dan masih berada dalam kondisi cair di tuang ke dalam tabung reaksi steril. Tabung yang telah berisi media lalu diletakkan pada posisi dengan kemiringan sekitar 30° dan dibiarkan hingga membeku.

3.4.2.3 Media Prakultur

Komposisi media yang digunakan untuk isolasi yakni :

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

Pembuatan media dilakukan terlebih dahulu dengan menimbang setiap bahan dengan seksama. Kemudian, secara berurutan ammonium sulfat, magnesium sulfat, ekstrak khamir, kalium dihidrogen fosfat, dan dinatrium hidrogen fosfat dilarutkan dalam aquadest. Kemudian larutan ini disterilkan dengan sterilisasi cara basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Larutan fruktosa 1% dibuat secara terpisah. Fruktosa ditimbang dengan seksama kemudian dilarutkan dengan aquadest dalam erlenmeyer. Larutan fruktosa kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15

menit. Larutan kloramfenikol dan metanol disterilkan dengan disaring menggunakan penyaring bakteri 0,22 μm . Larutan fruktosa dan metanol ditambahkan ke dalam larutan yang telah dibuat dan telah disterilkan dengan autoklaf sebelumnya serta telah didiamkan hingga suhu menjadi dingin.

3.4.2.4 Media Skrining Kemampuan Fermentasi Manitol

Komposisi media yang digunakan untuk isolasi yakni :

Metanol	1 mL
Fruktosa	5%
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
$\text{Na}_2\text{HOP}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,35 g
KH_2PO_4	0,3 g
Ekstrak Khamir	0,01 g
Aquadest	ad 100 mL

Pembuatan media dilakukan terlebih dahulu dengan menimbang setiap bahan dengan seksama. Kemudian, secara berurutan ammonium sulfat, magnesium sulfat, ekstrak khamir, kalium dihidrogen fosfat, dan dinatrium hidrogen fosfat dilarutkan dalam aquadest. Kemudian larutan ini disterilkan dengan sterilisasi cara basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Larutan fruktosa 5% dibuat secara terpisah. Fruktosa ditimbang dengan seksama kemudian dilarutkan dengan aquadest dalam erlenmeyer. Larutan fruktosa kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Larutan kloramfenikol dan metanol disterilkan dengan disaring menggunakan penyaring bakteri 0,22 μm . Larutan fruktosa dan metanol ditambahkan ke dalam larutan yang telah dibuat dan telah disterilkan dengan autoklaf sebelumnya serta telah didiamkan hingga suhu menjadi dingin.

3.4.2.5 Media Optimasi Biokonversi

Komposisi media yang digunakan untuk optimasi biokonversi yakni :

Metanol	1 mL
Fruktosa	10%

Aquadest ad 10 mL

Fruktosa ditimbang dan dilarutkan dalam aquadest kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Metanol disterilkan dengan disaring menggunakan penyaring bakteri 0,22 µffi dan ditambahkan dalam larutan fruktosa steril yang telah didiamkan hingga dingin.

3.4.3 Isolasi Khamir Metilotrop dari Tanah Sawah

Satu gram sampel tanah yang ditimbang secara seksama kemudian disuspensikan dalam 9 mL aquadest steril. Suspensi tersebut kemudian dibuat dalam pengenceran berseri 10 hingga konsentrasi 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} dengan aquadest steril. Sebanyak 0,1 mL dari pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4} diinokulasikan ke dalam cawan petri yang mengandung 15 mL media isolasi padat yang belum mengandung metanol. Kemudian di inkubasi selama 2-3 hari. Inokulum yang mengandung sel yang tumbuh kemudian dipindahkan ke dalam cawan petri yang berisi media yang sama namun telah diberi penambahan metanol. Kemudian inokulum ini diinkubasi selama 2-3 hari pada suhu ruang.

3.4.4 Pemurnian Isolat Khamir

Khamir yang tumbuh pada medium isolasi kemudian diambil dan disubkultur dalam Medium YPDA kemudian diinkubasi selama 2 hari pada suhu ruang. Khamir yang tumbuh kemudian diambil dan di subkultur dalam Media YPDA baru untuk memperoleh koloni tunggal. Setiap koloni tunggal kemudian diambil dan ditanam pada Medium YPDA baru kemudian diinkubasi kembali selama 2 hari pada suhu ruang.

3.4.5 Pengamatan Makroskopik dan Mikroskopik

3.4.5.1 Pengamatan Makroskopik

Khamir hasil isolasi yang telah murni diinokulasikan dalam cawan petri yang berisi media YPDA. Kemudian diinkubasi selama 1-3 hari pada suhu kamar. Selanjutnya dilihat warna, bentuk permukaan koloni, tepi dan bentuk koloni pada masing-masing isolat.

3.4.5.2 Pengamatan Mikroskopik

Sebanyak 2 ose khamir yang telah dimurnikan dan diremajakan dalam tabung reaksi digoreskan pada kaca objek. Kemudian satu tetes lactofenol cotton blue diteteskan kepada goresan sel tersebut. Setelah itu dipanaskan pada bunsen lalu diteteskan minyak imersi. Selanjutnya dilihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000 kali.

3.4.6 Peremajaan Isolat

Media yang digunakan untuk peremajaan isolat adalah *Yeast Polypepton Dextrose Agar* (YPDA). Media YPDA terlebih dahulu disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Kemudian, 5,0 mL media yang masih cair dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril secara aseptis. Kemudian tabung diletakkan pada posisi miring dengan sudut kemiringan lebih kurang 25° dan dibiarkan sampai membeku. Isolat kemudian digoreskan pada agar miring dengan menggunakan ose secara aseptis lalu dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu kamar selama 24 jam.

3.4.7 Penyiapan Prakultur

Khamir hasil isolasi dimasukkan sebanyak 3 ose ke dalam erlenmeyer yang mengandung Media Prakultur. Selanjutnya diinkubasi selama 2 hari pada suhu kamar dan disertai penggojokan menggunakan shaker berkecapan 175 rpm.

3.4.8 Skreening Kemampuan Tumbuh dalam Metanol Sebagai Sumber Karbon Tunggal

Sebanyak 1 ose sel khamir disuspensikan dalam 10 mL media prakultur dalam tabung reaksi. Kemudian dilakukan pengukuran *optical density* dengan spektrofotometri pada 5 ml suspensi untuk mengetahui kekeruhan di hari ke-0. Setelah itu dilakukan inkubasi pada suspensi yang tersisa selama 2 hari. Pada hari kedua dilakukan lagi pengukuran *optical density* untuk mengetahui kekeruhan setelah inkubasi..

3.4.9 Skreening Kemampuan Fermentasi Manitol

Sel khamir dari prakultur diambil menggunakan pipet volume sebanyak 10,0 mL untuk dipindahkan ke dalam erlenmeyer 250mL yang berisi media skrining fermentasi yang mengandung fruktosa 5% sebagai substrat. Kemudian digojok dengan kecepatan 175 rpm selama 3 hari pada suhu kamar.

Sampling dilakukan pada hari ketiga sebanyak 5 mL. Selanjutnya sampel ini di sentrifugasi lalu di ambil bagian supernatannya dan di saring dengan penyaring bakteri 0,22 μ m kemudian digunakan untuk menganalisis sisa substrat (fruktosa) dan produk fermentasi (manitol) yang dihasilkan menggunakan KCKT dan dibandingkan dengan standar.

3.4.10 Pembuatan *Resting Cell*

Prakultur yang telah dinkubasi dipipet sebanyak 1 mL untuk pengukuran *optical density*. Kemudian nilai tersebut dikonversi menjadi bobot sel yang didapat pada setiap mL media prakultur. Berdasarkan konversi tersebut, maka sejumlah tertentu prakultur disentrifugasi secara aseptik pada 8000 rpm dengan suhu 5°C selama 10 menit. Butiran sel kemudian disuspensi pada larutan salin fisiologis steril. Kemudian sel dipisahkan dari larutan dengan sentrifugasi kembali. Prosedur ini diulang sekali untuk mendapatkan *resting cell* yang bersih.

3.4.11 Optimasi Kondisi Biokonversi Manitol

3.4.11.1 Optimasi Waktu Fermentasi

Resting cell dari prakultur sebanyak 1200 mg disuspensi dalam erlenmeyer 50 mL yang mengandung 10 mL larutan fruktosa 10% dan metanol 1%. Erlenmeyer tersebut kemudian diinkubasi pada suhu kamar dengan penggojokan menggunakan *rotary shaker* pada 175 rpm selama 4 hari.

Sampling dilakukan pada setiap hari selama 4 hari sebanyak 2,5mL. Sebanyak 0,5mL digunakan untuk uji *Optical Density* dan sebanyak 2,0 mL digunakan untuk menganalisis sisa substrat dan produk fermentasi yang dihasilkan menggunakan KCKT dan dibandingkan dengan standar.

3.4.11.2 Konsentrasi *Resting Cell*

Resting cell dari prakultur dengan jumlah yang berbeda (300; 500; 1000; 1400 mg) disuspensi dalam erlenmeyer 50 mL yang mengandung 10 mL larutan fruktosa 10% dan metanol 1%. Erlenmeyer tersebut kemudian diinkubasi pada suhu kamar dengan penggojokan menggunakan *rotary shaker* pada 175 rpm selama 4 hari.

Sampling dilakukan pada hari keempat sebanyak 6,0 mL. Selanjutnya sampel ini di sentrifugasi lalu di ambil bagian supernatannya dan di saring dengan penyaring bakteri 0,22 μm . Sebanyak 1,0 mL digunakan untuk uji *Optical Density* dan sebanyak 5,0 mL digunakan untuk menganalisis sisa substrat dan produk fermentasi yang dihasilkan menggunakan KCKT dan dibandingkan dengan standar.

3.4.11.3 Optimasi Konsentrasi Fruktosa

Resting cell dari prakultur dengan jumlah yang sama, yaitu 500 mg disuspensi dalam erlenmeyer 50 mL yang mengandung 10 mL larutan fruktosa dengan konsentrasi berbeda, yaitu 7,5; 10; 12,5 dan 15% dan metanol 1%. Erlenmeyer tersebut kemudian diinkubasi pada suhu kamar dengan penggojokan menggunakan *rotary shaker* pada 175 rpm selama 4 hari.

Sampling dilakukan pada hari keempat sebanyak 6,0 mL. Sebanyak 1,0 mL digunakan untuk uji *Optical Density* dan sebanyak 5,0 mL digunakan untuk menganalisis sisa substrat dan produk fermentasi yang dihasilkan menggunakan KCKT dan dibandingkan dengan standar.

3.4.11.4 Optimasi Penambahan Ammonium Sulfat

Resting cell dengan jumlah yang sama, yaitu 500 mg disuspensi dalam erlenmeyer 50 mL berbeda yang mengandung 10 mL larutan fruktosa 10% dan metanol 1%. Masing-masing erlenmeyer diberi penambahan Ammonium Sulfat dengan konsentrasi berbeda-beda, yaitu 0,25; 0,50 dan 0,75%. Erlenmeyer tersebut kemudian diinkubasi pada suhu kamar dengan penggojokan menggunakan *rotary shaker* pada 175 rpm selama 4 hari.

