

**PENAPISAN KHAMIR SELULOLITIK DALAM MENDUKUNG  
PEMBENTUKAN ETANOL DAN SEBAGAI *OLEAGINOUS YEAST*  
(KHAMIR PENGHASIL LIPID)**

**Skripsi**

**Disusun untuk melengkapi syarat-syarat  
guna memperoleh gelar Sarjana Sains**



**ELSA ANGELA**

**3325061860**

**PROGRAM STUDI KIMIA**

**JURUSAN KIMIA**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA**

**2011**

**PERSETUJUAN PANITIA UJIAN SKRIPSI**

**PENAPISAN KHAMIR SELULOLITIK DALAM Mendukung Pembentukan ETANOL DAN SEBAGAI *OLEAGINOUS YEAST* (KHAMIR PENGHASIL LIPID)**

**Nama : Elsa Angela**

**No. Reg : 3325061860**

	<b>Nama</b>	<b>Tanda Tangan</b>	<b>Tanggal</b>
<b>Penanggung Jawab</b>			
<b>Dekan</b>	: <u>Dra. Marheni, M.Sc.</u> NIP. 19500606 197412 2 001		2/ 2011
<b>Wakil Penanggung Jawab</b>			
<b>Pembantu Dekan I</b>	: <u>Dr.rer.nat. Apriliana L.F, M.S., M.Ed.</u> NIP. 19600408 199003 2 002		2.02.2011
<b>Ketua</b>	: <u>Dr. Muktiningsih, M.Si.</u> NIP. 19640511 198903 2 001		20/ 01 2011
<b>Sekretaris</b>	: <u>Dr. Erdawati, M.Sc.</u> NIP. 19510912 198103 2 001		20/ 01 2011
<b>Anggota</b>			
<b>Pembimbing I</b>	: <u>Drs. Zulhipri, M.Si.</u> NIP. 19580703 198903 1 001		26/ 01 2011
<b>Pembimbing II</b>	: <u>Prof. Dr. I Made Sudiana, M.Sc.</u> NIP. 19630831 198803 1 001		26/ 01 2011
<b>Penguji</b>	: <u>Dra. Ine Mustikasari, M.Si.</u> NIP. 19481204 198703 2 001		25/ 01 2011

**Dinyatakan lulus ujian skripsi pada tanggal: 18 Januari 2011**

# Lembar Persembahan

Untuk Orang Tuaku Tercinta

Ya ALLAH,

Rendahkanlah suaraku bagi mereka  
Perindahlah ucapanku di depan mereka  
Lunakkanlah watakku terhadap mereka dan  
Lembutkan hatiku untuk mereka.....

Ya ALLAH,

Berilah mereka balasan yang sebaik-baiknya,  
atas didikan mereka padaku dan Pahala yang  
besar atas kasih sayang yang mereka limpahkan  
padaku,

peliharalah mereka sebagaimana mereka  
memeliharaku.

Ya ALLAH,

Apa saja gangguan yang telah mereka rasakan  
atau kesusahan yang mereka deritakan karena  
aku,

atau hilangnya sesuatu hak mereka karena  
perbuatanku,

maka jadikanlah itu semua penyebab susutnya  
dosa-dosa mereka dan bertambahnya pahala  
kebaikan mereka dengan perkenan-Mu ya ALLAH,

hanya Engkau yang berhak membalas  
kejahatan dengan kebaikan berlipat ganda.

Ya ALLAH,

Bila magfirah-Mu telah mencapai mereka  
sebelumku,

Izinkanlah mereka memberi syafa'at untukku.

Tetapi jika sebaliknya, maka izinkanlah aku

memberi syafa'at untuk mereka,

sehingga kami semua berkumpul

bersama dengan santunan-Mu di tempat

kediaman yang dinaungi kemuliaan-Mu,

ampunan-Mu serta

rahmat-Mu.....

Sesungguhnya Engkau yang memiliki Kurnia

Maha Agung,

serta anugerah yang tak berakhir dan Engkau yang

Maha Pengasih diantara semua pengasih.

Amin Ya Rabbal Alamin.

Hasil Karya ini kupersembahkan

kepada semua yang pernah menjadi

bagian dari hidupku dan yang kucintai:

Bapak, Mama, dan Adikku....

## UNTUKMU SAHABAT

(b c L)

Seindah cahaya pagi yang menyingsing pagi....

Seindah belaian khatulistiwa yang memancar....

Seindah gelora kasih yang bersemayam direlung hati....

Seindah persahabatan yang hari ini kita jalin....

Bintang-bintang bersinar gemerlap....

Rembulan terseyum dengan indah....

Komet Halley berlintas dengan cemerlang....

Seindah persahabatan yang hari ini kita rekat....

Ku bersyukur mendapatkan engkau kawan....

Ku bersyukur berteman denganmu kawan....

Ku berharap ini tak kan bias....

Ku berharap ini kan nyata....

Satu yang ku harapkan darimu teman....

Jadikan hidup ini indah dengan kepedulian....

Kepedulianmu terhadap sekelilingmu dan temanmu kawan....

## ABSTRAK

Elsa Angela. Penapisan Khamir Selulolitik Dalam Mendukung Pembentukan Etanol Dan Sebagai *Oleaginous Yeast* (Khamir Penghasil Lipid). **Skripsi**. Jakarta : Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta. 2011.

Tingginya tingkat pertumbuhan pemakaian energi bahan bakar minyak (BBM) kian meningkat dari tahun ke tahun. Hal ini menimbulkan adanya usaha untuk mencari sumber energi alternatif yang dapat diperbaharui dan ramah lingkungan (Moniruzzaman et al., 1997). Etanol dan lipid dari *Oleaginous Yeast* merupakan salah satu alternatif sumber energi yang dapat dihasilkan dari biomassa berselulosa.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh spesies khamir hasil isolasi dari pohon pada Hutan Lindung Papalia dan Mekongga, Sulawesi Tenggara yang berpotensi dalam mendukung pembentukan etanol dan sebagai *Oleaginous Yeast* (Khamir Penghasil Lipid). Metode penelitian ini meliputi seleksi khamir yang memiliki kemampuan aktivitas selulolitik terbesar dengan melihat kemampuannya dalam mendegradasi substrat selulosa. Khamir hasil seleksi kemudian diuji kemampuannya dalam mensintesis lipid serta diukur kadar etanol dan jenis lipid yang dihasilkan. Media pengujian yang digunakan yaitu media gliserol N-Limited, media YPD N-Limited, media xylosa N-Limited, dan media Carboxymethyl cellulose (CMC).

Hasil seleksi diperoleh 4 isolat khamir selulolitik terbesar yaitu isolat P.Le.6.DP.6, P.L.1.W.2, P.L.3.DP.9, dan P.L.3.DP.6 dari 30 isolat. Nilai aktivitas enzim selulase tertinggi dihasilkan oleh isolat P.L.3.DP.9 sebesar 0,592 mmol perjam pada media CMC sedangkan nilai total lipid tertinggi dihasilkan oleh isolat P.L.1.W.2 sebesar 597,250ppm pada media gliserol n-limited. Kadar etanol tertinggi dihasilkan oleh isolat P.L.3.DP.6 sebesar 11,61% dan kandungan lipid tertinggi dihasilkan oleh isolat P.L.3.DP.6 sebesar 33,40% pada media gliserol N-Limited dengan jenis lipid yang dihasilkan yaitu asam tetradekanoat, asam oktadekanoat, asam 9-heksadekanoat, asam heksadekanoat, asam 9,12-oktadekadienoat, dan asam oktadekanoat hasil analisis dengan GC-MS.

Kata kunci: Khamir, Enzim Selulase, Etanol, *Oleaginous Yeast*

## KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT dan berkat rahmat Allah SWT dan usaha, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Penapisan Khamir Selulolitik Dalam Mendukung Pembentukan Etanol Dan Sebagai *Oleaginous Yeast* (Khamir Penghasil Lipid)”. Dalam penyusunan skripsi ini penulis telah dibantu berbagai pihak baik berupa dukungan materi maupun moril yang sangat berarti bagi penyelesaian skripsi ini. Untuk itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada Drs. Zulhipri, M.Si, selaku dosen pembimbing I dan Prof. Dr. I Made Suidiana, M.Sc, selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan sebagian ilmunya, membimbing penulis, serta memberikan arahan dan dorongan moril dalam penyelesaian skripsi ini.

Penulis juga berterimakasih kepada Drs. Agung Purwanto, M.Si, selaku Ketua Jurusan Kimia, Drs. Zulhipri, M.Si, selaku Ketua Program Studi Kimia dan Dr. Erdawati, M.Sc, selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan saran serta kritik yang membangun dan bermanfaat. Terima kasih pula kepada seluruh staf pengajar dan karyawan Jurusan Kimia FMIPA UNJ untuk bekal ilmu pengetahuan dan rasa kekeluargaan yang erat.

Ucapan terima kasih penulis juga disampaikan kepada Kepala Bidang Mikrobiologi Puslit Biologi LIPI, Dr. Heddy Julistiono, yang telah

mengizinkan penulis melakukan penelitian. Ibu Atit Kanti, M.Sc serta kepada seluruh staf yang telah memberikan saran dan kritik selama penulis melakukan penelitian. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan rizki, rahmat dan hidayah-Nya kepada semua yang telah membantu.

Dalam penyusunan skripsi ini mungkin terdapat kesalahan yang tak akan pernah luput dari karya manusia, oleh sebab itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun untuk kepentingan yang akan datang. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi kita semua.

Jakarta, Januari 2011

Penulis



## DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK .....	i
KATA PENGANTAR .....	ii
DAFTAR ISI .....	iv
DAFTAR GAMBAR .....	vi
DAFTAR TABEL .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN .....	ix
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang .....	1
B. Identifikasi Masalah.....	4
C. Pembatasan Masalah.....	4
D. Perumusan Masalah .....	5
E. Tujuan Penelitian .....	5
F. Manfaat Penelitian .....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
A. Kajian Pustaka .....	7
1. Khamir.....	7
2. Enzim Selulase .....	11
3. Aktivitas Enzim Selulase .....	14
4. Fermentasi dan Pembentukan Etanol .....	18
5. Proses Sintesis Lipid di <i>Oleaginous Yeast</i> .....	22
BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....	24
A. Tujuan Operasional.....	24

B. Tempat dan Waktu .....	24
C. Metode Penelitian .....	25
D. Prosedur Penelitian .....	25
E. Tehnik Pengumpulan Data.....	37
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	38
1. Penentuan Isolat Terbaik.....	38
a. Isolat Khamir .....	38
b. Pengujian Kemampuan Selulolitik.....	40
c. Pengukuran Pertumbuhan Biomassa Khamir .....	46
2. Pengujian pada Berbagai Sumber Karbon .....	49
a. Pengujian Aktivitas Enzim Selulase .....	50
b. Pengukuran Total Lipid Produksi .....	55
3. Uji Pembentukan Etanol .....	62
4. Identifikasi Lipid.....	64
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....	67
A. Kesimpulan .....	67
B. Saran.....	68
DAFTAR PUSTAKA.....	69
LAMPIRAN.....	73

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Sel Khamir Sejati.....	9
2. Sel Khamir Liar.....	10
3. Tahap Kerja Enzim Endo- $\beta$ 1,4-glukanase.....	12
4. Tahap Kerja Enzim Ekso- $\beta$ 1,4-glukanase .....	13
5. Tahap Kerja Enzim Selobiose .....	13
6. Metabolisme Khamir pada Kondisi Aerobik dan Anaerobik .....	20
7. Siklus Metabolisme Etanol .....	21
8. Jalur Perubahan Glukosa menjadi Lipid pada <i>Oleaginous Yeast</i> .....	23
9. Koloni Isolat Khamir .....	39
10. Zona Bening Khamir Penghasil Enzim Selulase Terbesar .....	43
11. Struktur Molekul <i>Carboxy Methyl Cellulose</i> .....	44
12. Struktur Molekul <i>Congo Red</i> .....	45
13. Pertumbuhan Biomassa Khamir pada Media Cair .....	46
14. Grafik Pertumbuhan Biomassa Sel Khamir .....	47
15. Hasil Sentrifuge Biomassa Khamir .....	51
16. Struktur Molekul Asam 3,5-dinitrosalisilat dan Asam 3-amino-5-nitrosalisilat .....	52
17. Warna Hasil Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase .....	53
18. Grafik Hasil Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase .....	53
19. Pengamatan Sel Khamir dengan Mikroskop .....	56
20. Struktur Molekul <i>Nile Blue</i> .....	57
21. Pengukuran Total Lipid .....	58
22. Grafik Pengukuran Konsentrasi Lipid Produksi .....	59
23. Reaksi Pembentukan Etanol .....	62
24. Grafik Kadar Etanol pada Media CMC Cair.....	64

25.	Kurva Standar Glukosa .....	79
26.	Kurva Standar Etanol .....	80
27.	Kurva Standar PHB.....	81
28.	Kromatogram Hasil Uji GC (LIPID).....	95
29.	Kromatogram Hasil Uji MS (LIPID).....	97

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Indeks Selulolitik Khamir Penghasil Selulase.....	41
2. Persentase Kandungan Lipid dalam Sel Khamir .....	65
3. Pengenceran Bertingkat Larutan Glukosa 500ppm.....	78
4. Absorbansi Larutan Standar Glukosa .....	79
5. Pengenceran Bertingkat Larutan Etanol 50% .....	80
6. Absorbansi Larutan Standar PHB .....	81
7. Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase .....	83
8. Hasil Pengukuran Konsentrasi Etanol dengan GC.....	86
9. Konsentrasi Etanol yang Dihasilkan dari Tiap Isolat .....	86
10. Pengukuran Total Lipid Produksi dari Tiap Isolat .....	86
11. Pengukuran Total Lipid Produksi dari Tiap Isolat .....	91
12. Konsentrasi Lipid Produksi Tiap Isolat .....	92
13. Berat Kering Biomassa Khamir .....	94
14. Persentase Kandungan Lipid dalam Sel Khamir .....	94
15. Pengukuran Absorbansi Biomassa Khamir.....	100

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Diagram Alir Penelitian.....	74
2. Pembuatan Kurva Standar.....	78
3. Perhitungan Aktivitas Enzim Selulase.....	82
4. Perhitungan Kadar Etanol pada Media CMC Cair.....	85
5. Perhitungan Total Lipid Produksi.....	86
6. Perhitungan Konsentrasi Lipid Produksi.....	91
7. Perhitungan Persentase Kandungan Lipid dalam Sel Khamir.	93
8. Hasil Uji GC-MS (LIPID).....	95
9. Pengukuran Absorbansi Biomassa Khamir.....	100

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Kebutuhan energi dunia termasuk Indonesia di dalamnya semakin meningkat dari tahun ke tahun. Lebih dari 80% kebutuhan energi dunia dipenuhi oleh bahan bakar fosil yang berasal dari minyak bumi dan gas alam. Tingkat pertumbuhan pemakaian energi bahan bakar minyak (BBM) di negara kita Indonesia cukup tinggi yakni mencapai 273 juta barrel per tahun (Pusat Informasi Energi). Namun, sangat disayangkan peningkatan konsumsi energi ini tidak disertai dengan produksi energi yang memadai. Saat ini, produksi bahan bakar sektor migas semakin menurun karena sumbernya yang semakin menipis di lapisan bumi. Kita tidak mungkin terus mengandalkan minyak bumi sebagai pasokan energi karena minyak bumi adalah sumber energi yang tidak dapat diperbaharui (unrenewable resources) dan suatu saat akan habis. Diperkirakan produksi minyak bumi dunia akan turun sekitar 20 miliar barrel pada tahun 2050 (Sun dan Cheng, 2002). Oleh karena itu, perlu dipertimbangkan penggunaan sumber energi lain selain minyak bumi. Sumber energi alternatif yang dicari harus dapat diperbaharui dan

ramah lingkungan (Moniruzzaman et al., 1997). Sumber energi alternatif yang berbasis biomassa saat ini sedang dikembangkan.

Lipid yang dihasilkan dari Oleaginous Yeast, dapat digunakan sebagai salah satu alternatif bahan baku untuk menghasilkan bahan bakar hayati pengganti bahan bakar minyak yang saat ini sedang mengalami kelangkaan dan etanol yang diproduksi dari tanaman yang memiliki kadar karbohidrat tinggi, seperti: tebu, nira, sorgum, ubi kayu, ubi jalar, sagu, dan jagung lebih ramah lingkungan karena menghasilkan emisi karbon dioksida yang lebih rendah hingga 18%.

Salah satu alternatif bahan baku pembuatan etanol dan lipid dari Oleaginous Yeast adalah biomassa berselulosa. Selulosa merupakan biomassa yang paling melimpah di alam, sekitar  $1,5 \times 10^{12}$  ton diproduksi setiap tahunnya dari hasil fotosintesis, terutama oleh tanaman di daerah tropis (Sukumaran et al., 2005). Hal ini membuat selulosa menjadi salah satu sumber energi yang menjanjikan karena ketersediannya di alam dan sifatnya sebagai sumber energi yang dapat diperbaharui.

Selulosa dimanfaatkan sebagai sumber gula oleh berbagai jenis mikroba yang mampu mendegradasi selulosa menjadi gula yang lebih sederhana untuk kemudian difermentasi menjadi etanol sebagai salah satu sumber energi. Selulosa yang berada di alam berasal dari perombakan material tumbuhan dan sebagian kecil berasal dari perombakan jamur dan bakteri. Degradasi selulosa di alam



berlangsung sangat lambat, proses degradasi akan berlangsung lebih cepat jika mikroba ikut serta dalam proses dekomposisi tersebut (Kanti, 2007). *Aspergillus niger*, *Clostridium acetobutylicum*, Actinomycetes, *Trichoderma viride* serta bakteri golongan *Bacillus* sp. telah banyak diteliti karena perannya dalam mendegradasi selulosa (Kang, 2004; Meryandini, 2009; Zakpa, 2009)

Sampai saat ini peran khamir dalam mendegradasi selulosa belum banyak terungkap. Padahal khamir banyak ditemukan pada substrat dengan kandungan bahan organik tinggi (Kanti, 2007). Khamir lebih banyak dikenal akan kemampuannya memproduksi etanol dari hasil fermentasi gula sederhana dan hanya beberapa jenis khamir saja yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan lipid. Berdasarkan hal tersebut, dalam penelitian ini dilakukan penapisan serta karakterisasi aktivitas khamir selulolitik dari beberapa jenis spesies hasil isolasi dari pohon pada Hutan Lindung Papalia dan Mekongga, Sulawesi Tenggara dalam mendukung pembentukan etanol dan sebagai *Oleaginous Yeast* (Khamir Penghasil Lipid).

## B. Identifikasi Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka dapat didefinisikan berbagai masalah, yaitu :

1. Adakah spesies khamir hasil isolasi dari pohon pada Hutan Lindung Papalia dan Mekongga, Sulawesi Tenggara yang mampu menghasilkan enzim selulase dan sebagai *Oleaginous Yeast*?
2. Bagaimana aktivitas enzim selulase khamir selulolitik dan kemampuan khamir pensintesis lipid pada berbagai sumber karbon?
3. Bagaimanakah potensi khamir selulolitik dalam mendukung pembentukan etanol dan sebagai *Oleaginous Yeast*?
4. Berapakah kadar etanol yang dihasilkan oleh khamir selulolitik?
5. Jenis lipid apakah yang dihasilkan oleh khamir pensintesis lipid?
6. Apakah yang mempengaruhi besarnya aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh khamir?
7. Faktor-faktor apa saja yang mempengaruhi pembentukan lipid?

## C. Pembatasan Masalah

Penelitian ini dibatasi pada penapisan atau seleksi khamir selulolitik penghasil enzim selulase dan sebagai *Oleaginous Yeast*, penentuan aktivitas enzim selulase dan kemampuan khamir pensintesis lipid dari khamir selulolitik yang memiliki nilai indeks

selulolitik empat terbesar pada berbagai sumber karbon, dan potensi dari khamir tersebut dalam mendukung pembentukan etanol dan sebagai *Oleaginous Yeast*.

#### **D. Perumusan Masalah**

Perumusan masalah dalam penelitian ini ialah adakah spesies khamir hasil isolasi dari pohon pada Hutan Lindung Papalia dan Mekongga, Sulawesi Tenggara yang memiliki kemampuan selulolitik penghasil enzim selulase dan sebagai *Oleaginous Yeast*, bagaimana aktivitas enzim selulase dan kemampuan khamir pensintesis lipid dari khamir selulolitik yang memiliki nilai indeks selulolitik empat terbesar pada berbagai sumber karbon, dan bagaimana potensi dari khamir tersebut dalam mendukung pembentukan etanol dan sebagai *Oleaginous Yeast*.

#### **E. Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Memperoleh spesies khamir yang memiliki kemampuan selulolitik penghasil enzim selulase dan sebagai *Oleaginous Yeast* hasil isolasi dari pohon pada Hutan Lindung Papalia dan Mekongga, Sulawesi Tenggara.
2. Mengetahui aktivitas enzim selulase khamir selulolitik dan kemampuan khamir pensintesis lipid pada berbagai sumber karbon.

3. Mengetahui potensi dari khamir selulolitik dalam mendukung pembentukan etanol dan sebagai *Oleaginous Yeast*.

#### **F. Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk memberikan informasi mengenai jenis khamir selulolitik yang berpotensi dalam mendukung pembentukan etanol dan sebagai *Oleaginous Yeast* (Khamir Penghasil Lipid).

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Kajian Pustaka**

##### **1. Khamir**

Khamir (Yeast) adalah salah satu mikroorganisme yang termasuk dalam golongan fungi yang dibedakan bentuknya dari mould (kapang) karena berbentuk uniseluler. Reproduksi vegetatif pada khamir terutama dengan cara pertunasan. Sebagai sel tunggal khamir tumbuh dan berkembang biak lebih cepat dibanding dengan mould yang tumbuh dengan pembentukan filamen. Khamir sangat mudah dibedakan dengan mikroorganisme yang lain misalnya dengan bakteri, karena khamir mempunyai ukuran sel yang lebih besar dan morfologi yang berbeda. Sedangkan dengan protozoa, khamir mempunyai dinding sel yang lebih kuat serta tidak melakukan fotosintesis bila dibandingkan dengan ganggang atau algae. Dibandingkan dengan kapang, dalam pemecahan bahan komponen kimia, khamir lebih efektif memecahnya dan lebih luas permukaan serta produk yang dihasilkan lebih banyak. Khamir dapat dibedakan atas dua kelompok berdasarkan sifat metabolismenya yaitu bersifat fermentatif dan oksidatif. Jenis fermentatif dapat melakukan fermentasi alkohol yaitu memecah gula

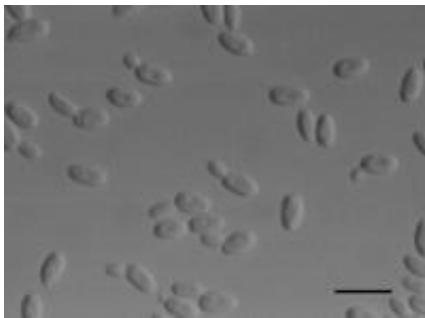
(glukosa) menjadi alkohol dan gas contohnya pada produk roti. Sedangkan oksidatif (respirasi) khamir dapat menghasilkan karbon dioksida dan air. Keduanya bagi khamir dipergunakan untuk energi walaupun energi yang dihasilkan melalui respirasi lebih tinggi dari yang melalui fermentasi (Fardiaz, 1992).

Secara umum, khamir dibagi kedalam dua kelompok utama yaitu:

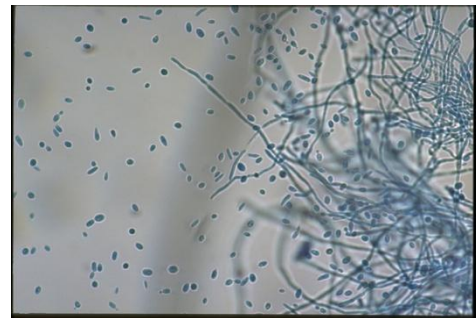
a) Kelompok khamir sejati (True yeasts)

Kelompok khamir sejati pada dasarnya termasuk ke dalam kelas Ascomycetes, dengan ciri selalu berspora. Termasuk ke dalam kelompok ini antara lain adalah berbagai spesies *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Debaryomyces* dan *Hanseniaspora*. Sedangkan pada kelompok jenis khamir sejati ini spesies yang umum digunakan dalam industri adalah *Saccharomyces cerevisiae* yaitu untuk pembuatan roti, minuman beralkohol, gliserol dan enzim invertase. Pada industri alkohol khamir ini termasuk ke golongan yang dapat melakukan fermentasi dengan kuat, dimana terjadi proses oksidasi yang cepat dari sekelompok khamir sehingga letaknya berada mengapung di permukaan. Sedangkan kelompok lain adalah yang terdapat di dasar minuman termasuk golongan fermentasi lambat dan selnya cenderung tidak menggerombol. Khamir yang hidup di dasar banyak digunakan pada industri bir (Balía, 2004).

