

**SELEKSI BERBAGAI SPESIES KHAMIR
UNTUK MENGHASILKAN XILITOL
MENGUNAKAN BAHAN DASAR D-XILOSA**

RIKI

0303030541



Universitas Indonesia

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Departemen Kimia

2008

**SELEKSI BERBAGAI SPESIES KHAMIR
UNTUK MENGHASILKAN XILITOL
MENGUNAKAN BAHAN DASAR D-XILOSA**

**Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat
Untuk memperoleh gelar Sarjana Sains**

Oleh:

RIKI

0303030541



DEPOK

2008

SKRIPSI : SELEKSI BERBAGAI SPESIES KHAMIR
UNTUK MENGHASILKAN XILITOL
MENGUNAKAN BAHAN DASAR D-XILOSA

NAMA : RIKI

NPM : 0303030541

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI
DEPOK, 8 JULI 2008

Dr. Endang Saepudin
PEMBIMBING I

Dra. Sitaresmi, M. Sc.
PEMBIMBING II

Tanggal lulus Ujian Sidang Sarjana : 8 Juli 2008

Penguji I : Dra. Susilowati Hs.,M.Sc.

Penguji II : Dra. Siswati Setiasih, M. Si.

Penguji III : Prof. Dr. Wahyudi Priyono S.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Sang Triratna karena telah memberikan kekuatan dan kesabaran dalam menyusun skripsi yang berjudul "Seleksi Berbagai Spesies Khamir Untuk Menghasilkan Xilitol Menggunakan Bahan Dasar D – Xilosa." Karya utama sarjana ini disusun untuk melengkapi persyaratan akhir dalam menempuh ujian sarjana di Departemen Kimia FMIPA UI.

Terimakasih penulis ucapkan sebesar – besarnya kepada bapak Dr. Endang Saepudin dan ibu Dra. Sitaresmi, M.Sc., yang telah membimbing penulis dengan amat sabar, penuh perhatian dan memberikan dukungan bagi penulis dalam menyelesaikan karya utama ini. Ucapan terimakasih juga penulis ucapkan kepada ibu Ariyanti Oetari dan ibu Wellyzar S. selaku penanggung jawab Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi yang telah mengizinkan penulis untuk melakukan penelitian disana.

Terimakasih yang paling dalam penulis ucapkan pula kepada papi, mami, dan adikku Rifan yang telah memberikan dukungan moril dan telah menjadi tempat keluh – kesah bagi penulis.

Tak lupa penulis ingin mengucapkan rasa terimakasih kepada :

1. Bapak Dr. Ridla Bakri, Ketua Departemen Kimia FMIPA UI.
2. Ibu Dra. Tresye Utari selaku koordinator penelitian.

3. Bapak Rahmat Wibowo selaku pembimbing akademik yang memberikan bimbingan selama penulis menempuh studi hingga selesainya karya utama ini.
4. Semua dosen dan karyawan di Departemen Kimia FMIPA UI khususnya mbak Ema, mbak Tri, pak Hedi, pak Amin, pak Wito, pak Soleh, pak Hadi, pak Mardji, pak Pri, pak Tris.
5. Kak Heidy, mbak Asri, pak Pri, kak Fit, kak Hisni, NaCha, RyVi, Uti, pak Haeru, serta teman – teman di laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi FMIPA UI.
6. Teman – teman penelitian lantai 4 : Vera, Dewi, Wawan, Isal Niezha, Tina, Janti, Ari, Ami, Danar, Ruth, Eka, Wakhid.
7. Teman – teman penelitian lantai 3 : Dina, Santi, Vena, Ela, Redy, mbak Isti, Opik, Lanny, Bernat, Atul, Nath.
8. Teman – teman 2003 lainnya : ForMaLin (Ican, Andika, Fahmi, Ali, Hasbi, Farid, Leo, Hendri, Jarot, Lukman, Demmy), KaroKoe (Rina, Lela, Lia, Tia), Krisnu.
9. Seluruh pihak yang telah membantu penulis dalam penyusunan skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Akhir kata, penulis berharap agar karya ilmiah ini dapat bermanfaat bagi masyarakat luas khususnya di bidang Biokimia meskipun penulis sadar bahwa karya ini masih jauh dari kesempurnaan.

Depok, Juni 2008

Penulis

ABSTRAK

Indonesia merupakan negara agraris sehingga bidang pertanian dan perkebunan merupakan industri yang berkembang di Indonesia. Hasil pertanian dan perkebunan jumlahnya berlimpah di seluruh pelosok negeri. Sehingga berdampak pada jumlah limbah yang berasal dari produk pertanian dan perkebunan. Oleh karenanya perlu dilakukan penanganan limbah yang benar agar dikemudian hari tidak menjadi masalah yang serius bagi lingkungan. Solusi yang diberikan adalah memanfaatkan limbah tersebut sebagai bahan baku pembuatan xilitol, suatu gula alkohol non kariogenik dan merupakan pemanis rendah kalori. Sepuluh khamir yang dapat menggunakan D – xilosa sebagai sumber karbon dilakukan seleksi dalam hal kemampuan memproduksi xilitol. Fermentasi dilakukan selama dua hari menggunakan 20 g/L xilosa. Didapatkan empat isolat yang dianggap potensial dalam menghasilkan xilitol. Dari keempat isolat tersebut *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247 menghasilkan xilitol sebesar 7,135 g/L dengan yield 38,13%. Keempat isolat potensial selanjutnya dianalisa kurva pertumbuhan dan kurva produknya.

Kata kunci : fermentasi, khamir, kurva pertumbuhan, kurva produk, xilitol, xilosa.

ix + 49 halaman; gbr.; lamp.; tab.

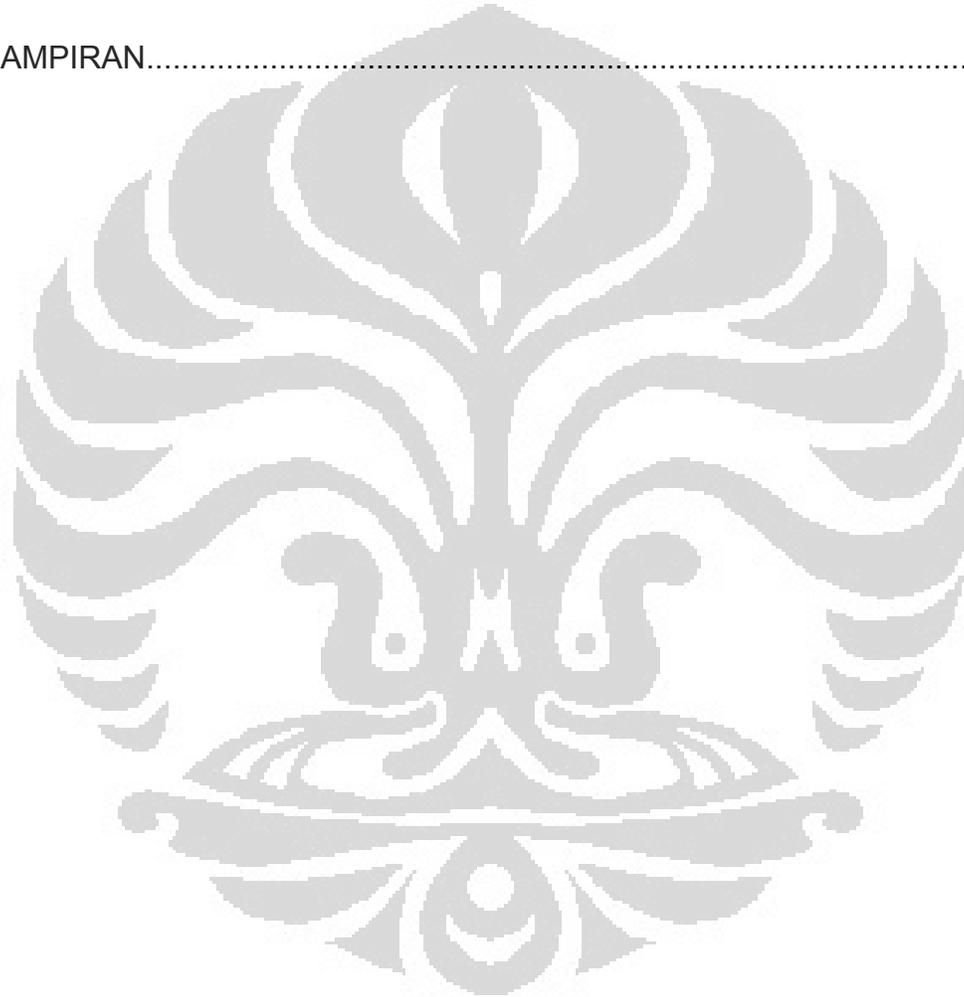
Bibilografi : 30 (1969 – 2007)

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
BAB I PENDAHULUAN.....	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
II. 1. Khamir sebagai model organisme untuk metabolisme xilosa.....	7
II. 1. 1. <i>Candida boidinii</i> UICC Y – 399.....	9
II. 1. 2. <i>Candida parapsilosis</i> UICC Y – 267.....	9
II. 1. 3. <i>Candida fukuyamaensis</i> UICC Y – 247.....	9
II. 1. 4. <i>Bullera</i> sp. L 4222.....	10
II. 1. 5. <i>Trichosporon coremiiforme</i> UICC Y – 242.....	10
II. 1. 6. <i>Rhodotorula graminis</i> L 4232.....	10
II. 1. 7. <i>Cryptococcus laurentii</i> (kufferath).....	11
II. 1. 8. <i>Cryptococcus aethanolamini</i> UICC Y – 241.....	11
II. 1. 9. <i>Cryptococcus podzolicus</i> UICC Y – 400.....	11
II. 1. 10. <i>Williopsis saturnus</i> UICC Y-399.....	12
II. 2. Metabolisme xilosa pada khamir.....	12
II. 3. Perkembangan pembentukan xilitol.....	15

BAB III BAHAN DAN CARA KERJA.....	18
III. 1. Alat.....	18
III. 2. Bahan.....	18
III. 3. Isolat yang digunakan.....	19
III. 4. Cara kerja.....	19
III. 4. 1. Seleksi khamir potensial.....	20
III. 4. 1. 1. Penyiapan inokulum.....	20
III. 4. 1. 2. Fermentasi.....	21
III. 4. 1. 3. Analisis hasil fermentasi.....	22
III. 4. 2. Penentuan kurva pertumbuhan dari khamir potensial.....	23
III. 5. Bagan Kerja.....	24
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	25
IV. 1. Seleksi khamir penghasil xilitol.....	25
IV. 2. Penentuan kurva pertumbuhan dari khamir yang potensial.....	28
IV. 2.1. Kurva pertumbuhan <i>Candida fukuyamaensis</i> UICC Y-247	29
IV. 2. 2. Kurva pertumbuhan <i>Bullera</i> sp. L 4222.....	30
IV. 2. 3. Kurva pertumbuhan <i>Candida boidinii</i> UICC Y-399.....	31
IV. 2. 4. Kurva pertumbuhan <i>Candida parapsilosis</i> UICC Y- 267.....	32
IV. 3. Penentuan kurva produk dari khamir yang potensial.....	33
IV. 3. 1. Kurva produk <i>Candida fukuyamaensis</i> UICC Y-247.....	34
IV. 3. 2. Kurva produk <i>Bullera</i> sp. L 4222.....	35
IV. 3. 3. Kurva produk <i>Candida boidinii</i> UICC Y-399.....	36

IV. 3. 4. Kurva produk <i>Candida parapsilosis</i> UICC Y – 267.....	37
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	38
V. 1. KESIMPULAN.....	39
V.2 SARAN.....	40
DAFTAR PUSTAKA.....	41
LAMPIRAN.....	45