Sampling dilakukan pada keempat sebanyak 6,0 mL. Sebanyak 1,0 mL digunakan untuk uji *Optical Density* dan sebanyak 5,0 mL digunakan untuk menganalisis sisa substrat dan produk fermentasi yang dihasilkan menggunakan KCKT dan dibandingkan dengan standar.

3.4.11.5 Optimasi Kondisi Aerasi

Resting cell dengan jumlah yang sama, yaitu 500 mg disuspensi dalam erlenmeyer 50 mL mengandung media dengan volume berbeda-beda, yaitu 10 mL; 15 mL; 20 mL; dan 25 mL serta mengandung larutan fruktosa 10% dan metanol 1%. Erlenmeyer tersebut kemudian diinkubasi pada suhu kamar dengan penggojokan menggunakan *rotary shaker* pada 175 rpm selama 4 hari.

Sampling dilakukan pada hari keempat sebanyak 6,0 mL. Sebanyak 1,0 mL digunakan untuk uji *Optical Density* dan sebanyak 5,0 mL digunakan untuk menganalisis sisa substrat dan produk fermentasi yang dihasilkan menggunakan KCKT dan dibandingkan dengan standar.

3.4.12 Pengukuran Biomassa Secara Turbidimetri dan Bobot Sel Kering

Sampel dan kultur fermentasi diukur OD-nya secara turbidimetri pada panjang gelombang 600 nm. Dipipet masing-masing sebanyak 1,0 mL sampel dari prakultur dan kultur fermentasi lalu dimasukkan masing-masing ke dalam labu ukur 10,0 mL dan 25,0 mL. Kemudian ditambahkan dengan aquadest hingga 25 mL pada media prakultur dan 100 mL pada media fermentasi. Selanjutnya diukur kekeruhannya menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Untuk mendapatkan bobot sel kering, sebanyak 10,0 mL dipipet dari inokulum kemudian disentrifugasi dan dicuci residunya dengan aquadest steril. Kemudian dikeringkan pada suhu 110°C selama 7 jam lalu ditimbang sampai didapat bobot konstan. Prosedur ini dilakukan tiga kali (triplo). Lalu dibuat kesetaraan antara OD dengan bobot sel keringnya

3.4.13 Analisa Kuantitatif secara KCKT

3.4.13.1 Pembuatan kurva kalibrasi Fruktosa

Fruktosa ditimbang dan dibuat larutan standar sebanyak lima macam konsentrasi berbeda yaitu 500, 2000, 4000, 6000, 8000 ppm. Kemudian

disuntikkan sebanyak 20 μ l. Selanjutnya dibuat kurva kalibrasi dengan menghitung dari luas puncak yang didapat.

3.4.13.2 Pembuatan kurva kalibrasi Manitol

Manitol ditimbang dan dibuat larutan standar sebanyak lima macam konsentrasi berbeda yaitu 1000,2000, 4000, 6000, 8000 ppm. Kemudian disuntikkan sebanyak 20 μ l. Selanjutnya dibuat kurva kalibrasi dengan menghitung dari luas puncak yang didapat.

3.3.12.3 Analisis Sisa Substrat dan Produk

Dipipet sebanyak 1,0 mL sampel dari kultur fermentasi. Kemudian sampel disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Lalu diambil supernatannya dan disaring menggunakan penyaring bakteri 0,22 μ m. Supernatan ini lalu dianalisa menggunakan KCKT dengan sistem HPLC Shimadzu pada kolom Waters, fase gerak asetonitril:air (97:3). Kolom dijalankan pada suhu 298 K dengan laju aliran 1 mL/menit. Analisa dibandingkan dengan standar. Kemudian dihitung kadarnya dengan cara memasukkan luas puncak yang di dapat ke dalam persamaan kurva kalibrasi.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini secara garis besar terdiri dari 5 tahap, yaitu isolasi khamir metilotrop dari tanah, pengamatan makroskopik dan mikroskopik isolat, skrining kemampuan tumbuh dalam metanol sebagai sumber karbon tunggal dan skrining kemampuan fermentasi manitol terhadap khamir hasil isolasi dan koleksi UICC, serta optimasi fermentasi manitol menggunakan isolat terbaik hasil skrining.

4.1 Isolasi khamir Metilotrop dari tanah

Tanah adalah sumber karbon organik dan nitrogen sehingga dapat menjadi pilihan sumber isolasi berbagai mikroorganisme, begitu juga khamir (Labeda (ed), 1990). Tanah yang dipilih adalah tanah sawah karena tanah sawah kaya akan bakteri metanotrof yang mengoksidasi metan menjadi metanol pada lapisan permukaan sedimen sawah (Reed dan Rehm(ed), 1993).

Isolat dilakukan dengan penggunaan media isolasi yang menggunakan kloramfenikol untuk mencegah pertumbuhan bakteri. Seleksi isolat berdasarkan pada karakteristik makroskopiknya, bahwa dalam 2 dimensi umumnya sel khamir berbentuk oval atau sferis, mengkilat dan tidak mengandung hifa. Isolat khamir dianggap sebagai khamir metilotrop ketika mampu tumbuh pada media yang hanya mengandung metanol sebagai satu-satunya sumber karbon. Isolat yang didapatkemudian dibedakan berdasarkan warnanya.

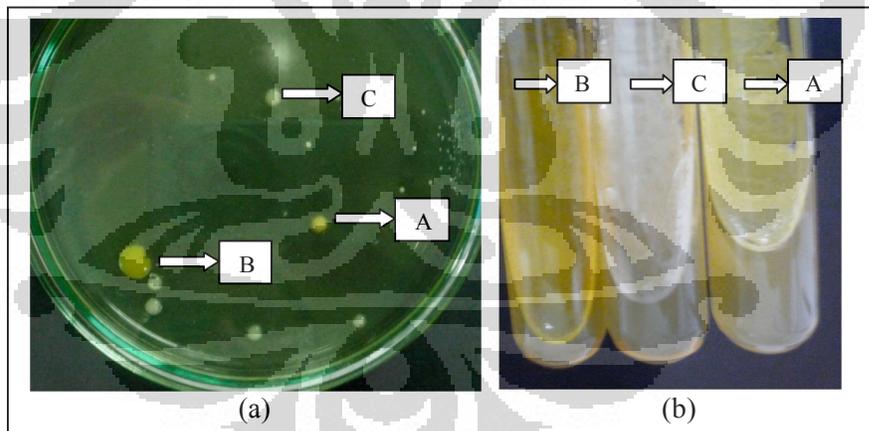
Pengambilan sampel tanah diambil pada kedalaman antara 2-10 cm karena pada kedalaman tersebut terdapat lapisan sedimen tanah. Selain itu, pengambilan tanah tidak dapat dilakukan pada permukaan paling atas dari tanah ataupun kedalaman dibawah 30 cm. Hal ini disebabkan tanah bagian atas biasanya mengandung sedikit khamir karena paparan sinar matahari dan pemanasan. Sedangkan pada kedalaman di bawah 30 cm, khamir hampir tidak dapat ditemukan (Labeda (ed), 1990).

Isolasi khamir metilotrop dilakukan dengan dua tahap. Tahap pertama dilakukan pada media isolasi yang merupakan media selektif tanpa mengandung metanol. Media ini lengkap akan sumber nitrogen, sulfur dan magnesium namun

miskin akan sumber karbon dan mengandung kloramfenikol untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Sebelum inokulasi ke dalam media isolasi, dilakukan pula proses pengenceran. Pengenceran dan penggunaan media selektif dilakukan karena tanah merupakan substrat yang sangat kaya akan mikroorganisme. Pengenceran saja tidak cukup karena cawan petri tidak mampu mendukung lebih dari sekitar 400 koloni terpisah. Hal ini mengakibatkan spesies minoritas (misalnya berjumlah kurang dari 1/400 atau 0,25% dari populasi) tidak dapat tumbuh pada media yang tidak selektif. Karena itulah, penggunaan media selektif dalam hal ini sangat penting (Labeda (ed), 1990). Proses isolasi yang dilakukan memberikan hasil berupa 3 isolat yang terduga khamir namun belum dapat dipastikan karena tidak dilakukan identifikasi molekuler.

4.1.1 Deskripsi Makroskopik

Berdasarkan pengamatan makroskopik, diketahui bahwa telah didapatkan 3 isolat yang diduga khamir dari proses isolasi. Hasil pengamatan makroskopik terhadap hasil isolasi dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Keterangan : (a) = isolat dalam cawan petri
 (b) = isolat murni pada agar miring
 A = Isolat A
 B = Isolat B
 C = Isolat C

Gambar 4.1 Pengamatan makroskopik hasil isolasi

Berikut adalah ciri makroskopik setiap isolat :

a. Isolat A

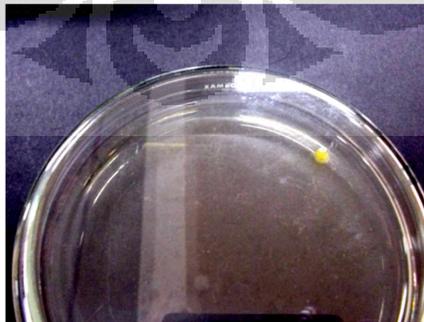
Penumbuhan isolat A pada media YPDA (Yeast Peptone Dextrose Agar) di dalam cawan petri selama 3 hari memberikan dekskripsi makroskopik seperti dapat dilihat pada Gambar 4.2. Secara makroskopik, tampak bahwa isolat A berwarna kuning muda, dengan permukaan licin, tepi rata dan bentuk bulat.



Gambar 4.2 Pengamatan makroskopik isolat A

b. Isolat B

Penumbuhan isolat B pada media YPDA (Yeast Peptone Dextrose Agar) di dalam cawan petri selama 3 hari memberikan dekskripsi makroskopik seperti dapat dilihat pada Gambar 4.3. Secara makroskopik, tampak bahwa isolat B berwarna kuning mengkilat, dengan permukaan licin, tepi rata dan bentuk bulat.



Gambar 4.3 Pengamatan makroskopik isolat B

c. Isolat C

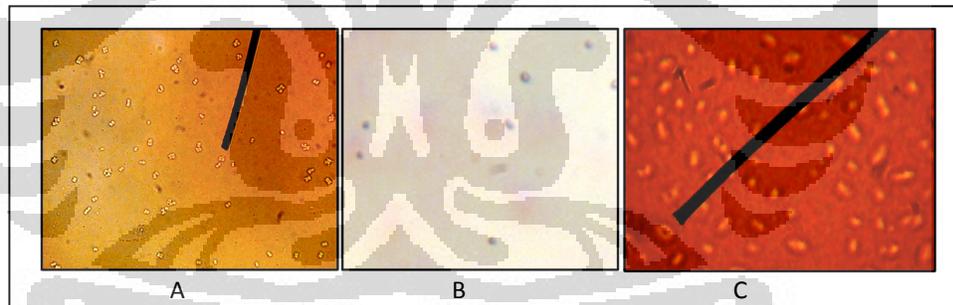
Penumbuhan isolat C pada media YPDA (Yeast Peptone Dextrose Agar) di dalam cawan petri selama 3 hari memberikan dekskripsi makroskopik seperti dapat dilihat pada Gambar 4.4. Secara makroskopik, tampak bahwa isolat berwarna putih, dengan permukaan licin, tepi rata dan bentuk bulat.



