



Bioethanol Production by Using Detoxified Sugarcane Bagasse Hydrolysate and Adapted Culture of *Candida tropicalis* 1

Inda Setyawati, Laksmi Ambarsari, Siti Nur'aeni, Suryani, Puspa Julistia Puspita, Popi Asri Kurniatin, Waras Nurcholis

The Addition Effects of Glucose as a Co-substrate on Xylitol Production by *Candida guilliermondii* 13

Laksmi Ambarsari, Suryani, Steffanus Gozales, Puspa Julistia Puspita

Isolasi dan Seleksi Bakteri Termofilik Pereduksi Kromium Heksavalen dari Limbah Pengolahan Batik 22

Wijastuti, I Made Artika, Novik Nurhidayat

Karakterisasi Rizobakteri Penghasil Giberelin yang Diisolasi dari Tanah Hutan di Banten 32

Hadi Susilo, Nisa Rachmania Mubarik, Triadiati

Identifikasi Gen Aroma (*badh2* Termutasi) dan Sifat Aroma Pada BC₅F₂ Ciharang Aromatik 42

Jap Mai Cing, Djarot Sasongko Hami Seno, Tri Joko Santoso

Published by:



Department of Biochemistry
Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Bogor Agricultural University (IPB)

In collaboration
with:



Indonesian Society for Biochemistry and Molecular Biology
(PBBMI), Bogor's Chapter

Special thanks to our Reviewers:

Dr. Dra. Nisa Rachmania Mubarik, M.Si
Department of Biology, Bogor Agricultural
University (IPB)

Dr. Isroi, S.Si., M.Si
Indonesian Biotechnology Research Institute
for Estate Crops

Drs. Edy Djauhari P.K., M.Si
Department of Biochemistry, Bogor
Agricultural University (IPB)

Prof. Dr. Ir. Khaswar Syamsu, M.Sc
Department of Agroindustrial Technology,
Bogor Agricultural University (IPB)

Dr. Dra. Laksmi Ambarsari, MS
Department of Biochemistry, Bogor
Agricultural University (IPB)

Prof. Dr. Ir. Nastiti Siswi Indrasti
Department of Agroindustrial Technology,
Bogor Agricultural University (IPB)

Dr. Ir. Utut Widyastuti M.Si.
Department of Biology, Bogor Agricultural
University (IPB)

Dr. Bram Kusbiantoro
Indonesian Agency for Agricultural Research
and Development

Dr. Asmini Budiani, M.Si
PT. Riset Perkebunan Nusantara

Dr. Ir. Liesbetini Haditjaroko, MS
Department of Agroindustrial Technology,
Bogor Agricultural University (IPB)

Dr. G. John Acton, BSc. Ph.D
Flinders University, Australia

Prof. Dr. Aris Triwahyudi
Department of Biology, Bogor Agricultural
University (IPB)

Dr. Ir. Abdjad Asih Nawangsih, M.Si
Department of Plant Protection, Bogor
Agricultural University (IPB)

Current Biochemistry Staff

Chief Editor

I Made Artika

Managing Editor

Suryani

Editorial Assistant

Puspa Julistia Puspita

Inda Setyawati

Husnawati

Ukhradiyah

Layout Editor

Rahadian Pratama

Syaefudin

Ikhsan Alif Rusmana

Publisher

IPB Press

Editorial Board

Maria Bintang

Djarot Sasongko Hami Seno

Syamsul Falah

Laksmi Ambarsari

Edy Djauhari

Waras Nurcholis

Akhmad Endang Zainal Hasan

Mega Safithri

Secretariat of Current Biochemistry

Department of Biochemistry

Bogor Agricultural University (IPB)

Bogor 16680, Indonesia

Phone/Fax.: +62 251 8423267

E-mail: current.biochemistry@gmail.com

To Our Subscribers

Welcome to the volume 2 of "Current Biochemistry". This journal publishes submissions entirely in English, or submissions in Indonesian with abstract in English, the results of original research that contribute significantly to the understanding of biological processes. Biochemistry is a laboratory based science that explores chemical processes within living organisms. It has become the foundation for understanding all living processes and now almost all areas of the life sciences are engaged in biochemical research. Today, one of the main focus of biochemistry is in understanding how biological molecules give rise to the processes that occur within living cells, which in turn relates greatly to the study and understanding of whole organisms.

"Current Biochemistry" is intended to make contemporary Indonesian research in biochemistry known internationally, and to encourage the sharing of this research with the widest possible audience. Our mandate is to publish manuscripts relating to emerging areas in biochemistry, chemical biology, biophysics, genomics, proteomics, model studies and structures, cellular and molecular biology, computational biochemistry, biotechnology, and new method developments which are all encouraged, especially if they address basic biochemical mechanisms. We therefore cordially invite quality articles from authors to elevate the standard and extend the readership of the journal.