Beberapa khamir di atas dapat hidup pada lingkungan dengan kadar gula dan garam tinggi serta bersifat osmofilik, khamir dari jenis ini sangat ditakuti karena bisa merusak sirup, madu, kecap dan anggur. Salah satunya adalah jenis *Zygosaccharomyces* sp.. Seringkali di anggap sebagai khamir kontaminan yang sering terdapat dalam fermentasi kecap dan anggur (Balía, 2004). Gambar 1 menunjukkan beberapa spesies khamir sejati :



a. *Asterotremella humicola*



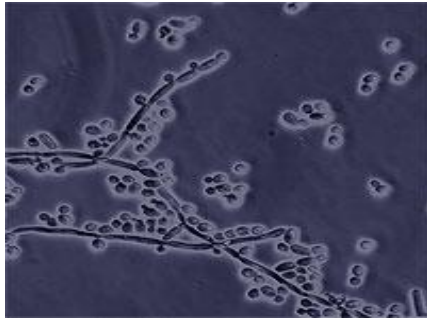
b. *Exophiala dermatitidis*

Gambar 1. (a dan b) Sel Khamir Sejati ( Anonim, 2005)

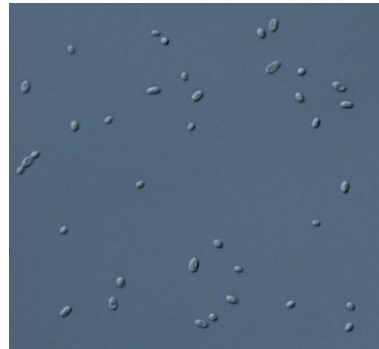
#### b) Kelompok khamir yang liar (Wild yeast)

Kelompok khamir yang dapat tumbuh pada berbagai media seperti contohnya pada industri fermentasi pangan dan minuman dikenal dengan istilah khamir liar (wild yeast). Khamir liar ini pertumbuhannya terkadang ada yang diharapkan dan ada yang tidak diharapkan dalam suatu fermentasi. Kelompok ini tidak mempunyai spora, yang termasuk ke dalam kelompok khamir liar di antaranya ialah *Candida*, *Bullera*, *Sporobolomyces*, *Torulopsis*, *Brettanomyces*,

*Rhodotorula*, *Trichosporon* dan *Kloeckera* (Balia, 2004). Gambar 2 menunjukkan beberapa spesies khamir liar :



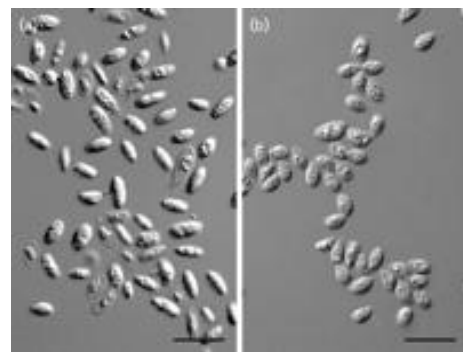
a. *Candida* sp.



b. *Rhodotorula mucilaginosa*



c. *Sporidiobolus ruineniae*



d. *Sporobolomyces bannaensis*



e. *Sporobolomyces poonsookiae*

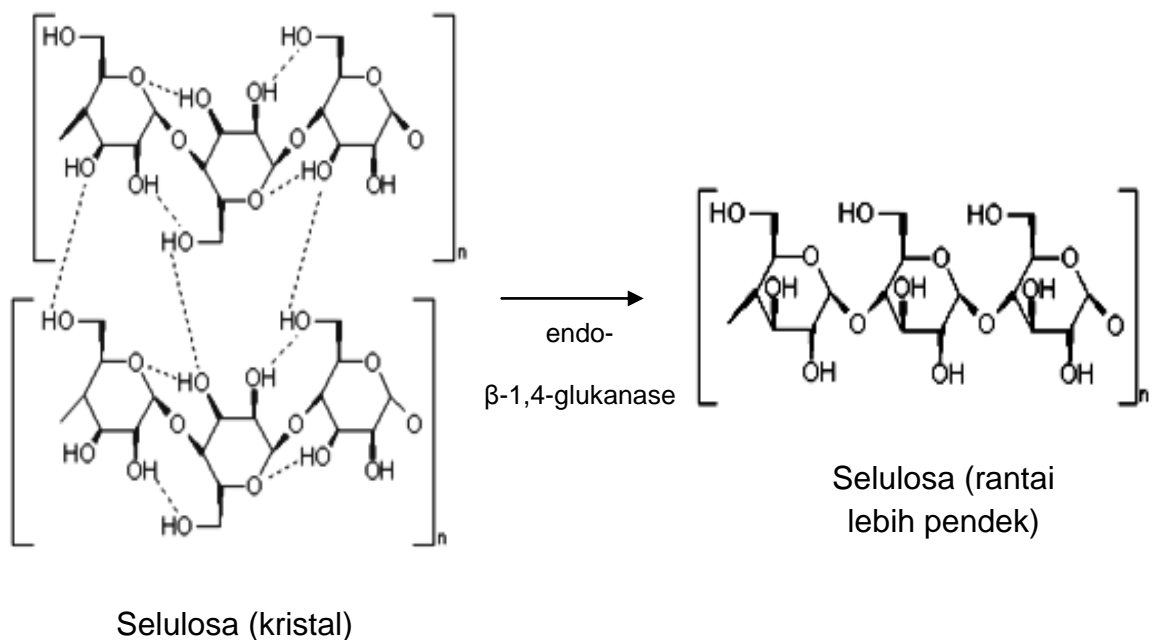
Gambar 2. (a,b,c,d,dan e) Sel Khamir Liar ( Anonim, 2005)



## 2. Enzim Selulase

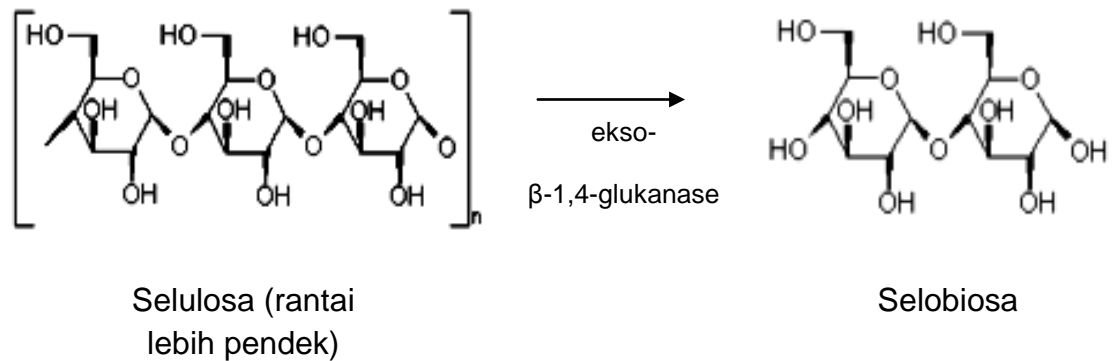
Salah satu enzim yang diisolasi dari mikroorganisme adalah enzim selulase. Enzim selulase adalah enzim yang dapat mendegradasi selulosa. Dan merupakan enzim ekstraseluler, artinya enzim yang diproduksi di dalam sel tetapi dikeluarkan ke media dan beraktivitas di luar sel serta berfungsi untuk menghidrolisis nutrisi yang berada disekitar sel sebagai bahan makanan yang diperlukan oleh mikroorganisme. Enzim selulase bukanlah enzim tunggal, melainkan suatu enzim kompleks yang terdiri dari 3 komponen besar (Kamara dkk.,2007), yaitu:

- a. Enzim endo- $\beta$ -1,4-glukanase atau disebut komponen Cx. Enzim ini mempengaruhi secara serentak ikatan  $\beta$ -1,4 di dalam makromolekul dan menghasilkan potongan-potongan besar berbentuk rantai dengan ujung-ujung bebas. Endoglukanase yang sering disebut karboksimetil selulase (CM)-selulase, berperan dalam memulai serangan acak pada sisi internal daerah amorf dari serat selulosa sehingga sisi yang terbuka dapat diserang oleh ekso- $\beta$ -1,4-glukanase atau selobiohidrolase. Enzim ini dapat memutuskan ikatan selulosa secara random menghasilkan glukosa dan selooligosakarida. Gambar 3 menunjukkan tahap kerja enzim endo- $\beta$ -1,4-glukanase:



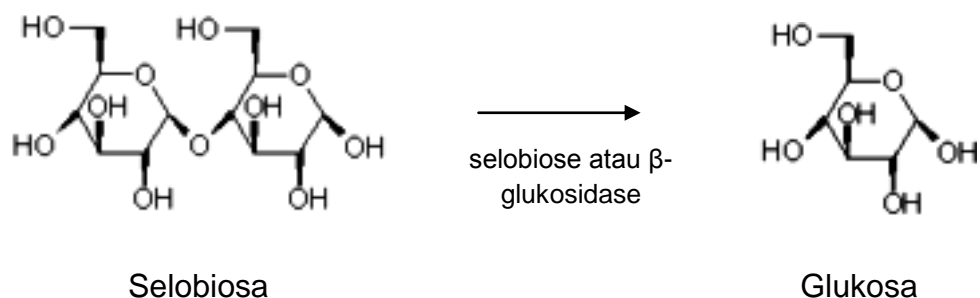
Gambar 3. Tahap kerja enzim endo- $\beta$ 1,4-glukanase

- b. Enzim ekso- $\beta$ -1,4-glukanase atau sering disebut komponen C1. Eksoglukanase memotong ujung-ujung rantai individu selulosa. Ekso-1,4- $\beta$ -glukanase atau selobiohidrolase menyerang bagian luar dari selulosa sehingga dihasilkan selobiosa sebagai struktur utamanya. Ekso-1,4- $\beta$ -glukanase adalah komponen utama dari sistem selulase fungi yakni sekitar 40-70% dari total protein selulase dan mampu menghidrolisis daerah kristalin sehingga menghasilkan selobiosa. Ekso-1,4- $\beta$ -glukanase memisahkan monomer dan dimer dari ujung rantai glukosa. Gambar 4 menunjukkan tahap kerja enzim ekso- $\beta$ -1,4-glukanase:



Gambar 4. Tahap kerja enzim ekso- $\beta$ 1,4-glukanase

- c. Enzim selobiose atau  $\beta$ -glukosidase menghidrolisis selobiosa dengan membentuk glukosa dan mengubah selooligosakarida menjadi glukosa. Gambar 5 menunjukkan tahap kerja enzim selobiose:



Gambar 5. Tahap kerja enzim selobiose

Hidrolisis enzimatik selulosa merupakan proses pemecahan struktur selulosa menjadi satuan-satuan monomernya yaitu glukosa, dengan bantuan enzim. Hidrolisis dengan enzim menghasilkan persentase hasil yang lebih tinggi dibandingkan dengan hidrolisis menggunakan asam. Hidrolisis selulosa secara enzimatik lebih baik

dibandingkan secara kimiawi (menggunakan asam). Hidrolisis menggunakan asam memiliki beberapa permasalahan, yaitu memakan biaya produksi yang besar karena menggunakan bahan kimia yang mahal, menimbulkan masalah korosi dan bersifat kurang ramah lingkungan. Hidrolisis selulosa secara enzimatik memiliki beberapa keuntungan, yakni produk utama yang lebih tinggi, menghasilkan produk samping yang minimal dan kebutuhan energi lebih rendah. Proses enzimatik merupakan proses bersih lingkungan (Gozan, 2007).

### 3. Aktivitas Enzim Selulase

Aktivitas selulolitik dari mikroorganisme ditentukan dengan cara mengukur aktivitas selulase. Terdapat dua cara dalam mengukur aktivitas selulase, yaitu:

#### a) Pengukuran indeks aktivitas selulolitik (IS)

Pengukuran aktivitas selulase dapat dilakukan dengan menghitung indeks aktivitas selulolitik (IS), yakni berdasarkan pengukuran zona bening yang dihasilkan (Kanti, 2005).

$$\frac{\text{Diameter zona bening}}{\text{Diameter koloni khamir}} = IS$$

Diameter koloni khamir

#### b) Pengukuran aktivitas enzim selulase

Pengukuran aktivitas selulase perlu dilakukan untuk mengetahui unit aktivitas selulase. Aktivitas enzim adalah besarnya kemampuan

enzim dalam mempercepat penguraian sumber karbon, dan dinyatakan dalam unit per mL, dimana 1 unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah yang menyebabkan perubahan 1 mikromol sumber karbon atau 1 mikromol produk yang dihasilkan per menit pada kondisi tertentu (Kanti, 2005).

Aktivitas selulase terdiri atas tiga tahap, pertama, adsorpsi enzim selulase pada permukaan selulosa. Kedua, biodegradasi selulosa menjadi glukosa dan ketiga, pelepasan enzim selulase. Kecepatan hidrolisis dari enzim selulase tergantung pada besarnya derajat polimerasi selulosa, yaitu enzim ini bekerja lebih cepat pada oligomer yang lebih panjang (Utari, 1997).

Aktivitas suatu enzim didefinisikan sebagai kecepatan pengurangan substrat atau kecepatan pembentukan produk pada kondisi optimum. Satuannya adalah unit yang menyatakan  $\mu\text{mol}$  produk yang terbentuk tiap satuan waktu. Aktivitas enzim dipengaruhi beberapa faktor, yaitu konsentrasi substrat, pH, dan suhu (Pelczar dan Chan, 1986).

Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim selulase adalah sebagai berikut:

a. Substrat (reaktan)

Kecepatan reaksi enzimatik umumnya dipengaruhi kadar substrat. Penambahan kadar substrat sampai jumlah tertentu dengan jumlah enzim yang tetap, akan mempercepat reaksi

enzimatik sampai mencapai maksimum. Penambahan substrat selanjutnya tidak akan menambah kecepatan reaksi, dimana enzim menjadi jenuh oleh substratnya dan tidak dapat berfungsi lebih cepat.

b. Suhu

Seperti reaksi kimia pada umumnya, maka reaksi enzimatik dipengaruhi oleh suhu. Kenaikan suhu sampai kondisi optimum yaitu kondisi dimana reaksi menghasilkan laju reaksi yang maksimum akan menghasilkan suhu optimum untuk reaksi enzimatik tersebut. Suhu optimum enzim berkisar 37- 40° C. Protein akan mengalami kerusakan (terdenaturasi) pada suhu diatas 50° C dan akibatnya daya kerja enzim akan menurun.

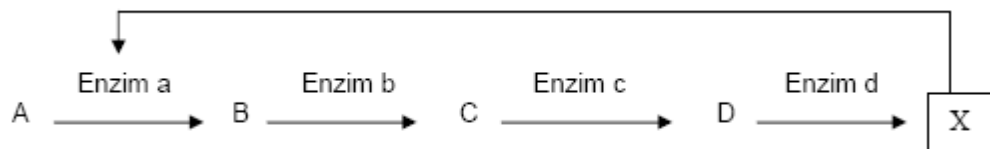
c. Keasaman (pH)

pH dapat mempengaruhi aktivitas enzim. Daya katalisis enzim menjadi rendah pada pH rendah maupun tinggi, karena terjadinya denaturasi protein enzim. Enzim mempunyai gugus aktif yang bermuatan positif (+) dan negatif (-). Aktivitas enzim akan optimum kalau terdapat keseimbangan antara kedua muatannya. Pada keadaan asam muatannya cenderung positif, dan pada keadaan basa muatannya cenderung negatif sehingga aktivitas enzimnya menjadi berkurang atau bahkan menjadi tidak aktif. pH optimum untuk masing-masing enzim tidak selalu sama. Sebagai contoh

amilase jamur mempunyai pH optimum 5,0, dan selulase mempunyai pH optimum 4,8.

d. Inhibisi umpan balik (feed back inhibitor)

Inhibitor enzim adalah zat atau senyawa yang dapat menghambat kerja enzim. Penghambatan/inhibisi umpan balik disebabkan oleh hasil akhir suatu rangkaian reaksi enzimatik yang menghambat aktifitas enzim pada reaksi pertama. Hasil akhir reaksi juga mempengaruhi pembentukan enzim, yang dapat digambarkan sebagai berikut:



Keterangan: A,B,C,D: substrat enzim a,b,c,d

X: hasil akhir reaksi enzimatik yang menghambat sintesis enzim a  
(Sumarsih, 2008)

Pada banyak organisme, inhibitor dapat merupakan bagian dari mekanisme umpan balik. Jika enzim memproduksi terlalu banyak produk, produk tersebut dapat berperan sebagai inhibitor bagi enzim tersebut. Hal ini akan menyebabkan produksi produk melambat atau berhenti. Sebagai contoh, inhibisi umpan balik yang terjadi pada hidrolisis selulosa dengan enzim kompleks selulase. Selulosa secara lemah dihambat oleh glukosa dan secara kuat dihambat oleh

selobiosa, akumulasi glukosa menghambat  $\beta$ -glukosidase, akibatnya terjadi akumulasi selobiosa yang akhirnya menghambat selulase sehingga mempengaruhi hidrolisis selulosa (Hisar, 2003).

Kondisi aktivitas enzim selulase tercapai pada suhu kisaran 35-80°C dan pH sekitar 3,6-9,0. Prinsip uji aktivitas enzim selulase adalah menentukan jumlah gugus pereduksi glukosa, sebagai hasil dari hidrolisis selulosa. Menurut Miller (1959), metode pengujian aktivitas enzim selulase antara lain dengan metode DNS (asam 3-5-dinitrosalisilat) yang berfungsi untuk memberikan warna pada senyawa sehingga dapat diukur serapannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

#### **4. Fermentasi dan Pembentukan Etanol**

Fermentasi adalah proses produksi energi dalam sel pada keadaan anaerobik (tanpa oksigen). Secara umum, fermentasi adalah salah satu bentuk respirasi anaerobik, akan tetapi, terdapat definisi yang lebih jelas yang mendefinisikan fermentasi sebagai respirasi dalam lingkungan anaerobik dengan tanpa akseptor elektron eksternal.

Khamir merupakan salah satu kelompok mikroorganisme yang banyak diteliti berkaitan dengan kemampuannya memfermentasi gula. Kemampuan khamir memfermentasi gula ditentukan oleh adanya sistem transport untuk gula dan sistem enzim yang dapat menghidrolisis gula dengan akseptor elektron alternatif selain oksigen,

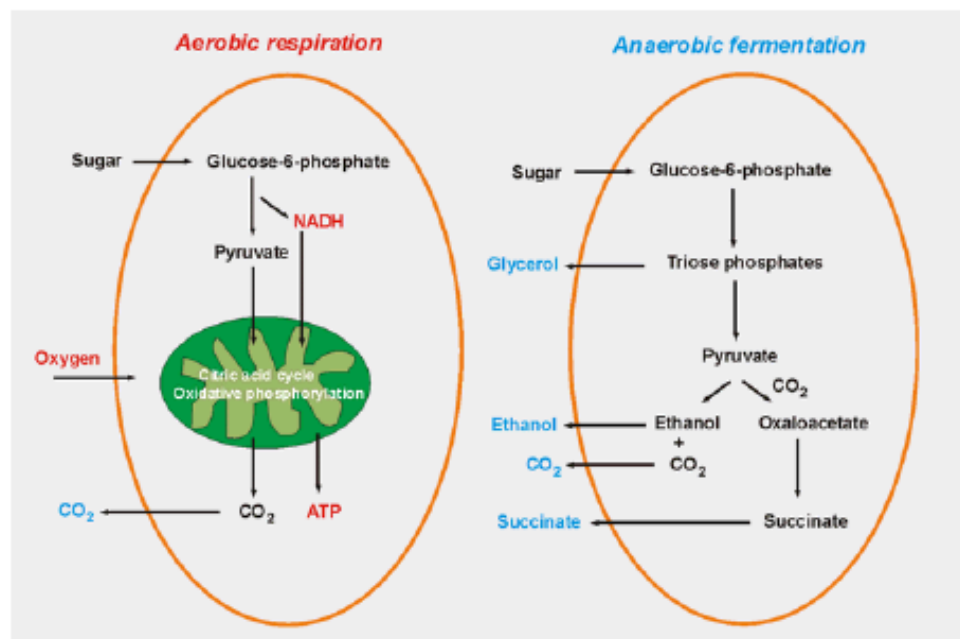


pada kondisi anaerob fakultatif (Gandjar et al., 2006). Glukosa merupakan sumber utama untuk pembentukan energi bagi khamir. Sedangkan glikolisis menjadi jalur yang paling umum dalam merubah glukosa menjadi piruvat yang kemudian diubah menjadi energi (Feldmann, 2007).

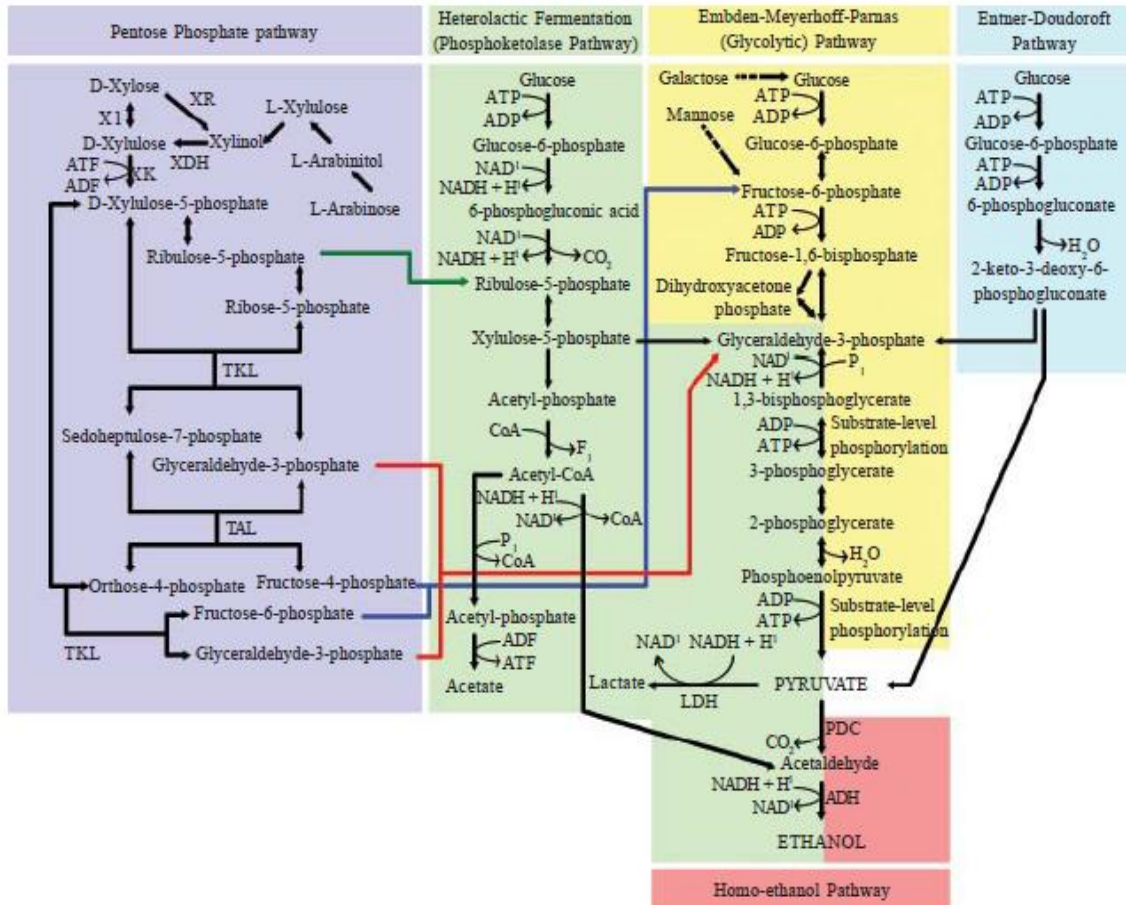
Di dalam sel organisme, gula yang dapat difermentasi akan diubah menjadi senyawa antara (intermediate) umum, piruvat, melalui tiga siklus utama, yaitu Embden- Meyerhoff-Parnas (EMP), Entner-Doudoroff (ED), dan siklus pentosa fosfat. Siklus Embden- Meyerhoff-Parnas (EMP) (atau lebih terkenal dengan nama glikolisis) merupakan siklus yang paling umum digunakan oleh khamir dan banyak bakteri. Siklus ini dapat bekerja dibawah kondisi anaerobik atau aerobik serta terdiri dari rangkaian reaksi 10 enzim katalis yang terdapat dalam matriks sitoplasma. Tiga enzim regulator dalam siklus ini (heksokinase, fosfofruktokinase, dan piruvat kinase) bekerja secara ireversibel sementara tahapan lainnya bekerja secara reversible, yang penting untuk peran biosintesis siklus sepanjang sintesis glukosa (Riyanti, 2009).

Tahapan awal dari pemecahan glukosa sebenarnya membutuhkan 2 molekul ATP untuk digunakan dalam 3 tahapan pembentukan fruktosa1,6-bifosfat. Molekul ini kemudian bergantung kepada kerja aldolase untuk membentuk 2 triosa ( $C_3$ ) fosfat yang berbeda, yaitu gliseraldehid-3-fosfat (GAP) dan dihidroksiaseton fosfat

(DAP). Hanya gliseraldehid-3-fosfat (GAP) yang dapat langsung diproses dalam siklus ini sementara dihidroksiaseton fosfat (DAP) harus diisomerisasi terlebih dahulu menjadi gliseraldehid-3-fosfat (GAP) sebelum dapat digunakan. Oksidasi 2 molekul gliseraldehid-3-fosfat (GAP) menjadi piruvat menghasilkan energi dalam bentuk 4 molekul ATP melalui 2 reaksi fosforilasi substrat. Namun untuk masing-masing molekul glukosa yang dioksidasi menjadi 2 molekul piruvat, hasil bersihnya hanya 2 molekul ATP, merujuk pada konsumsi ATP di awal reaksi. Selanjutnya piruvat yang dihasilkan akan di dekarboksilasi menjadi asetaldehida menggunakan piruvat dekarboksilase (PDC). Kemudian akan mengalami proses dehidrogenasi menjadi etanol oleh alkohol dehidrogenase. Gambar 6 menunjukkan metabolisme khamir pada kondisi aerobik dan anaerobik :



Gambar 6. Metabolisme khamir pada kondisi aerobik dan anaerobik (Feldmann, 2007)



Gambar 7. Siklus metabolisme etanol (Prescott et al., 2002)

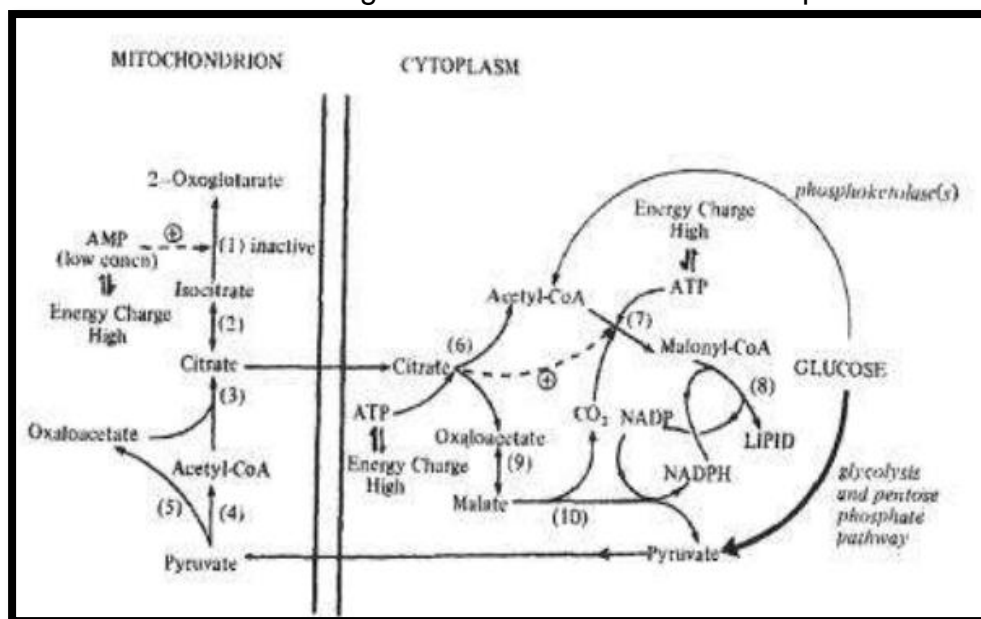
Selama fermentasi alkohol dari gula, khamir mengoksidasi kembali NADH menjadi NAD dalam dua tahapan reaksi dari piruvat, pertama tahap dekarboksilasi oleh piruvat dekarboksilase diikuti oleh reduksi asetaldehid, yang dikatalis oleh alkohol dehidrogenase (ADH) (Feldmann, 2007). Fermentasi alkohol adalah suatu proses feedback inhibition. Sel-sel khamir dibatasi oleh toleransi terhadap etanol, suhu dan tekanan osmotik dalam media fermentasi. Ketika etanol

terakumulasi cukup banyak di dalam media, maka pertumbuhan sel khamir akan terhambat, sehingga sel akhirnya mati. Meningkatnya konsentrasi etanol di dalam media juga menyebabkan struktur membran sel berubah. Toksisitas terhadap etanol mempengaruhi sel melalui perubahan pada membran fosfolipid dan melemahkan struktur membran. Hal tersebut akan mengakibatkan isi sel merembes keluar dan kemampuan fermentasi sel menjadi rusak (Gandjar et al., 2006).