Gambar 4.4 Pengamatan makroskopik isolat C

4.1.2 Dekskripsi Mikroskopik

Hasil pengamatan mikroskopik dapat dilihat pada gambar 4.5



Keterangan :

A = Isolat A dengan perbesaran 100x

B = isolate B perbesaran 40x

C = isolat C perbesaran 100x

Gambar 4.5 Pengamatan mikroskopik isolat

Dari pengamatan secara mikroskopik, didapatkan hasil bahwa Isolat A berbentuk bulat; isolat B berbentuk bulat dan tunggal; dan isolat C tampak

berukuran lebih besar, berbentuk ellips dan tampak sel yang sedang berada dalam keadaan *budding*.

4.2 Skrining Kemampuan Tumbuh dalam Metanol sebagai Sumber Karbon Tunggal

Skrining kemampuan tumbuh dalam metanol sebagai sumber karbon tunggal sebagai karakteristik dari khamir metilotrop dilakukan pada ketiga isolat dari tanah yang diduga khamir serta terhadap 3 spesies khamir koleksi UICC.

Pada proses skrining ini, satu ose khamir disuspensikan dalam 10 mL media isolasi yang mengandung metanol sebagai satu-satunya sumber karbon dalam tabung reaksi, kemudian diukur kekeruhannya dengan metode turbidimetri. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 600 nm karena pada panjang gelombang 600-700 nm absorpsi cahaya oleh komponen sel minimum. Metode pengukuran turbidimetri adalah penggabungan dari absorpsi cahaya dan diteruskannya cahaya oleh medium, sel, dan partikel lain (Rehm dan Reed (ed), 1993). Karena itulah, untuk mengetahui ada atau tidaknya pertumbuhan khamir pada media yang mengandung metanol sebagai sumber karbon tunggal, dilakukan pengukuran turbidimetri pada saat sebelum dan sesudah inkubasi, untuk mengetahui ada atau tidaknya pertambahan angka. Tabel 4.1 menunjukkan data hasil pengukuran turbidimetri pada keempat media yang telah disuspensikan oleh ketujuh khamir sebelum dan sesudah inkubasi selama 3 hari.

Berdasarkan pengamatan secara langsung dan pengukuran *optical density* diketahui adanya peningkatan kekeruhan pada koloni sel yang telah diinkubasi, meskipun secara kuantitatif peningkatan yang terjadi relatif kecil. Oleh sebab itu dapat disimpulkan bahwa isolat yang didapatkan dari proses isolasi serta ketiga isolat UICC adalah organisme metilotrop karena mampu tumbuh dalam media yang mengandung metanol sebagai sumber karbon tunggal. Kecilnya peningkatan *optical density* dapat disebabkan oleh minimnya suplai oksigen karena inkubasi dilakukan pada tabung reaksi.

Peran oksigen terhadap pertumbuhan khamir pada metanol sangat penting. Proses dekomposisi metanol menjadi CO_2 yang akan menghasilkan energi membutuhkan adanya O_2 . Terlebih, energi tersebut juga dibutuhkan untuk

asimilasi formaldehid pada khamir metilotrop. Reaksi asimilasi formaldehida untuk membentuk 2 molekul senyawa 3 karbon (dehidroksiaseton fosfat dan gliseraldehida fosfat) tersebut hanya akan berjalan ketika xylulosa 5 fosfat tersedia pada peroksisom. Transfer xylulosa 5 fosfat ke dalam peroksisom dari sitosol berjalan melalui transpor aktif sehingga membutuhkan energi. Karena itulah, suplai oksigen yang tidak cukup akan menyebabkan proses oksidasi metanol menjadi tidak sempurna serta terjadinya penurunan ketersediaan energi yang dibutuhkan untuk pertahanan hidup sel. (Klei et al, 2006). Hal tersebut dapat menjadi penyebab kecilnya perubahan kekeruhan sebelum dan setelah inkubasi.

Tabel 4.1 Data hasil skrining kemampuan tumbuh dalam media dengan metanol sebagai sumber karbon tunggal

Nama Isolat	Tabung A			Tabung B		
	OD _o	OD _t	ΔOD	OD _o	OD _t	ΔOD
Isolat A	0,0193	0,0402	0,0209	0,0186	0,0449	0,0263
Isolat B	0,0337	0,0609	0,0272	0,0674	0,0828	0,0154
Isolat C	0,0237	0,0304	0,0067	0,0121	0,0234	0,0113
<i>Candida sp</i>	0,0160	0,0178	0,0018	0,0182	0,0212	0,0018
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	0,0118	0,0242	0,0124	0,0151	0,0270	0,0119
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0,0422	0,0465	0,0033	0,0350	0,0270	0,0119

Keterangan :

OD_o : Nilai kerapatan optik suspensi khamir sebelum inkubasi yang diukur pada λ600 nm

OD_t : Nilai kerapatan optik suspensi khamir setelah inkubasi 48 jam pada suhu kamar dengan shaker kecepatan 175 rpm yang diukur pada λ = 600 nm

ΔOD : Nilai penambahan kerapatan optik suspensi khamir setelah inkubasi 48 jam pada suhu kamar dengan shaker kecepatan 175 rpm yang diukur pada λ = 600 nm

4.3 Skrining Kemampuan Fermentasi Manitol

Skrining kemampuan fermentasi manitol dilakukan terhadap ketiga isolat dari tanah yang diduga khamir serta ketiga isolat UICC untuk mengetahui spesies mana yang paling baik kemampuannya dalam melakukan biokonversi manitol. Ketujuh spesies khamir diinkubasikan dalam 100 mL media fermentasi yang mengandung 1 mL metanol, 5gr Fruktosa, 0,5 gr Ammonium Sulfat, 0,05 gr Magnesium Sulfat, 0,35 gr Dinatrium Hidrogen Fosfat Dihidrogenase, 0,3 gr

Kalium Dihidrogen Fosfat serta Ekstrak Khamir 0,01 gr dalam erlenmeyer 250 mL dan diinkubasi selama 72 jam.

Dari proses skrining didapatkan bahwa *Debaryomyces hansenii* menghasilkan mannitol dengan *yield value* terbesar dibandingkan keempat khamir lainnya dengan nilai 23,17%. Sementara pada sampel fermentasi khamir hasil isolasi, hanya isolat A yang terdeteksi mampu menghasilkan manitol dengan *yield value* 14,82%. Isolat UICC lainnya, *Candida sp* dan *Debaryomyces nepalensis* mampu memproduksi manitol dengan *yield value* masing-masing 4,38 dan 6,52. Rincian hasil skrining dapat dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil skrining kemampuan fermentasi manitol

Khamir	C_{fo} ($\mu\text{g/mL}$)	C_{ft} ($\mu\text{g/mL}$)	ΔC_f ($\mu\text{g/mL}$)	C_m ($\mu\text{g/mL}$)	Yield Value (%)
Isolat A	50000	29299,58	20700,42	3067,41	14,8181
Isolat B	50000	35763,74	14236,26	-	-
Isolat C	50000	26318,48	23681,52	-	-
<i>Candida sp</i>	50000	5529,08	49447,09	2164,89	4,38
<i>D. nepalensis</i>	50000	23460,26	47653,97	3109,21	6,52
<i>D. hansenii</i>	50000	19756,54	48024,35	11125,76	23,17

Keterangan :

- C_{fo} : Konsentrasi fruktosa awal
- C_{ft} : Konsentrasi fruktosa tersisa
- ΔC_f : Konsentrasi fruktosa yang digunakan
- C_m : Konsentrasi manitol yang dihasilkan

Debaryomyces hansenii adalah khamir yang sangat menarik dalam dunia bioteknologi karena sifatnya yang osmotoleran yaitu mampu tumbuh pada tekanan osmotik tinggi dan *oleaginous* yaitu mampu mengakumulasi dan menyimpan lipid. *Debaryomyces hansenii* adalah khamir haploid yang berreproduksi secara vegetatif melalui pertunasan multilateral. Khamir ini tidak memiliki pseudomiselium, namun pada keadaan tertentu dapat terbentuk. Reproduksi seksual dapat terjadi melalui konjugasi heterogen yang biasanya diikuti meiosis dan pembentukan askospora (Harms dan Breur, 2006). Berdasarkan skrining

kemampuan fermentasi manitol, *Debaryomyces hansenii* kemudian dipilih untuk digunakan pada optimasi biokonversi manitol selanjutnya.

4.4 Pengukuran Biomassa Sel

Pengukuran biomassa sel dilakukan dengan metode turbidimetri dan bobot sel kering. Turbidimetri dilakukan dengan menentukan absorbansi kekeruhan media prakultur yang mengandung sel khamir yang telah diinkubasi selama 3 hari menggunakan Spektrofotometri UV-VIS pada panjang gelombang 600 nm. Pada larutan sampel dengan pengenceran 10 kali didapatkan nilai absorbansi 0,1299.

Dari media prakultur yang sama, digunakan masing-masing 10 mL untuk penentuan bobot sel kering secara triplo. Hal ini dilakukan mula-mula dengan memisahkan sel dari media dengan sentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 15 menit. Kemudian, sel yang telah dipisahkan dari media dikeringkan dalam oven selama 7 jam pada suhu 110°C kemudian ditimbang dan dikeringkan lagi hingga didapatkan bobot konstan. Tabel hasil pengukuran bobot sel kering dapat dilihat pada tabel 4.3. Dari proses ini didapatkan 1 OD setara dengan 2,26 mg/mL dengan perhitungan seperti pada gambar 4.3.

Tabel 4.3 Hasil pengukuran bobot sel kering

Volume yang diambil (mL)	Bobot Endapan (mg)	Bobot Sel Kering (mg/mL)
10 mL	29,60	2,96
10 mL	29,20	2,92
10 mL	29,20	2,92
Bobot kering rata-rata		2,93

$$\begin{aligned}
 10 \times 0,1299 \text{ OD} &= 2,93 \text{ } \overset{\text{ffig}}{\text{I}}_{\text{ffil}} \\
 1,299 \text{ OD} &= 2,93 \text{ } \overset{\text{ffig}}{\text{I}}_{\text{ffil}} \\
 1 \text{ OD} &= 2,26 \text{ } \overset{\text{ffig}}{\text{I}}_{\text{ffil}}
 \end{aligned}$$

Gambar 4.6 Perhitungan kesetaraan optical density dan bobot sel kering

4.5 Optimasi Kondisi Biokonversi Manitol

Setiap tahapan optimasi diawali dengan menyiapkan *resting cell* dengan jumlah sebagaimana diperlukan. *Resting cell* adalah sel yang berada dalam fase stasioner. Kondisi ini terjadi karena sel berada dalam lingkungan yang kurang menguntungkan. Karena itu, sentrifugasi pada suhu 5°C dilakukan terhadap suspensi sel dalam media prakultur untuk memisahkan sel dari media serta menempatkan sel pada keadaan temperatur rendah. Berdasarkan konversi *optical density* ke dalam nilai bobot sel kering, didapatkan bahwa dari 1mL suspensi dapat didapatkan 2,26 mg sel. Konversi ini dijadikan dasar dalam penentuan konsentrasi sel yang akan diinokulasikan ke dalam media fermentasi meskipun bobot ini dapat berkurang pada *resting cell* karena lisis (Rehm dan Reed, 1993).