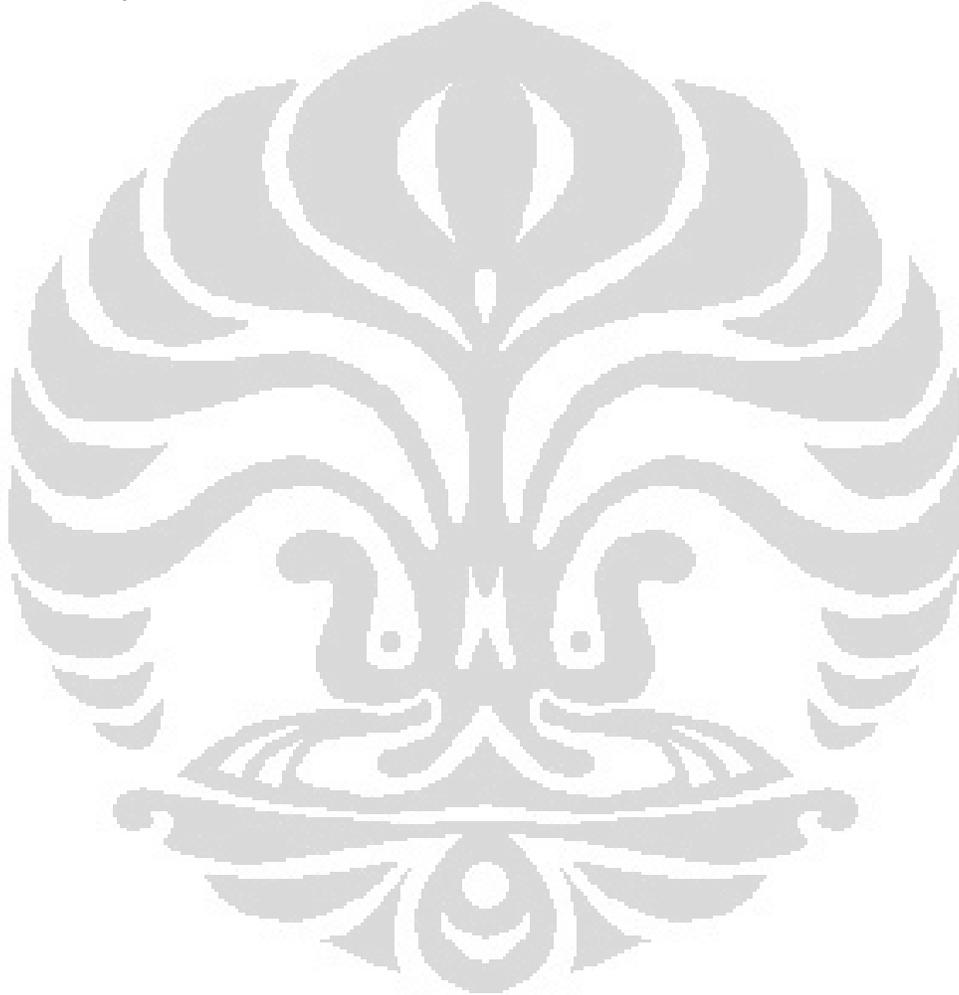
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Struktur D-xilosa.....	4
Gambar 2.2. Struktur dasar arabinoglukuronoxilan.....	5
Gambar 2.3. Struktur xilitol.....	7
Gambar 2.4. Reaksi reduksi xilosa menjadi xilitol.....	13
Gambar 2.5. Jalur metabolisme pembentukan xilitol dari xilosa.....	16
Gambar 4.1. Kurva pertumbuhan <i>Candida fukuyamaensis</i> UICC Y-247.....	29
Gambar 4.2. Kurva pertumbuhan <i>Bullera</i> sp. L 4222.....	30
Gambar 4.3. Kurva pertumbuhan <i>Candida boidinii</i> UICC Y-399.....	31
Gambar 4.4. Kurva pertumbuhan <i>Candida parapsilosis</i> UICC Y – 267.....	32
Gambar 4.5. Kurva produk <i>Candida fukuyamaensis</i> UICC Y-247.....	34
Gambar 4.6. Kurva produk xilitol yang dihasilkan <i>Bullera</i> sp. L 4222.....	35
Gambar 4.7. Kurva produk <i>Candida boidinii</i> UICC Y-399.....	36
Gambar 4.8. Kurva produk xilitol <i>Candida parapsilosis</i> UICC Y – 267.....	37

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 4.1 Kadar xilitol yang terbentuk saat fermentasi selama dua hari.....	27
Tabel 4.2 Konsentrasi xilitol yang terbentuk selama penentuan kurva produk.....	38



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Kurva Standar.....	45
Lampiran 2. Data Kurva Pertumbuhan Pada Panjang Gelombang 600 nm...46	
Lampiran 3. Data Kurva Produk.....	47
Lampiran 4. Kromatogram Hasil Pengukuran Xilosa dan Xilitol dengan HPLC (<i>Candida fukuyamaensis</i> UICC Y-247).....	49



BAB I

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara agraris sehingga bidang pertanian dan perkebunan merupakan industri yang berkembang di Indonesia. Hasil pertanian dan perkebunan jumlahnya berlimpah di seluruh pelosok negeri. Sehingga berdampak pada jumlah limbah yang berasal dari produk pertanian dan perkebunan. Oleh karena itu perlu dilakukan penanganan limbah yang benar agar dikemudian hari tidak menjadi masalah yang serius bagi lingkungan.

Limbah pertanian dan perkebunan merupakan bahan yang mengandung lignoselulosa yang kaya akan hemiselulosa. Hemiselulosa merupakan heteropolisakarida yang terdiri dari rantai pendek pentosa seperti D – xilosa dan L – arabinosa¹. Apabila hemiselulosa dihidrolisis maka akan diperoleh D – xilosa dengan jumlah tertentu tergantung pada jenis kayu yang digunakan. Dengan kata lain, limbah hasil pertanian dan perkebunan ini dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan xilosa. Xilosa dari hasil hidrolisis limbah pertanian dan perkebunan dapat memiliki manfaat sebagai bahan baku pembuatan xilitol. Oleh karena itu, limbah hasil pertanian dan perkebunan ini memiliki nilai jual yang tinggi.

Xilitol merupakan gula alkohol non kariogenik dan merupakan pemanis rendah kalori. Tingkat kemanisannya sama dengan sukrosa, tapi memiliki tingkat energi yang lebih rendah yakni 2.4 kal / g dibandingkan 4 kal / g pada sukrosa. Xilitol merupakan senyawa non kariogenik karena dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* yang berada pada gigi. Xilitol di alam dapat ditemukan dalam jumlah yang kecil pada sayur – sayuran dan buah – buahan. Xilitol memberikan sensasi dingin dan menyejukkan saat berada dimulut sehingga xilitol sering digunakan pada permen karet, permen dan pasta gigi².

Proses pembentukan xilitol dapat dilakukan dengan dua cara yakni secara kimiawi dan secara bioteknologi. Proses secara kimiawi adalah reaksi reduksi xilosa dengan gas hidrogen dan katalis Raney nikel pada suhu 80°C – 140°C dan tekanan tinggi. Proses kimia ini membutuhkan beberapa tahap pemurnian karena hanya xilosa murni yang bisa digunakan untuk reduksi secara kimia. Oleh karenanya hanya didapat sekitar 50 – 60% xilosa murni dari total xilan yang terdapat pada hemiselulosa³.

Sedangkan proses secara bioteknologi adalah dengan memanfaatkan mikroba yakni khamir dalam mereduksi xilosa menjadi xilitol dengan bantuan enzim *xylose reductase*. Indonesia berada didaerah tropis yang merupakan lingkungan ideal bagi pertumbuhan mikroorganisme, khususnya khamir, sehingga memungkinkan dalam memproduksi xilitol dengan cara bioteknologi. Juga dimungkinkan mencari khamir – khamir jenis baru yang dapat berperan sebagai produsen alamiah xilitol.

Proses bioteknologi ini secara industri memiliki keunggulan yakni reaksi reduksinya selektif terhadap xilosa apabila didalam media terdapat sumber gula lain, reaksinya berlangsung pada suhu dan tekanan yang rendah, menggunakan katalis yang tidak mahal dan *yield* yang didapat relatif tinggi (60-80%)³.

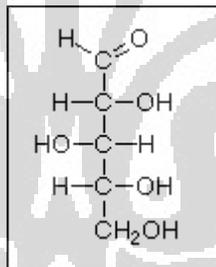
Penelitian ini bertujuan melakukan seleksi menggunakan beberapa isolat khamir dari koleksi UICC (Universitas Indonesia Culture Collection) yang dapat menghasilkan xilitol lebih baik menggunakan D-xilosa sebagai bahan baku utamanya.

Metode analisis yang digunakan dalam pengukuran xilosa dan xilitol yang terbentuk adalah dengan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC). Secara keseluruhan diharapkan kesemua khamir yang dilakukan seleksi mampu menghasilkan xilitol dengan *yield* yang tinggi (di atas 50%).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Xilosa merupakan aldopentosa, monosakarida yang terdiri dari lima buah atom karbon dengan gugus aldehid. Xilosa disebut gula kayu karena pada kayu terkandung hemiselulosa, yang bila dihidrolisis diperoleh kadar xilosa yang tinggi. Salah satu manfaat xilosa adalah sebagai bahan baku pembuatan xilitol. Xilosa diperoleh dengan menghidrolisis kayu dan bahan – bahan lignoselulosa lainnya dan kemudian dimurnikan.



Gambar 2.1 Struktur D-xilosa

Berikut adalah sifat fisika dari xilosa:

Nama Kimia : Xilosa

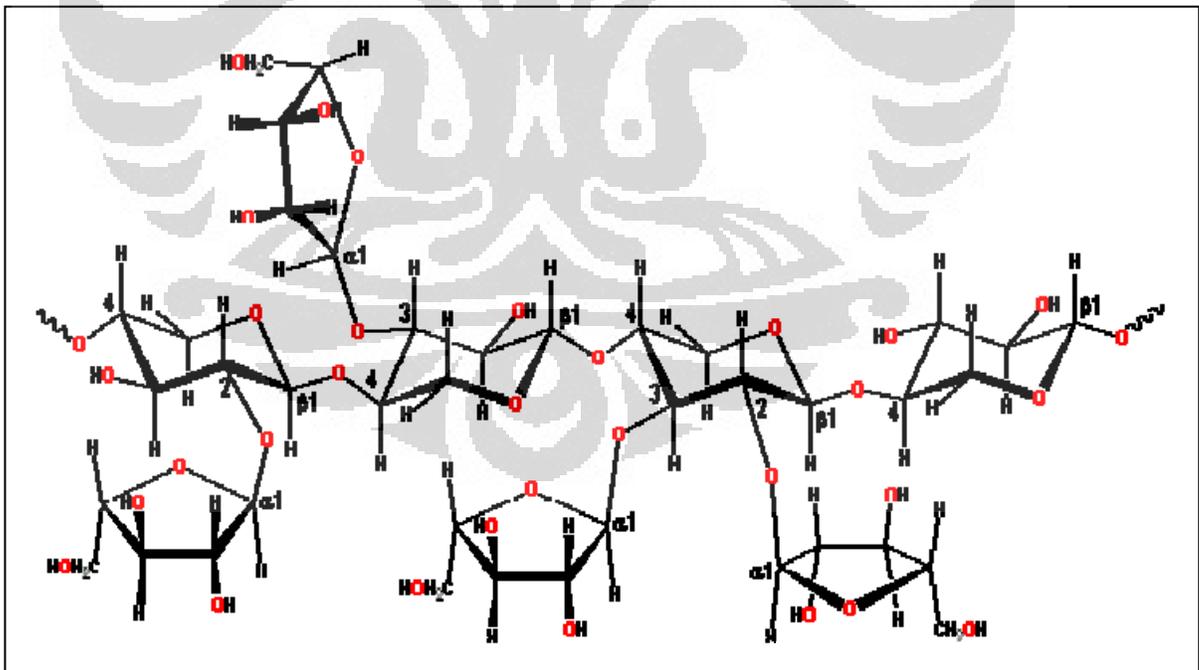
Rumus Kimia : $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$

Berat Molekul : 150,13 g/mol

Titik Leleh : 144-145°C

Lignoselulosa merupakan materi yang terdapat di dalam tanaman. Lignoselulosa tersusun atas tiga bagian utama, yakni lignin

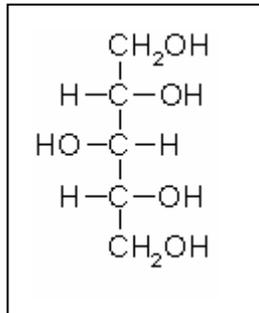
sekitar 15% - 25%, hemiselulosa sekitar 21% - 42% dan selulosa sekitar 38% - 50%. Lignin merupakan polimer dari unit – unit fenilpropana yang berikatan dengan selulosa dan hemiselulosa pada jaringan tanaman. Selulosa merupakan senyawa polimer dari 100 – 1500 unit glukosa dengan ikatan β (1 \rightarrow 4) linier dan merupakan komponen utama semua dinding sel tumbuhan. Hemiselulosa ditemukan bersama dengan selulosa di dalam dinding sel tanaman. Berbeda dengan selulosa yang merupakan homopolisakarida, hemiselulosa merupakan heteropolisakarida yang terdiri dari rantai pendek pentosa seperti D – xilosa dan L – arabinosa¹. Berikut salah satu contoh hemiselulosa yakni xilan.