### **5. Proses Sintesis Lipid di *Oleaginous Yeast***

Khamir pensintesis lipid atau *Oleaginous Yeast* merupakan salah satu tipe khamir yang dapat menghasilkan lipid pada kondisi kultivasi tertentu seperti C/N rasio, sumber nitrogen, temperatur, pH, oksigen dan konsentrasi garam anorganik. Jumlah Nitrogen yang berlebihan di dalam media, menyebabkan jumlah sel khamir menurun. Hal ini telah dilaporkan bahwa ketika C/N rasio dinaikkan dari 25 menjadi 70, kandungan minyak/lipid meningkat dari 18% menjadi 40%. Penggunaan media Nitrogen Limited menyebabkan ATP yang berfungsi sebagai sumber energi untuk metabolisme tidak bisa memisah membentuk AMP dan ADP. Padahal AMP berfungsi untuk mengaktifkan enzim NAD-IDH yang berfungsi sebagai katalis untuk mengubah isositrat menjadi 2-Oksoglutarat yang digunakan dalam siklus glioksilat untuk memperbanyak jumlah sel atau biomassa.

Dengan adanya glukosa dengan jumlah berlebih dan nitrogen dalam jumlah yang terbatas, menyebabkan siklus glikolisis yang terjadi terus menerus selama tersedianya glukosa akan menghasilkan ATP dalam jumlah besar dan karena terbatasnya nitrogen, ATP dalam jumlah besar yang dihasilkan dari proses glikolisis tersebut, hanya bisa diubah menjadi AMP dalam jumlah kecil dan tidak cukup untuk mengaktifkan enzim NAD-IDH yang merupakan katalis untuk merubah isositrat menjadi 2-oksoglutarat. Isositrat yang tidak bisa berubah menjadi 2-oksoglutarat berubah kembali menjadi sitrat dan keluar kembali ke sitoplasma, dan berubah jadi oksaloasetat dan asetil-KoA dengan bantuan enzim ATP (yaitu sitrat lyase). Asetil-KoA yang dihasilkan dari sitrat ini, bersama-sama dengan enzim asetil-KoA karboksilase dan  $\text{CO}_2$  menghasilkan malonil-KoA. Kemudian malonil-KoA bersama-sama dengan NADPH memulai sintesis lipid.



Gambar 8. Jalur Perubahan Glukosa menjadi Lipid pada *Oleaginous Yeast* (Athanasios et al., 2008)

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Tujuan Operasional**

Tujuan operasional dari penelitian ini adalah:

1. Menguji kemampuan selulolitik dan kemampuan pensintesis lipid beberapa jenis khamir.
2. Mengukur indeks zona bening dari khamir yang dapat menghidrolisis selulosa dan menyeleksi khamir selulolitik.
3. Mengetahui karakterisasi khamir selulolitik, meliputi pengukuran biomassa dan aktivitas enzim selulase.
4. Mengetahui nilai total lipid yang dihasilkan oleh *Oleaginous Yeast*.
5. Mengetahui kadar etanol yang diperoleh dan identifikasi lipid yang dihasilkan.

#### **B. Tempat dan Waktu**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fisiologi Mikroba Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi LIPI, Cibinong Science Center dimulai pada bulan Oktober - Desember 2010.

### **C. Metode Penelitian**

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen yang meliputi:

1. Pengukuran aktivitas enzim selulase dengan metode DNS, Miller.
2. Pengukuran total lipid dengan metode Suddan Black.
3. Pengukuran kadar etanol dengan analisis GC.
4. Identifikasi lipid dengan metode GC-MS.

### **D. Prosedur Penelitian**

#### **1. Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan adalah botol sampel, microtube, Eppendorf 1,5 mL, sentrifuse H-15 FR kokusan, mikropipet 1000 $\mu$ L, Laminar Air Flow sanyo Bioclean bench, Alat pemanas, kuvet, spektrofotometer Genesis 20, bioshaker incubator BR-300 LF, bioshaker BR-23 LF, gunting, tabung reaksi 100mL, tabung reaksi bertutup 10 mL iwaki, rak tabung reaksi, pH meter AB 15, alat vorteks SHIBASTA TTM-1, hot air rapid drying, Hot plate IKA RH Basic 2, gelas kimia 100mL pyrex, botol aquadest, lemari es, panci, autoclave tomy SX-500, inkubator sanyo, oven, cawan petri, spatula, labu erlenmeyer 250mL pyrex, gelas ukur 100mL, mikroskop olympus, kamera digital canon seri A480, Gas Kromatografi Nite, stopwatch DT20-501Y, neraca Sartorius, pipet tetes dan botol pembilas Nalgene.

Bahan yang digunakan adalah isolat hasil isolasi dari pohon pada Hutan Lindung Papalia dan Mekongga, Sulawesi Tenggara, aquadest Indigo, CMC BD Company, yeast ekstrak BD Company, glukosa PD. Frisconina, xylosa Pfanstiehl Chemical CO., gliserol Carlo Erba reagents, peptone Bacteriological USB, DNS Sigma, alkohol 70%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  Merck,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  Merck,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  Merck, agar C.V Prima Darmala,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  Merck,  $\text{MnSO}_4$  Merck, etil asetat, kapas Koperasi LIPI CSC, tisu Trendy, Nile Blue Trade Marck, metanol, korek Hunter, aluminium foil Total Wrap, label nama Tom & Jerry, karet, plastic wrap Klin Pak, spidol Snowman dan plastik tahan panas Cap Bison.

## **2. Cara Kerja**

### **a. Pembuatan Media dan Reagen**

#### **1) Pembuatan Media *CarboxyMethylCellulosa* (CMC)**

Sebanyak 2,5g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,25g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,005g  $\text{FeCl}_3$ , 0,25g yeast extract, dan 5g CMC ditimbang. Bahan-bahan tersebut dimasukkan ke dalam gelas kimia 500 mL yang berisi 500 mL aquadest sambil diaduk dengan magnetic stirrer dan dipanaskan, lalu disterilkan di autoclave dengan suhu  $121^\circ\text{C}$  selama  $\pm$  30 menit. Derajat pH diatur dengan penambahan larutan HCl atau NaOH hingga pH 7. Untuk media padat ditambah 7,5g agar serbuk.



**2) Pembuatan Media Yeast Peptone Dextrose (YPD) Padat**

Dilarutkan 5g yeast ekstrak, 10g pepton, dan 10g agar dalam 450mL aquadest dan diatur pH-nya 5,8-6,0 kemudian disterilkan di autoclave dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama  $\pm 30$  menit, setelah itu ditambahkan dengan 50mL larutan glukosa 40% yang telah disterilkan (media YPD cair 500mL).

**3) Pembuatan Media Cair YPD Nitrogen-Limited**

Dilarutkan 50g Glukosa, 4g media yeast ekstrak, 1,5g pepton dalam 500 mL aquadest, kemudian distirrer sambil dipanaskan, pH diatur menjadi 5 dengan menambahkan NaOH atau HCl. Media yang sudah siap lalu disterilkan di autoclave dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama  $\pm 30$  menit.

**4) Pembuatan Media Cair Gliserol Nitrogen-Limited**

Dilarutkan 10mL Gliserol, 1,6g media yeast ekstrak, 0,6g pepton dalam 200 mL aquadest, kemudian distirrer sambil dipanaskan, pH diatur menjadi 7 dengan menambahkan NaOH atau HCl. Media yang sudah siap lalu disterilkan di autoclave dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama  $\pm 30$  menit.

**5) Pembuatan Media Cair Xylosa Nitrogen-Limited**

Dilarutkan 10g Xylosa, 1,6g media yeast ekstrak, 0,6g pepton dalam 200 mL aquadest, kemudian distirrer sambil dipanaskan, pH diatur menjadi 5 dengan menambahkan NaOH atau HCl. Media yang

sudah siap lalu disterilkan di autoclave dengan suhu 121°C selama  $\pm$ 30 menit.

**6) Pembuatan Reagen Nile Blue**

Dilartkan 0,01g bubuk Nile Blue dalam 10 mL metanol, kemudian distirrer sampai larut sempurna.

**7) Pembuatan Reagen Dinitro Salisilat (DNS)**

Dilartkan 1g DNS dan 2g NaOH di dalam 100mL aquadest di atas pengaduk magnetik.

**8) Pembuatan Larutan *congo red* (0,2 %)**

Larutan congo red merupakan reagen yang digunakan untuk melakukan penguji aktivitas selulolitik dari mikroorganisme. Pembuatan larutan ini dilakukan dengan memasukkan sebanyak 0,2g congo red ke dalam gelas beker dan selanjutnya menambahkan aquades steril sebanyak 100 mL dan kemudian ditutup

**9) Larutan NaCl Fisiologis (0,85 %)**

Pembuatan larutan ini dilakukan dengan cara: memasukkan sebanyak 0,85g NaCl ke dalam akuades sebanyak 100 mL. Kemudian larutan disterilisasi dengan menggunakan autoclave pada suhu 121° C selama 15-20 menit.

**10) Pembuatan standar glukosa**

Glukosa ditimbang sebanyak 0,1g dan dilarutkan dalam aquades 200 mL, maka didapatkan larutan dengan konsentrasi 500

ppm. Selanjutnya dibuat pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi 100, 200, 300 dan 400 ppm.

#### 11) Larutan CMC 1%

Larutan ini digunakan sebagai substrat dalam pengukuran aktivitas enzim selulase. Larutan dibuat dengan memasukkan 1g CMC dalam 100 mL akuades yang telah dipanaskan, kemudian diaduk menggunakan stirrer secara terus menerus hingga larut.

#### 12) Pembuatan Standar Etanol

Etanol 96% diencerkan sehingga didapat konsentrasi etanol 1%, 5% dan 10%.

#### b. Pemilihan Isolat

Isolat didapatkan dari LIPI Microbiology Culture Collection (LIPIMC) yang telah teridentifikasi. Isolat ini diisolasi dari pohon di Hutan Lindung Papalia dan Mekongga, Sulawesi Tenggara. Isolat yang digunakan di antaranya adalah:

No.	Kode Isolat	Nama Isolat
1.	P.L.4.W.6	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>
2.	P.L.3.W.8	<i>Candida intermedia</i>
3.	P.L.3.W.4	<i>Debaryomyces vanrijae var.yarrowii</i>
4.	P.L.3.W.5	<i>Candida insectorum</i>
5.	P.L.3.DP.5	<i>Sporobolomyces poonsookiae</i>
6.	P.L.4.W.7	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>

7.	P.L.1.W.2	<i>Exophiala dermatitidis</i>
8.	P.L.3.DP.7	<i>Cryptococcus flavescens</i>
9.	P.L.3.DP.9	<i>Asterotremella humicola</i>
10.	P.L.3.W.10	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>
11.	P.L.3.W.2	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>
12.	P.L.3.W.11	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>
13.	P.L.1.W.9	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
14.	P.L.3.DP.8	<i>Cryptococcus laurentii</i>
15.	P.L.3.DP.2	<i>Cryptococcus flavescens</i>
16.	P.L.3.DP.6	<i>Cryptococcus flavescens</i>
17.	P.L.5.W.1	<i>Candida sp.</i>
18.	P.L.1.F.2	<i>Asterotremella humicola</i>
19.	P.L.3.F.1	<i>Candida parapsilosis</i>
20.	P.L.3.DP.1	<i>Debaryomyces vanrijae var.yarrowii</i>
21.	P.Le.6.DP.6	<i>Candida intermedia</i>
22.	P.Le.3.W.4	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>
23.	P.Le.3.W.2	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>
24.	P.Le.5.W.1	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>
25.	P.Le.4.V.2	<i>Sporobolomyces bannaensis</i>
26.	MK.S.10.W.2	<i>Candida pseudointermedia</i>
27.	MK.L.6.DP.2	<i>Pichia sp.</i>
28.	MK.L.5.W.1	<i>Candida intermedia</i>

29.	MK.L.5.W.2	<i>Candida lesepsii</i>
30.	MK.L.8.W.2	<i>Pichia sp.</i>

### c. Pengujian Kemampuan Selulolitik

Untuk pengujian kemampuan selulolitik khamir digunakan media CMC (Carboxymethyl cellulose). Media CMC yang digunakan untuk pengujian kemampuan selulolitik ada dua macam, yaitu: media padat dan cair. Media padat untuk uji zona bening, sedangkan media cair digunakan untuk kultivasi dan analisis pertumbuhan sel, serta uji aktivitas enzim.

Biakan khamir dipindahkan ke dalam media CMC padat menggunakan metode totol (dimana dalam satu cawan petri digunakan untuk 3 jenis isolat), dan diinkubasi pada temperatur ruang selama 4 hari. Setelah itu dilakukan pengujian ada atau tidaknya zona bening yang terbentuk pada media CMC. Hal ini dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya aktivitas enzim dari khamir. Pengujian zona bening dilakukan dengan menggunakan larutan congo red 0,2% sebagai larutan penguji dan NaCl 0,85% sebagai larutan pencuci. Sebanyak 2mL larutan congo red dituangkan ke dalam media yang berisi isolat, kemudian dibiarkan selama 1 hari. Larutan dibuang kemudian dibilas dengan larutan NaCl 0,85%. Selanjutnya, dilakukan pengukuran indeks selulolitik (IS) yang dihasilkan oleh khamir. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan jangka sorong.

Data yang diperoleh dari pengukuran diameter zona bening dan diameter koloni khamir, selanjutnya dimasukkan ke dalam rumus Indeks Selulolitik:

$$\frac{\text{Diameter zona bening}}{\text{Diameter koloni khamir}} = \text{IS}$$

Diameter koloni khamir

Dari hasil pengujian kemampuan selulolitik diambil lima isolat yang memiliki nilai Indeks Selulolitik paling tinggi. Selanjutnya isolat dalam bentuk slan atau dalam media miring dipindahkan ke media YPD (Yeast Peptone Dextrose) padat secara aseptis untuk digunakan pada proses selanjutnya.

#### **d. Pembuatan Media Pertumbuhan**

Isolat-isolat khamir dalam media YPD padat secara aseptis dan di inokulasikan ke dalam 5mL media cair CMC, YPD Nitrogen-Limited, gliserol Nitrogen-Limited, dan xylosa Nitrogen-Limited. Isolat-isolat kemudian diinkubasi pada temperatur ruang selama 3 hari. Pertumbuhan khamir ditandai dengan adanya perubahan warna media yang menjadi keruh, setelah tumbuh isolat khamir dapat dipindahkan ke dalam media uji.

#### **e. Pembuatan Media Pengujian**

Masing–masing sebanyak 5mL media cair CMC, YPD Nitrogen-Limited, gliserol Nitrogen-Limited, dan xylosa Nitrogen-Limited yang mengandung isolat di pindahkan ke dalam 50mL media cair CMC, YPD Nitrogen-Limited, gliserol Nitrogen-Limited, dan xylosa Nitrogen-

Limited dalam tabung reaksi 100mL. Tabung-tabung reaksi ini kemudian diinkubasi dalam bioshaker pada temperatur ruang.

#### **f. Parameter Karakteristik Enzim Selulolitik yang Diamati**

Parameter yang diamati untuk mengetahui karakteristik enzim selulase meliputi pengukuran biomassa (jumlah sel khamir) dan aktivitas enzim yang dinyatakan dalam unit, yaitu: jumlah mikromol gula pereduksi yang terbentuk/mL enzim/menit.

#### **g. Pengukuran Biomassa**

Khamir diukur biomasanya berdasarkan metode kerapatan optik (optical density) dengan spektrofotometer (Spectronic, Genesis 20) pada panjang gelombang 600nm. Hal ini dilakukan setiap pengambilan sampel biomasa khamir.

#### **h. Pengukuran Aktivitas Enzim Selulolitik**

Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan menggunakan metode DNS (Kanti, 2005; Miller 1976). Metode DNS merupakan metode umum yang digunakan dalam pengujian gula reduksi dan aktivitas enzim selulase.

Sebelum mengukur aktivitas enzim terlebih dahulu dibuat substrat CMC 1%, pereaksi DNS, dan kurva standar. Untuk membuat kurva standar terlebih dahulu dibuat larutan glukosa dengan konsentrasi 0-500 ppm. Setelah itu, diambil 500 $\mu$ L dari setiap konsentrasi dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi tertutup, ditambah 200 $\mu$ L DNS kemudian dipanaskan dalam air mendidih

selama 7 menit. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540nm.

Penentuan aktivitas enzim selulase dilakukan dengan cara, biomassa khamir dipipet sebanyak 1-1,5mL dari media pengujian ke dalam tabung eppendorf kemudian disentrifuge pada kecepatan 6000 rpm selama 5 menit pada suhu 4<sup>0</sup>C, setelah itu supernatannya dipipet sebanyak 500μL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup. Tabung-tabung ini kemudian ditambahkan 500μL substrat CMC 1% kemudian divorteks agar merata selanjutnya diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C. Setelah itu ditambah 200μL DNS dan dipanaskan selama 7 menit pada air mendidih. Setiap larutan pada tabung diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540nm. Perlakuan untuk blangko sama dengan gula reduksi, namun sampel diganti dengan aquadest. Satu unit aktivitas enzim adalah jumlah mikromol glukosa yang dihasilkan 1mL enzim selulase setiap menit (Kanti, 2005).

#### **i. Pengukuran Total Lipid Produksi**

Pengukuran total lipid produksi dilakukan dengan menggunakan metoda Nile Blue. 1 mL sampel diambil dari media pengujian, lalu ditambahkan 20μL reagen Nile Blue, lalu divortex, kemudian diinkubasi dalam suhu 37<sup>0</sup>C selama 60 menit. Setelah diinkubasi, diukur absorbansinya dengan menggunakan Spektrofotometer UV/Vis pada panjang gelombang 626 nm. Setelah



itu, sampel disentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 7500 rpm, dan suhu 4°C. Kemudian diukur kembali absorbansinya pada panjang gelombang 626 nm. Total lipid produksi dapat dihitung dengan cara :

$$\text{Total lipid} = A \text{ tanpa sentrifuge} - A \text{ setelah sentrifuge}$$

#### **j. Uji Pembentukan Etanol**

Sebanyak 1mL biomassa khamir dipipet ke dalam tabung eppendorf steril kemudian disentrifuge pada kecepatan 6000 rpm selama 25 menit pada suhu 4°C, setelah itu supernatannya dipipet sebanyak 500µL dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf yang ditambahkan dengan 500µL etil asetat. Tabung eppendorf kemudian divortex dan disentrifuge pada kecepatan 6000 rpm selama 25 menit pada suhu 4°C, supernatan yang diperoleh diukur kadar etanolnya dengan Gas Chromatography (GC).

Pengujian etanol dilakukan setelah sepuluh hari dari waktu inokulasi isolat khamir ke dalam media uji. Dimana lima hari pertama isolat diinkubasi dalam bioshaker, sedangkan lima hari berikutnya isolat diinkubasi tanpa digoyang. Lima hari pertama merupakan tahapan hidrólisis substrat selulosa, sedangkan lima hari berikutnya merupakan proses fermentasi.

#### **k. Identifikasi Lipid**

Terdapat lima tahap dalam persiapan ekstrak/sampel untuk analisis GC-MS, yaitu:

1. Pemanenan khamir

Isolat khamir yang memiliki nilai total lipid tinggi diambil 4 mm loop dan dimasukkan kedalam tabung reaksi kecil bertutup.

2. Saponifikasi

Menambahkan 1mL reagen 1(45g NaOH + 150mL metanol + 150mL aquadest), kemudian di vorteks selama 10 detik. Selanjutnya dipanaskan pada suhu 100<sup>0</sup>C selama 5 menit, lalu di vorteks kembali selama 10 detik dan dipanaskan kembali pada suhu 100<sup>0</sup>C selama 25 menit.

3. Metilasi

Menambahkan 2mL reagen 2(325mL HCl + 275mL metil alkohol), kemudian divorteks selama 10 detik dan dipanaskan selama 10 menit pada suhu 80<sup>0</sup>C.

4. Ekstraksi

Menambahkan 1,25mL reagen 3 (200mL heksana + 200mL methyltert-butyl eter) terbentuk dua lapisan, kemudian tabung reaksi dibolak-balik selama 10 menit. Selanjutnya lapisan bawah dipipet/dibuang.

5. Pencucian sampel

Menambahkan 3mL reagen 4 (10,8g NaOH dilarutkan dalam 900mL aquadest), kemudian tabung reaksi dibolak-balik

selama 5 menit dan terbentuk 2 lapisan. Selanjutnya memipet 2/3 lapisan atas untuk analisis GC-MS.

#### **E. Tehnik Pengumpulan Data**

Teknik pengumpulan data yang dilakukan yaitu: menyeleksi spesies khamir yang mempunyai kemampuan selulolitik penghasil enzim selulase dan sebagai *Oleaginous Yeast*, uji karakterisasi dari khamir selulolitik dan uji nilai total lipid, uji kadar etanol dan identifikasi lipid.

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **1. Penentuan Isolat Khamir Terbaik**

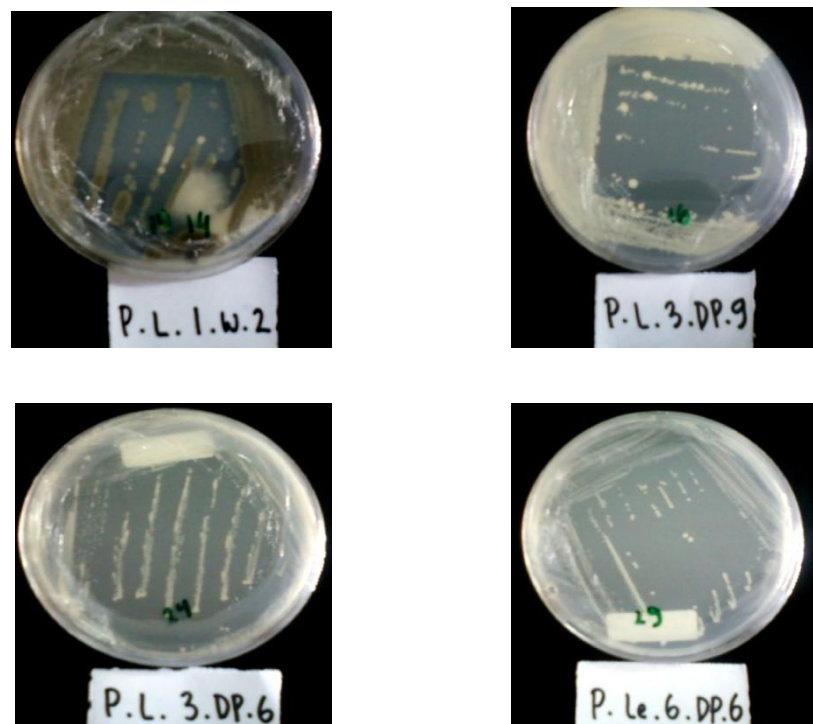
##### **a. Isolat Khamir**

Penentuan isolat khamir terbaik bertujuan untuk mendapatkan isolat khamir penghasil enzim selulase terbesar. Isolat khamir didapatkan dari biakan koleksi LIPI Microbiology Culture Collection (LIPIMC) yang merupakan hasil isolasi dari pohon di Hutan Lindung Papalia dan Mekongga, Sulawesi Tenggara. Tiga puluh isolat yang digunakan mempunyai kode yang berbeda-beda. Kode P dan MK menunjukkan tempat diperolehnya khamir yaitu Papalia dan Mekongga, kode L; Le; dan S menunjukkan sumber diperolehnya khamir yaitu L berarti Leaf Liter (seresah); Le berarti Leaf (daun); dan S berarti Soil (tanah), nomor setelah kode sumber isolat menunjukkan urutan pohon atau tanah diambilnya isolat, kode W; DP; V; dan F menunjukkan metode yang digunakan untuk mengisolasi khamir yaitu W berarti Washing (Whirl Pack); DP berarti Direct Inoculation; V berarti Ballitospore Falling; dan F berarti Micro-filtration, dan nomor pada bagian terakhir menunjukkan nomor isolat yang ditentukan berdasarkan urutan isolat diperoleh ketika melakukan isolasi.

Tiga puluh isolat yang digunakan diremajakan pada media Yeast Peptone Dextrose (YPD) padat. Berdasarkan hasil pengamatan,

seluruh isolat khamir dapat tumbuh pada media Yeast Peptone Dextrose (YPD) padat dengan waktu inkubasi 4 hari pada suhu 28°C. Yeast Peptone Dextrose (YPD) merupakan media umum untuk pertumbuhan khamir karena pada media Yeast Peptone Dextrose (YPD) mengandung glukosa yang sangat diperlukan oleh sel khamir untuk dapat tumbuh. Adanya glukosa dalam media akan menyebabkan pertumbuhan biomassa yang lebih cepat (Kanti, 2007). Hal ini dikarenakan glukosa dapat diabsorpsi langsung oleh sel dan digunakan untuk pertumbuhan biomassa.

Gambar 9 menunjukkan koloni isolat khamir P.L.1.W.2, P.L.3.DP.9, P.L.3.DP.6, dan P.Le.6.DP.6:



Gambar 9. Koloni Isolat Khamir khamir P.L.1.W.2, P.L.3.DP.9, P.L.3.DP.6, dan P.Le.6.DP.6

Peremajaan khamir dilakukan dengan menggunakan metode cawan gores (Streak plate). Metode cawan gores (Streak plate) adalah metode isolasi yang dilakukan dengan cara menggoreskan ose atau kawat yang berbentuk loop dibagian ujung pada permukaan media padat. Tujuan dari teknik ini yaitu agar diperoleh koloni-koloni tunggal yang terpisah dengan sempurna (Hadioetomo, 1985).

#### **b. Pengujian Kemampuan Selulolitik**

Uji kemampuan selulolitik dilakukan untuk mendapatkan isolat khamir yang dapat menghasilkan enzim ekstraseluler (enzim selulase). Pengujian kemampuan selulolitik dilakukan dengan mengukur Indeks Selulolitik (IS). Indeks Selulolitik merupakan hasil bagi antara diameter zona bening dengan diameter koloni khamir. Hasil uji menunjukkan adanya isolat khamir yang dapat menghasilkan enzim selulase, hal ini ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni setelah ditambahkan dengan larutan congo red. Zona bening yang terbentuk dikarenakan khamir melepaskan enzim selulase yang merupakan enzim ekstraseluler ke media sekitarnya.