Optimasi kondisi Manitol dilakukan terhadap beberapa variabel, yaitu waktu inkubasi, konsentrasi sel yang diinkubasi, konsentrasi fruktosa, penambahan ammonium sulfat, dan volume aerasi.

4.5.1 Optimasi Waktu Fermentasi

Tahap ini dilakukan dengan inkubasi 140 mg/mL *resting cell* ke dalam 10 mL media fermentasi yang mengandung 10% fruktosa dan 1% metanol dalam erlenmeyer 50 mL. Sampling dilakukan setiap hari selama 4 hari sebanyak 2,5 mL dimana 0,5 mL diantaranya digunakan untuk pengukuran turbidimetri dan 2,0 mL lainnya digunakan untuk analisis produk.

Berdasarkan data yang diperoleh (Tabel 4.4), tampak bahwa hasil terbaik manitol didapatkan pada inkubasi hari ketiga dengan jumlah manitol 18002,90 mg/L. Jumlah manitol terlihat mengalami peningkatan dari hari pertama hingga ketiga. Hal ini menunjukkan bahwa sel masih terus melakukan biokonversi manitol hingga hari ketiga. Namun pada hari keempat, terlihat bahwa jumlah fruktosa yang terdeteksi mengalami peningkatan sementara jumlah manitol yang terdeteksi mengalami penurunan dari hari ketiga (gambar 4.7) . Hal ini dapat disebabkan karena produk manitol yang dihasilkan dikonversi kembali menjadi fruktosa oleh sel. Hal tersebut mungkin terjadi pada saat substrat fruktosa tidak tersedia dalam jumlah yang cukup dan terjadi inhibisi oleh manitol.

Tabel 4.4 Hasil optimasi waktu fermentasi dengan konsentrasi resting cell 140 mg/mL

Waktu	Biomassa Sel (mg/mL)	C_{fo} ($\mu\text{g/mL}$)	C_{ft} ($\mu\text{g/mL}$)	ΔC_f ($\mu\text{g/mL}$)	C_m ($\mu\text{g/mL}$)	Yield Value (%)
Hari 1	93,79	100000	75888,59	24111,41	10926,64	45,32%
Hari 2	105,09	100000	13817,98	86182,02	15404,98	7,21%
Hari 3	166,56	100000	6324,566	93675,43	18002,9	34,67%
Hari 4	130,85	100000	7868,205	92131,79	7350,40	-

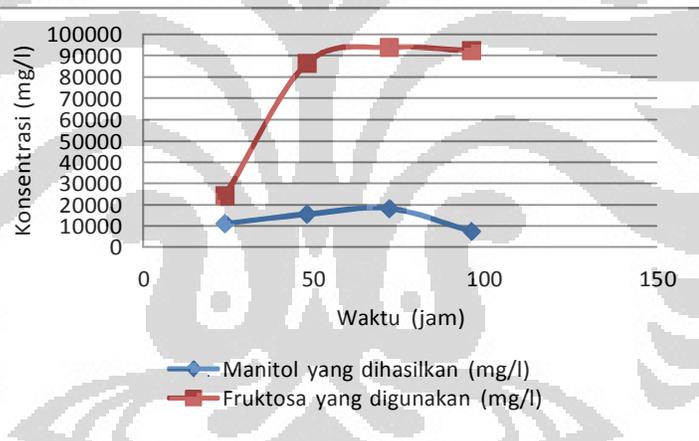
Keterangan :

C_{fo} : Konsentrasi fruktosa awal

C_{ft} : Konsentrasi fruktosa tersisa

ΔC_f : Konsentrasi fruktosa yang digunakan

C_m : Konsentrasi manitol yang dihasilkan



Gambar 4.7 Grafik produksi manitol dan fruktosa yang digunakan pada konsentrasi resting cell 140 mg/mL

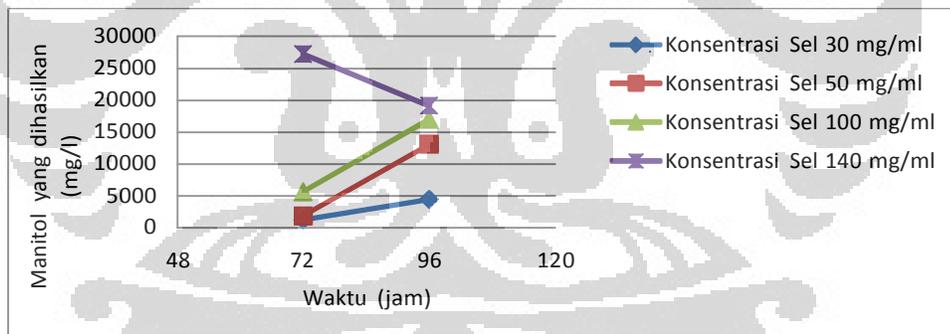
Hal tersebut juga serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Lee et. Al., (2003) pada enzim Manitol dehidrogenase yang didapatkan dari khamir *Candida magnoliae*. Melalui penelitian tersebut, diketahui bahwa manitol menghambat laju reaksi reduksi fruktosa.

Hasil yang berbeda didapatkan pada fermentasi menggunakan jumlah *restingcell* berbeda, dimana terjadi peningkatan jumlah manitol yang dihasilkan di

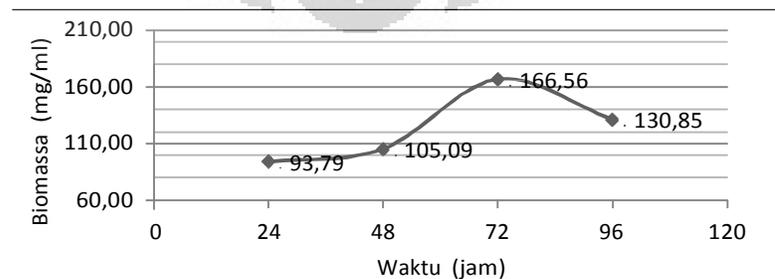
hari keempat (Tabel 4.5 dan Gambar 4.8) pada fermentasi dengan konsentrasi sel 30, 50, 100 dan 140 mg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa dengan konsentrasi sel yang lebih kecil, fruktosa yang tersedia pada hari ketiga masih mencukupi untuk dapat dikonversi menjadi manitol. Peningkatan yang signifikan dari jumlah manitol yang dihasilkan pada hari keempat terlihat pada konsentrasi sel 50 mg/mL dan 100 mg/mL (Tabel 4.5 dan Gambar 4.8).

Tabel 4.5 Hasil pengukuran konsentrasi manitol dengan variasi konsentrasi *resting cell*

Waktu Kultivasi (jam)	Manitol yang dihasilkan (mg/l)			
	Konsentrasi Sel 30 mg/mL	Konsentrasi Sel 50 mg/mL	Konsentrasi Sel 100 mg/mL	Konsentrasi Sel 140 mg/mL
72	1173,54	1809,55	5595,31	27162,63
96	4396,62	13031,29	16960,57	19069,79



Gambar 4.8 Grafik produksi manitol dengan variasi konsentrasi *resting cell*

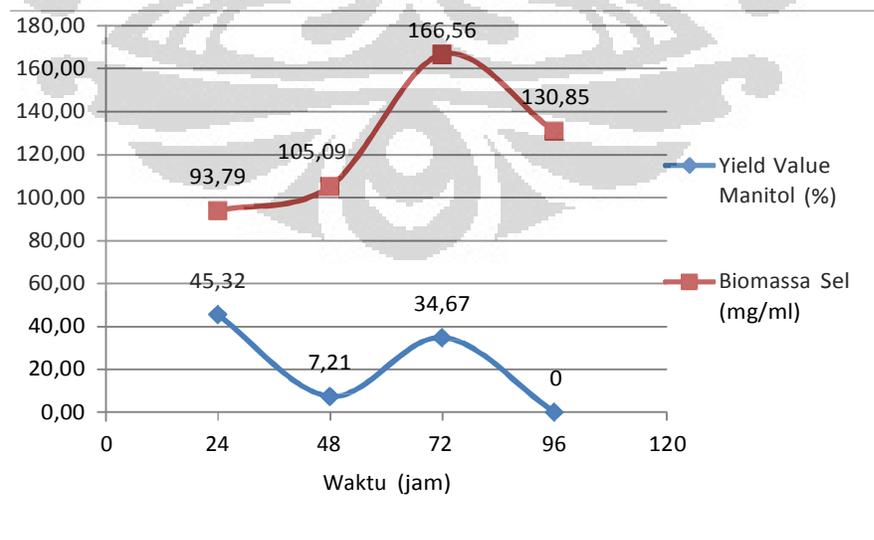


Gambar 4.9 Grafik pertumbuhan biomassa sel

Berdasarkan data pengukuran biomassa sel, dapat diketahui bahwa pada hari kedua terjadi peningkatan biomassa yang relatif lebih rendah dari pada peningkatan biomassa pada hari ketiga (Gambar 4.6). Grafik tersebut serupa dengan fase lag pada kurva pertumbuhan. Fase lag terjadi karena pada penyiapan *resting cell*, sel mengalami kerusakan karena pemisahan dengan medium serta terpapar pada suhu yang sangat rendah. Kondisi tersebut menyebabkan sel mengalami kekurangan berbagai konstituen penting sehingga membutuhkan waktu untuk melakukan biosintesis. Selain itu, pemindahan sel dari media yang lebih kaya (media prakultur) ke media yang lebih miskin (media fermentasi) menyebabkan sel harus mensintesis berbagai metabolit esensial yang tidak tersedia pada lingkungannya sehingga diperlukan waktu untuk produksi berbagai enzim (Madigan, 2012).

Pada hari ketiga tampak bahwa sel mengalami pertumbuhan yang sangat cepat, yaitu fase eksponensial. Pada hari keempat terjadi penurunan jumlah biomassa sel. Hal tersebut dapat terjadi karena sel mengalami lisis. Lisis dapat disebabkan oleh menurunnya jumlah fruktosa yang diperlukan untuk metabolisme sel. Kondisi tersebut serupa dengan fase kematian pada kurva pertumbuhan.

Perhitungan *Yield Value* manitol per hari juga dilakukan untuk mengetahui hubungan antara pertumbuhan biomassa dengan laju biokonversi. Data tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.10.



Gambar 4.10 Grafik *yield value* manitol dan pertumbuhan biomassa sel

Berdasarkan grafik, dapat diketahui bahwa pada fase lag, peningkatan biomassa sel seiring dengan penurunan *yield value* manitol. Pada fase eksponensial, kecepatan biomassa sel dan *yield value* manitol meningkat. Hal ini dapat dikarenakan pada fase lag, kerja beberapa enzim belum maksimal dan metabolisme lebih diarahkan pada pertumbuhan biomassa sel. Sementara, pada fase eksponensial, sel telah mampu melakukan pertumbuhan biomassa dan biokonversi manitol dengan baik. Pada fase kematian di hari keempat, terjadi penurunan *yield value* manitol dan biomassa sel. Hal ini dapat dikarenakan substrat yang tidak lagi mencukupi kebutuhan sel.