Gambar 2.2. Struktur dasar arabinoglukuronoxilan.

Xilitol memiliki rumus molekul $C_5H_{12}O_5$. Xilitol terdapat pada sayur – sayuran dan buah – buahan dalam jumlah yang kecil. Xilitol merupakan gula alkohol yang non kariogenik dan berpotensi sebagai pemanis rendah kalori. Tingkat kemanisannya sama dengan sukrosa tapi memiliki tingkat energi lebih rendah yaitu 2,4 kal/g dibandingkan pada sukrosa sebesar 4 kal/g². Berdasarkan penelitian, mikroorganisme kariogenik lebih menyukai struktur gula enam karbon seperti D – glukosa untuk mendukung pertumbuhannya. Xilitol memiliki jumlah atom karbon lima sehingga bakteri kariogenik seperti *Streptococcus mutans* yang ada di dalam mulut tidak dapat menggunakan atau mendegradasinya sebagai sumber energi. Oleh karenanya, xilitol banyak digunakan untuk mencegah karies pada gigi⁶. Xilitol memberikan sensasi dingin dan menyejukkan saat berada di dalam mulut sehingga xilitol sering digunakan pada permen karet, permen dan pasta gigi².

Xilitol ditemukan oleh kimiawan dari Jerman dan Prancis pada akhir abad ke 19. Xilitol pertama kali diisolasi oleh ahli kimia Jerman yakni Prof. Dr. Emil Herman Fischer (pemegang nobel kimia tahun 1902) dari serpihan kayu *birch* di Finlandia. Setelah penemuan ini, pada tahun 1990-an produksi xilitol menjadi perhatian dan dilaporkan mencapai sekitar 5000 ton di seluruh dunia. Negara yang menghasilkan xilitol dalam skala besar yakni Jepang, China dan Amerika. Salah satu produsen xilitol terbesar di Asia hingga awal tahun 2008 telah memproduksi xilitol hingga 35.000 ton per tahun⁷.



Gambar 2.3 Struktur xilitol

Sifat fisik dan kimia dari xilitol adalah sebagai berikut:

Rumus Molekul : $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_5$

Berat Molekul : 152,15 g / mol

Wujud : Kristal putih

Titik Leleh : 92-96°C

Titik Didih : 126°C

Jumlah Kalori : 2,4 kal / g

Densitas : 1,52 g / cm^3

II. 1. Khamir sebagai model organisme untuk metabolisme xilosa.

Fungi merupakan mikroorganisme yang paling banyak dan tersebar. Terdapat lebih dari 250.000 spesies yang telah diidentifikasi dan terbagi menjadi khamir (organisme yang terdiri dari satu sel), kapang (organisme yang berfilamen) dan jamur (organisme yang berkumpul membentuk struktur makroskopik atau lendir)⁸. Cabang dari mikrobiologi yang mempelajari fungi disebut mikologi.

Fungi merupakan organisme yang heterotrof (menggunakan komponen organik sebagai sumber karbon), nonfototrof (tidak menggunakan sinar matahari sebagai sumber energi) dan absorptif (menyerap nutrisi dari larutan). Kebanyakan fungi merupakan saprofit (mendapatkan nutrisi dengan cara mendekomposisi bahan organik yang sudah mati) tetapi beberapa diantaranya patogen terhadap tanaman dan hewan termasuk manusia.

Khamir merupakan bentuk pertumbuhan dari mikroorganisme eukariotik yang berada dalam kingdom fungi. Khamir merupakan golongan fungi yang merupakan fakultatif anaerob atau dapat hidup dalam kondisi anaerob. Khamir ini bersel satu, kebanyakan berbentuk oval dan bereproduksi secara aseksual dengan cara *budding* atau pertunasan walau ada sebagian dengan cara pembelahan biner. Dalam *budding*, bentuk gelembung terbentuk pada permukaan sel, tumbuh, membesar keluar dan kemudian memisahkan diri. Kadang gelembung ini tetap berada pada sel induk membentuk rantai sel yang disebut pseudohifa^{8,9}.

Berikut merupakan karakteristik dari isolat koleksi UICC yang digunakan dalam penelitian ini yang kesemuanya diisolasi dari Taman Nasional Gunung Halimun, Jawa Barat.

II. 1. 1. *Candida boidinii* UICC Y – 399¹¹.

Khamir ini ditumbuhkan pada suhu ruang dalam medium YMA koloninya berwarna putih agak krem; permukaan dan tekstur koloni licin, mengkilap seperti mentega dan profil dan tepi koloni rata, lurus. Diketahui mampu melakukan fermentasi menggunakan glukosa. Mampu mengasimilasi glukosa, galaktosa, sukrosa, maltosa, laktosa, pati terlarut, D – xilosa, L – arabinosa, dan D – ribosa. Khamir ini mampu tumbuh membentuk koloni pada suhu 37 °C. Isolat ini diisolasi dari gastropoda *Melanoides sp.*

II. 1. 2. *Candida parapsilosis* UICC Y – 267¹⁰.

Khamir ini ditumbuhkan dalam medium YMA berwarna putih; permukaan dan tekstur koloni berkerut, mengkilap, seperti mentega; profil dan tepi koloni rata, bergerigi. Diketahui mampu melakukan fermentasi dengan menggunakan galaktosa. Mampu mengasimilasi karbon seperti glukosa, sukrosa, maltosa, pati terlarut, D – xilosa, L – arabinosa, dan D – ribosa. Khamir ini diketahui dapat tumbuh pada suhu 37 °C. Isolat ini berasal dari daun dan buah *Papilionaceae*.

II. 1. 3. *Candida fukuyamaensis* UICC Y – 247¹².

Khamir ini ditumbuhkan pada suhu ruang dalam medium YMA koloninya berwarna putih agak krem; permukaan dan tekstur koloni licin, mengkilap seperti mentega; profil dan tepi koloni menggunggung, lurus. Diketahui mampu melakukan fermentasi menggunakan glukosa, galaktosa dan sukrosa. Mampu mengasimilasi glukosa, sukrosa, D –

xilosa, dan L – arabinosa. Khamir ini mampu tumbuh membentuk koloni pada suhu 37 °C. Isolat ini diisolasi dari serasah di Cikurutug.

II. 1. 4. *Bullera* sp. L 4222¹².

Khamir ini ditumbuhkan pada suhu ruang dalam medium YMA koloninya berwarna krem keputihan; permukaan dan tekstur koloni licin, mengkilap, berlendir; profil dan tepi koloni menggantung, lurus. Tidak mampu melakukan fermentasi menggunakan glukosa. Mampu mengasimilasi glukosa, sukrosa, pati terlarut, D – xilosa, dan L – arabinosa. Khamir ini tidak mampu tumbuh pada suhu 37 °C. Isolat ini diisolasi dari serasah di Cikaniki.

II. 1. 5. *Trichosporon coremiiforme* UICC Y – 242¹².

Khamir ini ditumbuhkan pada suhu ruang dalam medium YMA koloninya berwarna krem keputihan; permukaan dan tekstur koloni kusam, kering; profil dan tepi koloni rata, berfilamen. Tidak mampu melakukan fermentasi menggunakan glukosa. Mampu mengasimilasi glukosa, galaktosa, D – xilosa, dan D – ribosa. Khamir ini mampu tumbuh pada suhu 37 °C. Isolat ini diisolasi dari serasah di Cikurutug.

II. 1. 6. *Rhodotorula graminis* L 4232¹².

Khamir ini ditumbuhkan pada suhu ruang dalam medium YMA koloninya berwarna oranye kemerahan; permukaan dan tekstur koloni mengkilap, licin, seperti mentega; profil dan tepi koloni rata, lurus. Tidak mampu melakukan fermentasi menggunakan glukosa. Mampu mengasimilasi glukosa, sukrosa, dan D – xilosa. Khamir ini tidak

mampu tumbuh pada suhu 37 °C. Isolat ini diisolasi dari serasah di Cikaniki.

II. 1. 7. *Cryptococcus laurentii* (kufferath)¹¹.

Khamir ini ditumbuhkan pada suhu ruang dalam medium YMA koloninya berwarna krem; permukaan dan tekstur koloni mengkilap, licin, berlendir; profil dan tepi koloni menggantung, lurus. Tidak mampu melakukan fermentasi menggunakan glukosa. Mampu mengasimilasi glukosa, galaktosa, sukrosa, maltosa, laktosa, L – arabinosa dan D – xilosa. Khamir ini mampu tumbuh pada suhu 37 °C dan dapat membentuk senyawa pati ekstraseluler. Isolat ini diisolasi dari gastropoda *Bellamyia javanica* di Cikurutug.

II. 1. 8. *Cryptococcus aethanolamini* UICC Y – 241¹².

Khamir ini ditumbuhkan pada suhu ruang dalam medium YMA koloninya berwarna krem keputihan; permukaan dan tekstur koloni mengkilap, licin, berlendir putih; profil dan tepi koloni menggantung, lurus. Tidak mampu melakukan fermentasi menggunakan glukosa. Mampu mengasimilasi glukosa, galaktosa, sukrosa, maltosa, D – ribosa, L – arabinosa dan D – xilosa. Khamir ini tidak mampu tumbuh pada suhu 37 °C. Isolat ini diisolasi dari serasah di Cikurutug.

II. 1. 9. *Cryptococcus podzolicus* UICC Y – 400¹¹.

Khamir ini ditumbuhkan pada suhu ruang dalam medium YMA koloninya berwarna krem; permukaan dan tekstur koloni mengkilap, licin, seperti mentega; profil dan tepi koloni rata, lurus. Tidak mampu

melakukan fermentasi menggunakan glukosa. Mampu mengasimilasi glukosa, galaktosa, sukrosa, maltosa, laktosa, L – arabinosa dan D – xilosa. Khamir ini tidak mampu tumbuh pada suhu 37 °C. Isolat ini diisolasi dari gastropoda *Melainoides sp.* di Cikurutug.

II. 1. 10. *Williopsis saturnus* UICC Y-399¹¹.

Khamir ini ditumbuhkan pada suhu ruang dalam medium YMA koloninya berwarna putih agak krem; permukaan dan tekstur koloni mengkilap, licin, seperti mentega; profil dan tepi koloni menggantung, lurus. Mampu melakukan fermentasi menggunakan glukosa dan sukrosa. Mampu mengasimilasi glukosa, sukrosa, dan D – xilosa. Khamir ini tidak mampu tumbuh pada suhu 37 °C. Isolat ini diisolasi dari gastropoda *Bellamyia javanica* di Cikurutug.

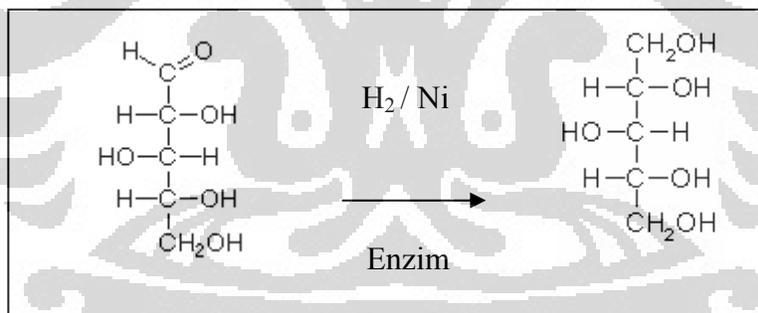
II. 2. Metabolisme xilosa pada khamir.

Pembentukan xilitol dari xilosa secara umum dapat dilakukan dengan dua cara yakni secara kimiawi dan secara bioteknologi. Proses secara kimiawi dilakukan dengan mereduksi xilosa dengan gas hidrogen dan katalis Raney nikel pada suhu 80°C – 140°C dan tekanan yang tinggi. Proses kimia ini memiliki kelemahan yakni membutuhkan beberapa tahap pemurnian karena hanya xilosa murni yang bisa digunakan untuk reduksi secara kimia. Oleh karenanya hanya didapat sekitar 50 – 60% xilosa murni dari total xilan yang terdapat pada

hemiselulosa³. Kelemahan lainnya adalah hasil samping dari reaksi ini adalah dihasilkannya limbah nikel ke lingkungan.