Berdasarkan hasil pengamatan diketahui terdapat khamir yang memiliki kemampuan selulolitik dan yang tidak memiliki kemampuan selulolitik. Adapun data nilai Indeks Selulolitik (IS) secara lebih jelas dapat dilihat pada tabel 1, sebagai berikut:

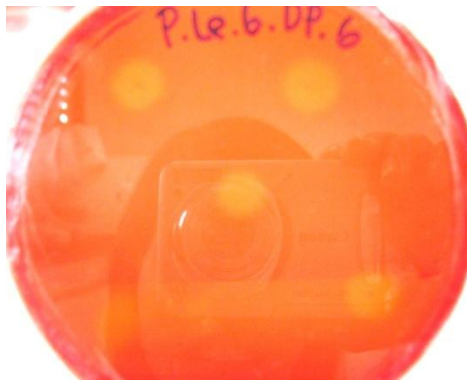
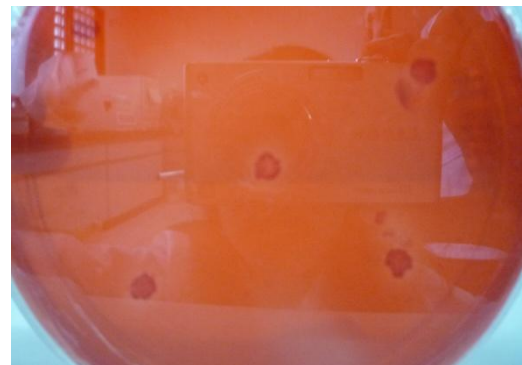
Tabel 1. Indeks Selulolitik Khamir Penghasil Enzim Selulase

Kode Isolat	Nama Isolat	Diameter Zona bening (mm)	Diameter Koloni (mm)	Indeks Selulolitik
P.L.4.W.6	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	2,0	1,7	1,17
P.L.3.W.8	<i>Candida intermedia</i>	-	-	Tidak ada zona bening
P.L.3.W.4	<i>Debaryomyces vanriijiae</i> <i>var. yarrowii</i>	-	-	Tidak ada zona bening
P.L.3.W.5	<i>Candida insectorum</i>	-	-	Tidak ada zona bening
P.L.3.DP.5	<i>Sporobolomyces poonsookiae</i>	-	-	Tidak ada zona bening
P.L.4.W.7	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	2,0	1,7	1,17
P.L.1.W.2	<i>Exophiala dermatitidis</i>	6,5	2,0	3,25
P.L.3.DP.7	<i>Cryptococcus flavescens</i>	3,0	2,0	1,5
P.L.3.DP.9	<i>Asterotremella humicola</i>	4,0	2,4	1,66
P.L.3.W.10	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	2,0	1,7	1,17
P.L.3.W.2	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	2,0	1,7	1,17
P.L.3.W.11	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	3,5	2,5	1,4
P.L.1.W.9	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	3,0	2,0	1,5
P.L.3.DP.8	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	Tidak ada zona bening
P.L.3.DP.2	<i>Cryptococcus flavescens</i>	4,5	3,0	1,5
P.L.3.DP.6	<i>Cryptococcus flavescens</i>	4,0	2,5	1,6
P.L.5.W.1	<i>Candida</i> sp.	-	-	Tidak ada zona bening
P.L.1.F.2	<i>Asterotremella humicola</i>	6,0	4,0	1,5
P.L.3.F.1	<i>Candida parapsilosis</i>	-	-	Tidak ada zona bening
P.L.3.DP.1	<i>Debaryomyces</i>	-	-	Tidak ada zona

	<i>vanriijae</i> <i>var. yarrowii</i>			bening
P.Le.6.DP.6	<i>Candida</i> <i>intermedia</i>	11,0	2,0	5,5
P.Le.3.W.4	<i>Sporidiobolus</i> <i>ruineniae</i>	2,0	1,5	1,33
P.Le.3.W.2	<i>Sporidiobolus</i> <i>ruineniae</i>	2,0	1,5	1,33
P.Le.5.W.1	<i>Sporidiobolus</i> <i>ruineniae</i>	2,0	1,5	1,33
P.Le.4.V.2	<i>Sporobolomyces</i> <i>bannaensis</i>	-	-	Tidak ada zona bening
MK.S.10.W.2	<i>Candida</i> <i>pseudointermedia</i>	-	-	Tidak ada zona bening
MK.L.6.DP.2	<i>Pichia</i> sp.	-	-	Tidak ada zona bening
MK.L.5.W.1	<i>Candida</i> <i>intermedia</i>	-	-	Tidak ada zona bening
MK.L.5.W.2	<i>Candida</i> <i>lesepsii</i>	-	-	Tidak ada zona bening
MK.L.8.W.2	<i>Pichia</i> sp.	-	-	Tidak ada zona bening

Dari hasil pengukuran Indeks Selulolitik (IS), didapatkan empat isolat yang memiliki kemampuan selulolitik terbesar yakni, isolat P.Le.6.DP.6 sebesar 5,50; isolat P.L.1.W.2 sebesar 3,25; isolat P.L.3.DP.9 sebesar 1,66; dan isolat P.L.3.DP.6 sebesar 1,60. Gambar 10 menunjukkan hasil pengamatan zona bening khamir penghasil enzim selulase terbesar:

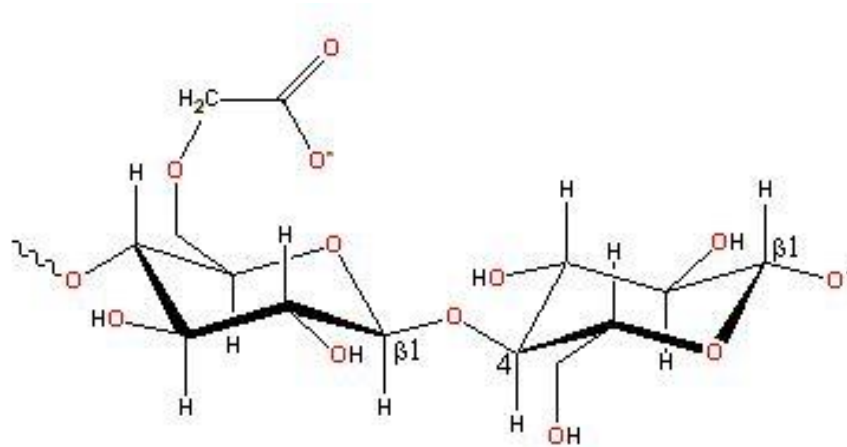


**P.Le.6.DP.6****P.L.1.W.2****P.L.3.DP.9****P.L.3.DP.6**

Gambar 10. Zona bening khamir penghasil enzim selulase terbesar

Media yang digunakan dalam tahap uji kemampuan selulolitik adalah media *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) padat, dimana CMC merupakan satu-satunya sumber karbon dalam media ini. *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) merupakan turunan selulosa yang mudah larut dalam air dan memiliki struktur amorf (Masfufatun, 2009). Bagian amorf selulosa dihidrolisis oleh enzim endo- $\beta$ -1,4 glukonase. Enzim ini bekerja dengan cara memutuskan ikatan  $\beta$ -1,4 selulosa secara random sehingga menghasilkan glukosa dan selooligosakarida yang

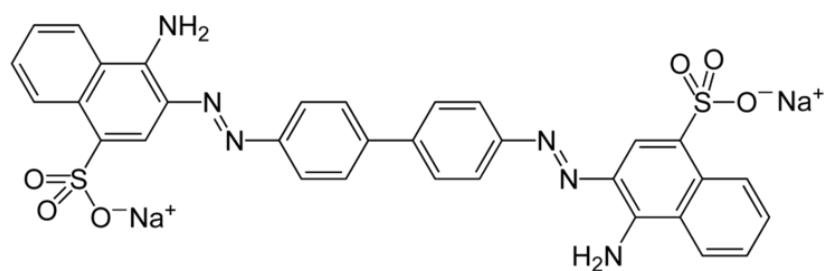
nantinya akan digunakan sebagai substrat oleh enzim ekso- $\beta$ -1,4 glukonase (Kamara dkk.,2007). Gambar 11 menunjukkan struktur molekul *Carboxy methyl cellulose*:



Gambar 11. Struktur molekul *Carboxy methyl cellulose*

Pertumbuhan biomassa sel ditentukan oleh keberadaan substrat yang mudah terabsorpsi ke dalam sel, dimana glukosa merupakan sumber karbon yang dapat diabsorpsi langsung oleh sel dan digunakan untuk pertumbuhan biomassa. Kebutuhan nutrisi ini menstimulasi sel untuk membentuk enzim yang dapat menghidrolisis CMC, yaitu enzim selulase (Kanti, 2007). Hal ini dikarenakan CMC atau selulase tidak dapat diabsorpsi ke dalam sel khamir karena memiliki bobot molekul yang besar, sehingga perlu dipecah terlebih dahulu oleh enzim selulase. Enzim selulase akan menghidrolisis selulosa yang terkandung di dalam media menjadi glukosa. Glukosa hasil hidrolisis ini yang akan digunakan oleh sel khamir sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan biomassa.

Metode yang digunakan untuk melihat adanya zona bening disekitar koloni khamir adalah metode congo red. Zona bening disekitar koloni isolat akan tampak ketika ditetesi dengan larutan congo red, dimana congo red dapat berikatan dengan polisakarida yang terdiri dari unit-unit glukosa yang dihubungkan oleh ikatan  $\beta$ -glukosida (Teather, R., 1981). Timbulnya zona bening dikarenakan congo red tidak dapat berikatan dengan substrat selulosa yang telah terhidrolisis menjadi glukosa oleh enzim selulase yang dimiliki isolat khamir. Gambar 12 menunjukkan struktur *Congo red*:



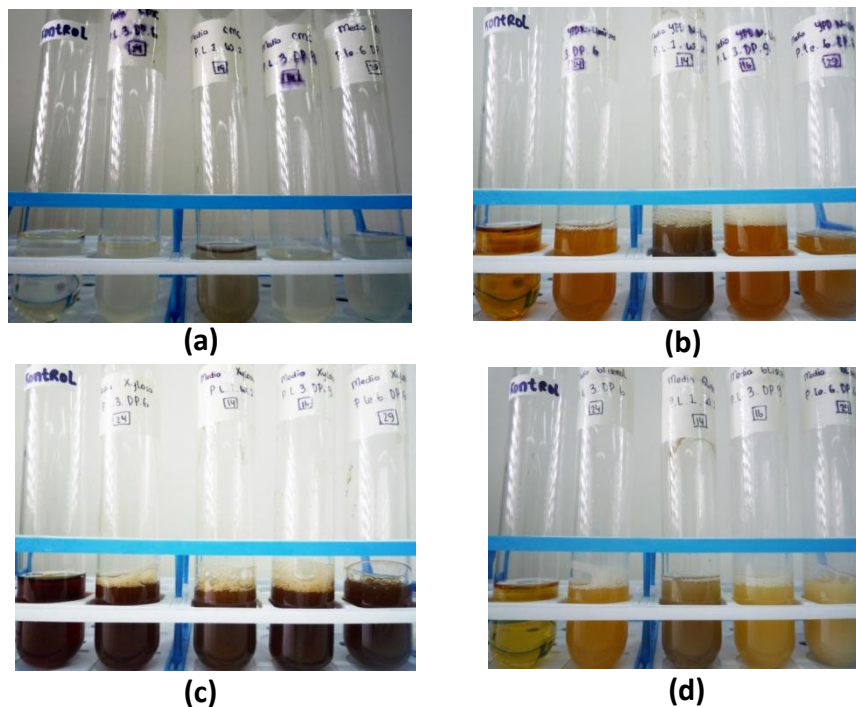
Gambar 12. Struktur Molekul *Congo red*

Dari 30 isolat khamir yang diuji kemampuan selulolitiknya pada media CMC padat, terdapat empat isolat yang menghasilkan zona bening terbesar. Masing-masing isolat mempunyai indeks selulolitik (IS) yang spesifik. Indeks selulolitik (IS) merupakan indikator kekuatan aktivitas khamir selulolitik dalam mendegradasi selulosa yang dihitung berdasarkan hasil bagi antara diameter zona bening dengan diameter koloni isolat. Semakin besar diameter zona bening yang dihasilkan maka semakin besar pula nilai Indeks selulolitiknya. Semakin besar

nilai Indeks selulolitik (IS) maka aktivitas enzim selulase dari isolat dalam menghidrolisis substrat selulosa semakin besar pula.

### c. Pengukuran Pertumbuhan Biomassa Khamir

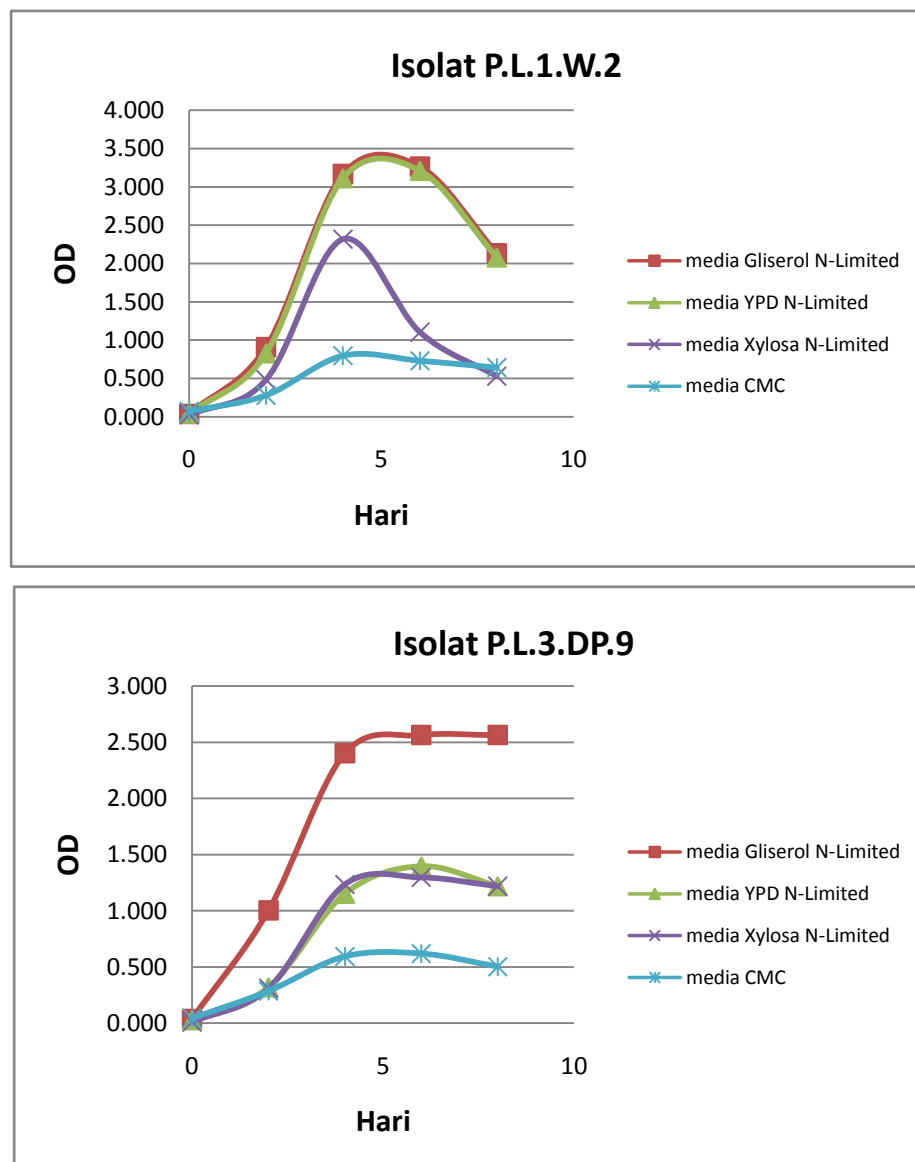
Isolat khamir terseleksi ditumbuhkan pada berbagai media dengan sumber karbon yang berbeda-beda yaitu media cair CMC , media YPD N-Limited, media xylosa N-Limited, dan media gliserol N-Limited. Pengamatan pertumbuhan biomassa sel khamir pada media cair, ditandai dengan perubahan warna media yang menjadi keruh. Oleh karena itu, digunakan metode kerapatan optik menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600nm untuk mengetahui besarnya pertumbuhan biomassa khamir. Gambar 13 menunjukkan biomassa sel khamir pada berbagai media cair:

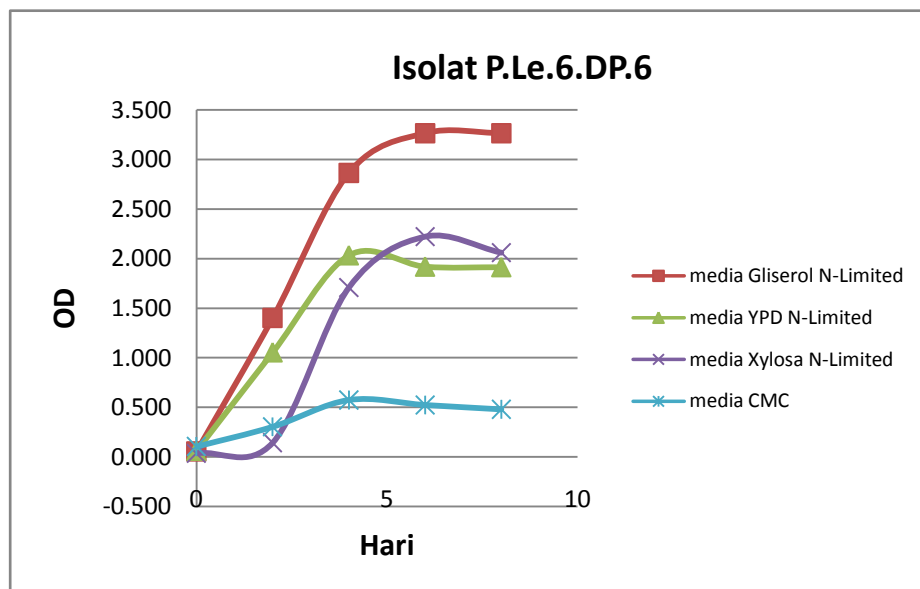
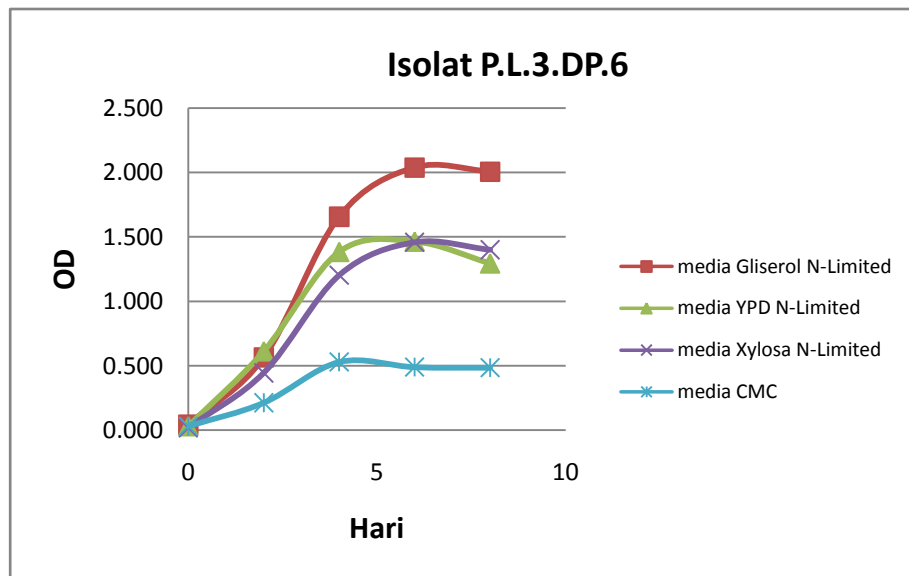


Gambar 13. Biomassa khamir pada berbagai media cair (a) media CMC, (b) media YPD N- Limited, (c) media xylosa N- Limited, dan (d) media gliserol N-Limited

Pertumbuhan biomassa sel ditentukan oleh keberadaan sumber karbon yang mudah terabsorpsi ke dalam sel. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa keempat isolat khamir dapat tumbuh pada empat media cair yang digunakan, yaitu media gliserol N-Limited, media YPD N-Limited, media xylosa N-Limited, dan media CMC.

Gambar 14 menunjukkan grafik pertumbuhan biomassa khamir pada empat media berbeda:





Gambar 14. Grafik pertumbuhan biomassa sel khamir

Pada awal kultivasi (0-1hari), terlihat bahwa untuk keempat isolat pertumbuhan biomassa terbesar yaitu pada media gliserol N-Limited, diikuti oleh media YPD N-Limited, media xylosa N-Limited, dan yang terendah pada media CMC.

Biomassa khamir pada media YPD N-Limited lebih besar dibandingkan pada media xylosa N-Limited, hal ini dikarenakan pada media YPD N-Limited mengandung glukosa sebanyak 10% sedangkan pada media xylosa N-Limited hanya mengandung xylosa sebanyak 5% sehingga lebih banyak glukosa yang diabsorpsi oleh sel untuk pembentukan biomassa. Selain itu, kecenderungan dari sel khamir yang lebih menyukai glukosa sebagai sumber karbon untuk pembentukan biomassa.

Pada media CMC cair, pertumbuhan biomassa pada awal kultivasi (0-1hari) rendah dikarenakan pada media ini sumber karbonnya adalah CMC, sedangkan untuk membentuk biomassa diperlukan sumber karbon sederhana seperti monosakarida (contohnya glukosa). Kebutuhan akan sumber karbon sederhana ini yang menstimulasi sel untuk membentuk enzim yang dapat menghidrolisis CMC menjadi glukosa. Dari hasil pengukuran keempat isolat khamir yang diuji mampu tumbuh dalam media dengan substrat CMC sebagai sumber karbon. Hal ini menunjukkan, bahwa keempat isolat khamir yang diuji mampu menghasilkan enzim endo- $\beta$ -1,4 glukanase (CMC-ase), yakni enzim yang mampu menghidrolisis CMC.

## **2. Pengujian pada Berbagai Sumber Karbon**

Isolat khamir terseleksi yang ditumbuhkan pada berbagai media dengan substrat yang berbeda yaitu media cair CMC, media YPD N-Limited, media xylosa N-Limited, dan media gliserol N-Limited

dilakukan pengujian terhadap aktivitas enzim selulase dan nilai total lipid.

#### a. Pengujian Aktivitas Enzim Selulase

Pengujian aktivitas enzim selulase dilakukan dengan metode DNS pada media *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) cair. Sumber karbon CMC merupakan sumber karbon selulosa murni yang berbentuk amorphous sehingga aktivitas enzim selulase pada sumber karbon CMC merupakan aktivitas enzim endo- $\beta$ -1,4 glukonase (CMC-ase).

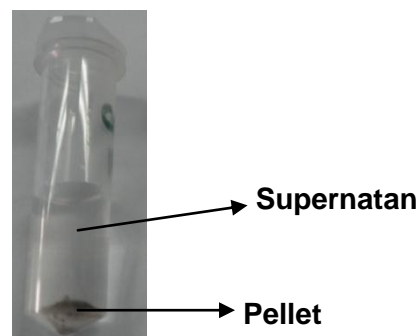
Aktivitas enzim selulase yang dihasilkan dari masing-masing isolat dapat diukur dengan menambahkan substrat CMC 1%. Derajat hidrolisis selulosa oleh enzim dapat ditentukan dengan mengukur jumlah gula reduksi yang dibebaskan (unit enzim / mmol Glukosa perjam).

Isolat-isolat yang akan diuji aktivitas enzimnya ditumbuhkan terlebih dahulu pada media starter atau enrichment yaitu media CMC cair dengan volume 5mL. Hal ini bertujuan untuk memperbanyak biomassa dari isolat dan agar khamir dapat beradaptasi sebelum di pindahkan kedalam media pengujian. Setelah diinkubasi selama 3 hari, biomassa khamir dari media enrichment dipindahkan secara aseptis kedalam media uji CMC cair volume 50mL. Media uji CMC ini mengandung *Carboxy Methyl Cellulose* sebagai satu-satunya sumber karbon dalam media.



Pengukuran aktivitas enzim selulase dilakukan selama tujuh hari berturut-turut, dimana inkubasi dilakukan pada temperatur ruang (28°C) dengan kecepatan agitasi atau pengocokan (dalam bioshacker) sebesar 94rpm. Pengocokan atau agitasi diperlukan untuk memenuhi kebutuhan oksigen bagi mikroorganismenya. Semua perlakuan ini berfungsi untuk menstimulasi sel khamir agar dapat menghasilkan enzim selulase.

Penyiapan enzim selulase dilakukan dengan mendapatkan supernatan dari media uji, yaitu dengan cara mensentrifuge pada kecepatan 6000rpm selama 5 menit dengan suhu 4°C. Dimana hasil dari sentrifuge adalah terbentuknya dua lapisan, yakni lapisan atas yang merupakan supernatan berupa cairan dan lapisan bawah yang merupakan pellet berupa endapan. Adapun secara lebih jelas dapat dilihat pada gambar 15 dibawah ini:



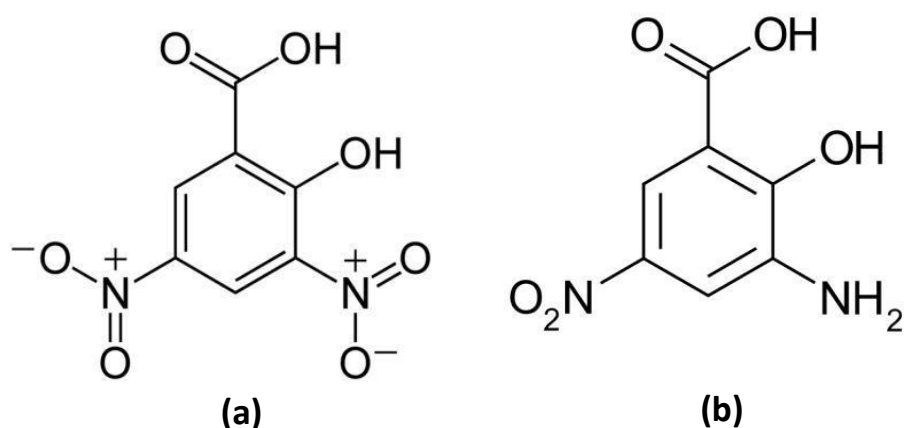
Gambar 15. Hasil sentrifuge biomassa khamir

Supernatan kemudian dipipet sebanyak 500µL sebagai larutan yang mengandung enzim selulase. Supernatan yang diperoleh ditambahkan dengan 500µL substrat CMC 1%, kemudian diinkubasi

selama 1 jam dalam bioshacker dengan suhu 37 °C. Pengocokan atau agitasi pada saat inkubasi substrat-enzim bertujuan untuk memperbesar kontak antara enzim selulase dan komponen selulosa sehingga dapat meningkatkan aktivitas enzim selulase.

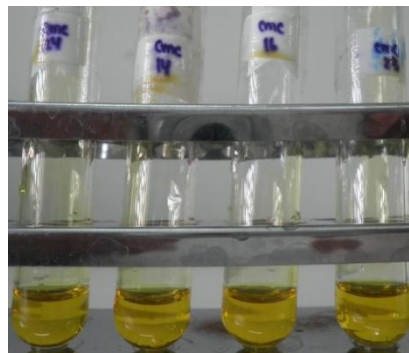
Metode yang digunakan untuk pengukuran aktivitas enzim selulase adalah metode DNS. Metode DNS merupakan metode yang digunakan untuk mengukur banyaknya glukosa yang terbentuk dari hasil hidrolisis substrat selulosa oleh enzim selulase. DNS atau asam 3,5-dinitrosalisilat merupakan suatu senyawa aromatik yang bereaksi dengan gula reduksi dan membentuk molekul asam 3-amino-5-nitrosalisilat, yang menyerap cahaya pada panjang gelombang 540nm. Warna kuning yang semakin pekat menunjukkan tingginya kadar glukosa akibat dari aktivitas enzim selulase yang besar pula.