4.5.2 Optimasi Konsentrasi *Resting Cell*

Tahap ini dilakukan dengan inkubasi *resting cell* dengan jumlah berbeda, yaitu 300, 500, 1000, dan 1400 mg ke dalam 10 mL media fermentasi yang mengandung 10% fruktosa dan 1% metanol masing-masing pada erlenmeyer 50 mL yang berbeda. Sampling dilakukan pada hari ketiga dan keempat untuk pengukuran turbidimetri dan analisis produk.

Berdasarkan data yang diperoleh, pada hari ketiga tampak bahwa hasil terbaik manitol didapatkan dengan jumlah *resting cell* 1400 mg dalam 10 mL media atau dengan konsentrasi 140 mg/mL dengan nilai 19069,79 mg/L. Hal ini disebabkan semakin banyaknya sel yang mereduksi fruktosa menjadi manitol.

Namun demikian, pada hari keempat diketahui bahwa *yield value* dan konsentrasi manitol yang dihasilkan mengalami penurunan pada konsentrasi sel 140 mg/mL tersebut di hari ketiga. Hal tersebut serupa dengan penurunan yang terjadi pada tahap optimasi sebelumnya, yaitu optimasi waktu kultivasi fermentasi. Sementara pada konsentrasi lainnya, yaitu 30, 50 dan 100 mg/mL produksi manitol optimal dicapai pada hari keempat dengan nilai yang cukup signifikan. Hal ini dapat disebabkan karena jumlah biomassa yang tidak terlalu tinggi sehingga substrat fruktosa tetap tersedia dalam jumlah yang cukup untuk dikonversi menjadi manitol dan untuk proses metabolisme lainnya yang menghasilkan energi untuk kelangsungan hidup sel dalam waktu lebih lama yaitu

hingga hari keempat. Hal ini didukung dengan masih meningkatnya jumlah biomassa pada hari keempat dibandingkan dengan hari ketiga.

Tabel 4.6 Hasil optimasi jumlah *resting cell*

N (mg)	Biomassa Sel (mg/mL)	C_{fo} (mg/l)	C_{ft} (mg/l)	ΔC_f (mg/l)	C_m (mg/l)	Yield Value (%)
300	24,63	100000	16081,68	83918,32	4396,62	5,24%
500	32,97	100000	8111,626	91888,37	13031,29	14,18%
1000	35,89	100000	8036,411	91963,59	16960,57	18,44%
1400	122,50	100000	6942,192	93057,81	19069,79	20,49%

Keterangan :

- N : Jumlah *resting cell*
- C_{fo} : Konsentrasi fruktosa awal
- C_{ft} : Konsentrasi fruktosa tersisa
- ΔC_f : Konsentrasi fruktosa yang digunakan
- C_m : Konsentrasi manitol yang dihasilkan

Pada hasil optimasi, tampak juga bahwa dengan jumlah 500 mg dalam 10 mL media atau dengan konsentrasi sel 50 mg/mL telah didapatkan hasil yang cukup signifikan yaitu 14,18%. Oleh karena itu, optimasi selanjutnya dilakukan dengan inokulasi 500 mg *resting cell* ke dalam 10 mL media fermentasi dengan waktu kultivasi empat hari. Rincian hasil optimasi konsentrasi *resting cell* dapat dilihat pada tabel 4.6.

4.5.3 Optimasi Konsentrasi Fruktosa

Tahap ini dilakukan dengan inkubasi *resting cell* masing-masing dengan jumlah sama, yaitu 500 mg pada media fermentasi yang mengandung 1% metanol dan konsentrasi fruktosa berbeda yaitu 7,5; 10; 12,5; 15% masing-masing pada erlenmeyer 50 mL berbeda. Sampling dilakukan pada hari keempat untuk pengukuran turbidimetri dan analisis produk. Tabel 4.7 menunjukkan data hasil optimasi. Berdasarkan data yang diperoleh, tampak bahwa manitol didapatkan dengan jumlah terbesar pada media fermentasi dengan konsentrasi fruktosa 10% yaitu 14199,90 dengan *yield value* manitol 16,33% .

Pada konsentrasi fruktosa lebih dari 10%, tampak bahwa *yield value* manitol menurun. Hal ini sesuai dengan sifat *Debaryomyces hansenii* sebagai khamir halofil moderat yang tumbuh optimal pada konsentrasi NaCl 3-5% namun masih mampu tumbuh pada konsentrasi NaCl hingga 25%. (Harms dan Breur, 2006). Berdasarkan data yang tercantum pada Martindale 28 (1982), diketahui bahwa larutan fruktosa 5,05% isoosmotik dengan larutan NaCl 0,9%. Hal tersebut berarti bahwa jika dilakukan konversi tekanan osmotik NaCl pada fruktosa, diketahui bahwa *D.hansenii* mampu tumbuh optimal pada konsentrasi fruktosa 16,83-28,05%. Pertumbuhan optimal akan menyebabkan penggunaan substrat untuk metabolisme yang mendukung pembentukan energi untuk sel. Karena itulah pada pertumbuhan yang optimal konversi manitol menurun.

Tabel 4.7 Hasil optimasi konsentrasi fruktosa

Kadar Fruktosa	Biomassa Sel (mg/mL)		$C_{i_0} H_4$ (mg/mL)	$C_{i_1} H_4$ (mg/mL)	$\Delta C_f H_4$ (mg/mL)	$C_m H_4$ (mg/mL)	Yield Value
	H3	H4					
7,5 %	38,24	38,24	75000	10827,80	64172,20	10042,44	15,65%
10,0 %	38,58	38,58	100000	13044,85	86955,15	14199,90	16,33%
12,5 %	37,74	37,74	125000	5526,62	119473,38	13375,25	11,20%
15,0	36,36	36,36	150000	21718,79	128281,21	11998,43	9,35%

Keterangan :

$C_{i_0} H_4$: Konsentrasi fruktosa awal pada hari keempat

$C_{i_1} H_4$: Konsentrasi fruktosa tersisapada hari keempat

$\Delta C_f H_4$: Konsentrasi fruktosa yang digunakan pada hari keempat

$C_m H_4$: Konsentrasi manitol yang dihasilkan pada hari keempat

Biomassa sel yang terukur pada hari ketiga dan keempat menunjukkan bahwa sudah terjadi penurunan biomassa (fase kematian) terutama pada konsentrasi mendekati optimum (16,83-28,05%). Sehingga, nilai biomassa pada hari ketiga dan keempat tidak dapat dijadikan acuan untuk mengetahui kecepatan metabolisme sel pada setiap konsentrasi larutan fruktosa. Maka, untuk mengetahui pengaruh konsentrasi larutan fruktosa terhadap kecepatan metabolisme sel, dapat dilakukan dengan mengamati konsentrasi fruktosa yang terdeteksi pada hari keempat (tabel 4.7).

Menurut data pengukuran fruktosa yang tersisa, diketahui bahwa terjadi penurunan fruktosa yang tersisa secara signifikan pada fermentasi dengan larutan fruktosa 12,5%. Bahkan, pada fermentasi dengan larutan fruktosa 15%, fruktosa yang terdeteksi mengalami peningkatan sementara biomassa sel telah mengalami penurunan pada hari dilakukannya pengukuran yang berarti manitol telah mulai dikonversi menjadi fruktosa. Hal ini menunjukkan bahwa kecepatan penggunaan fruktosa pada kondisi larutan fruktosa 15% lebih tinggi sehingga pada fermentasi tersebut, fruktosa lebih dahulu mencapai jumlah yang tidak memadai untuk dikonversi menjadi manitol.

Berdasarkan hal tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa metabolisme sel semakin meningkat pada konsentrasi fruktosa mendekati 16,83% (setara dengan NaCl 3%). Peningkatan metabolisme sel tersebut berkebalikan dengan produksi manitol yang semakin menurun dengan peningkatan konsentrasi fruktosa. Hal tersebut dikarenakan kecepatan penggunaan substrat dan kofaktor enzim lebih besar penggunaannya pada siklus katabolisme yang menunjang pertumbuhan sel. Kondisi osmotik optimal (larutan fruktosa 10%) dapat mencapai produksi manitol terbaik dapat disebabkan oleh optimalnya jumlah substrat enzim manitol dehidrogenase yang tersedia dan kondisi osmotik lingkungan yang sesuai.

4.5.4 Optimasi Penambahan Ammonium Sulfat

Tahap ini dilakukan dengan inkubasi *resting cell* masing-masing dengan jumlah sama, yaitu 500 mg pada media fermentasi yang mengandung 1% metanol dan konsentrasi fruktosa 10% dan penambahan ammonium sulfat berbeda yaitu 0,25%, 0,50% dan 0,75% masing-masing pada erlenmeyer 50 mL. Sampling dilakukan pada hari keempat untuk pengukuran turbidimetri dan analisis produk. Hasil optimasi penambahan ammonium sulfat dapat dilihat pada tabel 4.8.

Berdasarkan data yang diperoleh, tampak bahwa hasil *yield value* manitol meningkat seiring meningkatnya konsentrasi ammonium sulfat hingga konsentrasi ammonium sulfat 0,75% (Gambar 4.8). Nilai tertinggi 40,99% dicapai pada konsentrasi ammonium sulfat tertinggi yaitu 0,75%. Selain itu, tampak pula bahwa dapat dikatakan tidak terjadi peningkatan biomassa sel seiring bertambahnya konsentrasi ammonium sulfat. Hal ini sesuai dengan data yang

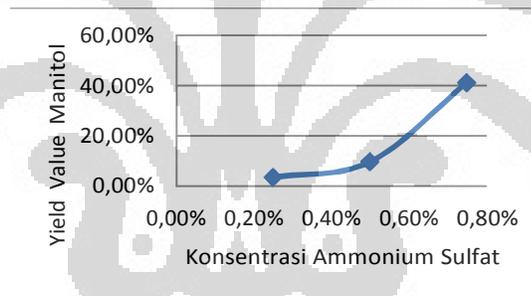
dilaporkan oleh Chaodary dan Rao (1984) bahwa Ammonium Sulfat tidak mendukung pertumbuhan *Debaryomyces hansenii*.

Tabel 4.8 Hasil Optimasi Penambahan Ammonium Sulfat

Kadar Amm.Sulfat (%)	Biomassa Sel (mg/mL)	C_{fo} ($\mu\text{g/mL}$)	C_{ft} ($\mu\text{g/mL}$)	ΔC_f ($\mu\text{g/mL}$)	C_m ($\mu\text{g/mL}$)	Yield Value (%)
0,25	24,95	100000	7171,787	92828,21	3220,29	3,47%
0,50	32,39	100000	6591,901	93408,1	8940,37	9,57%
0,75	31,78	100000	19292,96	80707,04	33083,32	40,99%

Keterangan :

- C_{fo} : Konsentrasi fruktosa awal
- C_{ft} : Konsentrasi fruktosa tersisa
- ΔC_f : Konsentrasi fruktosa yang digunakan
- C_m : Konsentrasi manitol yang dihasilkan



Gambar 4.11 Grafik *yield value* manitol dengan variasi penambahan Ammonium Sulfat

Peningkatan produksi manitol dengan meningkatnya konsentrasi ammonium sulfat hingga 0,75% mungkin disebabkan peningkatan fluks metabolisme reduksi fruktosa yang dikatalisis oleh manitol dehidrogenase. Hal ini berkebalikan dengan penelitian yang dilakukan oleh Pedersen *et. al.*, (1999) pada fungi *Aspergillus oryzae* dimana fluks metabolisme manitol dehidrogenase tidak mengalami perbedaan yang signifikan saat tumbuh pada ammonia dan nitrat.