Proses kedua yakni secara bioteknologi adalah dengan memanfaatkan mikroorganismenya yakni khamir dalam mereduksi xilosa menjadi xilitol dengan bantuan enzim *xylose reductase*. Proses secara bioteknologi ini memiliki beberapa keuntungan yakni reaksi reduksinya selektif terhadap xilosa apabila didalam media terdapat sumber gula lain, reaksinya berlangsung pada suhu dan tekanan yang rendah, menggunakan katalis yang murah karena berasal dari sel khamir dan *yield* yang didapat relatif tinggi (60-80%)⁴.

Berikut merupakan reaksi reduksi secara umum pembentukan xilitol dari xilosa.



Gambar 2.4. Reaksi reduksi xilosa menjadi xilitol

Pada umumnya khamir yang menggunakan xilosa sebagai sumber karbon, menyerap xilosa melalui difusi terfasilitasi^{4,8,13,14}. Namun apabila pada medium terdapat sumber karbon berupa heksosa maka heksosa akan dimanfaatkan terlebih dahulu sebagai sumber energi.

Saat konsentrasi heksosa rendah, xilosa dimanfaatkan sebagai sumber energi¹⁴.

Jalur katabolisme D – xilosa melibatkan tiga buah enzim kunci yakni *xilose reduktase* (XR), *xilitol dehidrogenase* (XDH) dan *xilulokinase* (XK). Pertama, D – xilosa direduksi menjadi xilitol oleh enzim XR. Xilitol yang terbentuk kemudian dioksidasi menjadi D – xilulose oleh XDH. Akhirnya, D – xilulose difosforilasi menjadi xilulosa – 5 fosfat oleh XK yang kemudian masuk ke jalur *Pentose Phosphate Pathway* (PPP). Jalur ini menggunakan energi berupa ATP. *Xilose reductase* memerlukan kofaktor baik NADH maupun NADPH tetapi *xilitol dehidrogenase* bergantung pada NAD^{2,15,16}. Enzim *xilulokinase* dilain pihak memerlukan ATP sebagai kofaktornya².

Peran oksigen merupakan faktor yang penting untuk menghasilkan xilitol dari xilosa apabila menggunakan khamir dari golongan *Candida*. Pada kondisi oksigen terbatas, jalur oksidatif fosforilasi tidak dapat mengoksidasi kembali NADH yang terbentuk, sehingga konsentrasi NADH di dalam sel meningkat². Tingginya konsentrasi NADH dalam sel menaikkan aktivitas enzim *xilose reductase* dan menyebabkan akumulasi xilitol .

Konsentrasi substrat juga berpengaruh pada aktivitas enzim *xilose reductase* dan *xilitol dehidrogenase*. Substrat yang digunakan dalam industri sebenarnya berasal dari bahan baku yang dapat diperbaharui yaitu hidrolisat dari lignoselulosa yang mengandung

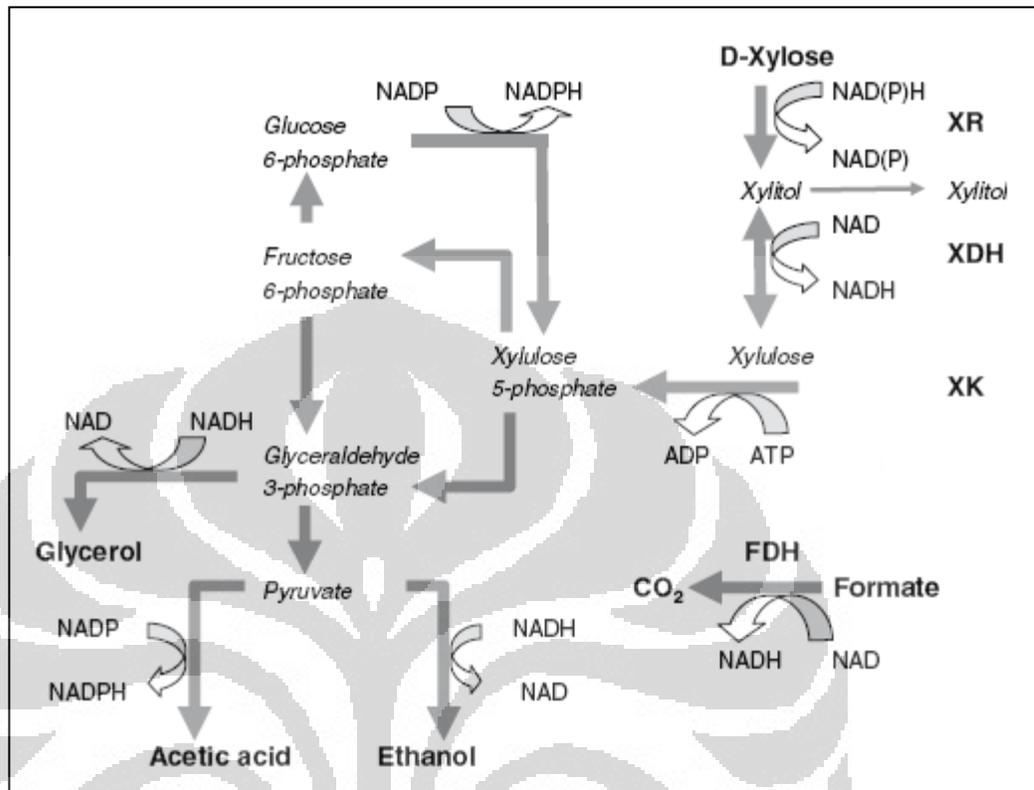
berbagai jenis gula seperti glukosa, xilosa, mannanosa, arabinosa dan galaktosa. Pengaruh konsentrasi gula tersebut terhadap aktivitas enzim XR dan XDH perlu diperhatikan.

Penelitian dilakukan terhadap *Candida parapsilosis* menggunakan hidrolisat tongkol jagung yang mengandung xilosa, glukosa, dan arabinosa. Pengamatan terhadap pengaruh konsentrasi gula dilakukan dengan menambahkan sejumlah gula kedalam medium berisi xilosa. Apabila konsentrasi glukosa diatas 5 g/L menyebabkan produksi xilitol menurun dan konsentrasi arabinosa di atas 2 g/L juga menurunkan jumlah xilitol yang terbentuk. Kesemua penurunan hasil xilitol akibat terbentuknya produk samping yakni etanol¹⁷.

Metabolisme pembentukan xilitol dari xilosa secara singkat dapat dilihat pada gambar 2.5.

II. 3. Perkembangan pembentukan xilitol.

Pembentukan xilitol dengan menggunakan khamir pertama kali diusulkan menggunakan glukosa sebagai bahan baku karena glukosa diperkirakan harganya murah dan mudah didapat³. Jalur metabolisme yang diusulkan adalah glukosa pertama kali diubah menjadi D – arabitol dan kemudian membentuk D – xilulosa. Akhirnya D – xilulosa direduksi menjadi xilitol. *Yield* xilitol yang diperoleh rendah yakni sebesar 11,6% dari 77,5 g glukosa yang dikonsumsi. Dibandingkan dengan reaksi reduksi D – xilosa menjadi xilitol yang hanya melalui satu tahap reaksi, pembentukan xilitol menggunakan glukosa menjadi kurang diminati^{3,21}.



Gambar 2.5. Jalur metabolisme pembentukan xilitol dari xilosa

Penelitian tentang pembentukan xilitol dilakukan dengan menggunakan D – xilosa dan hasil yang diperoleh adalah bahwa aktivitas enzim *xilose reductase* berperan dalam pembentukan xilitol¹⁵. Seiring berjalannya waktu, penelitian pembentukan xilitol ini berkembang dari mencari jalur metabolisme pembentukan hingga bagaimana menaikkan *yield* dari xilitol yang didapat²³.

Pada tahun 1998, dilakukan penelitian untuk menaikkan *yield* xilitol dengan menambahkan glukosa sebagai kosubstrat dan diperoleh kenaikan *yield* xilitol dari 82% saat digunakan xilosa saja menjadi 93%

saat menggunakan kedua gula dengan perbandingan glukosa/xilosa 15% untuk *Candida tropicalis*²⁰. Penambahan glukosa dapat menaikkan *yield* xilitol namun hingga konsentrasi tertentu²⁵. Penambahan glukosa diatas 10 g/L menunjukkan represi terhadap aktivitas enzim *xilose reductase* sehingga xilitol yang dihasilkan berkurang. Represi ini terjadi karena dihasilkannya etanol sebagai metabolit samping²⁴.

Penelitian kemudian berkembang kepada penggunaan bahan baku yang tersedia dari alam yakni tongkol jagung¹⁷, sekam padi²⁶, ampas tebu²⁷, dan batang gandum²⁸. Kesemuanya menghasilkan *yield* yang berbeda – beda karena komposisi masing – masing hemiselulosa tertentu namun secara keseluruhan memberikan *yield* yang berkisar antara 50% - 80%.

Akhir - akhir ini penelitian diarahkan pada mutasi gen penyandi enzim kunci dalam fermentasi xilosa yakni *xilitol dehidrogenase* yang mengkatalisis oksidasi xilitol menjadi xilulosa pada *Candida tropicalis*. Adanya mutasi pada gen penyandi *xilitol dehidrogenase* menyebabkan penggunaan xilosa sebagai sumber energi tidak dimungkinkan. Sehingga perlu ditambahkan sumber karbon lain, seperti glukosa, sebagai sumber energi bagi sel. Jadi xilosa hanya digunakan sebagai penghasil xilitol tanpa digunakan oleh sel sebagai sumber energi. Diperoleh *yield* 98% dari 50 g/L xilosa dan 10 g/L glukosa sebagai kosubstrat¹⁸.

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

III.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang pengaduk, cawan petri, botol semprot, corong kaca, pipet tetes, pipet mikro, pipet bulb, jarum ose, tabung reaksi, gelas piala 100 mL, labu erlenmeyer 25, 100 dan 1000 mL, labu ukur 50, 100 dan 250 mL, alat sentrifugasi, autoklaf, timbangan analitis, pH meter, alat spektrofotometri *spectronic 20*, HPLC Shimadzu Prominence 20 (kolom: Shim-pack SCR-101, Detektor: refraktif indeks RID-10A, pompa : LC-20AB), *vortex* dan *shaker incubator*.

III. 2. Bahan

Bahan kimia yang digunakan seperti adalah aqua destilat, xilosa, glukosa, xilitol, yeast ekstrak (Bacto™), malt ekstrak (Bacto™), pepton (Bacto™), agar (Bacto™), ammonium sulfat p.a., magnesium sulfat p.a., NaOH p.a., Asam klorida p.a., kalium permanganat p.a., kertas saring whatman no 42, filter membran nitroselulosa nitrat 0.45 µm dan filter membran nitroselulosa nitrat 0.2 µm .

III. 3. Isolat yang digunakan

Dalam penelitian ini menggunakan berbagai khamir yang berasal dari koleksi UICC (Universitas Indonesia Cultur Collection) yakni:

1. *Candida parapsilosis* UICC Y- 267,
2. *Candida boidinii* UICC Y-399,
3. *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247,
4. *Cryptococcus podzolicus* UICC Y-400,
5. *Cryptococcus aethanolamini* UICC Y-241,
6. *Cryptococcus laurentii* (kufferath) C. E. Skinner,
7. *Trichosporon coremiiforme* UICC Y-242,
8. *Bullera* sp. L 4222,
9. *Rhodotorula graminis* L 4232,
10. *Williopsis saturnus* UICC Y-399

III. 4. Cara kerja

Sebelum dilakukan seleksi terhadap khamir, dilakukan persiapan seperti sterilisasi alat gelas dan pembuatan medium. Sterilisasi alat gelas dilakukan dengan cara sterilisasi kering yakni memanaskan alat gelas pada suhu 160°C selama 2 jam menggunakan oven. Sementara untuk medium dilakukan sterilisasi basah dengan menggunakan autoclave suhu 121°C selama 15 menit.