Gambar 16 menunjukkan struktur molekul dari asam 3,5-dinitrosalisilat dan asam 3-amino-5-nitrosalisilat:



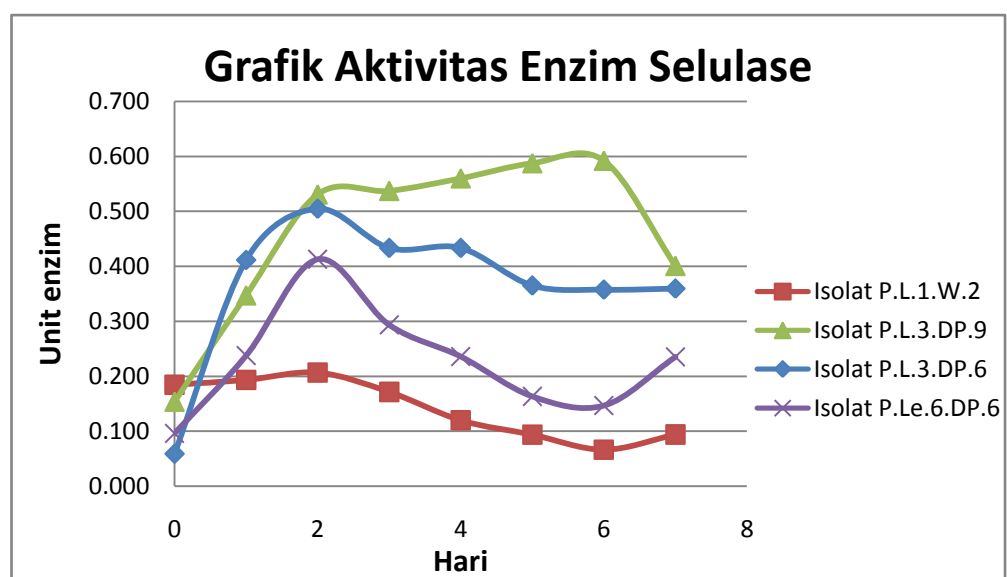
Gambar 16. Struktur molekul (a) asam 3,5-dinitrosalisilat dan (b) asam 3-amino-5-nitrosalisilat

Hasil pengamatan menunjukkan adanya aktivitas enzim selulase dari keempat isolat yang tidak terlalu besar, dapat dilihat pada gambar dibawah ini, dimana warna yang dihasilkan setelah ditambahkan pereaksi DNS tidak terlalu pekat. Gambar 17 menunjukkan warna hasil pengukuran enzim selulase:



Gambar 17. Warna Hasil Pengukuran Enzim Selulase

Berdasarkan hasil pengukuran gula reduksi menunjukkan bahwa terdapat perbedaan aktivitas enzim selulase dalam menghidrolisis selulosa dari masing-masing isolat. Gambar 18 menunjukkan grafik aktivitas enzim selulase pada media CMC cair:



Gambar 18. Grafik hasil pengukuran aktivitas enzim selulase pada media CMC cair (dalam Unit Enzim/ mmol Glukosa perjam)

Pada gambar diatas terlihat bahwa aktivitas enzim terbesar dihasilkan oleh isolat P.L.3.DP.9 pada hari keenam yaitu sebesar 0,592 mmol perjam. Diikuti oleh isolat P.L.3.DP.6 sebesar 0,505 mmol perjam, isolat P.Le.6.DP.6 sebesar 0,413 mmol perjam, dan yang terendah isolat P.L.1.W.2 sebesar 0,207 mmol perjam (perhitungan pada lampiran 3).

Pada media CMC cair isolat P.L.1.W.2 memiliki nilai biomassa tertinggi (gambar 14) tetapi memiliki aktivitas enzim terendah, yaitu sebesar 0,207 mmol glukosa perjam pada hari kedua. Hal ini dikarenakan gula reduksi yang terbentuk hasil hidrolisis selulosa oleh enzim selulase diabsorpsi seluruhnya oleh sel untuk membentuk biomassa.

Pada gambar 14 dan gambar 18 terlihat bahwa aktivitas enzim selulase meningkat seiring dengan pertumbuhan selnya. Namun ketika sel mencapai fase stasioner, aktivitas enzim selulase menurun. Pada fase stasioner kecepatan pembelahan sel sama dengan kecepatan kematian sel dan lisis sel sehingga pada fase ini selain enzim selulase juga dihasilkan enzim protease (Martini dkk, 2002). Hal ini menyebabkan turunnya aktivitas enzim selulase.

Produk gula reduksi yang dihasilkan merupakan hasil hidrolisis substrat selulosa (CMC) oleh enzim selulase. Ketiga macam enzim selulase berkerja secara sinergis untuk menghidrolisis selulosa. Pada tahap awal, selulosa non-kristalin (amorf) diserang oleh enzim endo- $\beta$ -

1,4 glukonase sehingga menghasilkan sisi-sisi yang memungkinkan untuk diserang oleh enzim ekso- $\beta$ -1,4 glukonase (selobiohidrolase). Selanjutnya dari hasil kerjasama kedua enzim tersebut akan dihasilkan selobiosa yang selanjutnya akan diserang oleh enzim glukosidase menghasilkan glukosa (Kamara, 2007).

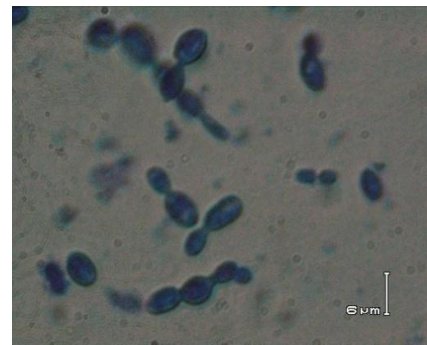
#### **b. Pengukuran Total Lipid Produksi**

Pengukuran total lipid produksi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan lain dari khamir selulolitik yang diperoleh, misalnya dalam hal mensintesis lipid. Pengukuran ini dilakukan dengan alasan, karena hasil proses glikolisis yaitu piruvat dapat masuk pada proses pembentukan etanol atau pembentukan lipid dengan kondisi yang berbeda. Dimana, pada pembentukan etanol dilakukan pada keadaan anaerob sedangkan pada pembentukan lipid perlu adanya aerasi. Pengukuran ini dilakukan pada media gliserol N-Limited, media xylosa N-Limited, media YPD N-Limited, dan *media Carboxy Methyl Cellulose* (CMC).

Lipid yang dihasilkan dari sintesis lipid oleh khamir, dihitung menggunakan metode *Nile Blue* dan diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 626nm. Pengamatan secara mikroskopis juga dilakukan untuk melihat keadaan sel khamir sebelum dan sesudah diberikan *Nile Blue*. Gambar 19 menunjukkan sel khamir secara mikroskopis sebelum dan sesudah diberikan *Nile Blue*:

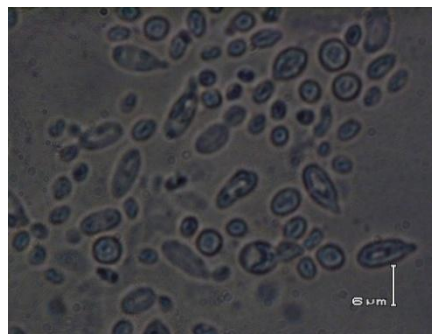


(a)

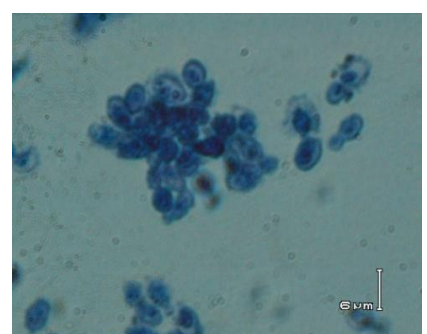


(b)

P.L.1.W.2

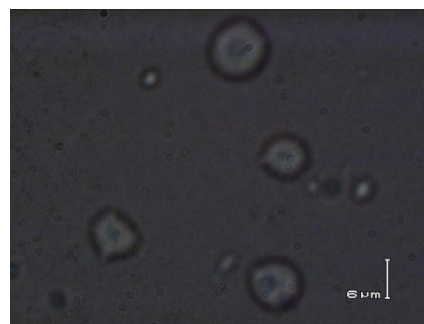


(a)



(b)

P.L.3.DP.9



(a)



(b)

P.L.3.DP.6



(a)

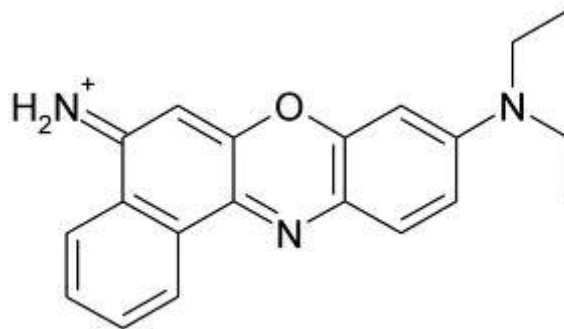


(b)

P.Le.6.DP.6

Gambar 19. Pengamatan Sel Khamir dengan Mikroskop (a) sebelum dan (b) sesudah diberikan *Nile Blue*

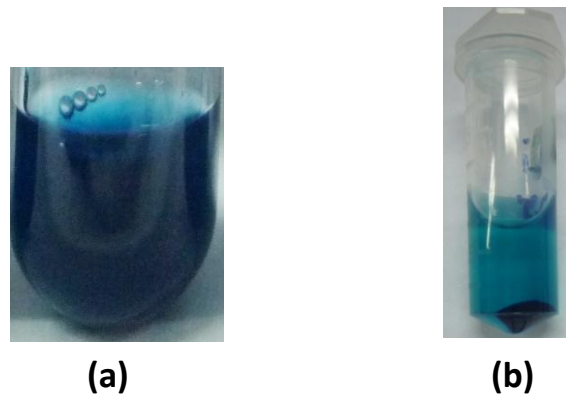
Dari pengamatan dengan mikroskop, dapat dilihat bahwa *Nile Blue* akan masuk ke dalam sel dan mengikat lipid yang dihasilkan oleh khamir. Dapat dilihat pada gambar, ketika *Nile Blue* berikatan dengan lipid, sel khamir berubah warna menjadi biru. Gambar 20 menunjukkan struktur molekul dari *Nile Blue*:



Gambar 20. Struktur molekul *Nile Blue*

Pengukuran nilai absorbansi dilakukan dalam dua tahap. Pada tahap pertama nilai absorbansi diukur tanpa disentrifuge terlebih dahulu sedangkan pada tahap kedua diukur setelah terlebih dahulu disentrifuge. Dan, nilai total lipid diperoleh dengan mengurangkan nilai absorbansi tanpa disentrifuge dengan nilai absorbansi setelah disentrifuge (lampiran 5). Hal ini bertujuan untuk mengetahui berapa total lipid yang dihasilkan dari masing-masing isolat khamir, sehingga dapat diketahui isolat khamir mana yang berpotensi sebagai khamir pensintesis lipid (*oleaginous yeast*), yang dilihat dari nilai total lipid yang besar. Dimana, semakin besar nilai total lipid berarti semakin besar pula *Nile Blue* yang terserap ke dalam sel yang akan berikatan dengan lipid. Hal ini dapat dilihat ketika sampel ditambahkan dengan

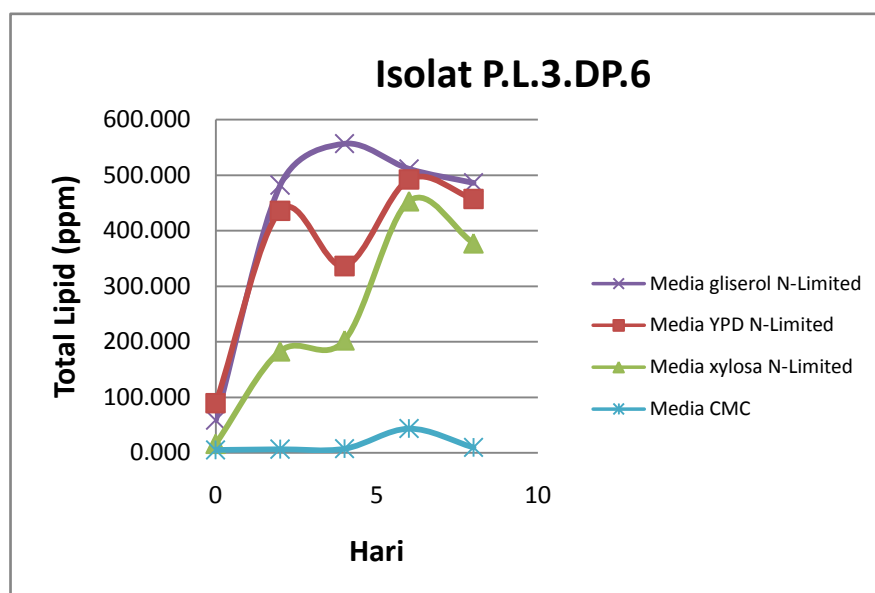
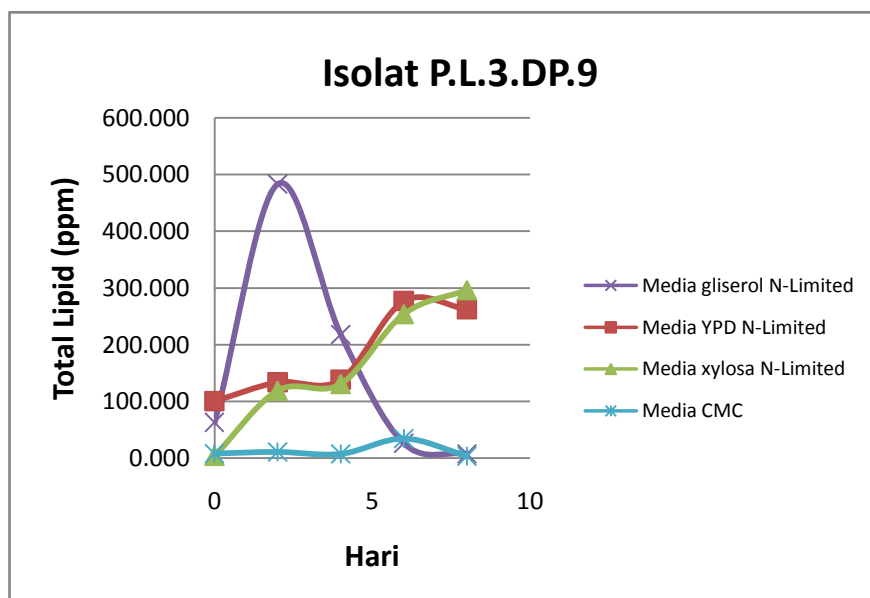
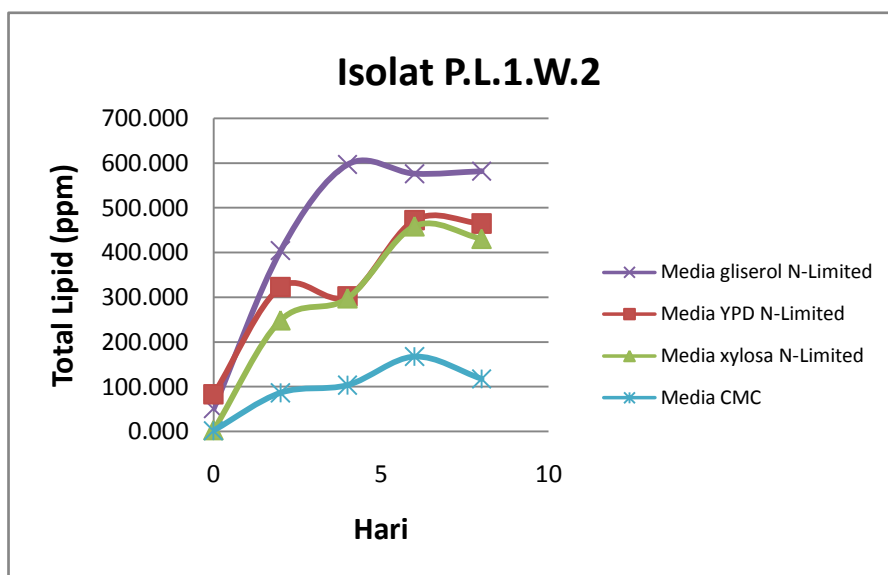
*Nile Blue*, setelah disentrifuge maka supernatan akan berwarna lebih jernih. Adapun secara lebih jelas dapat dilihat pada gambar 21 dibawah ini:

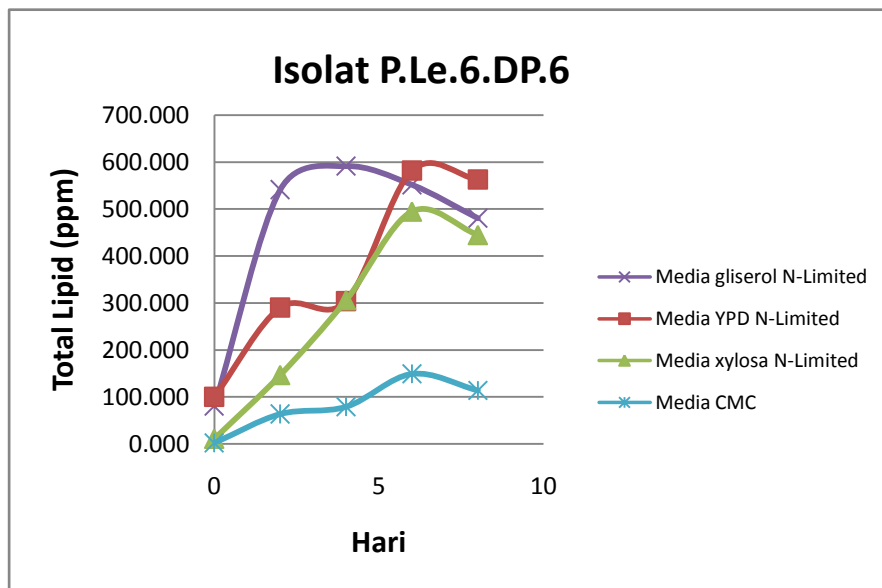


Gambar 21. Pengukuran Total Lipid (a) sebelum disentrifuge dan (b) setelah disentrifuge

Berdasarkan hasil pengukuran total lipid produksi menunjukkan bahwa keempat isolat (P.L.1.W.2, P.L.3.DP.9, P.L.3.DP.6, dan P.Le.DP.6) memiliki sifat sebagai khamir pensintesis lipid (Oleaginous Yeast). Dimana, masing-masing isolat memiliki kemampuan mensintesis lipid yang berbeda-beda. Gambar 22 menunjukkan grafik konsentrasi lipid produksi pada berbagai media cair:







Gambar 22. Grafik Pengukuran Konsentrasi Lipid Produksi

Dari hasil pengukuran, didapatkan untuk keempat isolat nilai total lipid terbesar ialah pada media gliserol N-Limited, diikuti media YPD N-Limited, lalu media xylosa N-Limited, dan yang terendah pada media CMC. Adapun hasilnya yaitu, untuk isolat P.L.1.W.2 terbesar pada media gliserol N-Limited sebesar 597,250ppm, untuk isolat P.L.3.DP.9 terbesar pada media gliserol N-Limited sebesar 483,250ppm, untuk isolat P.L.3.DP.6 terbesar pada media gliserol N-Limited sebesar 556,750ppm, dan untuk isolat P.Le.6.DP.6 terbesar pada media gliserol n-limited sebesar 591,750ppm (perhitungan pada lampiran 6).

Pada masing-masing media, nilai total lipid terbesar dihasilkan oleh isolat yang berbeda. Untuk media gliserol N-Limited nilai total lipid terbesar dihasilkan oleh isolat P.L.1.W.2 yaitu sebesar

597,250ppm, pada media YPD N-Limited dihasilkan oleh isolat P.Le.6.DP.6 sebesar 582ppm, pada media xylosa N-Limited dihasilkan oleh isolat P.Le.6.DP.6 sebesar 495ppm, dan pada media CMC dihasilkan oleh isolat P.L.1.W.2 sebesar 167,750ppm.

Pada media gliserol N-Limited, nilai total lipidnya besar dikarenakan pada media ini sumber karbon yang digunakan oleh khamir untuk pembentukan lipid adalah gliserol. Gliserol sebagai sumber karbon dalam media pertumbuhan memberikan efek positif terhadap kesuburan khamir penghasil lipid (oleaginous yeast), (Li-Xia Pan, 2009). Dengan sumber karbon gliserol jalur pembentukan piruvat akan lebih cepat, dimana gliserol akan diubah menjadi gliserol 3 fosfat oleh enzim gliserol kinase, (Anthanasious et al., 2008). Selanjutnya piruvat akan diubah menjadi sitrat, dan karena kandungan nitrogen dalam media sedikit maka aktivitas enzim nicotinamide adenine dinucleotide isocitrate dehidrogenase (NAD-IDH) menurun sehingga sitrat akan masuk dalam metabolisme pembentukan lipid dengan diubah menjadi asetil-KoA dalam sitoplasma.

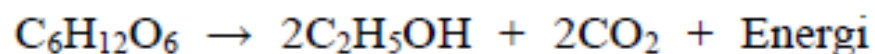
Sementara itu pada media YPD N-limited dengan sumber karbon glukosa dan pada media xylosa N-Limited, perubahan glukosa dan xylosa menjadi gliserol 3 fosfat melalui tahap yang lebih panjang. Dimana glukosa dan xylosa diubah terlebih dahulu menjadi fruktosa 6 fosfat. Sedangkan pada media CMC cair nilai total lipidnya rendah, dikarenakan pada media ini sumber karbonnya adalah selulosa.

Dimana selulosa terlebih dahulu dihidrolisis oleh enzim selulase menjadi glukosa, barulah glukosa ini masuk dalam proses glikolisis diubah menjadi piruvat yang selanjutnya digunakan untuk metabolisme pembentukan lipid.

### 3. Uji Pembentukan Etanol

Uji pembentukan etanol dilakukan untuk mendapatkan isolat khamir yang dapat melakukan proses fermentasi glukosa menjadi etanol. Pengujian etanol dilakukan setelah sepuluh hari dari waktu inokulasi isolat khamir ke dalam media uji (CMC cair). Dimana lima hari pertama isolat diinkubasi dalam bioshaker yang merupakan tahap hidrolisis substrat selulosa menjadi glukosa, sedangkan lima hari berikutnya isolat diinkubasi tanpa di shaker yang merupakan tahap proses fermentasi.

Proses fermentasi pada khamir melalui siklus Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) atau lebih terkenal dengan nama Glikolisis. Glukosa hasil hidrolisis selulosa oleh enzim selulase akan memasuki proses glikolisis membentuk piruvat. Dimana, selanjutnya piruvat yang dihasilkan diubah menjadi asetaldehida oleh enzim piruvat dekarboksilase (PDC), kemudian mengalami proses dehidrogenasi menjadi etanol oleh enzim alkohol dehidrogenase (Riyanti, 2009). Berikut ini adalah reaksi singkat pembentukan etanol:



Gambar 23. Reaksi Pembentukan Etanol

Kadar etanol yang dihasilkan dari masing-masing isolat dapat diukur dengan mengekstraksi supernatan dengan pelarut etil asetat. Besar kadar etanol ditentukan dengan membandingkan luas area dari standar dengan sampel, hasil uji Gas Chromatography (GC).

Penyiapan sampel dilakukan dengan mendapatkan supernatan dari media uji, yaitu dengan cara mensentrifuge pada kecepatan 6000rpm selama 25 menit dengan suhu 4°C. Dimana hasil dari sentrifuge adalah terbentuknya dua lapisan, yakni lapisan atas yang merupakan supernatan berupa cairan dan lapisan bawah yang merupakan pellet berupa endapan. Supernatan kemudian dipipet sebanyak 500µL sebagai larutan yang mengandung etanol. Supernatan yang diperoleh ditambahkan dengan 500µL etil asetat, selanjutnya di vorteks selama 1 menit yang merupakan proses ekstraksi sehingga terbentuk dua lapisan, yakni lapisan atas yang berupa fase organik dan lapisan bawah yang berupa fase air. Dimana etanol yang bersifat nonpolar akan terdistribusi kedalam pelarut etil asetat (berada pada fase organik) sedangkan media uji atau substrat yang mengandung air berada pada fase air. Hal ini yang disebut “like dissolves like” yang berarti bahwa senyawa polar akan mudah larut dalam pelarut polar, dan senyawa nonpolar mudah larut dalam pelarut nonpolar (Sudjadi, 1988).

Berdasarkan hasil pengukuran standar, senyawa etanol muncul pada waktu retensi sekitar 1,4 – 1,6 menit. Dan dari hasil pengukuran

sampel, masing-masing isolat memiliki kemampuan fermentasi yang berbeda-beda. Gambar 24 menunjukkan grafik kadar etanol pada media CMC cair:



Gambar 24. Grafik Kadar Etanol pada media CMC cair

Pada gambar 24 terlihat bahwa kadar etanol terbesar dihasilkan oleh isolat P.L.3.DP.6 sebesar 11,61% diikuti isolat P.L.3.DP.9 sebesar 1,82% lalu isolat P.L.1.W.2 sebesar 0,61%, dan yang terendah isolat P.Le.6.DP.6 sebesar 0,27% (perhitungan pada lampiran 4). Rendahnya kadar etanol yang dihasilkan dikarenakan glukosa yang tersedia digunakan oleh sel khamir untuk pembentukan biomassa dalam rangka mempertahankan hidup.

#### 4. Identifikasi Lipid

Identifikasi lipid ini bertujuan untuk mengetahui jenis lipid dan kadar lipid yang dihasilkan oleh khamir. Persentase kandungan lipid

dalam sel khamir yang dihasilkan dari masing-masing isolat dihitung dengan membagi konsentrasi lipid yang dihasilkan (ppm) dengan berat kering biomassa isolat (ppm). Berikut ini adalah persentase kandungan lipid dalam sel khamir yang dihasilkan dari masing-masing isolat (perhitungan pada lampiran 7):

Tabel 2. Persentase Kandungan Lipid dalam Sel Khamir

Media Isolat	Media Gliserol N-limited (%)	Media YPD N- Limited (%)	Media Xylosa N-limited (%)	Media CMC (%)
P.L.3.DP.6	33,40	29,54	4,95	2,61
P.L.1.W.2	14,33	3,54	3,83	5,59
P.L.3.DP.9	14,50	11,08	5,08	2,07
P.Le.6.DP.6	16,90	17,75	16,50	5,96

Sedangkan untuk mengetahui jenis lipid dilakukan uji GC-MS, dan isolat yang diuji yaitu isolat P.L.3.DP.6. Dari hasil analisis menggunakan GC-MS (lampiran 8) diketahui bahwa untuk isolat P.L.3.DP.6 pada keempat media jenis lipid yang dihasilkan yaitu asam tetradekanoat (asam miristat), asam oktadekanoat (asam stearat), asam 9-heksadekanoat (asam palmitoleinat), asam heksadekanoat (asam palmitat), asam 9,12-oktadekadienoat (asam linoleat), dan asam oktadekanoat (asam oleat). Dimana untuk asam miristat muncul pada waktu retensi 5,621 menit, asam stearat pada waktu retensi 12,011 menit, asam palmitoleinat pada waktu retensi 8,285menit, asam palmitat pada waktu retensi 8,626 menit, asam linoleat pada

waktu retensi 11,459, dan asam oleat pada waktu retensi 11,562-11,764 menit.

Persentase kandungan lipid dalam sel khamir isolat P.L.3.DP.6 pada keempat media berbeda-beda. Dimana pada media gliserol N-Limited dihasilkan sebesar 33,40%, untuk media ypd n-limited sebesar 29,54%, untuk media xylosa N-Limited sebesar 4,95%, dan untuk media CMC sebesar 2,61%.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, diketahui bahwa pada isolat P.L.3.DP.6 kadar lipid tertinggi yaitu pada media gliserol N-Limited sebesar 33,40%. Hal ini sesuai dengan pernyataan Li-Xia Pan (2009), yang menyatakan bahwa Oleaginous yeast mampu menghasilkan dan mengakumulasi lipid kurang lebih 20-80% dari berat biomassa kering.