4.5.5 Optimasi Kondisi Aerasi

Tahap ini dilakukan dengan inkubasi *resting cell* masing-masing dengan jumlah sama, yaitu 500 mg pada volume media fermentasi berbeda-beda yaitu 10, 15, 20, dan 25 mL yang mengandung 1% metanol dan konsentrasi fruktosa 10% masing-masing pada erlenmeyer 50 mL berbeda. Sampling dilakukan pada hari keempat untuk pengukuran turbidimetri dan analisis produk. Data hasil optimasi dapat dilihat pada tabel 4.9.

Tabel 4.9 Hasil optimasi kondisi aerasi

Volume Media (mL)	Biomassa Sel (mg/mL)	C_{fo} ($\mu\text{g/mL}$)	C_{ft} ($\mu\text{g/mL}$)	ΔC_f ($\mu\text{g/mL}$)	C_m ($\mu\text{g/mL}$)	Yield Value (%)
10	34,87	100000	5928,49	94071,51	10062,76	10,67
15	30,85	100000	28906,94	71093,06	43472,74	61,15
20	27,98	100000	13374,56	86625,44	27589,62	31,85
25	24,11	100000	12200,41	87799,59	5394,59	6,14

Keterangan :

C_{fo} : Konsentrasi fruktosa awal

C_{ft} : Konsentrasi fruktosa tersisa

ΔC_f : Konsentrasi fruktosa yang digunakan

C_m : Konsentrasi manitol yang dihasilkan

Berdasarkan data yang diperoleh, tampak bahwa yield value manitol tertinggi didapatkan dengan kondisi aerobik relatif terbatas yaitu dengan volume media fermentasi 15 mL pada erlenmeyer 50 mL yaitu senilai 61,15%. Pada volume media fermentasi 10 mL dimana kondisi aerobik tertinggi dihasilkan penurunan nilai *yield value* yang cukup signifikan yaitu menjadi 10,67%. Hal ini sebanding dengan pengaruh aerasi pada fermentasi xylitol oleh *Debaryomyces hansenii* dari substrat xylose dimana pada kondisi sangat aerobik, produk xylitol menurun dikarenakan xylitol tersebut digunakan untuk produksi biomassa dan laju sintesis xylitol sangat rendah karena NADH yang diperlukan akan direoksidasi dengan adanya oksigen jumlah besar pada rantai respiratorik. Sementara pada kondisi aerasi terbatas, *Debaryomyces hansenii* mampu memproduksi xylitol dalam jumlah yang tinggi karena oksigen yang tersedia

hanya cukup untuk regenerasi NADH yang diperlukan dalam biokonversi manitol. NADH tersebut perlu diregenerasi oleh Xylitol Dehidrogenase untuk digunakan kembali pada reduksi xylosa melalui oksidasi selanjutnya menjadi NAD^+ . Sebaliknya, produksi xylitol oleh *Debaryomyces hansenii* dengan kondisi anaerobik akan menghasilkan produk dengan jumlah kecil karena aktivitas Xylitol Dehidrogenase yang bergantung NADH lemah tanpa adanya oksigen. (Harms dan Breur, 2006).

Hal yang serupa diperkirakan terjadi juga pada biokonversi manitol dari fruktosa pada *Debaryomyces hansenii* dimana pada kondisi aerobik yang terbatas, oksigen hanya cukup untuk oksidasi NADH yang diperlukan pada reduksi fruktosa menjadi manitol yang dikatalisis oleh Manitol Dehidrogenase. Kondisi aerobik yang berlebih akan meningkatkan reoksidasi NADH dalam rantai respiratorik yang selanjutnya digunakan untuk peningkatan biomassa sehingga penggunaan NADH untuk biokonversi manitol berkurang. Terlihat bahwa nilai biomassa meningkat pada kondisi lebih aerobik sedangkan produk manitol menurun. Kemudian pada kondisi aerasi sangat kecil yaitu volume media 25 mL pada erlenmeyer 50 mL, biomassa dan produk manitol menurun karena terbatasnya oksigen yang diperlukan untuk reoksidasi NADH. Melalui Tabel 4.9 terlihat bahwa peningkatan biomassa seiring dengan penurunan *yield value* manitol pada kondisi aerobik (volume media 10 dalam erlenmeyer 50 mL) sementara penurunan biomassa seiring dengan penurunan *yield value* manitol pada kondisi aerasi sangat kecil (volume media 20 dan 25 mL dalam erlenmeyer 50 mL).

Penggunaan metanol pada fermentasi juga berperan pada terjadinya fenomena diatas. Pertumbuhan dengan adanya metanol membutuhkan oksigen untuk konversi metanol menjadi CO_2 . Hal ini menyebabkan oksigen tidak hanya dibutuhkan untuk respirasi sel sehingga kebutuhan oksigen menjadi lebih besar. Jika terjadi keterbatasan oksigen, maka oksidasi metanol tidak dapat terjadi sempurna sehingga biomassa sel akan menjadi lebih rendah (Lee (ed), 2006).

4.6 Analisis Hasil Fermentasi

Analisis hasil fermentasi dilakukan dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dengan Kolom Waters dan Detektor Indeks Bias. Fase gerak yang digunakan adalah Asetonitril:Air 93:7 laju alir 1,00 mL/menit dan volume injek 20 μ l. Kromatogram yang didapatkan menampakkan lebih banyak peak jika dibandingkan kromatogram hasil fermentasi sel aktif *Debaryomyces hansenii* yang dilakukan pada tahap skrining. Hal ini diperkirakan terjadi karena sifat halofilik dari *Debaryomyces hansenii* yang berusaha mempertahankan keadaan osmotiknya dengan memproduksi substansi yang biasa disebut *compatible solute*. Substansi ini dapat berupa gliserol, trihalose dan arabinitol dimana pada keadaan *resting*, substansi didominasi oleh arabinitol. Substansi ini dihasilkan pada optimasi fermentasi dengan *resting cell* karena pada media ini tidak digunakan K^+ dan Na^+ dimana kedua kation tersebut penting untuk keseimbangan halotoleransi (Harms dan Breur, 2006). Sementara pada saat skrining fermentasi yang menggunakan media mengandung KH_2PO_4 dan $Na_2HOP_4 \cdot 7H_2O$ sehingga kromatogram yang dihasilkan tidak menampakkan banyak peak.

Penentuan *yield value* dilakukan terlebih dahulu dengan mengkonversi luas puncak fruktosa yang tersisa dan manitol yang dihasilkan pada kromatogram ke dalam persamaan yang telah didapatkan dari kurva kalibrasi. Selanjutnya dilakukan perhitungan konsentrasi fruktosa yang digunakan dengan mengurangi konsentrasi fruktosa awal dengan konsentrasi fruktosa yang tersisa. Penentuan *yield value* didapatkan dengan membagi konsentrasi manitol yang dipakai dengan konsentrasi fruktosa yang digunakan dan dikalikan seratus persen. Rumus dapat dilihat pada persamaan 4.1 dengan C_m adalah konsentrasi manitol yang dihasilkan dan ΔC_f adalah konsentrasi fruktosa yang dihasilkan.

$$\text{Y eld Value (\%)} = \frac{C_m}{\Delta C_f} \cdot 100\% \quad (4.1)$$

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

- a. Isolat khamir yang terpilih sebagai khamir metilotrop yang mampu melakukan biokonversi manitol adalah *Debaryomyces hansenii* UICC Y276
- b. Kondisi optimum biokonversi manitol menggunakan *resting cell* khamir metilotrop *Debaryomyces hansenii* UICC Y276 adalah dengankultivasi *resting cell* 140 mg/mL selama 96 jam, penggunaan konsentrasi fruktosa 10% , ammonium sulfat 0,75% serta persentase aerasi 70%.

5.2 Saran

- a. Pengambilan sampel untuk pengukuran biomassa sel dilakukan setiap hari untuk mengetahui pengaruh perbedaan kondisi fermentasi terhadap pertumbuhan sel
- b. Penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh ammonium Sulfat terhadap aktivitas enzim Manitol Dehidrogenase.
- c. Penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh kondisi fermentasi lainnya untuk memperoleh hasil biokonversi manitol yang lebih optimal
- d. Penelitian mengenai potensi khamir isolat lokal terus dilakukan untuk meningkatkan kemandirian di Bidang Bioteknologi

DAFTAR ACUAN

- Asthana, H., Humphrey, A. E., dan Moritz, V. (1971). Growth of Yeast on Methanol as the Sole Carbon Substrate. *Journal Biotechnology and Bioengineering* Vol XIII, 923-929.
- Becze, George. (1955). *A Microbiological Process Report*. Indiana: Schenley Distillers, In
- Beauveit, B., Rigoulet, M., Raffard, G., Levioni, P., Guerin, B. (1993). Interaction Between glucose Metabolism and Oxidative Phosphorilation on Respiratory Competent *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Environmental Journy Biochemistry* 214 : 162-172
- Breur, U dan Harms, Hauke (2006). *Debaryomyces hansenii*-An extremeophilic Yeast With Biotechnology Potential. *Wiley Interscience*. dari <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/yea.1374/pdf> pada tanggal 31 Mei 2012
- Choudary, Prabhakara V dan Rao, G Ramananda (1984). Molecular analysis of inorganic nitrogen assimilation in yeasts. *Archives of Microbiology*, 138 (3):183.
- Departemen Kesehatan. (1995). *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta : Departemen Kesehatan RI.
- Drenthe College(n.d.) *Standarbase techniques: High Performance Liquid Chromatography*. Drenthe College, The Netherlands. Diunduh dari www.standarbase.com/tech/HPLC.pdf pada tanggal 1 Februari 2012.
- Hagerdal, et al. (2005). *Role of Cultivation Media in The Development of Yeast Strains for Large Scale Industrial Use*. BioMed Central Ltd
- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok : Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Ghoreishidan Shahrestani (2009). Innovative strategies for engineering mannitol production. *Trends in Food Science & Technology* 20 :263-270
- Gonzalez-Hernandez JC. 2004. Sodium and Potassium transport in the halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *Wiley Interscience*. John Wiley and Sons, Ltd. Diunduh dari <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/yea.1108/pdf> pada 31 Mei 2012.
- Kavanagh, Kevin (ed). (2005). *Fungi : Biology and Applications*. England : John wiley and Sons, Ltd
- Khan et al., (2009). Mannitol production from glycerol by *Resting Cells* of *Candida magnolia*. *Bioresource Technology* 100 : 4911–4913
- Klei et al., (2006). The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763: 1453–1462.
- Labeda, David P (ed). (1990). *Isolation of Biotechnological Organisms from Nature*. New york : Mc Graw Hill