Medium agar yang digunakan untuk pertumbuhan adalah medium YMA dengan komposisi glukosa 10 g/L, yeast ekstrak 3 g/L, malt ekstrak 3 g/L, pepton 5 g/L dan agar 15 g/L sementara komposisi medium yang digunakan untuk fermentasi yaitu xilosa 20 g/L, yeast ekstrak 2 g/L, kalium dihidrogen fosfat KH_2PO_4 5 g/L, ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L dan magnesium sulfat $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebesar 0.4 g/L dengan pH diatur 6²⁹.

III. 4. 1. Seleksi khamir potensial

III. 4. 1. 1. Penyiapan inokulum

Kultur – kultur yang didapat dimurnikan dengan metode cawan gores yakni:

- Petri berisi medium agar dibagi menjadi empat daerah.
- Secara aseptik, biakan yang berada dalam agar miring dipindahkan dengan cara menggesekkan jarum ose sebanyak satu kali.
- Secara aseptik, jarum ose berisi biakan tadi digores bolak – balik kedalam permukaan petri berisi medium yang telah disiapkan pada bagian tepi daerah pertama.
- Jarum ose dipijarkan di dalam api dan digunakan untuk menggores petri lagi.

- Kali ini goresan berikutnya berasal dari permukaan yang telah di gores sebelumnya, tegak lurus dengan tepi petri daerah berikutnya.
- Goresan dilakukan sama seperti poin sebelumnya terhadap daerah berikutnya hingga keempat daerah tergores semua.

Petri yang telah digores tadi diinkubasi didalam inkubator dengan suhu 30 °C selama 2 hari. Setelah hari kedua, biakan dalam petri dilakukan pengamatan. Secara aseptis biakan yang dianggap berasal dari sel tunggal diambil dan dipindahkan kedalam agar miring yang telah disiapkan. Biakan dalam agar miring tadi diinkubasi selama 2 hari suhu 30 °C untuk dilakukan fermentasi.

III. 4. 1. 2. Fermentasi

1. Sebelum fermentasi, dilakukan pembuatan suspensi sel terlebih dahulu yakni:
 - Secara aseptik, 9 mL akuades steril dituang kedalam agar miring berisi biakan hasil pemurnian sebelumnya.
 - Secara aseptik, jarum ose digoreskan kedalam tabung reaksi tadi dan suspensi yang didapat ditempatkan didalam erlenmeyer steril.
 - Suspensi yang didapat diaduk menggunakan *vortex*.

2. Setelah mendapatkan suspensi sel, suspensi sel sebanyak 5 mL dimasukkan kedalam 100 mL medium fermentasi yang sebelumnya telah disterilisasi.
3. Medium fermentasi berisi suspensi sel dan kontrol sebagai pembanding, diinkubasi pada suhu 30 °C selama 2 hari dengan laju guncangan 110 rpm.

III. 4. 1. 3. Analisis hasil fermentasi.

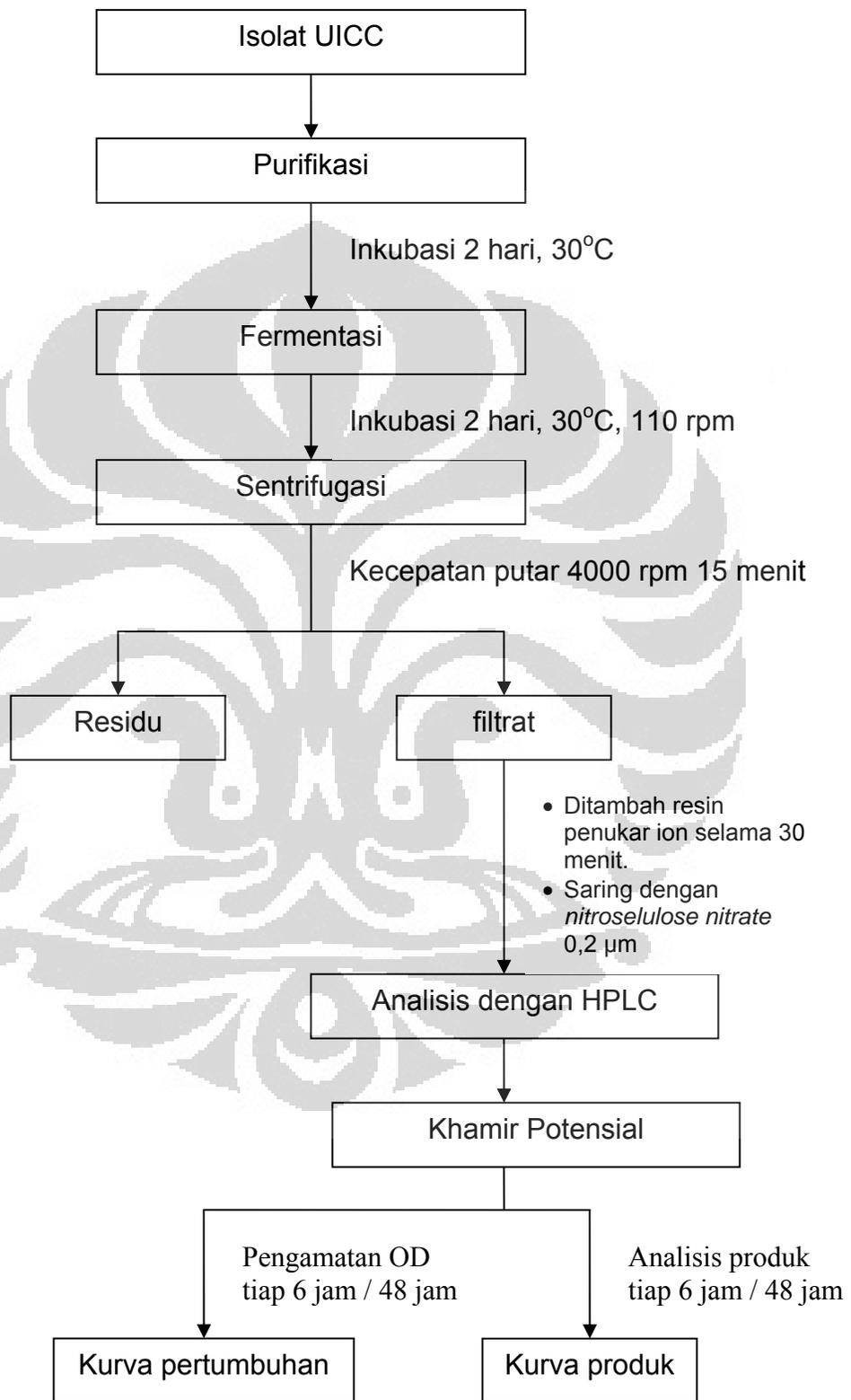
- Hasil fermentasi selama 2 hari disentrifugasi selama 15 menit dengan laju putaran 4000 rpm.
- Sebanyak 10 mL filtrat diberikan resin penukar kation kira – kira satu sendok teh sambil diaduk selama sekitar 30 menit.
- Filtrat diukur pH – nya. Setelah menunjukkan pH asam, dilakukan pemisahan dengan cara penyaringan atau dekantasi.
- Filtrat hasil pemisahan diberikan resin penukar anion kira – kira satu sendok teh sambil diaduk selama sekitar 30 menit dan diukur pH –nya. Bila pH mendekati netral, dilakukan penyaringan.
- Filtrat kemudian disaring dengan kertas saring *nitroselulose nitrate* 0,2 µm.

- Filtrat hasil penyaringan dianalisis dengan menggunakan HPLC sebanyak 20 μ L sampel dengan fasa gerak akuadestilasi, suhu 80°C dan laju alir 1 mL / menit.
- Untuk mendapatkan konsentrasi xilosa dan xilitol, luas area xilosa dan xilitol dari masing – masing sampel dibandingkan dengan luas area standar.

III. 4. 2. Penentuan kurva pertumbuhan khamir potensial

- Dalam penentuan kurva pertumbuhan untuk khamir potensial ini, fermentasi dilakukan dengan menyiapkan sejumlah erlenmeyer dan diurutkan sesuai waktu pengamatan yakni kontrol, 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, dan 48 jam
- Tiap erlenmeyer berisi medium fermentasi steril masing – masing 25 mL dengan volume suspensi sel yang ditambahkan sebanyak 1,25 mL.
- Fermentasi dilakukan pada suhu 30°C selama 2 hari dengan laju guncangan 110 rpm sesuai dengan pada saat dilakukan seleksi.
- Setiap 6 jam, jumlah sel diamati dengan melihat kekeruhan dari medium fermentasi menggunakan alat spektrofotometer *spectronic 20* pada panjang gelombang 600 nm
- Masing – masing medium tadi dianalisis hasil fermentasinya dengan HPLC sesuai prosedur III.4.1.3.

III. 5. Bagan Kerja.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Prinsip penelitian ini adalah menentukan spesies khamir yang mampu menghasilkan xilitol dalam jumlah paling tinggi dengan bahan baku xilosa sebanyak 20 g/L dan kemudian menentukan kapan spesies – spesies khamir potensial ini mulai menghasilkan xilitol.

IV. 1. Seleksi khamir penghasil xilitol

Sebelum dilakukan fermentasi, isolat khamir yang didapat dilakukan purifikasi dengan metode cawan gores. Metode cawan gores ini merupakan cara yang paling umum dan mudah untuk pemurnian mikroorganisme dari kontaminasi mikroorganisme lain. Setelah dilakukan inkubasi, diperoleh sejumlah sel khamir yang murni dan kemudian digunakan pada tahap selanjutnya yakni fermentasi.

Pada tahap fermentasi, pertama kali dilakukan pembuatan medium fermentasi yang berisi xilosa sebagai sumber karbon bagi khamir; yeast ekstrak sebagai sumber nutrisi; KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sebagai sumber mineral dan medium ini diatur pH sebesar 6 yang merupakan kondisi optimal untuk pertumbuhan khamir secara umum.

Pada waktu sterilisasi, medium fermentasi diberikan perlakuan khusus yakni untuk garam $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dilakukan sterilisasi terpisah

dengan medium lainnya. Hal ini dilakukan untuk mencegah reaksi antara ion ammonium dengan gula pada medium. Reaksi ini disebut reaksi Maillard³⁰. Reaksi ini biasa terjadi pada makanan yang mengandung asam amino dan karbohidrat dan dipanaskan pada suhu tinggi misalkan pada pemanggangan roti. Reaksi ini disebut juga *browning reaction* karena menyebabkan perubahan warna menjadi kecokelatan (*browning*) dan rasa agak pahit pada makanan.

Setelah purifikasi, khamir berusia 2 hari dilakukan pembuatan suspensi sel. Dari suspensi yang terbentuk, diambil secara aseptik sebanyak 5 ml dan diinkubasi selama dua hari dalam *incubator shaker*. Fermentasi dilakukan pada *incubator shaker* agar suhu fermentasi tetap terjaga. Penggunaan *shaker* ditujukan untuk memaksimalkan penggunaan medium dan oksigen oleh mikroorganisme⁸.

Hasil fermentasi dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan putaran 4000 rpm selama 15 menit karena pada kecepatan ini sel khamir telah memisah dengan medium beserta metabolitnya. Hasil sentrifugasi tadi dilakukan pemisahan dengan cara dekantasi.

Filtrat akhirnya dianalisa kadar xilosa dan xilitolnya menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC). Sebelum dilakukan analisis, sampel diberikan resin penukar ion sebab adanya ion magnesium pada sampel misalnya, dikhawatirkan akan merusak kolom HPLC. Setelah diperoleh kromatogram, ditentukan luas area dan besarnya

dibandingkan dengan luas area standar xilosa dan xilitol yang sebelumnya sudah ditentukan.

Dari hasil analisa diperoleh data seperti pada Tabel 4.1

Tabel 4.1 Kadar xilitol yang terbentuk saat fermentasi selama dua hari.