## BAB V

### PENUTUP

#### A. Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Khamir hasil isolasi dari pohon pada Hutan Lindung Papalia dan Mekongga, Sulawesi Tenggara terdapat empat isolat yang memiliki kemampuan selulolitik penghasil enzim selulase terbesar yaitu isolat P.L.1.W.2 (*Exophiala dermatitidis*), P.L.3.DP.9 (*Asterotremella humicola*), P.L.3.DP.6 (*Cryptococcus flavescens*), P.Le.6.DP.6 (*Candida intermedia*) dan satu isolat sebagai *Oleaginous Yeast* yaitu isolat P.L.3.DP.6 (*Cryptococcus flavescens*).
2. Aktivitas enzim selulase yang dihasilkan isolat P.L.3.DP.9 sebesar 0,592mmol perjam, isolat P.L.3.DP.6 sebesar 0,505mmol perjam, isolat P.Le.6.DP.6 sebesar 0,413mmol perjam, dan isolat P.L.1.W.2 sebesar 0,207mmol perjam.
3. Kemampuan khamir selulolitik sebagai khamir pensintesis lipid pada berbagai sumber karbon berbeda-beda.
4. Kemampuan keempat isolat khamir selulolitik dalam mensintesis lipid terbesar dihasilkan pada media gliserol N-Limited. Untuk isolat P.L.1.W.2 sebesar 597,250ppm, isolat

P.L.3.DP.9 sebesar 483,250ppm, isolat P.L.3.DP.6 sebesar 556,750ppm, dan isolat P.Le.6.DP.6 sebesar 591,750ppm.

5. Kadar etanol tertinggi dihasilkan oleh isolat P.L.3.DP.6 sebesar 11,61% dan terendah dihasilkan oleh isolat P.Le.6.DP.6 sebesar 0,27%.
6. Isolat khamir yang berpotensi sebagai *Oleaginous yeast* yaitu isolat P.L.3.DP.6 sebesar 33,40% dengan jenis lipid yang dihasilkan yaitu asam tetradekanoat (asam miristat), asam oktadekanoat (asam stearat), asam 9-heksadekanoat (asam palmitoleinat), asam heksadekanoat (asam palmitat), asam 9,12-oktadekadienoat (asam linoleat), dan asam oktadekanoat (asam oleat) pada media gliserol N-Limited.

## **B. Saran**

Saran untuk penelitian selanjutnya yaitu:

1. Perlu dilakukan pencarian kondisi optimum dari pH, suhu, dan kecepatan pengadukan yang digunakan sehingga diperoleh kadar etanol dan total lipid yang optimum.
2. Dilakukan pencarian strain yang lebih baik untuk memproduksi etanol dan lipid yang optimum.
3. Mengaplikasikan lipid yang dihasilkan oleh khamir pensintesis lipid ini sebagai bahan baku pembuatan biodiesel.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2005. Yeast. <http://www.bugs.bio.usyd....ngi.html>. Diunduh pada tanggal 30 Agustus 2010, pukul 10:00 WIB.
- Anonim. 2005. *Gula Penyusun Hemiselulosa*. <http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e08.htm2005>. Diunduh pada tanggal 28 Agustus 2010, pukul 13:00 WIB.
- Anonim, Pusat Informasi Energi. [www.esdm.go.id](http://www.esdm.go.id). Diunduh pada tanggal 10 Agustus 2010, pukul 11.00 WIB.
- Athanasios Beopoulos, Zuzana Mrozova, France Thevenieau, Marie-The´re`se Le Dall, Ivan Hapala, Seraphim Papanikolaou, Thierry Chardot, and Jean-Marc Nicaud. 2008. *Control of Lipid Accumulation in the Yeast Yarrowia lipolytica*. Applied And Environmental Microbiology, p. 7779–7789 Vol. 74, No. 24.
- Balia, R. L. 2004. *Potensi dan Prospek Yeast (khamir) Dalam Meningkatkan Diversifikasi Pangan di Indonesia*. Departemen Pendidikan Nasional Universitas Padjadjaran, Bandung.
- Dai, Chuan-chao. 2007. *Biodiesel generation from oleaginous yeast Rhodotorula glutinis with xylose assimilating capacity*. African Journal of Biotechnology Vol. 6 (18), p. 2130-2134.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Feldmann, H. 2007. *Yeast Molecular Biology*. Adolf-Butenandt-Institute University of Munich.
- Gandjar i., Wellyzar S., dan Oetari A. 2006. *Mikologi Dasar dan Terapan*. Yayasan Obor, Jakarta.
- Gozan, Misri, Samsuri, M., 2007. *Sakarifikasi dan Fermentasi Bagas Menjadi Ethanol Menggunakan Enzim Selulase dan Enzim Sellobiase*. Jurnal Teknologi, Edisi No. 3, Tahun Xxi, 209–215.
- Hadioetomo, R.S. 1985. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*. PT. Gramedia, Jakarta.

- Hidayat, I. 2005. *Pengaruh pH terhadap Aktivitas Endo-1,4- $\beta$ -Glucanase Bacillus sp. AR 009*. Jurnal Biodiversitas Vol.6 No.4 hlm:244-246.
- Hisar, 2003. *Isolasi Bakteri Selulolitik Aerobik dan Karakteristik selulasenya dari Tanah gambut Kalimantan*. Skripsi. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Pakuan, Bogor.
- Kamara, D. S., Rachman, S. D., Gaffar, S. 2007. *Degradasi Enzimatis Selulosa dari Pohon Pisang Untuk Produksi Glukosa dengan Bantuan Aktivitas Selulolitik Trichoderma viride*. Laporan Penelitian Dasar Univesitas Padjadjaran November 2007.
- Kang, S. W., Y. S. Park, J.S. Lee, S.I. Hong , S.W. Kim. 2004. *Production of Cellulases and Hemicellulases by Aspergillus niger KK2 from lignocellulosic biomass*. Elsevier. Bioresource Technology 91 (2004) 153–156.
- Kanti, A. 2005. *Actinomycetes Selulolitik dari Tanah Hutan Taman Nasional Bukit Duabelas, Jambi*. Biodivesitas Vol.6 No.2 hlm: 85-89.
- Kanti, A. 2007. *Penapisan Khamir Selulolitik Cryptococcus sp. yang Diisolasi dari Tanah Kebun Biologi Wamena, Jaya Wijaya, propinsi Papua*. Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi – LIPI.
- Lehninger. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia 1*. Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Li-Xia Pan, Deng-Feng Yang, Li Shao, Wei Li, Gui-Guang Chen and Zhi-Qun Liang. 2009. *Isolation of the Oleaginous Yeasts from the Soil and Studies of Their Lipid-Producing Capacities*. Food Technol. Biotechnol. 47 (2) 215–220.
- A. Martini, N. Yuli, M. Sutisna. *J.Natur.4 (2002) 156*.
- Masfufatun. 2009. *Hidrolisis Carboxy Methyl Cellulose (CMC) Dengan Enzim Selulase Dari Bekicot (Achatina fulica) Untuk Produksi Etanol Menggunakan Zymomonas mobilis*. ITS Tesis SK 2402
- Meryandini, A., Widosari, W., Maranatha, B., Sunarti, T. C., Rachmania, N., dan Satria, H. 2009. *Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya*. Makara, Sains, VOL. 13, NO. 1, April 2009: 33-38.
- Miller, G. L. 1976. *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*. Anal. Chem. 31(2): 426 – 428.
- Moniruzzaman, M., Dien, B.S., Skory, C.D., Chen, Z.D., Hespell, R.B., Ho, N.W.Y., Dale, B.E., Bothast, R.J., 1997. *Fermentation of Corn Fibre*

- Sugars by An Engineered Xylose Utilizing Saccharomyces Yeast Strain*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 13, 341–346.
- Nasution, M. A. 2008. *Karakterisasi Mikroba Selulolitik yang diisolasi dari Ekosistem Laut dan Teritorial*. Laporan Kuliah Praktek Sains dan Teknologi. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas, Padang.
- Pelczar MJ dan ECS Chan. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi I*. UI Press, Jakarta.
- Riyanti, Ida. 2009. *Biomassa sebagai Bahan Baku Bioetanol*. Jurnal Litbang 28(3).
- Sasser, M. 2009. *Microbial Identification by Gas Chromatographic Analysis of Fatty Acid Methyl Esters (GC-FAME)*. [www.midi-inc.com](http://www.midi-inc.com). Diunduh pada tanggal 8 September 2010, pukul 10.00 WIB.
- Setiawan, A. 2008. *Peran Enzim Amilase pada Tubuh*. <http://andhikse.blogspot.com/2008/11/peran-enzim-amilase-pada-tubuh-manusia.html>. Diunduh pada tanggal 28 Maret 2010, pukul 11:28 WIB.
- Soeharsono, Martoharsono. 2006. *Biokimia Jilid 2*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Sudjadi. 1988. *Metode Pemisahan*. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Sukumaran, R. K., Reeta R. S., Ashok Pandey. 2005. *Microbial Cellulases-Production, Applications and Challenges*. *Journal of Scientific & Industrial Research* 64, 832-844.
- Sun, Y., Cheng, J.Y., 2002. *Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: a review*. *Bioresource Technology* 83, 1–11.
- Supriyono. 2003. *Actinomycetes Selulolitik yang Diisolasi dari Tanah*. Skripsi. Jurusan Kimia FMIPA Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Teather, R. M. dan Petter J. Wood. 1982. *Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Apr. 1982, p. 777-780.
- Utari, D. W., 1997. *Kajian Kondisi Suhu Pertumbuhan, Kelembaban dan Ketebalan Media dalam menghasilkan Enzim Selulase oleh Kapang*

*Neurospora sitophila* pada fermentasi Jerami Padi. Skripsi. Jurusan Farmasi FMIPA-UI, Depok.

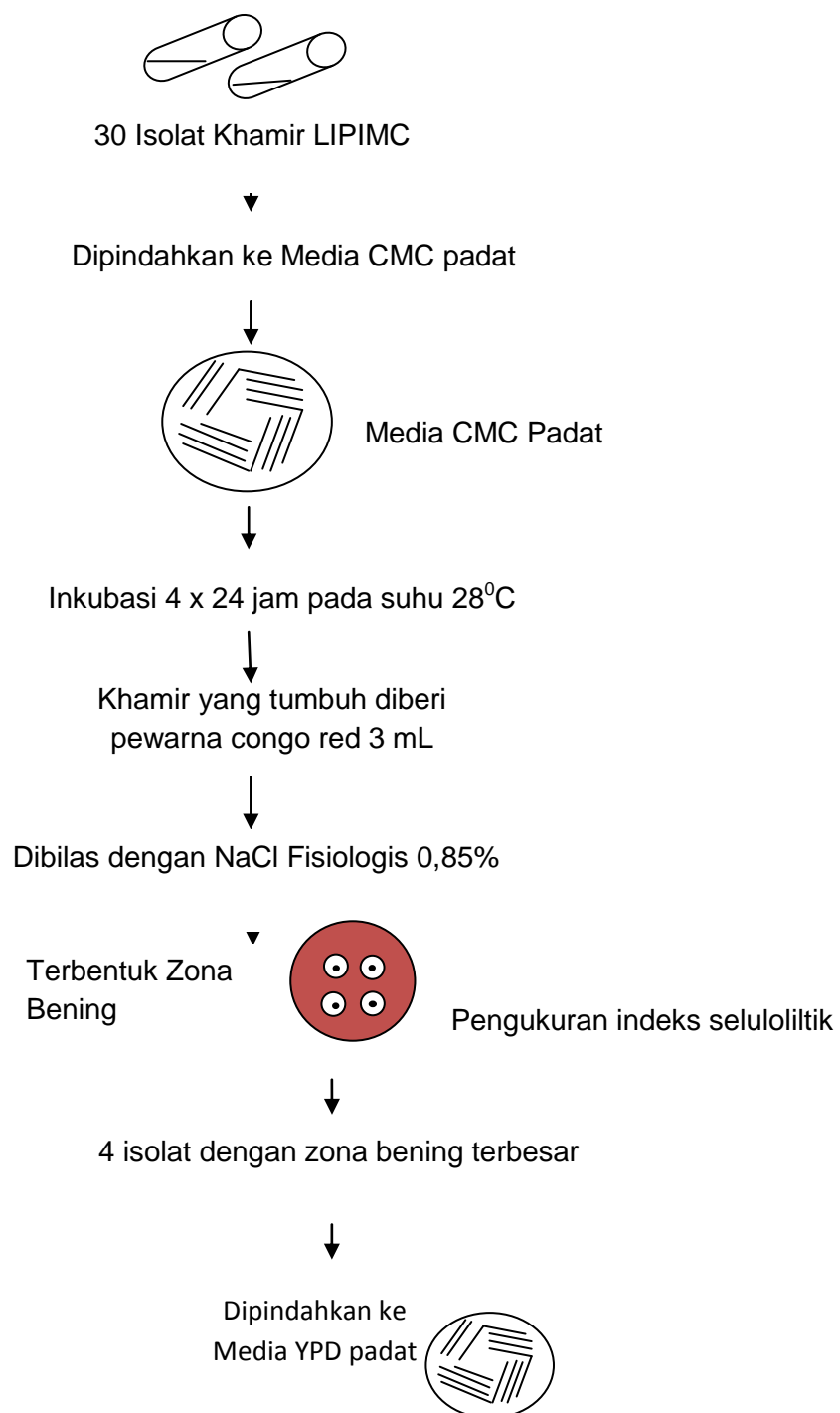
Yulia, E. 2010. *Diversitas Khamir Penghasil Lipid (Oleaginous Yeast) yang Diisolasi dari Tanah dan Serasah Kepulauan Raja Ampat Provinsi Papua Barat*. Skripsi. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas, Padang.

Zakpa, H. D., E. E. Mak-Mensah, and F. S. Johnson. 2009. *Production of Bio-ethanol from Corncobs Using Aspergillus niger and Saccharomyces cerevisiae in Simultaneous Saccharification and Fermentation*. African Journal of Biotechnology Vol. 8 (13), pp. 3018-3022, 6 July, 2009.

# LAMPIRAN

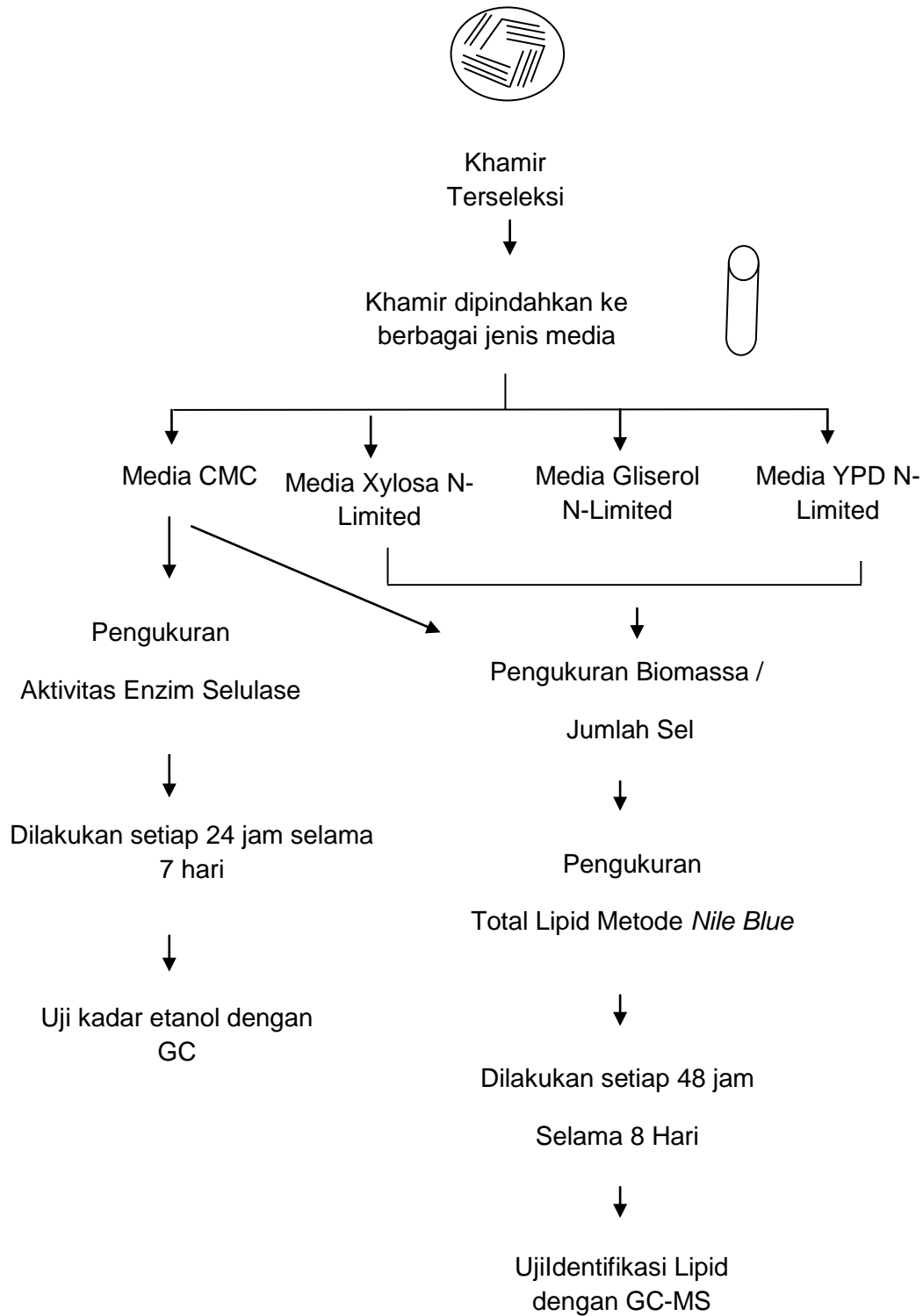
## Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian

### A. Penentuan Isolat

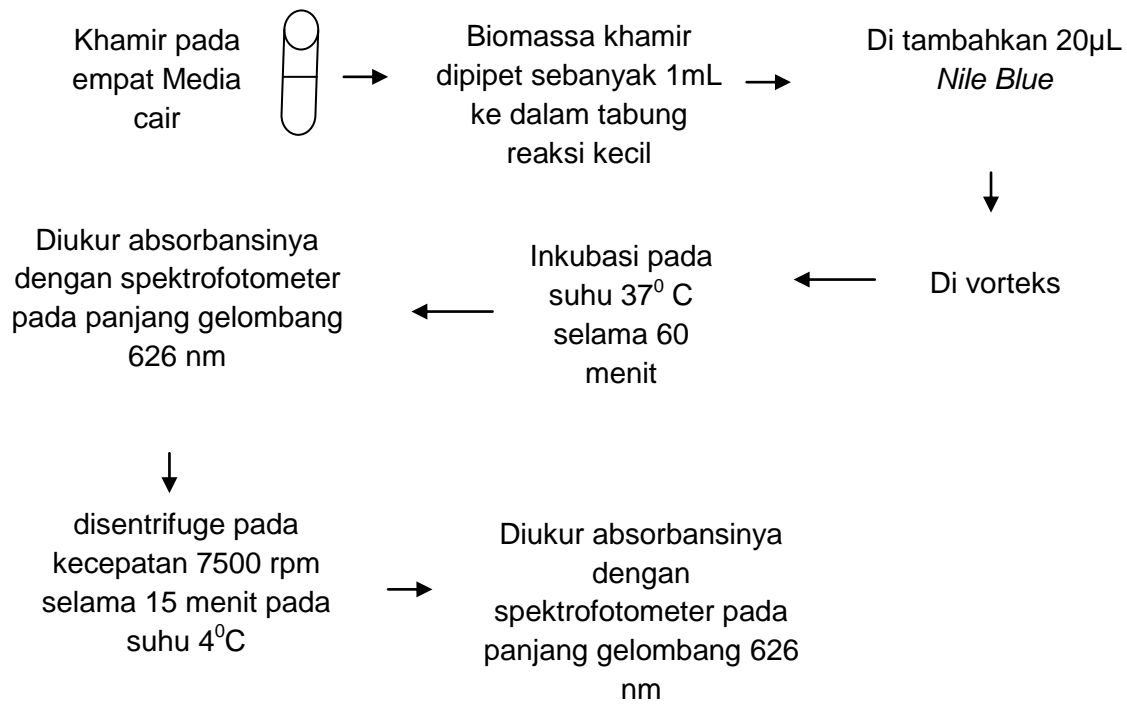




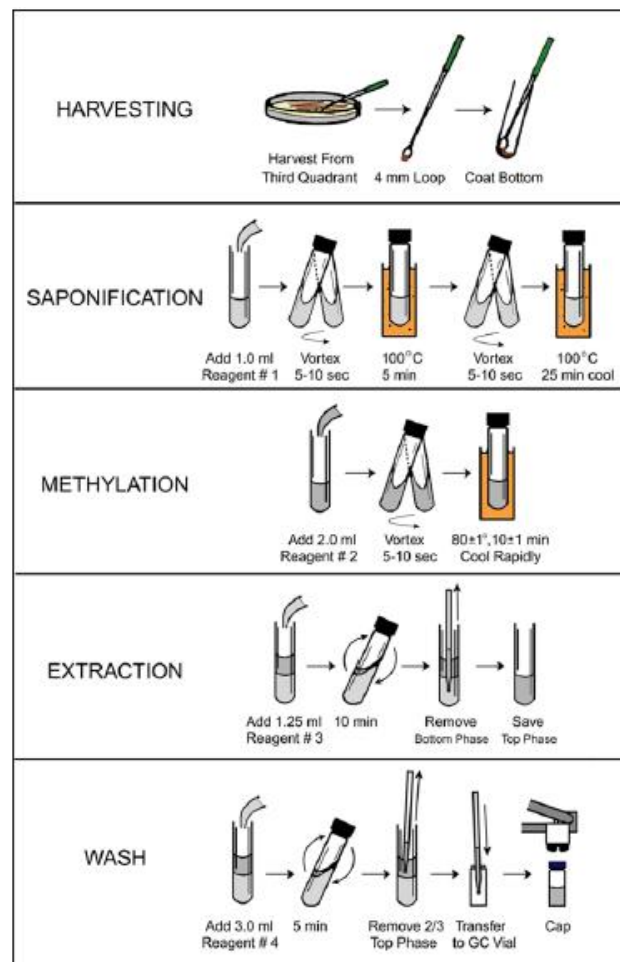
## B. Uji Hidrolisis Pada Berbagai Sumber Karbon



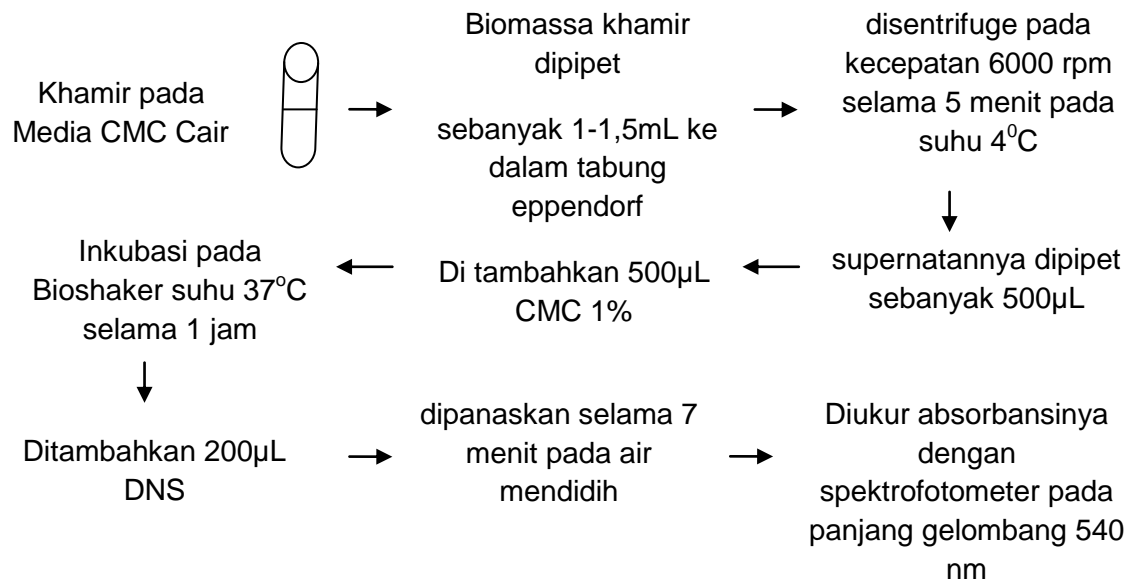
### C. Metode Suddan Black untuk Pengukuran Total Lipid



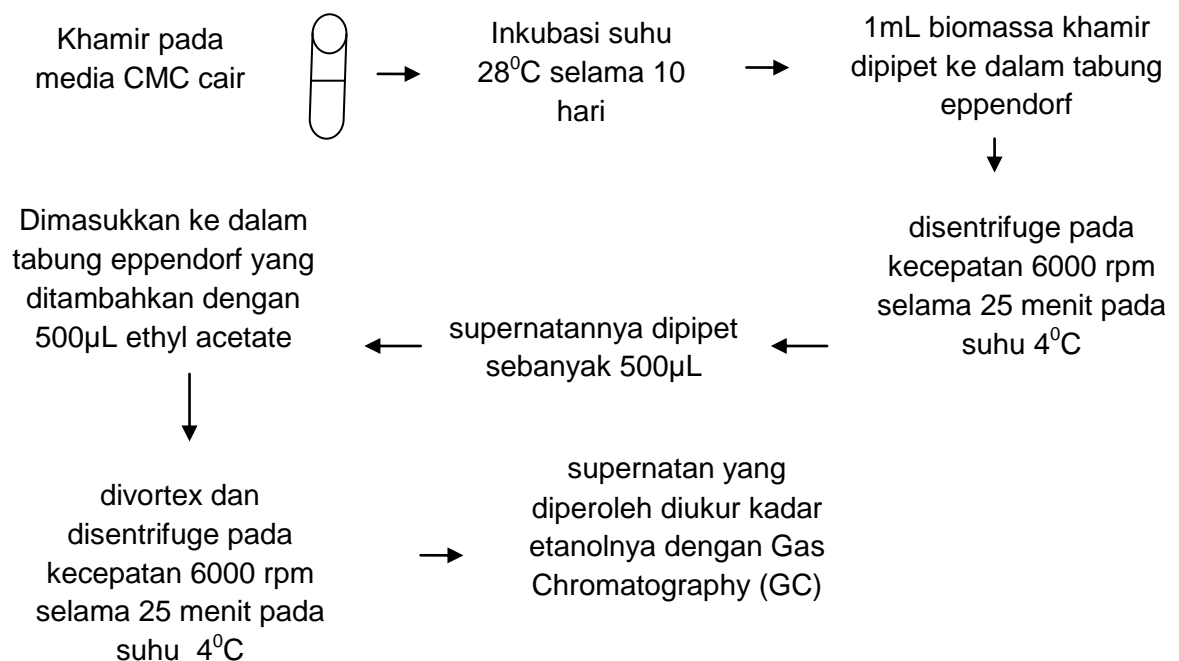
### D. Metode Pengujian Jenis Lipid



### E. Metode DNS Untuk Pengukuran Aktivitas Enzim



### F. Metode Pengujian etanol



## Lampiran 2. Pembuatan Kurva Standar

### 1. Kurva Standar Glukosa

Menyiapkan larutan glukosa dalam beberapa tabung reaksi dengan konsentrasi yang beraneka ragam yaitu 100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm, dan 500ppm. Konsentrasi dibuat dengan pengenceran bertingkat dari larutan induk 500ppm.