- Lee, Yuan Kun (ed). (2006). *Microbial Biotechnology Principle an Applications*. United Kingdom : World Scientific Publishing Co.
- Lee, JK., Koo, BS., Hwon, HH. (2003). Purification and Characterization of a Novel Mannitol Dehydrogenase from a Newly Isolated Strain of *Candida Magnoliae*. *Applied enviromental Microbiology* Vol 69 (8) : 4438-4447
- Lewis, D.H., Smith, D.C., (1967). Sugar alcohols (polyols) in fungi and greenplants. *New Phytol.* 66, 143–184.
- Madigan, MT., Martinko, JM., Stahl, DA., Clark, DP. (2006). *Brock Biology of Microbial Biotechnology Principle and Application*. San Fransisco : Pearson Education, Inc
- McNeil dan Harvey (ed), *Practical Fermentation Technology*. Wiley. England : 2008
- NCBI (2004). *Mannitol - Compound Summary*. Februari 6, 2012. Diunduh dari <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6251> pada tanggal 30 Maret 2012
- Negruta, O., Csutak, O., Stoica, I., Rusu, E., dan Vassu, T. (2010). Methylotrophic yeasts: diversity and methanol metabolism. *Romanian Biotechnological Letters*, Vol. 15, No. 4, 5369-5375.
- Pederson, H., Carlsen, M., Nielsen, J (1999). Identification of Enzyme and Quantification of Metabolic Fluxes in the Wild Type and in a Recombinant *Aspergillus oryzae* strain. *Applied and Enviromental Microbiology* 65 : 11-19
- Rehm, JH dan Reed, G. (1993) *Biotechnology Second Edition*. Weinhom : VCH Verlagsgesselschaff mbH
- Saha dan Nakamura (2002). *Production of Mannitol and Lactic Acid by Fermentation With *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693[†]*. United States of America : Wiley Periodicals.
- Saha dan Racine (2010). Biotechnology production of manitol *Applied Microbial Biotechnoogy Springer-Verlag* 89 : 879-891.
- Stanburry *et al.*, (1995). *Principles of Fermentation Technology*. Massachusstes: Elsevier Science.
- Suryadi, H., Tohoru Katsuragi, Nobuyuki Yoshida, Shinsuke Shuzuki, dan Yoshiki Tani. (2000). *Polyol Production by Culture of Methanol-Utilizing Yeast*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* Vol. 89, No. 3, 236-240.
- Wisselink, Wouter (2004). *Metabolic Engineering of Mannitol Production in *Lactobacillus Lactis* 2004*. The Netherlands: Thesis Wageningen University
- Yurimoto *et al.*, (2011). *Yeast Metilotropy: Metabolism, Gene Regulation and Peroxisome Homeostasis*. International Journal of Microbiology
- Vongsuvanlert, V. Dan Tani, Y. “Xylitol production by a methanol yeast, *Candida boidinii* (Kloeckera sp) no. 2201”. *J. Ferment. Technol.*, 1988



Lampiran 1.Data Hasil Pengukuran Kurva Kalibrasi Standar Fruktosa

No	Konsentrasi Fruktosa ($\mu\text{g/mL}$)	Luas Puncak (mV/s)
1	503,4	4533
2	2009,6	272413
3	4019,2	602087
4	6028,8	1052794
5	8038,4	1426834
6	10068	1765083

Keterangan :

$$a = -103530,09$$

$$b = 187,33$$

$$r = 0,9991$$

$$\text{persamaan kurva kalibrasi} = y = -103530,09 + 187,33x$$

Lampiran2 Data Hasil Pengukuran Kurva Kalibrasi Manitol

No	Konsentrasi Manitol ($\mu\text{g/mL}$)	Luas Puncak (mV/s)
1	200,96	16858
2	502,4	68688
3	1004,8	168111
4	2009,6	336576
5	4019,2	656879
6	6028,8	1011061
7	8038,4	1350128
8	10048	1736150

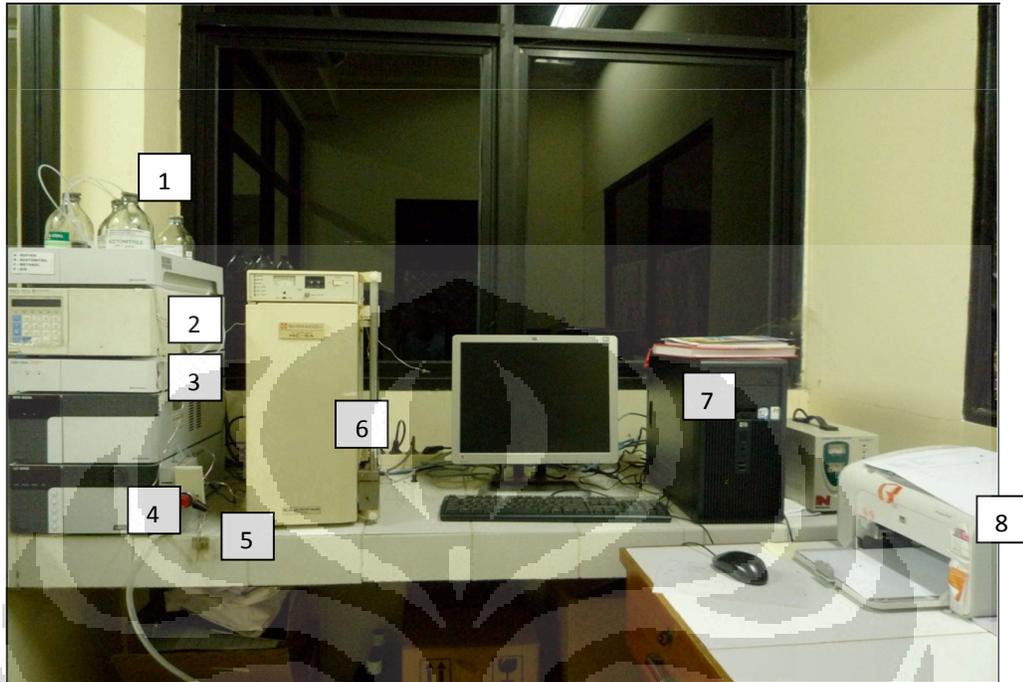
Keterangan :

$$a = -17686,96$$

$$b = 172,23$$

$$r = 0,9997$$

$$\text{Persamaan kurva kalibrasi} = y = -17686,96 + 172,23x$$

Lampiran 3. Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

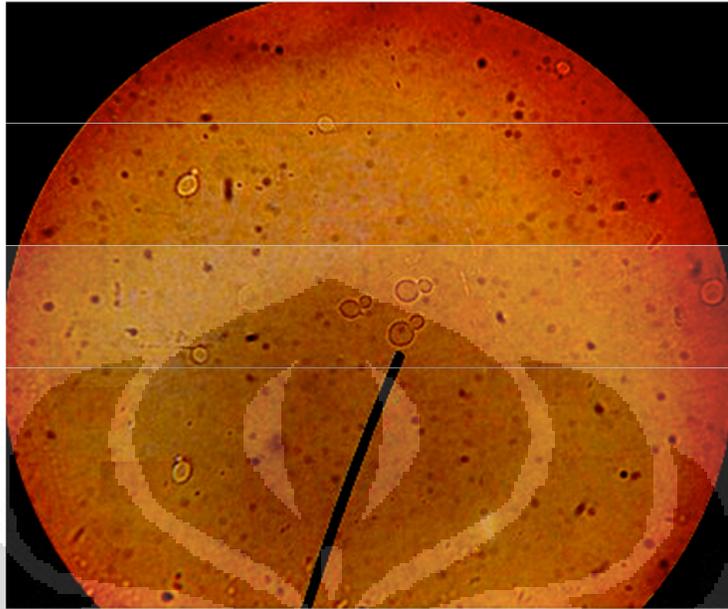
Keterangan :

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

Lampiran 4. Gambar Koloni *Debaryomyces hansenii* dalam cawan petri



Lampiran 5. Gambar Mikroskopik *Debaryomyces hansenii*



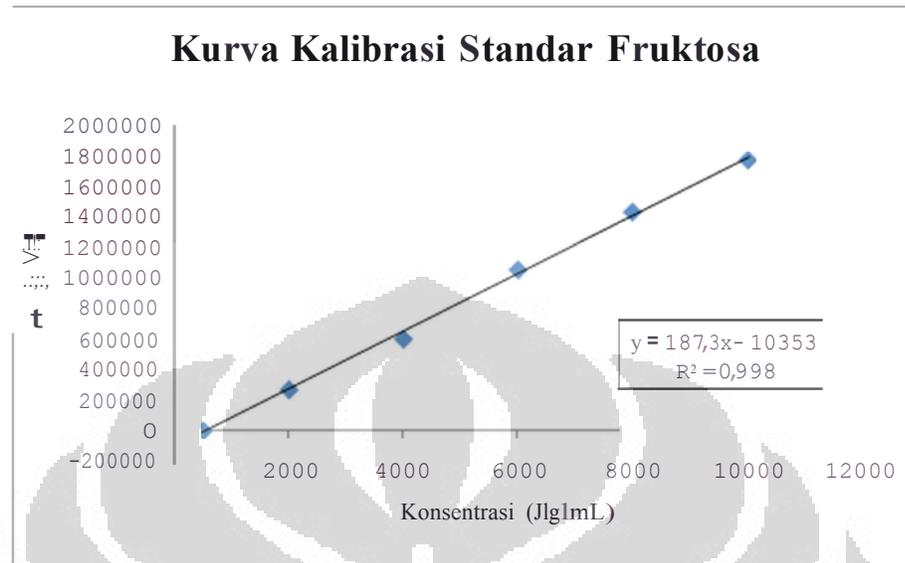
Keterangan : Perbesaran 100 kali

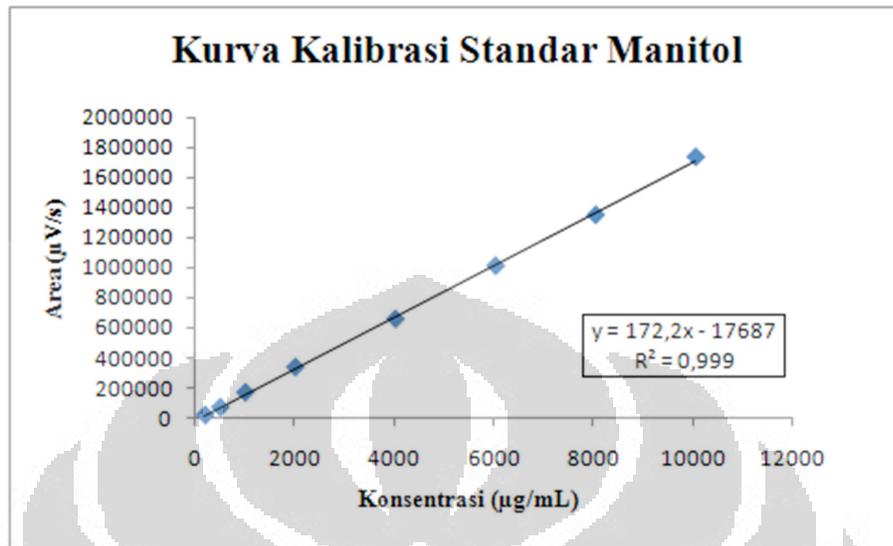
Lampiran 6. Biakan khamir *Debaryomyces hansenii* UICC Y-276, *Debaryomyces nepalensis* UICC Y-328, dan *Candida sp.* UICC Y-216 pada media agar miring.