Spesies Khamir	Konsentrasi Xilitol (g/L)	Konsumsi xilosa (g/L)	Yield %
<i>Candida fukuyamaensis</i> UICC Y-247	7,135	18,44	38,18
<i>Bullera</i> sp L 4222	3,36	4,03	82,28
<i>Candida boidinii</i> UICC Y-399	3,035	18,29	16,38
<i>Candida parapsilosis</i> UICC Y- 267	2,095	7,49	27,6
<i>Trichosporon coremiiforme</i> UICC Y-242	0,92	15,28	5,49
<i>Rhodotorula graminis</i> L 4232	0,455	4,93	9,11
<i>Cryptococcus laurentii</i> (kufferath)	0,285	18,75	1,5
<i>Cryptococcus aethanolamini</i> UICC Y-241	0,22	11,92	1,82
<i>Cryptococcus podzolicus</i> UICC Y-400	0,165	4,91	3,32
<i>Williopsis saturnus</i> UICC Y-399	0,145	7,76	1,84

Dari Tabel 4.1 diperoleh bahwa *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247 menghasilkan xilitol sebesar 7,135 g/L dengan *yield* 38,13%, *Bullera* sp. L 4222 menghasilkan xilitol sebesar 3,36 g/L dengan *yield* 82,28%, *Candida boidinii* UICC Y-399 menghasilkan xilitol sebesar 3,035 g/L dengan *yield* 16,38%, *Candida parapsilosis* UICC Y – 267 menghasilkan xilitol sebesar 2,095 g/L dengan *yield* 27,6%. Keempat khamir ini dapat

dianggap baik dalam menghasilkan xilitol karena isolat lainnya menghasilkan xilitol dibawah 1 g/L. Mikroorganisme yang menghasilkan xilitol dalam jumlah yang tinggi dan waktu yang singkat, merupakan sesuatu yang menjanjikan bagi industri. Oleh karenanya, selanjutnya keempat spesies ini akan ditentukan kurva pertumbuhan dan kurva produknya.

Bagi khamir yang menghasilkan xilitol dibawah 1 g/L dan konsumsi xilosa rendah seperti *Rhodotorula graminis* L 4232, *Williopsis saturnus* UICC Y-399, dan *Cryptococcus podzolicus* UICC Y-400 mungkin dibutuhkan waktu fermentasi lebih dari yang ditentukan yakni 2 hari.

VI. 2. Penentuan kurva pertumbuhan dari khamir yang potensial.

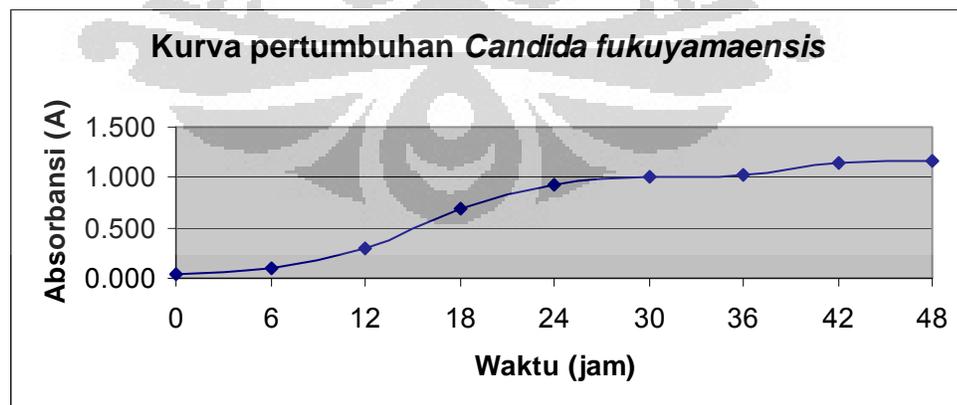
Keempat khamir yang potensial tadi, ditentukan kurva pertumbuhannya dengan melakukan pengamatan terhadap kekeruhannya setiap enam jam selama 48 jam atau dua hari. Pembuatan kurva pertumbuhan ini secara umum bertujuan untuk mengetahui gambaran aktivitas metabolisme dari khamir pada media fermentasi. Namun secara lebih spesifik yaitu untuk mengetahui puncak dari fasa eksponensial dimana jumlah mikroorganisme yang tumbuh menunjukkan jumlah terbanyak, sehingga pada saat ini aktivitas metabolismenya tinggi.

Penentuan kurva pertumbuhan ini menggunakan metode spektrofotometri. Perhitungan mikroorganisme dengan metode spektrofotometri prinsipnya adalah dengan mengukur banyaknya cahaya yang disebarkan oleh suspensi sel. Pengukuran kekeruhan ini didasarkan bahwa partikel – partikel kecil menyebarkan cahaya secara proporsional. Semakin keruh suspensi sel, semakin banyak jumlah sel dalam suspensi dan makin kecil intensitas cahaya yang lolos. Berdasarkan perhitungan, nilai kekeruhan dinyatakan absorbansi (A) atau rapat optis (*optical density* atau OD).

Berikut akan dibahas kurva pertumbuhan dari keempat isolat potensial.

IV. 2. 1. Kurva pertumbuhan *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247.

Selama dua hari dengan pengamatan setiap enam jam diperoleh kurva pertumbuhan dari *Candida fukuyamaensis* UICC Y – 247 seperti pada Gambar 4.1

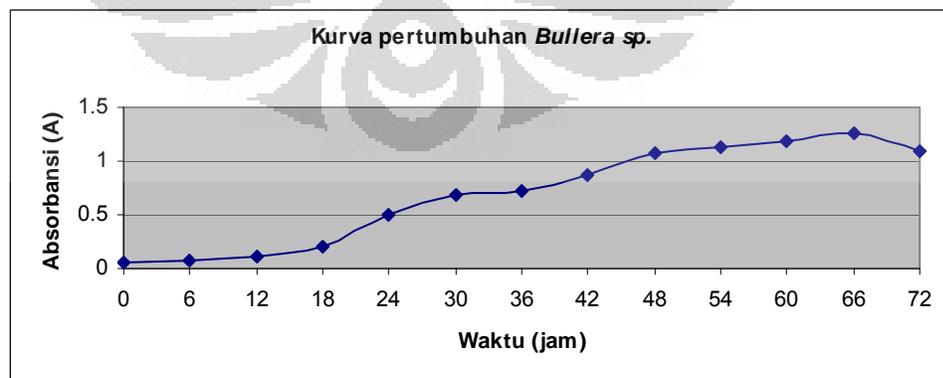


Gambar 4.1 Kurva pertumbuhan *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247

Dari Gambar 4.1 terlihat dari jam ke 0 hingga jam ke 6, *C. fukuyamaensis* mengalami fase lag. Selama fase lag, sel khamir melakukan adaptasi dengan kondisi yang berbeda menggunakan cadangan energi yang berasal dari medium sebelumnya mengingat perubahan kondisi dari lingkungan yang kaya nutrien ke lingkungan yang miskin nutrien. Selama jam ke 12 hingga ke 24, khamir memasuki fase logaritma. Selama waktu ini pula aktivitas enzim untuk penggunaan xilosa sebagai sumber karbon, secara perlahan naik. Pada jam ke 30 pertumbuhan khamir berjalan lambat karena pada tahap ini jumlah sel khamir tetap atau jumlah sel yang hidup sebanding dengan yang mati.

IV. 2. 2. Kurva pertumbuhan *Bullera* sp. L 4222.

Selama tiga hari dengan pengamatan setiap enam jam diperoleh kurva pertumbuhan dari *Bullera* sp. L 4222 seperti pada Gambar 4.2



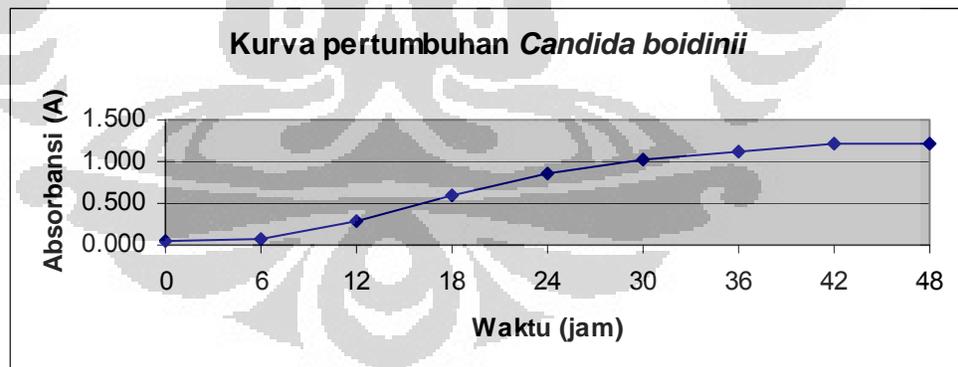
Gambar 4.2 Kurva pertumbuhan *Bullera* sp. L 4222

Berbeda dengan *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247, penentuan kurva pertumbuhan *Bullera* sp. L 4222 dilakukan selama tiga hari atau 72 jam karena tidak didapatkan fase stasioner apabila pengamatan dilakukan selama 48 jam. Ternyata pada *Bullera* sp. membutuhkan waktu yang lebih lama dalam pertumbuhannya. Hal ini menunjukkan aktivitas enzim *xilose reductase* yang rendah.

Hal lain yang didapatkan adalah pada jam ke 66 hingga 72 kurva pertumbuhan mengalami penurunan atau memasuki fase kematian.

IV. 2. 3. Kurva pertumbuhan *Candida boidinii* UICC Y-399.

Selama dua hari dengan pengamatan setiap enam jam diperoleh kurva pertumbuhan dari *Candida boidinii* UICC Y-399 seperti pada Gambar 4.3



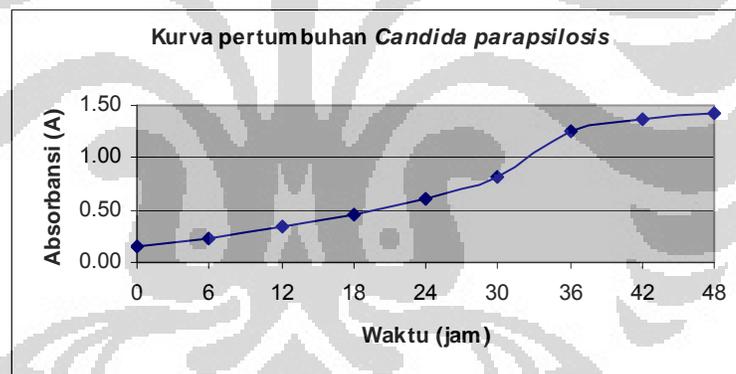
Gambar 4.3 Kurva pertumbuhan *Candida boidinii* UICC Y-399

Pada Gambar 4.3 terlihat bahwa *C. boidinii* melalui fase lag yang sama dengan *C. fukuyamaensis* yakni dari jam ke 0 hingga jam ke 6. Setelah jam ke 6 hingga ke 30 merupakan fase eksponensial

dari *C. boidinii*. Setelah jam ke 30 hingga jam ke 48 mengalami fase stasioner. Dari keseluruhan kurva pertumbuhan dari *C. boidinii* terlihat kemiripan dengan kurva pertumbuhan pada *C. fukuyamaensis*. Hal ini dapat dipahami karena berasal dari satu genus yakni *Candida* dan memiliki aktivitas enzim yang sama pula.

IV. 2. 4. Kurva pertumbuhan *Candida parapsilosis* UICC Y- 267.

Kurva pertumbuhan dari *Candida parapsilosis* UICC Y – 267 diperoleh setelah melakukan pengamatan selama dua hari dengan pengamatan setiap enam jam seperti pada Gambar 4.4



Gambar 4.4 Kurva pertumbuhan *Candida parapsilosis* UICC Y – 267

Candida parapsilosis seperti terlihat pada Gambar 4.4 tidak terlihat fase lag melainkan langsung ke fase eksponensial. Hal ini berarti *C. parapsilosis* mampu menggunakan xilosa tanpa perlu menginduksi terlebih dahulu enzim *xilose reductase*. Namun fase eksponensialnya terlihat jelas mulai pada jam ke 30. Dari jam ke 0 hingga jam ke 30, kurva cenderung landai artinya sel khamir tumbuh

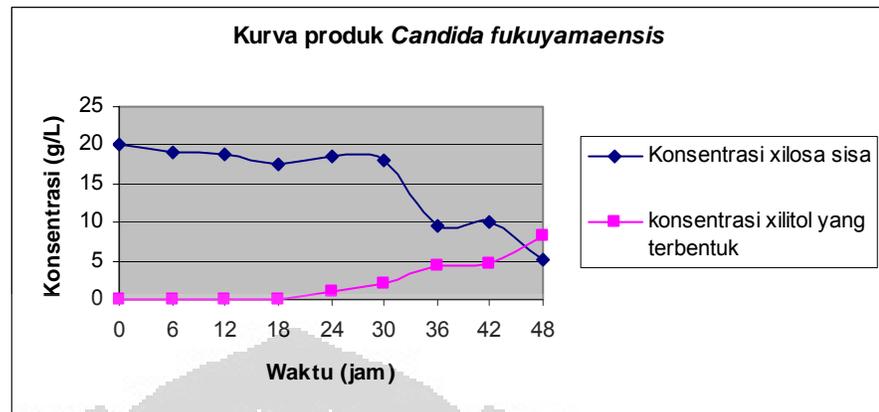
dengan kecepatan rendah atau memasuki fase pra pertumbuhan. Hal ini dapat dipahami karena sel khamir tersebut masih memiliki cadangan energi yang berasal dari medium sebelumnya. Lain halnya dengan isolat lain yang menunjukkan fase lag. Selama fase lag, cadangan energi digunakan untuk menginduksi enzim *xilose reductase*. Khamir akan tumbuh setelah dihasilkan enzim *xilose reductase*.