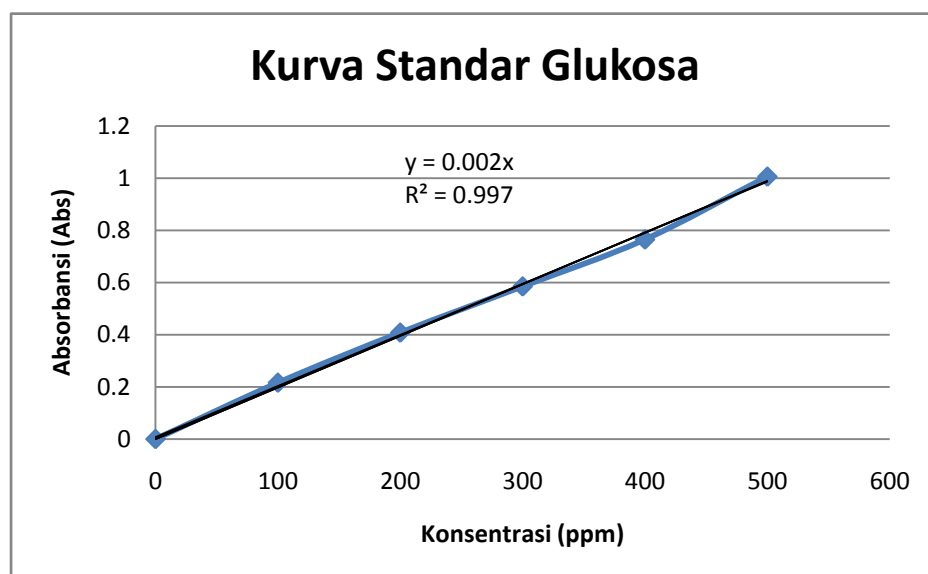
Tabel 3. Pengenceran bertingkat larutan glukosa 500ppm

Tabung	Volume Larutan Glukosa 500 ppm (mL)	Aquadest (mL)	Konsentrasi Larutan Glukosa (ppm)
1	0	1	0
2	10	40	100
3	20	30	200
4	30	20	300
5	40	10	400

Selanjutnya, mengambil sebanyak 0,5 mL dari setiap larutan standar glukosa dan ditambahkan 0,2 mL pereaksi DNS. Kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 7 menit. Kandungan glukosa diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm sehingga diperoleh persamaan garis lurus yang akan digunakan untuk perhitungan kandungan glukosa yang dihasilkan oleh aktivitas enzim CMC-ase.

Tabel 4. Absorbansi larutan standar glukosa

Larutan Standar Glukosa (ppm)	Absorbansi pada $\lambda=540\text{nm}$
0	0
100	0,216
200	0,408
300	0,585
400	0,765
500	1,006



Gambar 25. Kurva Standar Glukosa

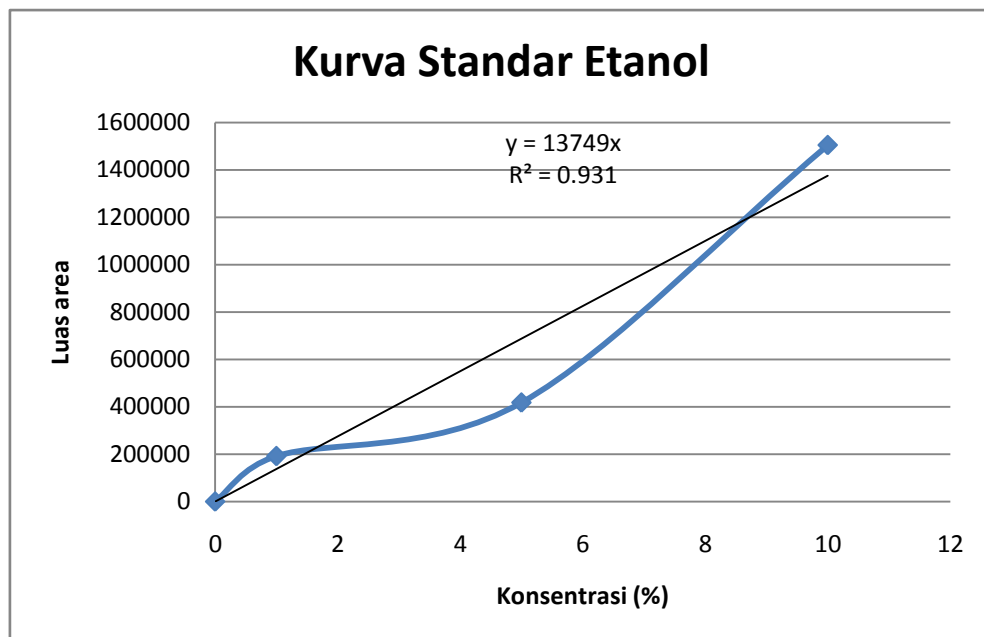
## 2. Kurva Standar Etanol

Menyiapkan larutan standar etanol dengan berbagai konsentrasi, diantaranya 1%, 5%, dan 10%. Larutan standar diperoleh dengan cara pengenceran bertingkat dari 10mL larutan etanol 50%. Larutan Etanol 50% didapat dengan cara mengencerkan 5,2 mL larutan etanol 96% hingga volumenya tepat 10mL.

Tabel 5. Pengenceran bertingkat larutan etanol 50%

Tabung	Volume Larutan Etanol 50% (mL)	Aquadest (mL)	Konsentrasi Larutan Etanol (%)
1	0	1	0
2	0,02	0,98	1
3	0,10	0,90	5
4	0,20	0,80	10

Masing-masing tabung kemudian diekstraksi dengan 500  $\mu$ L etil asetat, lalu diinjeksikan ke dalam gas kromatografi sebanyak 1  $\mu$ L. Kurva standar etanol dibuat dengan membandingkan luas area peak dengan konsentrasi larutan standar etanol.

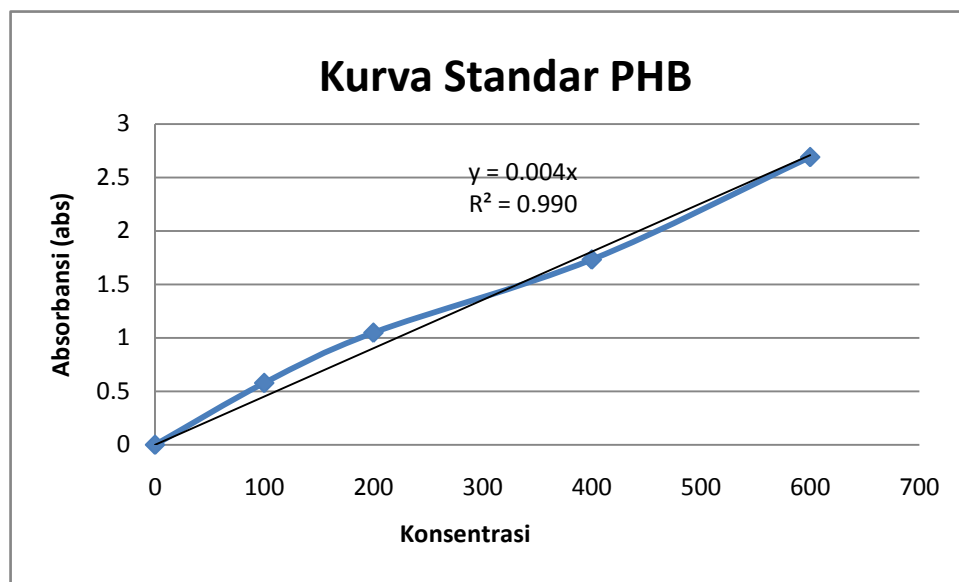


Gambar 26. Kurva Standar Etanol

### 3. Kurva Standar PHB

Tabel 6. Absorbansi larutan standar PHB

Larutan Standar PHB (ppm)	Absorbansi pada lamda 626nm
0	0
100	0,578
200	1,048
400	1,732
600	2,690



Gambar 27. Kurva Standar PHB

### Lampiran 3. Perhitungan Aktivitas Enzim Selulase

Perhitungan untuk menentukan aktivitas enzim (U) dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Hasil pengukuran absorbansi aktivitas enzim masing-masing isolat dimasukkan ke dalam persamaan regresi kurva sebagai sumbu Y sehingga didapatkan sumbu X (konsentrasi glukosa).
2. Konsentrasi glukosa (sumbu X) yang telah didapatkan selanjutnya diubah satuannya menjadi mmol/mL dengan cara membagi dengan berat molekul glukosa ( $M_r$  glukosa=180 gr/mol).
3. Aktivitas enzim selulase dapat ditentukan dengan menggunakan rumus:

$$U = \frac{\text{Konsentrasi Glukosa (X)} \times V}{(p \times q)}$$

Keterangan :

U= Aktivitas Enzim Unit

V= Volume total larutan yang disentrifugasi (mL)

p= Volume enzim kasar yang direaksikan(mL)

q= Waktu inkubasi (jam)



Tabel 7. Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase

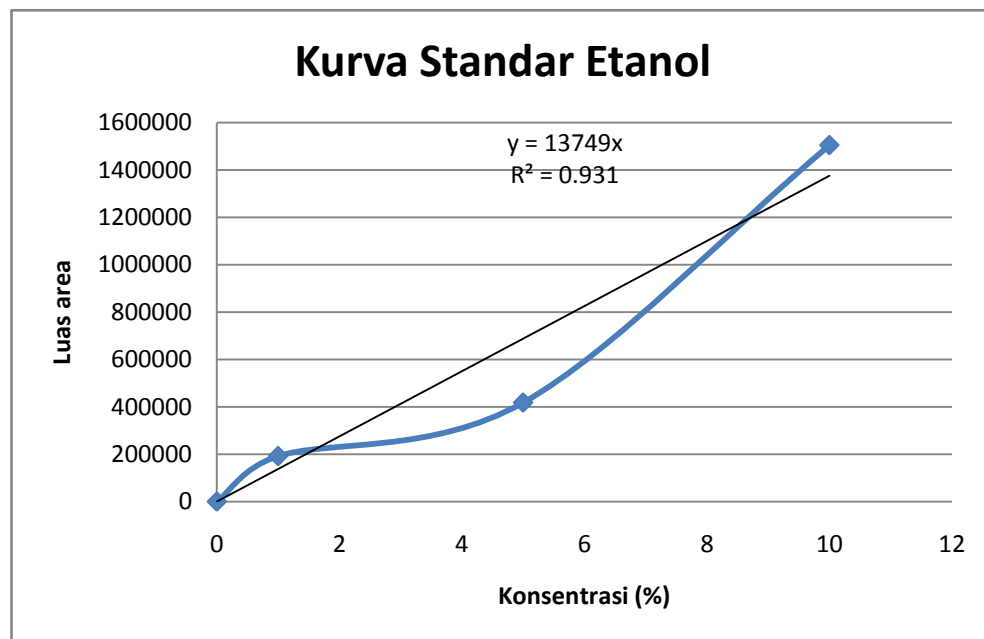
Isolat	Hari	Enzim		Mean	mg Glukosa	Dikurang Kontrol	DF 2	mMol Glukosa
		Ulangan 1	Ulangan 2					
P.L.3.DP.6	0	0,033	0,033	0,033	16,550	5,300	10,600	0,059
	1	0,096	0,097	0,097	48,275	37,025	74,050	0,411
	2	0,114	0,113	0,113	56,675	45,425	90,850	0,505
	3	0,101	0,101	0,101	50,250	39,000	78,000	0,433
	4	0,101	0,101	0,101	50,250	39,000	78,000	0,433
	5	0,088	0,088	0,088	44,100	32,850	65,700	0,365
	6	0,087	0,086	0,087	43,425	32,175	64,350	0,358
	7	0,087	0,087	0,087	43,600	32,350	64,700	0,359
			blanko	0,023	11,250			

Isolat	Hari	Enzim		Mean	mg Glukosa	Dikurang Kontrol	DF 2	mMol Glukosa
		Ulangan 1	Ulangan 2					
P.L.1.W.2	0	0,056	0,056	0,056	27,875	16,625	33,250	0,185
	1	0,057	0,058	0,057	28,650	17,400	34,800	0,193
	2	0,060	0,060	0,060	29,850	18,600	37,200	0,207
	3	0,055	0,052	0,053	26,700	15,450	30,900	0,172
	4	0,044	0,044	0,044	22,050	10,800	21,600	0,120
	5	0,039	0,040	0,039	19,700	8,450	16,900	0,094
	6	0,035	0,034	0,035	17,250	6,000	12,000	0,067
	7	0,039	0,040	0,039	19,725	8,475	16,950	0,094
			blanko	0,023	11,250			

Isolat	Hari	Enzim		Mean	mg Glukosa	Dikurang Kontrol	DF 2	mMol Glukosa
		Ulangan 1	Ulangan 2					
P.L.3.DP.9	0	0,050	0,051	0,050	25,125	13,875	27,750	0,154
	1	0,085	0,085	0,085	42,525	31,275	62,550	0,348
	2	0,118	0,118	0,118	59,050	47,800	95,600	0,531
	3	0,119	0,120	0,119	59,625	48,375	96,750	0,538
	4	0,123	0,123	0,123	61,675	50,425	100,850	0,560
	5	0,128	0,128	0,128	64,150	52,900	105,800	0,588
	6	0,129	0,129	0,129	64,550	53,300	106,600	0,592
	7	0,095	0,095	0,095	47,350	36,100	72,200	0,401
				blanko	0,023	11,250		

Isolat	Hari	Enzim		Mean	mg Glukosa	Dikurang Kontrol	DF 2	mMol Glukosa
		Ulangan 1	Ulangan 2					
P.Le.6.DP.6	0	0,040	0,040	0,040	19,925	8,675	17,350	0,096
	1	0,065	0,065	0,065	32,650	21,400	42,800	0,238
	2	0,097	0,097	0,097	48,425	37,175	74,350	0,413
	3	0,075	0,075	0,075	37,675	26,425	52,850	0,294
	4	0,065	0,065	0,065	32,500	21,250	42,500	0,236
	5	0,052	0,052	0,052	25,975	14,725	29,450	0,164
	6	0,049	0,049	0,049	24,475	13,225	26,450	0,147
	7	0,065	0,065	0,065	32,450	21,200	42,400	0,236
				blanko	0,023	11,250		

## Lampiran 4. Perhitungan Konsentrasi/Kadar Etanol pada Media CMC cair



Persamaan garis:  $y = 13749 x$

Dimana,  $y =$  luas area

$X =$  konsentrasi/kadar (%)

Konsentrasi/kadar etanol sampel dapat ditentukan dengan menggunakan rumus:

$$x = \frac{y}{13749}$$

Tabel 8. Hasil Pengukuran Etanol dengan GC

Isolat	Luas Area
P.L.3.DP.6	159657
P.L.1.W.2	8380
P.L.3.DP.9	25072
P.Le.6.DP.6	3710

Tabel 9. Konsentrasi/Kadar Etanol yang dihasilkan dari tiap Isolat

Isolat	Konsentrasi/Kadar Etanol (%)
P.Le.3.DP.6	11,61
P.L.1.W.2	0,61
P.L.3.DP.9	1,82
P.Le.6.DP.6	0,27

## Lampiran 5. Perhitungan Total Lipid Produksi

Total Lipid produksi diperoleh dengan menggunakan rumus:

$$\text{Total lipid} = A \text{ sebelum disentrifuge} - A \text{ sesudah disentrifuge}$$

Tabel 10. Pengukuran Total Lipid Produksi

### a. Media Gliserol N-Limited

Hari	Isolat P.L.1.W.2							
	sebelum sentrifuge		sesudah sentrifuge		total lipid		Mean	dikurang kontrol
0	1,549	1,549	1,255	1,254	0,294	0,295	0,295	0,204
2	3,376	3,363	1,666	1,656	1,710	1,708	1,709	1,618
4	3,450	3,450	0,971	0,970	2,479	2,480	2,479	2,389

6	3,363	3,363	0,966	0,966	2,398	2,397	2,397	2,307
8	3,450	3,449	1,031	1,030	2,419	2,419	2,419	2,329

Hari	Isolat P.L.3.DP.9							
	sebelum sentrifuge		sesudah sentrifuge		total lipid		Mean	dikurang kontrol
0	1,549	1,549	1,204	1,206	0,345	0,343	0,344	0,253
2	3,450	3,450	1,427	1,427	2,023	2,023	2,023	1,933
4	3,363	3,363	2,401	2,401	0,962	0,962	0,962	0,872
6	3,062	3,062	2,865	2,865	0,197	0,197	0,197	0,106
8	2,665	2,662	2,542	2,542	0,122	0,120	0,121	0,031

Hari	Isolat P.L.3.DP.6							
	sebelum sentrifuge		sesudah sentrifuge		total lipid		Mean	dikurang kontrol
0	1,545	1,547	1,219	1,22	0,326	0,327	0,327	0,236
2	3,062	3,062	1,043	1,043	2,019	2,019	2,019	1,929
4	3,363	3,363	1,046	1,046	2,318	2,318	2,318	2,227
6	3,062	3,062	0,926	0,926	2,136	2,136	2,136	2,046
8	3,062	3,062	1,026	1,026	2,036	2,036	2,036	1,945

Hari	Isolat P.Le.6.DP.6							
	sebelum sentrifuge		sesudah sentrifuge		total lipid		Mean	dikurang kontrol
0	1,549	1,55	1,133	1,137	0,416	0,413	0,415	0,324
2	3,363	3,363	1,106	1,106	2,257	2,258	2,257	2,167
4	3,45	3,45	0,883	0,883	2,567	2,567	2,567	2,367
6	3,363	3,363	1,065	1,065	2,299	2,298	2,298	2,208
8	3,45	3,448	1,435	1,435	2,015	2,013	2,014	1,923

#### b. Media YPD N-Limited

Hari	Isolat P.L.1.W.2							
	sebelum sentrifuge		sesudah sentrifuge		total lipid		Mean	dikurang kontrol
0	1,556	1,553	1,024	1,019	0,532	0,534	0,533	0,333
2	3,363	3,363	1,873	1,872	1,490	1,491	1,491	1,291
4	3,450	3,450	2,043	2,043	1,408	1,407	1,407	1,208
6	3,363	3,361	1,274	1,272	2,090	2,089	2,089	1,890

8	3,450	3,450	1,390	1,390	2,060	2,060	2,060	1,860
---	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Hari	Isolat P.L.3.DP.9							
	sebelum sentrifuge		sesudah sentrifuge		total lipid		Mean	dikurang kontrol
0	1,534	1,532	0,932	0,929	0,602	0,603	0,603	0,403
2	2,518	2,518	1,784	1,784	0,735	0,735	0,735	0,535
4	2,665	2,665	1,91	1,911	0,754	0,753	0,754	0,554
6	2,133	2,133	0,826	0,825	1,307	1,308	1,308	1,108
8	2,187	2,185	0,936	0,935	1,252	1,25	1,251	1,051

Hari	Isolat P.L.3.DP.6							
	sebelum sentrifuge		sesudah sentrifuge		total lipid		Mean	dikurang kontrol
0	1,550	1,540	0,993	0,982	0,557	0,558	0,558	0,358
2	3,363	3,363	1,420	1,420	1,943	1,943	1,943	1,744
4	3,062	3,062	1,517	1,517	1,545	1,545	1,545	1,346
6	2,665	2,665	0,496	0,496	2,169	2,169	2,169	1,969
8	2,585	2,585	0,557	0,557	2,029	2,028	2,028	1,829

Hari	Isolat P.Le.6.DP.6							
	sebelum sentrifuge		sesudah sentrifuge		total lipid		Mean	dikurang kontrol
0	1,528	1,529	0,926	0,927	0,602	0,602	0,602	0,402
2	3,062	3,062	1,701	1,701	1,362	1,362	1,362	1,162
4	3,363	3,363	1,947	1,949	1,416	1,415	1,415	1,216
6	3,363	3,363	0,836	0,836	2,528	2,527	2,527	2,328
8	3,363	3,363	1,02	1,02	2,343	2,344	2,343	2,253

### c. Media Xylosa N-Limited

Hari	Isolat P.L.1.W.2							
	sebelum sentrifuge		sesudah sentrifuge		total lipid		Mean	dikurang kontrol
0	1,547	1,549	1,311	1,313	0,236	0,236	0,236	0,014
2	3,062	3,062	1,845	1,845	1,217	1,218	1,217	0,996
4	3,363	3,363	1,949	1,949	1,415	1,415	1,415	1,193
6	3,363	3,363	1,305	1,305	2,059	2,058	2,058	1,837
8	3,45	3,45	1,505	1,503	1,945	1,947	1,947	1,725

Hari	Isolat P.L.3.DP.9							
	sebelum sentrifuge		sesudah sentrifuge		total lipid		Mean	dikurang kontrol
0	1,539	1,537	1,333	1,334	0,206	0,203	0,205	0,017
2	2,585	2,585	1,887	1,886	0,699	0,699	0,699	0,477
4	3,062	3,062	2,316	2,316	0,746	0,746	0,746	0,524
6	2,886	2,886	1,647	1,647	1,239	1,239	1,239	1,017
8	3,086	3,085	1,677	1,677	1,41	1,408	1,408	1,186

Hari	Isolat P.L.3.DP.6							
	sebelum sentrifuge		sesudah sentrifuge		total lipid		Mean	dikurang kontrol
0	1,544	1,547	1,389	1,391	0,155	0,156	0,156	0,066
2	3,062	3,062	2,108	2,108	0,954	0,954	0,954	0,732
4	3,363	3,363	2,330	2,330	1,033	1,033	1,033	0,811
6	3,062	3,062	1,028	1,028	2,035	2,034	2,034	1,813
8	3,062	3,060	1,328	1,328	1,735	1,732	1,732	1,510

Hari	Isolat P.Le.6.DP.6							
	sebelum sentrifuge		sesudah sentrifuge		total lipid		Mean	dikurang kontrol
0	1,547	1,547	1,282	1,280	0,265	0,267	0,266	0,044
2	2,322	2,409	1,514	1,600	0,808	0,809	0,809	0,587
4	3,363	3,363	1,917	1,916	1,446	1,447	1,447	1,225
6	3,062	3,062	0,861	0,860	2,201	2,202	2,202	1,980
8	2,761	2,762	0,761	0,760	2,000	2,002	2,002	1,780

#### d. Media CMC

Hari	Isolat P.L.1.W.2							
	sebelum sentrifuge		sesudah sentrifuge		total lipid		Mean	dikurang kontrol
0	1,544	1,548	1,519	1,525	0,025	0,023	0,024	0,009
2	2,25	2,322	1,886	1,962	0,364	0,36	0,362	0,347
4	2,363	2,363	1,932	1,932	0,431	0,431	0,431	0,416
6	1,085	1,083	0,398	0,397	0,686	0,686	0,686	0,671

8	1,085	1,085	0,598	0,598	0,487	0,487	0,487	0,472
---	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

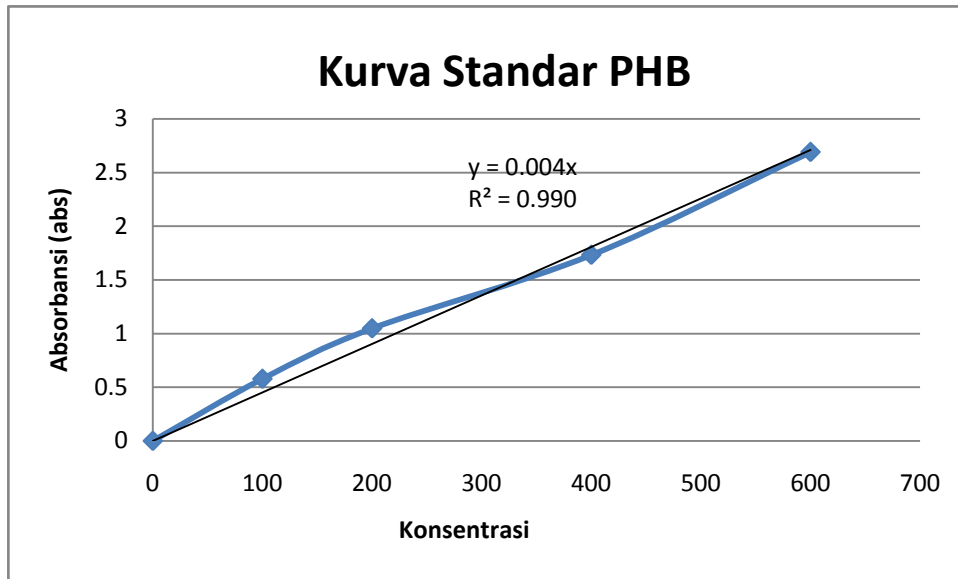
Hari	Isolat P.L.3.DP.9							
	sebelum sentrifuge		sesudah sentrifuge		total lipid		Mean	dikurang kontrol
0	1,523	1,525	1,475	1,476	0,048	0,049	0,048	0,033
2	1,309	1,309	1,250	1,250	0,059	0,059	0,059	0,044
4	2,409	2,413	2,363	2,368	0,046	0,045	0,045	0,030
6	2,518	2,515	2,363	2,365	0,155	0,150	0,153	0,138
8	1,439	1,438	1,409	1,409	0,030	0,029	0,030	0,015

Hari	Isolat P.L.3.DP.6							
	sebelum sentrifuge		sesudah sentrifuge		total lipid		Mean	dikurang kontrol
0	1,542	1,539	1,506	1,504	0,036	0,035	0,036	0,021
2	2,363	2,363	2,322	2,322	0,041	0,041	0,041	0,026
4	2,409	2,407	2,363	2,363	0,046	0,044	0,045	0,030
6	1,299	1,299	1,110	1,110	0,189	0,189	0,189	0,174
8	1,165	1,163	1,110	1,109	0,055	0,054	0,054	0,039

Hari	Isolat P.Le.6.DP.6							
	sebelum sentrifuge		sesudah sentrifuge		total lipid		Mean	dikurang kontrol
0	1,547	1,546	1,522	1,524	0,025	0,022	0,024	0,008
2	2,518	2,518	2,25	2,25	0,269	0,269	0,269	0,254
4	2,518	2,518	2,187	2,188	0,331	0,331	0,331	0,316
6	1,377	1,376	0,766	0,765	0,611	0,611	0,611	0,596
8	1,359	1,359	0,89	0,889	0,469	0,47	0,47	0,455



## Lampiran 6. Perhitungan Konsentrasi Lipid Produksi



Persamaan garis:  $y = 0,004 x$

Dimana,  $y$  = absorbansi

$X$  = konsentrasi (ppm)

Konsentrasi lipid produksi dapat ditentukan dengan menggunakan rumus:

$$X = \frac{y}{0,004}$$

Tabel 11. Pengukuran Total Lipid Produksi dari tiap Isolat

### a. Isolat P.L.1.W.2

Media \ Hari	Absorbansi				
	0	2	4	6	8
gliserol N-Limited	0,204	1,618	2,389	2,307	2,329
YPD N-Limited	0,333	1,291	1,208	1,89	1,86
xylosa N-Limited	0,014	0,996	1,193	1,837	1,725
CMC	0,009	0,347	0,416	0,671	0,472

**b. Isolat P.L.3.DP.9**

Media \ Hari	Absorbansi				
	0	2	4	6	8
gliserol N-Limited	0,253	1,933	0,872	0,106	0,031
YPD N-Limited	0,403	0,535	0,554	1,108	1,051
xylosa N-Limited	0,017	0,477	0,524	1,017	1,186
CMC	0,033	0,044	0,030	0,138	0,015