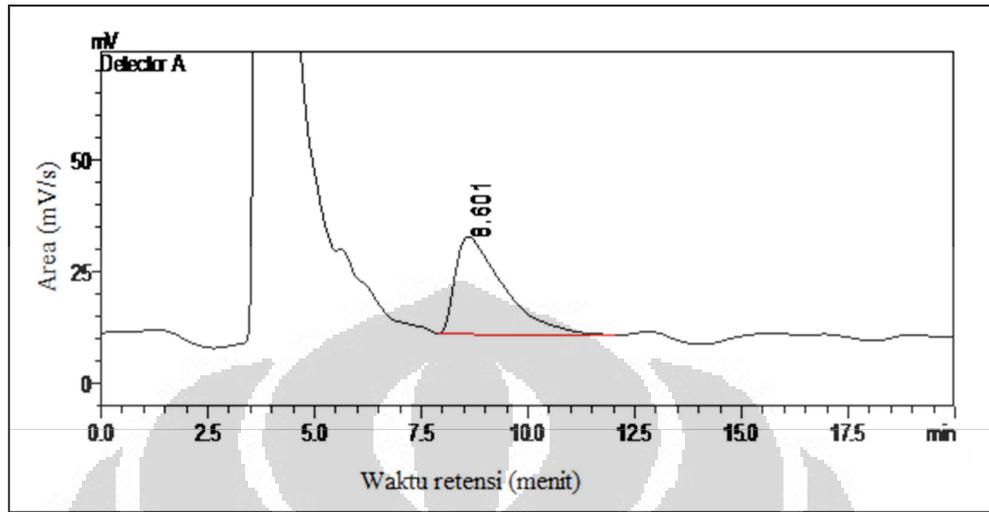


Lampiran 7. Proses fermentasi dengan penggojokan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 175 rpm pada suhu kamar.



Lampiran 8. Kurva kalibrasi standar fruktosa

Lampiran 9. Kurva kalibrasi standar manitol

Lampiran 10. Kromatogram standar fruktosa 10.000 ppm

Keterangan :

Waktu retensi fruktosa = 8,601 menit

Kondisi analisis :

Kondisi analisis

Kolom : Waters@*carbohydrate analysis* 10 μ m, 300 x 3,9 mm

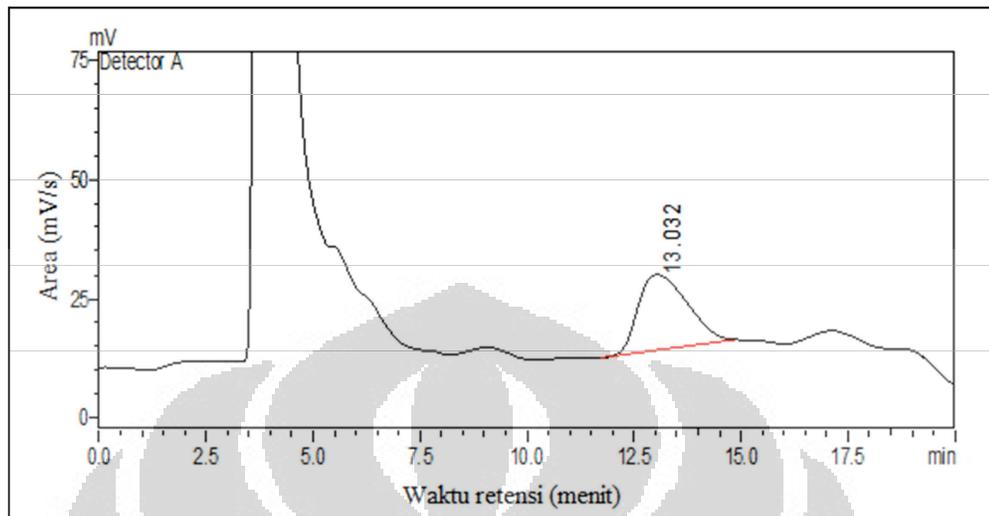
Laju alir : 1,0mL/menit

Detektor : indeks bias

Volume penyuntikan : 20 μ L

Gambar 4.8 Kromatogram standar manitol 10.000 ppm

Lampiran 11. Kromatogram standar manitol 10.000 ppm



Keterangan :

Waktu retensi manitol = 13,032 menit

Kondisi analisis

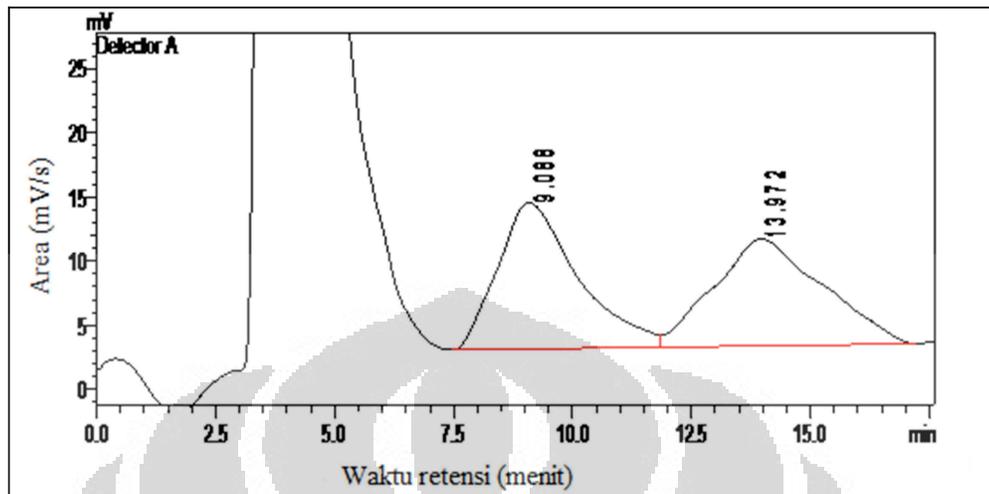
Kolom : Waters@*carbohydrate analysis* 10 μ m, 300 x 3,9 mm

Laju alir : 1,0mL/menit

Detektor : indeks bias

Volume penyuntikan : 20 μ L

Lampiran 12. Kromatogram campuran standar fruktosa dan manitol 8.000 ppm



Keterangan :

waktu retensi fruktosa = 9,088 menit

waktu retensi manitol = 13,972 menit

Kondisi analisis

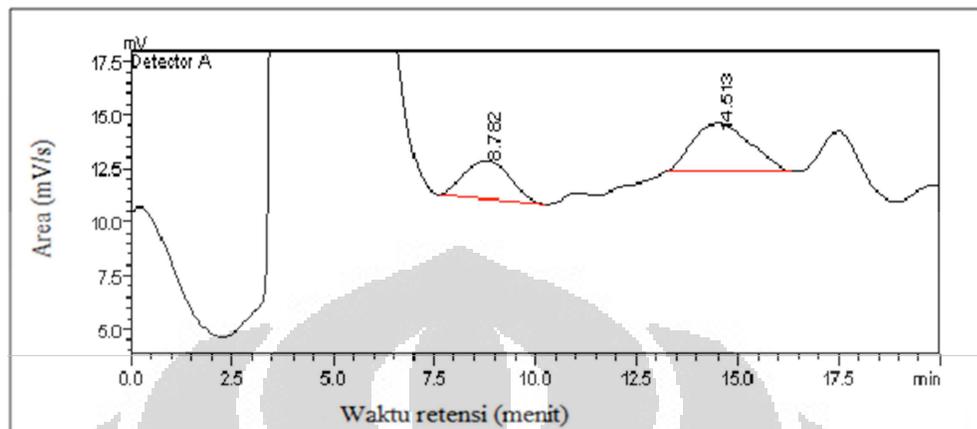
Kolom : Waters® *carbohydrate analysis* 10 μ m, 300 x 3,9 mm

Laju alir : 1,0mL/menit

Detektor : indeks bias

Volume penyuntikan : 20 μ L

Lampiran 13. Kromatogram fruktosa dan manitol dalam sampel fermentasi pada media fermentasi dengan konsentrasi fruktosa 10%



Keterangan :

Waktu retensi fruktosa = 8,782

Waktu retensi manitol = 14,513

Kondisi analisis

Kolom : Waters@*carbohydrate analysis*10 μ m, 300 x 3,9 mm

Laju alir : 1,0mL/menit

Detektor : indeks bias

Volume penyuntikan : 20 μ L

Lampiran 15 Sertifikat Analisis Manito)



1e A g 2011 15 21 <+o:ooJ :-

"t>!'A00100

17! o>!'t/ 't:)

CARGILL SH L DIV: IIIJ IH PIV III P I CIALIT A
VIA CUH" :IAH,
I (Q ROVIGO
I-1)0ICA: TIVHSSA

Fax 00492.5575939

Certificate of Analysis/Conformity

Product. C*PharmMannidcx 16700

Product descr: nkm Man**Hiot

Lot number 05065153

Production date: 18JUL2011

Volume (kg) 1.00

Order 1321

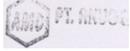
Packing description 99

Shipment date 11

Producting P: Inl Cargill sri Otv JimTd-Dcr-Spec- V1a Cerestar 1 - 45035 Cvsclmns: (HJ) J<- ly- • 10

Analysis	Unit	Result	Mon	M.L
Tot. aerobic m1crobta count Ph.Eur. /g		3		1000
Tot. combined yens/mould count Ph.EUT		absent		100
E. coh Ph.Eur./g		absent		100
Salmonella Ph.Eur. /10g		pass test		100
Identif callon C Ph.Eur. IR		pass test		100
Appearance or solution Ph.Eur.		0.9		100
Conductivity Ph.Eur.	Sicm	<0.20		100
Red. sugars Ph.Eur.	%	pass test		100
Related substances Ph.Eur. on d.b.	%	0.05		100
Related subs ta1ces, d1zregard Ph.E	%	0.9		100
Related subs irmces, total Ph.Eur. on o.o	%	<0.05*		100
Related subs tIncef, unspecified Ph.Eur.	%	0.13		100
Impurity, In Omal Ph tur on d.b	%	<0.05		100
Impurity, m1crob Ph.Eur	%	0.61		100
Impurity, S1B tol	%	9.1J		100
Water Ph.Eur.	%	98.1		100
Mannitol, nssay Ph.Eur. on d.b	%	3		<100
Tot. aerobic m1crobta count Ph.Eur. /g		3		100
Tot. combined ycz.sts'moulds count Ph.Eur		absent		100
E. coli Ph.Eur./g		absent		100
Salmonella Ph.Eur. /10g		<0.5		100
Lead Ph.Eur.	ppm	<1		100
Nickel Ph.Eur.	ppm	<1		100

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



Page 1/3 18-aug