IV. 3. Penentuan kurva produk dari khamir yang potensial.

Sama halnya dengan penentuan kurva pertumbuhan khamir potensial, pengamatan diamati setiap enam jam selama dua atau tiga hari mengacu pada kurva pertumbuhan masing – masing khamir yang sebelumnya telah diperoleh. Analisis yang digunakannya sama seperti pada analisis hasil fermentasi sebelumnya yakni dengan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC).

IV. 3. 1. Kurva produk *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247.

Kurva produk xilitol pada *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247 diperoleh data seperti pada Gambar 4.5 sebagai berikut



Gambar 4.5 Kurva produk *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247

Dari Gambar 4.5 terlihat bahwa produk berupa xilitol mulai terbentuk pada jam ke 24 sesuai dengan kurva pertumbuhan yang telah diperoleh sebelumnya. Pada jam ke 24 merupakan titik puncak dari fase eksponensial, dimana sel melakukan metabolisme untuk penyimpanan cadangan energi. Pada fase ini mulai terbentuk metabolit seperti xilitol karena kandungan NADH dalam sel mengalami akumulasi. Salah satu penyebab terjadinya akumulasi NADH adalah kandungan oksigen yang terdapat pada medium. Terakumulasinya NADH menyebabkan aktivitas dari enzim *xilose reductase* lebih dominan dibandingkan enzim *xilitol dehidrogenase*. Aktivitas enzim *xilose reductase* dipengaruhi oleh jumlah NADH dalam sel. Tingginya aktivitas enzim *xilose reductase* juga dapat terlihat pada konsumsi xilosa yang tinggi².

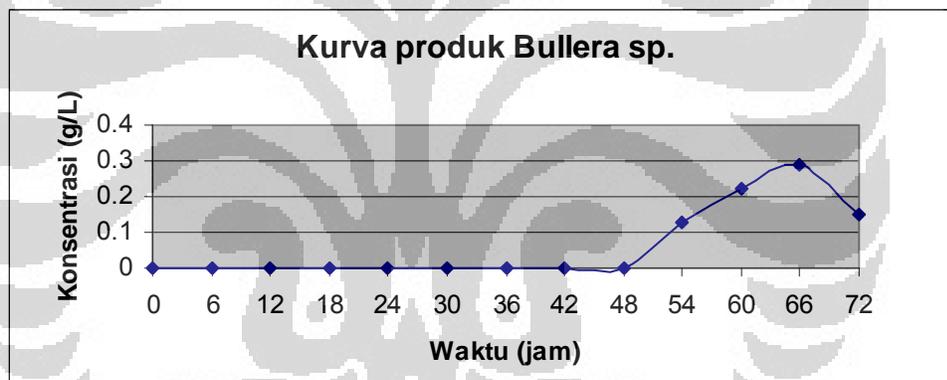
Seiring dengan waktu, produk yang dihasilkan bertambah hingga suatu saat xilitol ini menghambat pertumbuhan khamir atau

xilosa sebagai bahan bakunya telah habis digunakan. Sehingga produk yang diperoleh mengalami penurunan atau konstan.

Pada akhir fermentasi yakni pada jam ke 48 diperoleh produk xilitol yang paling tinggi sebesar 8,27 g/L, konsentrasi xilosa yang tersisa sebesar 5,28 g/L dan *yield* sebesar 57,19%.

IV. 3. 2. Kurva produk *Bullera* sp. L 4222.

Dari pengamatan setiap enam jam selama tiga hari atau 72 jam diperoleh kurva produk sebagai berikut



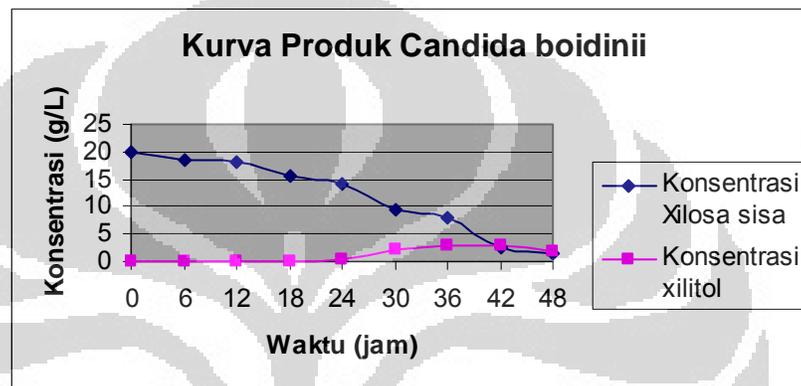
Gambar 4.6 Kurva produk xilitol yang dihasilkan *Bullera* sp. L 4222

Pada Gambar 4.6 terlihat bahwa xilitol mulai terbentuk setelah jam ke 48 dan sesuai dengan kurva pertumbuhan yang telah didapatkan. Selama 72 jam pengamatan, diperoleh konsentrasi xilitol yang terbesar adalah sebesar 0,29 g/L, konsentrasi xilosa sisa 13,31 g/L dan *yield* sebesar 4,28 % yakni pada jam ke 66. Pada jam ke 72, konsentrasi xilitol mengalami penurunan. Hal ini juga terlihat pada

kurva pertumbuhan. Penurunan ini terjadi karena adanya metabolit samping yang dihasilkan dan menghambat pertumbuhan khamir.

IV. 3. 3. Kurva produk *Candida boidinii* UICC Y-399.

Kurva produk xilitol pada *Candida boidinii* UICC Y-399 diperoleh data seperti pada Gambar 4.7 sebagai berikut

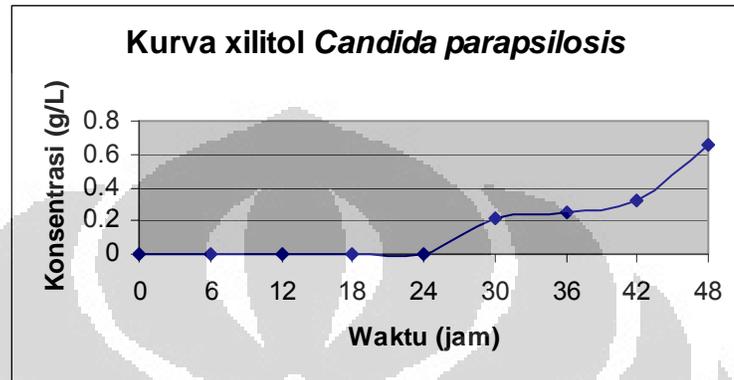


Gambar 4.7 Kurva produk *Candida boidinii* UICC Y-399

Pada Gambar 4.7 terlihat kenaikan konsentrasi xilitol mulai pada jam ke 24 hingga mencapai puncaknya pada jam ke 36 dengan konsentrasi 3,07 g/L dan konsentrasi xilosa sisa 7,82 g/L sehingga diperoleh *yield* sebesar 24,87 %. Pada Gambar 4.7 juga terlihat konsumsi xilosa cukup besar. Hal ini disebabkan karena aktivitas enzim *xilose reductase* yang tinggi. Setelah jam ke 36, konsentrasi xilitol mengalami penurunan akibat konsentrasi xilosa dalam medium berada dalam jumlah yang sedikit.

IV. 3. 4. Kurva produk *Candida parapsilosis* UICC Y – 267.

Berikut merupakan kurva produk dari *Candida parapsilosis* UICC Y- 267.



Gambar 4.8 Kurva produk xilitol *Candida parapsilosis* UICC Y – 267

Pada Gambar 4.8 terlihat pembentukan xilitol sejak jam ke 30 dengan konsentrasi 0,21 g/L dan mencapai maksimum pada jam ke 48 dengan konsentrasi 0,66 g/L, konsentrasi xilosa yang dikonsumsi 2,66 g/L dan *yield* 24,49%.

Dari keempat kurva produk yang diamati konsentrasi xilitol yang dihasilkan dirangkum pada Tabel 4.2

Kalau dibandingkan dengan hasil seleksi sebelumnya, *yield* yang diperoleh mengalami peningkatan. *Candida fukuyamaensis* yang sebelumnya mendapatkan xilitol dengan *yield* 38,18% saat dilakukan penentuan kurva produk diperoleh *yield* tertinggi 57,19%. *Candida boidinii* awalnya memperoleh *yield* 16,38% menjadi 24,87%.

Tabel 4.2 Konsentrasi xilitol yang terbentuk selama penentuan kurva produk.

Spesies Khamir	Konsentrasi Xilitol	Konsumsi xilosa	Yield
	Maksimum (g/L)	Maksimum (g/L)	%
<i>Candida fukuyamaensis</i> UICC Y-247	8,27	14,72	57,19
<i>Bullera sp</i> L 4222	0,29	6,69	4,28
<i>Candida boidinii</i> UICC Y-399	3,07	12,18	24,87
<i>Candida parapsilosis</i> UICC Y- 267	0,66	2,66	24,49

Hal sebaliknya terjadi pada *Bullera sp.*, sebelumnya mendapatkan *yield* 82% ternyata pada pengamatan selanjutnya mendapatkan *yield* 4,28%. Jadi isolat *Bullera sp.* L4222 untuk selanjutnya tidak dapat dimasukkan kategori sebagai khamir potensial.

Terhadap khamir ini dilakukan penyelidikan lebih lanjut. Ternyata isolat *Bullera sp.* yang berada dalam medium agar, terkontaminasi oleh bakteri sehingga hasilnya tidak valid.

Jadi, pada penentuan kurva produk xilitol khamir potensial, urutan dari yang mampu menghasilkan xilitol tertinggi adalah *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247, *C. boidinii* UICC Y-399, dan *C. parapsilosis* UICC Y- 267.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V. 1. Kesimpulan

Dari hasil seleksi kesepuluh khamir, didapatkan empat isolat khamir yang potensial menghasilkan xilitol yakni *Candida fukuyamaensis* UICC Y-247 menghasilkan xilitol sebesar 7,135 g/L dengan *yield* 38,13%, *Bullera* sp. L 4222 menghasilkan xilitol sebesar 3,36 g/L dengan *yield* 82,28%, *C. boidinii* UICC Y-399 menghasilkan xilitol sebesar 3,035 g/L dengan *yield* 16,38%, *C. parapsilosis* UICC Y-267 menghasilkan xilitol sebesar 2,095 g/L dengan *yield* 27,6%.

Kemampuan memproduksi xilitol didasarkan pada aktivitas enzim *xilose reductase* dan *xilitol dehidrogenase*. Pada penentuan kurva produk, *C. fukuyamaensis* UICC Y-247 menghasilkan xilitol maksimum pada jam ke 48 sebesar 8,27 g/L dengan *yield* 57,19%, *Bullera* sp. L 4222 menghasilkan xilitol maksimum pada jam ke 66 sebesar 0,29 g/L dengan *yield* 4,28%, *C. boidinii* UICC Y-399 menghasilkan xilitol maksimum pada jam ke 36 sebesar 3,07 g/L dengan *yield* 24,87%, dan *C. parapsilosis* UICC Y-267 menghasilkan xilitol maksimum pada jam ke 48 sebesar 0,66 g/L dengan *yield* 24,49%.

Isolat khamir yang potensial berdasarkan jumlah xilitol yang dihasilkan adalah *C. fukuyamaensis* UICC Y-247, *C. boidinii* UICC Y-399, dan *C. parapsilosis* UICC Y-267.

V. 2. Saran

Bagi khamir hasil seleksi yang menghasilkan xilitol dibawah 1 g/L dan konsumsi xilosa rendah seperti *Rhodotorula graminis* L 4232, *Williopsis saturnus* UICC Y-399, *Cryptococcus podzolicus* UICC Y-400 dibutuhkan waktu fermentasi lebih dari 2 hari.