**c. Isolat P.L.3.DP.6**

Media \ Hari	Absorbansi				
	0	2	4	6	8
gliserol N-Limited	0,236	1,929	2,227	2,046	1,945
YPD N-Limited	0,358	1,744	1,346	1,969	1,829
xylosa N-Limited	0,066	0,732	0,811	1,813	1,510
CMC	0,021	0,026	0,030	0,174	0,039

**d. Isolat P.Le.6.DP.6**

Media \ Hari	Absorbansi				
	0	2	4	6	8
gliserol N-Limited	0,324	2,167	2,367	2,208	1,923
YPD N-Limited	0,402	1,162	1,216	2,328	2,253
xylosa N-Limited	0,044	0,587	1,225	1,980	1,780
CMC	0,008	0,254	0,316	0,596	0,455

Tabel 12. Konsentrasi Lipid Produksi dari tiap Isolat

**a. Isolat P.L.1.W.2**

Media \ Hari	Konsentrasi Lipid (ppm)				
	0	2	4	6	8
gliserol N-Limited	51,000	404,500	597,250	576,750	582,250
YPD N-Limited	83,250	322,750	302,000	472,500	465,000
xylosa N-Limited	3,500	249,000	298,250	459,250	431,250
CMC	2,250	86,750	104,000	167,750	118,000

**b. Isolat P.L.3.DP.9**

Media \ Hari	Konsentrasi Lipid (ppm)				
	0	2	4	6	8
gliserol N-Limited	63,250	483,250	218,000	26,500	7,750
YPD N-Limited	100,750	133,750	138,500	277,000	262,750
xylosa N-Limited	4,250	249,000	298,250	459,250	431,250
CMC	8,250	11,000	7,500	34,500	3,750

**c. Isolat P.L.3.DP.6**

Media \ Hari	Konsentrasi Lipid (ppm)				
	0	2	4	6	8
gliserol N-Limited	59,000	482,250	556,750	511,500	486,250
YPD N-Limited	89,500	436,000	336,500	492,250	457,250
xylosa N-Limited	16,500	183,000	202,750	453,250	377,500
CMC	5,250	6,500	7,500	43,500	9,750

**d. Isolat P.Le.6.DP.6**

Media \ Hari	Konsentrasi Lipid (ppm)				
	0	2	4	6	8
gliserol N-Limited	81,000	541,750	591,750	552,000	480,750
YPD N-Limited	100,500	290,500	304,000	582,000	563,250
xylosa N-Limited	11,000	146,750	306,250	495,000	445,000
CMC	2,000	63,500	79,000	149,000	113,750

## Lampiran 7. Perhitungan Persentase Kandungan Lipid dalam Sel Khamir

Persentase kandungan lipid dalam sel khamir dapat ditentukan dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Lipid} = \frac{\text{Konsentrasi lipid yang dihasilkan (ppm)}}{\text{Berat kering biomassa (ppm)}} \times 100\%$$

Tabel 13. Berat Kering Biomassa Khamir

<b>Media</b> <b>Isolat</b>	<b>Media Gliserol N-Limited (mg/L)</b>	<b>Media YPD N-Limited (mg/L)</b>	<b>Media Xylosa N-Limited (mg/L)</b>	<b>Media CMC (mg/L)</b>
P.L.3.DP.6	1.666,67	1.666,67	9.166,67	1.666,67
P.L.1.W.2	4.166,67	13.333,33	12.000,00	3.000,00
P.L.3.DP.9	3.333,33	2.500,00	5.833,33	1.666,67
P.Le.6.DP.6	3.333,33	3.333,33	3.000,00	2.500,00

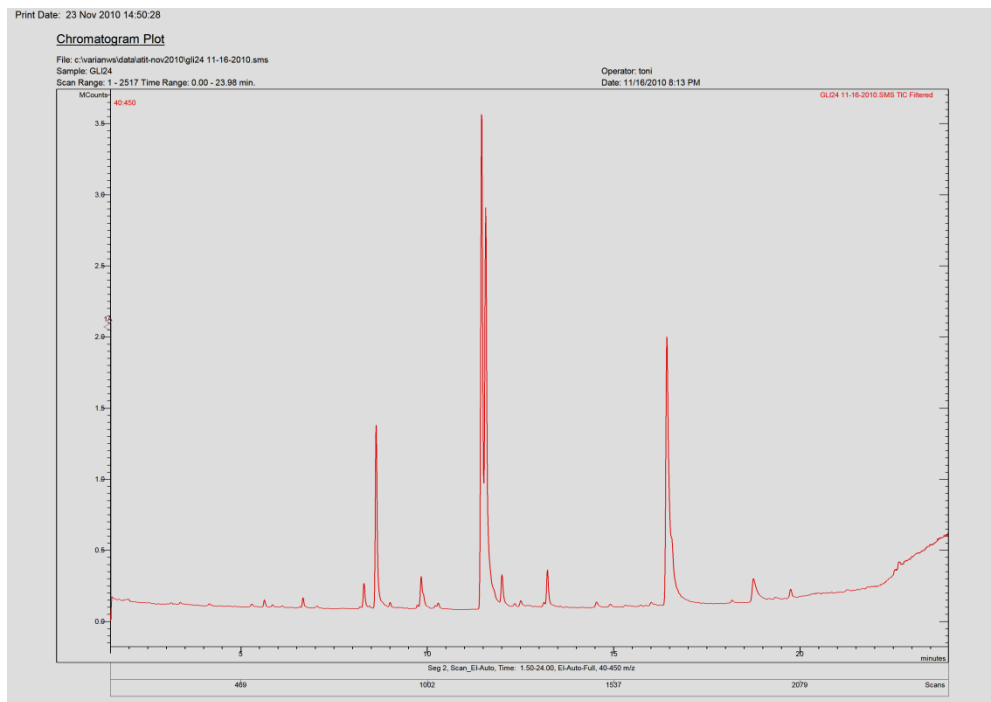
Tabel 14. Persentase Kandungan Lipid dalam Sel Khamir

<b>Media</b> <b>Isolat</b>	<b>Media Gliserol N-Limited (%)</b>	<b>Media YPD N-Limited (%)</b>	<b>Media Xylosa N-Limited (%)</b>	<b>Media CMC (%)</b>
P.L.3.DP.6	33,40	29,54	4,95	2,61
P.L.1.W.2	14,33	3,54	3,83	5,59
P.L.3.DP.9	14,50	11,08	5,08	2,07
P.Le.6.DP.6	16,90	17,75	16,50	5,96

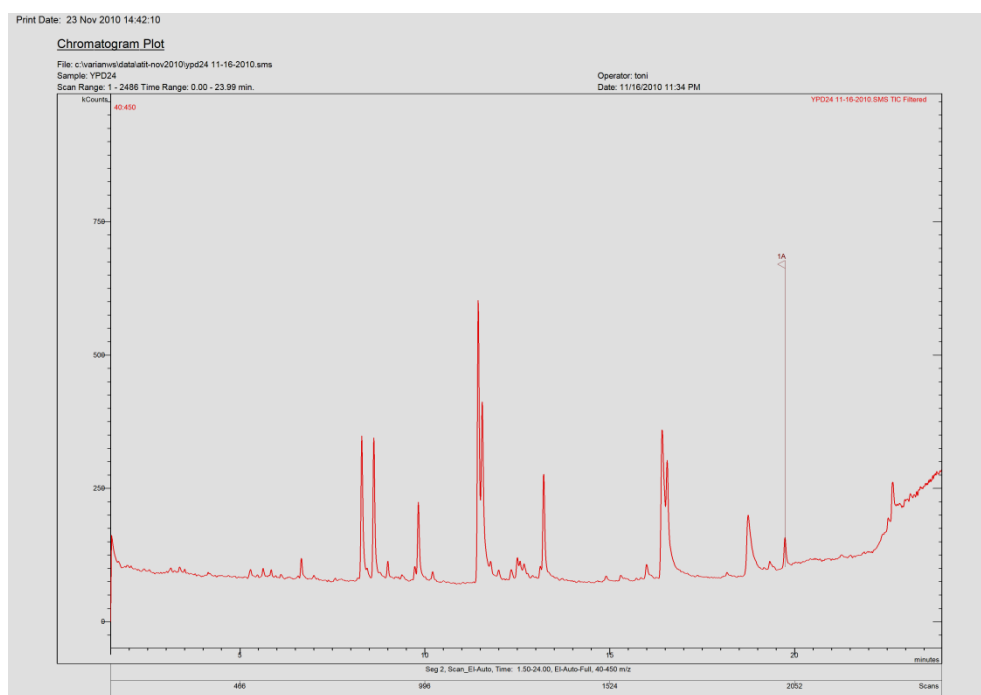
## Lampiran 8. Hasil Uji GC-MS (LIPID)

Berikut ini adalah gambar kromatogram hasil uji GC:

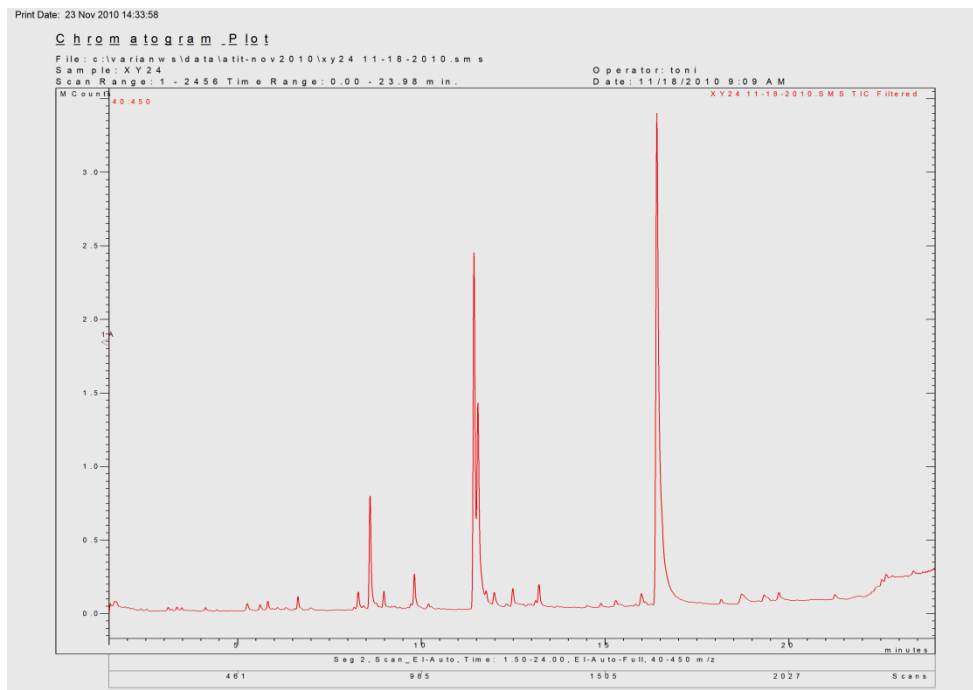
a. Isolat P.L.3.DP.6 pada media gliserol N-Limited



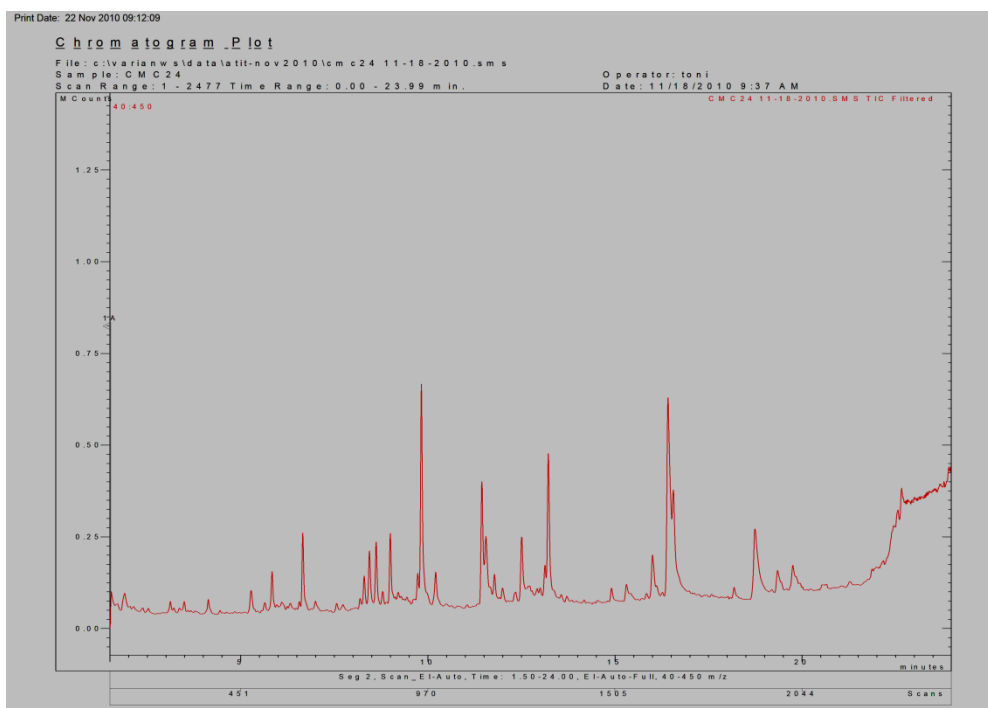
b. Isolat P.L.3.DP.6 pada media YPD N-Limited



## c. Isolat P.L.3.DP.6 pada media xylosa N-Limited



## d. Isolat P.L.3.DP.6 pada media CMC



Gambar 28. Gambar Kromatogram Hasil Uji GC (LIPID)

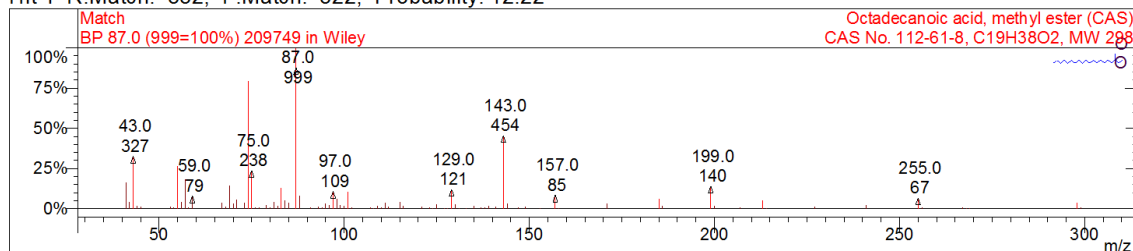
Berikut ini adalah gambar kromatogram hasil uji MS:

a. Peak 1 waktu retensi 5,621 menit

Print Date: 23 Nov 2010 14:34:48

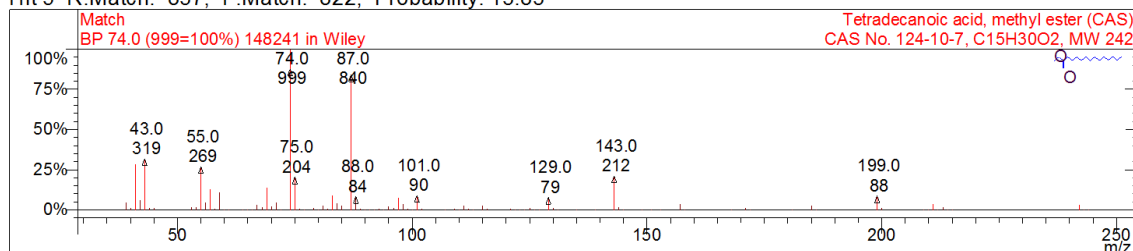
Best 5 Hits of Search NIST Libraries for Spectrum - Page 2

Hit 4 R.Match: 882, F.Match: 822, Probability: 12.22



Spectrum 209749 from Wiley Library  
Name: Octadecanoic acid, methyl ester (CAS)  
Pair Count: 97 MW: 298 Formula: C<sub>19</sub>H<sub>38</sub>O<sub>2</sub>  
CAS No: 112-61-8 Acquired Range: 41.0 - 301.0 m/z

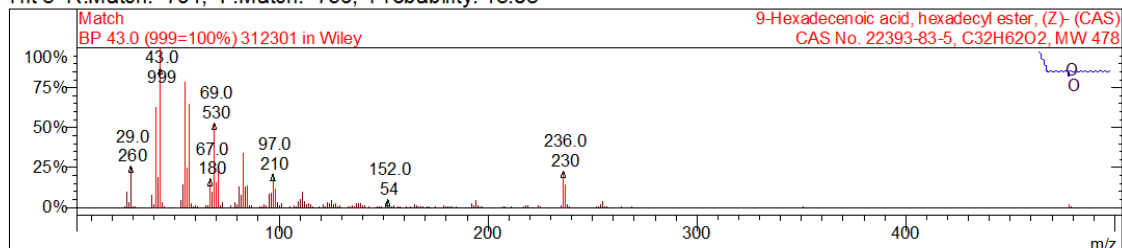
Hit 5 R.Match: 837, F.Match: 822, Probability: 13.83



Spectrum 148241 from Wiley Library  
Name: Tetradecanoic acid, methyl ester (CAS)  
Pair Count: 125 MW: 242 Formula: C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>  
CAS No: 124-10-7 Acquired Range: 39.0 - 244.0 m/z

b. Peak 2 waktu retensi 8,285 menit

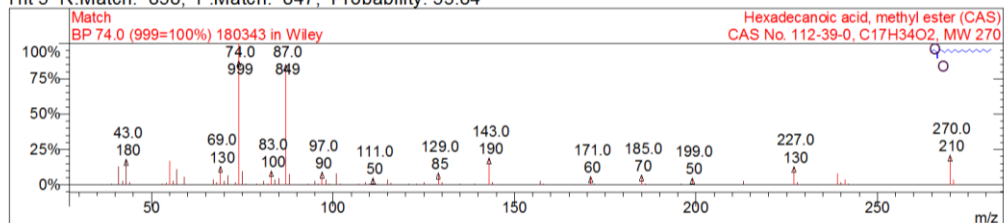
Hit 3 R.Match: 791, F.Match: 769, Probability: 13.83



Spectrum 312301 from Wiley Library  
Name: 9-Hexadecenoic acid, hexadecyl ester, (Z)- (CAS)  
Pair Count: 263 MW: 478 Formula: C<sub>32</sub>H<sub>62</sub>O<sub>2</sub>  
CAS No: 22393-83-5 Acquired Range: 26.0 - 481.0 m/z

## c. Peak 3 waktu retensi 8,626 menit

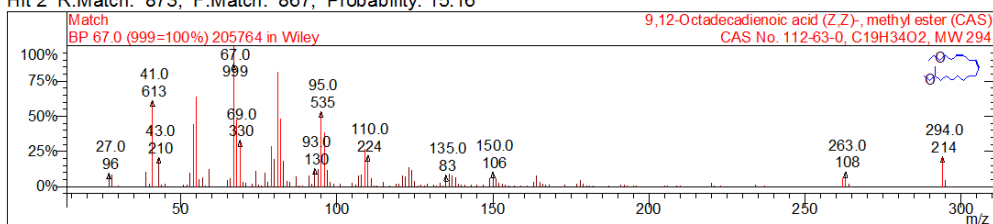
Hit 5 R.Match: 858, F.Match: 847, Probability: 33.84



Spectrum 180343 from Wiley Library  
Name: Hexadecanoic acid, methyl ester (CAS)  
Pair Count: 74 MW: 270 Formula: C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>  
CAS No: 112-39-0 Acquired Range: 39.0 - 273.0 m/z

## d. Peak 4 waktu retensi 11,459 menit

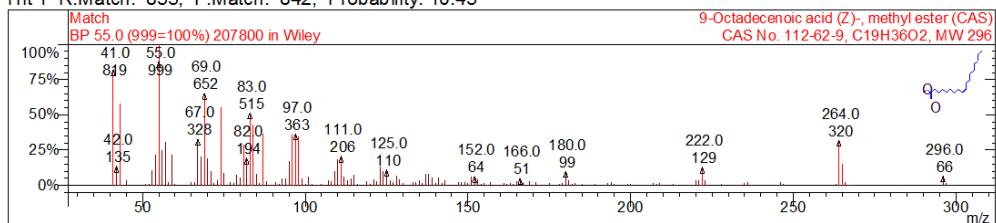
Hit 2 R.Match: 873, F.Match: 867, Probability: 15.16



Spectrum 205764 from Wiley Library  
Name: 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester (CAS)  
Pair Count: 134 MW: 294 Formula: C<sub>19</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>  
CAS No: 112-63-0 Acquired Range: 27.0 - 297.0 m/z

## e. Peak 5 waktu retensi 11,562 menit

Hit 1 R.Match: 853, F.Match: 842, Probability: 10.45

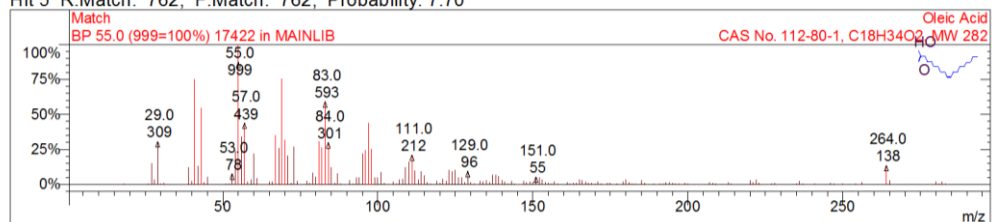


Spectrum 207800 from Wiley Library  
Name: 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester (CAS)  
Pair Count: 159 MW: 296 Formula: C<sub>19</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>  
CAS No: 112-62-9 Acquired Range: 40.0 - 299.0 m/z



## f. Peak 6 waktu retensi 11,764 menit

Hit 5 R.Match: 762, F.Match: 762, Probability: 7.70



Spectrum 17422 from MAINLIB Library

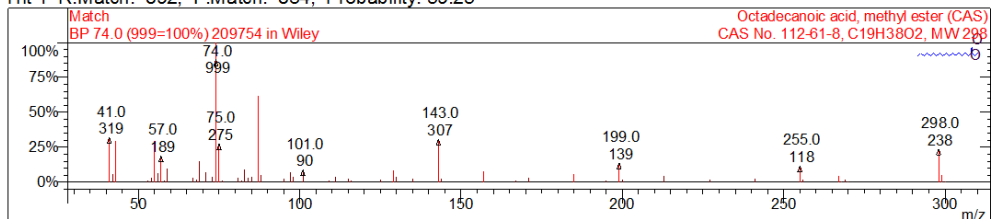
Name: Oleic Acid

Pair Count: 247 MW: 282 Formula: C18H34O2

CAS No: 112-80-1 Acquired Range: 14.0 - 284.0 m/z

## g. Peak 7 waktu retensi 12,011

Hit 1 R.Match: 892, F.Match: 834, Probability: 59.25



Spectrum 209754 from Wiley Library

Name: Octadecanoic acid, methyl ester (CAS)

Pair Count: 60 MW: 298 Formula: C19H38O2

CAS No: 112-61-8 Acquired Range: 41.0 - 301.0 m/z

Gambar 29. Gambar Kromatogram Hasil Uji MS (LIPID)

## Lampiran 9. Pengukuran Absorbansi Biomassa Khamir

Tabel 15. Pengukuran Absorbansi Biomassa Khamir

### a. Isolat P.L.1.W.2

Media \ Hari	Absorbansi				
	0	2	4	6	8
gliserol N-Limited	0,040	0,908	3,165	3,262	2,132
YPD N-Limited	0,042	0,829	3,112	3,209	2,079
xylosa N-Limited	0,026	0,485	2,318	1,106	0,503
CMC	0,070	0,281	0,799	0,733	0,643

### b. Isolat P.L.3.DP.9

Media \ Hari	Absorbansi				
	0	2	4	6	8
gliserol N-Limited	0,038	1,003	2,402	2,563	2,563
YPD N-Limited	0,027	0,319	1,152	1,396	1,219
xylosa N-Limited	0,010	0,310	1,234	1,296	1,218
CMC	0,044	0,286	0,595	0,620	0,504

### c. Isolat P.L.3.DP.6

Media \ Hari	Absorbansi				
	0	2	4	6	8
gliserol N-Limited	0,044	0,566	1,658	2,038	2,007
YPD N-Limited	0,031	0,612	1,383	1,463	1,294
xylosa N-Limited	0,020	0,445	1,203	1,459	1,401
CMC	0,032	0,214	0,530	0,490	0,486

### d. Isolat P.Le.6.DP.6

Media \ Hari	Absorbansi				
	0	2	4	6	8
gliserol N-Limited	0,056	1,402	2,864	3,264	3,264
YPD N-Limited	0,063	1,055	2,033	1,919	1,914
xylosa N-Limited	0,038	0,145	1,709	2,221	2,060
CMC	0,106	0,305	0,574	0,524	0,480

## SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Dengan ini saya yang bertanda tangan di bawah ini. Mahasiswa Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta:

Nama : Elsa Angela  
No. Registrasi : 3325061860  
Jurusan : Kimia  
Program Studi : Kimia

Menyatakan bahwa skripsi yang saya buat dengan judul “**Penapisan Khamir Selulolitik Dalam Mendukung Pembentukan Etanol dan Sebagai *Oleaginous Yeast* (Khamir Penghasil Lipid)**” adalah :

1. Dibuat dan diselesaikan oleh saya sendiri, berdasarkan data yang diperoleh dari hasil penelitian dari bulan Oktober 2010 hingga Desember 2010.
2. Bukan merupakan duplikat skripsi yang pernah dibuat oleh orang lain atau jiplakan karya tulis orang lain dan bukan terjemahan karya tulis orang lain.

Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan saya bersedia menanggung segala akibat yang timbul apabila pernyataan saya tidak benar.

Jakarta, Januari 2011

Elsa Angela

## RIWAYAT HIDUP PENULIS



ELSA ANGELA. Dilahirkan di Jakarta pada tanggal 14 April 1988. Anak pertama dari dua bersaudara, dari pasangan Elfius dan Sri Sudiati. Bertempat tinggal di Jalan Narogong cantik III Blok F68 No. 4 Bekasi Timur 17115.

Riwayat Pendidikan. Memulai pendidikan di Taman Kanak-kanak TRIDAYA, Bekasi Timur, pada tahun 1993 dan lulus tahun 1994. Melanjutkan sekolah di SDN Narogong Indah, Bekasi Timur, lulus tahun 2000. Melanjutkan pendidikan di SLTP Negeri 16 Bekasi, lulus tahun 2003. Kemudian melanjutkan pendidikan di SMA Negeri 6 Bekasi, lulus tahun 2006. Penulis kemudian melanjutkan pendidikan ke Universitas Negeri Jakarta, Fakultas MIPA, Jurusan Kimia, Program Studi Kimia.

Selama kuliah di Universitas Negeri Jakarta, kegiatan kegiatan yang pernah diikuti antara lain : peserta Kunjungan Industri tahun 2007, kegiatan Kunjungan Kerja Lapangan ke PT. Madukismo dan BATAN di Yogyakarta tahun 2010. Penulis juga pernah menjadi asisten dosen untuk mata kuliah Praktikum Kimia Kimia Dasar Umum dan Praktikum Kimia Fisika II.

Prestasi akademik yang pernah diperoleh selama kuliah adalah Juara 1 Lomba Pekan Ilmiah Mahasiswa Nasional (PIMNAS) ke-XXII bidang kegiatan Program Kreativitas Mahasiswa Gagasan Tertulis (PKM-GT).