Untuk ketiga khamir potensial, yakni *C. fukuyamaensis* UICC Y-247, *C. boidinii* UICC Y-399, dan *C. parapsilosis* UICC Y-267, dapat dilakukan penambahan sumber karbon lain seperti glukosa untuk menaikkan *yield*. Dapat juga digunakan sumber karbon yang berasal dari alam seperti ampas tebu atau sekam padi.

Perlu dilakukan seleksi dengan berbagai jenis khamir lainnya yang dapat menghasilkan xilitol dengan jumlah yang lebih banyak dalam waktu yang relatif singkat agar dapat digunakan dalam industri.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sjostrom, E. 1995. Kimia Kayu, Dasar – Dasar dan Penggunaan, terjemahan dari *Wood Chemistry, Fundamentals and Applications*, oleh Sastrohamidjoyo, H. Gajah Mada University Press, Yogyakarta: vii +390 halaman.
2. Granstrom, T.B., Ken I. & Matti L. 2007. A Rare Sugar Xylitol. Part I: The Biochemistry and Biosynthesis of Xylitol. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 227-281.
3. Granstrom, T.B., Ken I. & Matti L. 2007. A Rare Sugar Xylitol. Part II: Biotechnological Production and Future Applications of Xylitol. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 273-276.
4. Granstrom, T.B. 2002. *Biotechnological Production of Xylose with Candida yeast*. Technical Biochemistry Report.
5. Setiasih, S, Sri H., Endang S. & Susilowati Hs. 2006. *Penuntun Praktikum Mikrobiologi*. Departemen kimia FMIPA UI. Depok.
6. <http://www.xilitol.org/drmakinen.htm> 3 Agustus 2007 Pkl. 11.00
7. <http://www.confectionerynews.com/news/ng.asp?id=82727-futaste-xylitol-danisco> 8 Juni 2008 pkl 10.53
8. Ingraham, J. L. & C.A. Ingraham. 2000. *Introduction of Microbiology 2nd Ed*. Brooks/Cole – Thomson learning. California. USA.
9. Pelczar, M. Chan, E, C, S. 1986. *Dasar – Dasar Mikrobiologi*. UI Press. Jakarta.

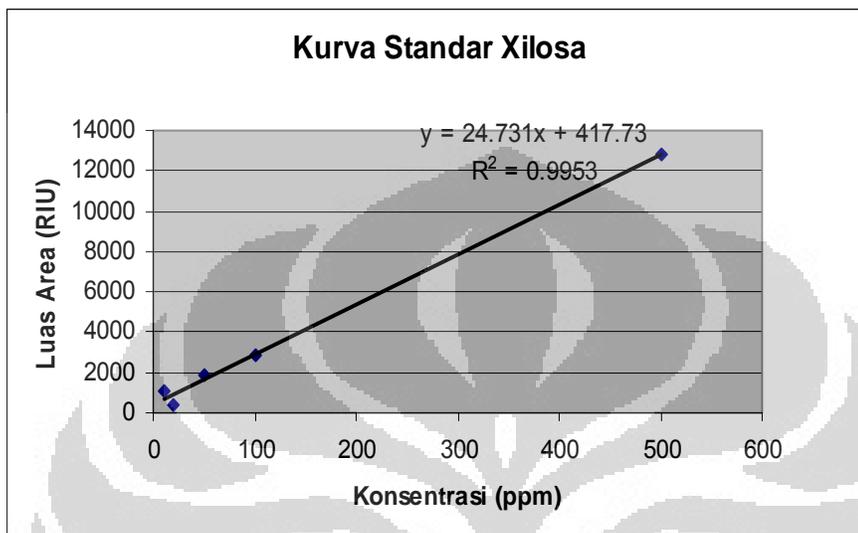
10. Supandi, W. W. 2005. *Inventariasi dan Identifikasi Khamir Pada Tumbuhan di Taman Nasional Gunung Halimun*. Karya Utama Sarjana Biologi FMIPA UI. Depok.
11. Syauqi, A. 2005. *Inventariasi dan Identifikasi Khamir Dari Gastropoda di Taman Nasional Gunung Halimun*. Karya Utama Sarjana Biologi FMIPA UI. Depok.
12. Fitrianiingsih. 2005. *Inventariasi dan Identifikasi Khamir Dari Serasah di Taman Nasional Gunung Halimun*. Karya Utama Sarjana Biologi FMIPA UI. Depok.
13. Salohemo, A., Jenita R., Oleh V.S., Andrei A.S., Merja P. & Laura R. 2007. Xylose Transport Studies with Xylose Utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing Heterologous and Homologous Permeases. *Appl Microbiol Biotechnol*. 74: 1041-1052.
14. Nelson, D. L. & Michael M. C. 1999. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd ed. Worth Publisher. USA.
15. Bruinberg, P. M., Peter H.M., Johannes P. & Alexander S. 1984. NADH – linked Aldose Reductase: The Key to Anaerobic Alcoholic Fermentation of Xylose by Yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*.19: 256-260.
16. Karhuman, Kaisa, Romain F. & Marie F. 2007. High Activity of Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase Improves Xylose Fermentation by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 73: 1039 – 1046 .

17. Kim, S. Y., Oh D.K. & Kim D.H. 1999. Evaluation of Xylitol Production from Corn Cob Hemicellulose Hydrolysate by *Candida parapsilosis*. *Biotechnol letters*. 21: 891 – 895.
18. Ko, B.S., Kim J. & Kim J.H. 2006. Production of Xylitol from D – xylose by a Xylitol Dehydrogenase Gene – Disrupted Mutant of *Candida tropicalis*. *Appl and Environment Microbiol*. 72: 4207 – 4213.
19. Kim, J. H., Ryu Y.W. & Seo J.H. 1999. Analysis and Optimation of a Two Substrate Fermentation for Xylitol Production Using *Candida tropicalis*. *J. Industrial Microbiol & Biotechnol*. 22: 181 – 186.
20. Kim, S. Y. & Kim S.Y. 1998. Increase of Xylitol *yield* by Feeding Xylose and Glucose in *Candida tropicalis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 50: 419 – 425.
21. Onishi, H. & Suzuki T. 1969. Microbial Production of Xylitol from Glucose. *Appl Microbiol*. 72:1031 – 1035.
22. Rangaswamy, S. & Agblevor F.A. 2002. Screening of Facultative Anaerobic Bacteria Utilizing D – Xylose for Xylitol Production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 60: 88 – 93.
23. Girio, F, Amalia P. & Amarai M.T. 1989. Enzymatic and Physiological Study of D – Xylose Metabolism by *Candida shehatae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 32: 199 – 204.
24. Sampaio, F. C., Wandel B., Virginia M., Flavia M. & Jorge L. 2003. Screening of Filamentous Fungi for Production of Xylitol from D – Xylose. *Brazilian J. Microbiol*. 34 : 325 – 328.

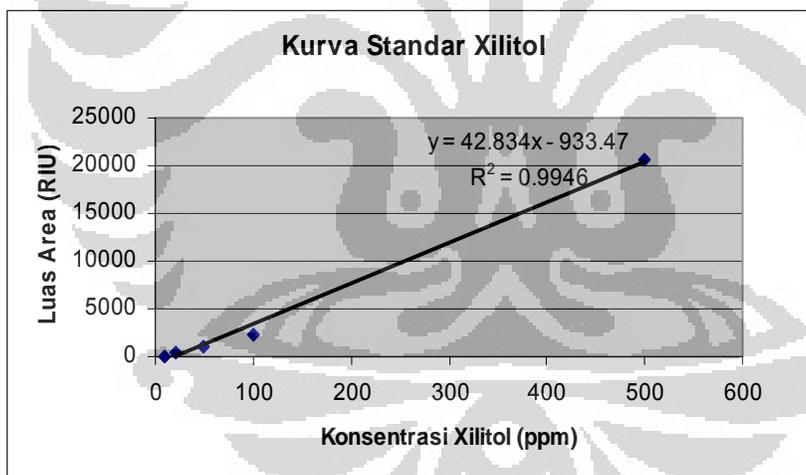
25. Kastner, James R., Mark A. E. & Sarah A.L. 2001. Glucose Repression of Xylitol Production in *Candida tropicalis* Mixed Sugar Fermentation. *Biotechnol letters*. 23: 1663 – 1667.
26. Mayerhoff, Z. D. V. L., Inez C. R. & Silvio S. S. 1997. Xylitol Production from Rice Straw Hemicellulose Hydrolysate Using Different Yeast Strain. *Biotechnol letters*. 19 : 407 – 409.
27. Carvalho, W., Santos J. C., Canilha J., Silva S.S., Perego P. & Converti A. 2005. Xylitol Production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate Metabolic Behaviour of *Candida guilliermondii* cells entrapped in Calcium alginate. *Biochem Engineering*. 25: 25 – 31.
28. Canilha, L., Carvalho W. & Silva J.B. 2005. Influence of Medium Composition in Xylitol Bioproduction from Wheat Straw Hemicellulosic Hydrolysate. *World J. Microbiol Biotechnol*. 21: 1087 – 1093.
29. Furlan, Sandra A. & Castro H.F. 2001. Xylitol Production by *Candida parapsilosis* Under Fed – Batch Culture. *Braz. Archiv. Biol Technol*. 44 : 125 – 128.
30. www.Food-info.net/uk/color/Maillard.htm 5 Juni 2008 pkl 10.00

LAMPIRAN 1

KURVA STANDAR



Konsentrasi (ppm)	Luas Area (RIU)
10	1059
20	376
50	1856
100	2825
500	12790



Konsentrasi (ppm)	Luas Area (RIU)
10	8
20	377
50	1129
100	2266
500	20680

LAMPIRAN 2

Data Kurva Pertumbuhan Pada Panjang Gelombang 600 nm.

Candida fukuyamaensis UICC Y-247

Waktu (jam)	Absorbansi (A)
0	0,047
6	0,104
12	0,291
18	0,691
24	0,936
30	1,014
36	1,027
42	1,14
48	1,172

Bullera sp. L 4222

Waktu (jam)	Absorbansi (A)
0	0,053
6	0,066
12	0,112
18	0,196
24	0,505
30	0,689
36	0,722
42	0,872
48	1,073
54	1,128
60	1,18
66	1,264
72	1,085

Candida boidinii UICC Y-399

Waktu (jam)	Absorbansi (A)
0	0,048
6	0,081
12	0,277
18	0,602
24	0,863
30	1,029
36	1,114
42	1,206
48	1,213

Candida parapsilosis UICC Y- 267

Waktu (jam)	Absorbansi (A)
0	0,151
6	0,234
12	0,333
18	0,465
24	0,617
30	0,812
36	1,250
42	1,363
48	1,429

LAMPIRAN 3

DATA KURVA PRODUK

Candida fukuyamaensis UICC Y-247

Waktu (jam)	Konsentrasi Xilosa Sisa (g/L)	Konsentrasi Xilitol (g/L)
0	20	0
6	19,19	0
12	18,7	0
18	17,6	0
24	18,61	0,95
30	18,06	2,09
36	9,62	4,35
42	10,13	4,52
48	5,28	8,27

Bullera sp. L 4222

Waktu (jam)	Konsentrasi Xilosa sisa (g/L)	Konsentrasi Xilitol (g/L)
0	20	0
6	16,84	0
12	16,58	0
18	16,06	0
24	15,71	0
30	15,61	0
36	15,02	0
42	15,52	0
48	14,78	0
54	14,59	0,13
60	12,7	0,22
66	13,31	0,29
72	13,18	0,15

Candida boidinii UICC Y-399

Waktu (jam)	Konsentrasi Xilosa Sisa (g/L)	Konsentrasi Xilitol (g/L)
0	20	0
6	18,59	0
12	18,06	0
18	15,54	0
24	14,08	0,42
30	9,29	2,19
36	7,82	3,07
42	2,575	2,79
48	1,44	1,85

Candida parapsilosis UICC Y- 267

Waktu (jam)	Konsentrasi Xilosa Sisa (g/L)	Konsentrasi Xilitol (g/L)
0	20	0
6	20	0
12	19,88	0
18	19,34	0
24	19,58	0
30	19,00	0,21
36	18,12	0,25
42	16,81	0,32
48	17,34	0,66

LAMPIRAN 4

Kromatogram Hasil Pengukuran Xilosa dan Xilitol dengan HPLC

(*Candida fukuyamaensis* UICC Y-247)