We would like to thank the reviewers and all those who have contributed to the first issue of Current Biochemistry volume 2.

With best wishes

From the Editor

Table of Contents

Bioethanol Production by Using Detoxified Sugarcane Bagasse Hydrolysate and Adapted Culture of <i>Candida tropicalis</i>	1
Inda Setyawati, Laksmi Ambarsari, Siti Nur'aeni, Suryani, Puspa Julistia Puspita, Popi Asri Kurniatin, Waras Nurcholis	
The Addition Effects of Glucose as a Co-substrate on Xylitol Production by <i>Candida guilliermondii</i>	13
Laksmi Ambarsari, Suryani, Steffanus Gozales, Puspa Julistia Puspita	
Isolation and Selection of Thermophilic Bacteria as Hexavalent Chromium Reducer from Batik Processing Waste Water	22
Wijiastuti, I Made Artika, Novik Nurhidayat	
Characterization of Gibberellin Producing Rhizobacteria Isolated from Soil Forest in Banten	32
Hadi Susilo, Nisa Rachmania Mubarik, Triadiati	
Identification of Aroma Gene (Mutated <i>badh2</i>) and Properties of Aroma on Aromatic BC₅F₂ Ciherang	42
Jap Mai Cing, Djarot Sasongko Hami Seno, Tri Joko Santoso	

CURRENT BIOCHEMISTRY

ISSN: 2355-7877

Homepage: <http://biokimia.ipb.ac.id>

E-mail: current.biochemistry@ipb.ac.id

The Addition Effects of Glucose as a Co-substrate on Xylitol Production by *Candida guilliermondii*

(Pengaruh Penambahan Glukosa Sebagai Ko-substrat Terhadap Produksi Xilitol oleh *Candida guilliermondii*)

¹Laksmi Ambarsari^{1*}, Suryani¹, Steffanus Gozales¹, Puspa Julistia Puspita¹

Department of Biochemistry, Bogor Agricultural University, Bogor, 16680, Indonesia

Received: 1 January 2014 Accepted: 25 February 2014

*Corresponding author: Dr. Laksmi Ambarsari, MS ; Departemen Biokimia, Jl. Agatis Gd. Fapet Lt. 5, Wing 5, Bogor 16680; Telp/Fax. +62251-8423267; E-mail: ami_icha@yahoo.com

ABSTRACT

High cost production is one of the constraints of the commercial xylitol production due to high energy needed and pure raw materials. Therefore, it is necessary to improve the xylitol production efficiently with lower production cost by using microorganisms. The research objectives were to determine the optimum xylitol production from xylose by metabolism of *C. guilliermondii* and effect of glucose as a co-substrate in fermentation medium. The ratio of glucose : xylose (g/L) was 1:25, 1:12, 1:5 and 1:2.5 respectively. The xylitol concentration was measured by spectrophotometer method (D-sorbytol/D-xylitol kit). The result showed that the exponential phase of *Candida guilliermondii* was 12 h to 36 of incubation and optimum of incubation time to produce the highest xylitol was 72 h. The best ratio- of glucose : xylose to produce xylitol was 9 g/L glucose : 45 g/L xylose (1 : 5). The xylitol concentration produced from medium with the addition of glucose was 2.85 g/L. This concentration increased five times compared to that in the medium without addition of glucose that only reached 2.85 g/L. According to this study, the addition of glucose as a co-substrate could increase the xylitol production.

Keywords: xylitol, co-substrate, *C. guilliermondii*, glucose

ABSTRAK

Salah satu tantangan produksi xilitol secara komersial yaitu tingginya biaya produksi, karena memerlukan energi yang besar dan bahan baku murni. Oleh sebab itu perlu dilakukan upaya untuk meningkatkan produksi xilitol dengan biaya murah dan efisien dengan memanfaatkan mikroba. Dalam penelitian ini ditentukan optimasi produksi xilitol dari xilosa oleh *Candida guilliermondii* serta pengaruh penambahan glukosa sebagai kosubstrat ke dalam media fermentasi. Variasi rasio (glukosa:xilosa) yang digunakan adalah (1:25, 1:12, 1:5 dan 1:2.5) g/L. Kadar xilitol diukur

menggunakan spektrofotometer dengan Kit D-sorbitol/D-xilitol. Hasil penelitian menunjukkan fase eksponensial dari pertumbuhan sel *C. guilliermondii* terdapat pada inkubasi jam ke-12 sampai 36, dan waktu inkubasi optimum untuk memperoleh kadar xilitol tertinggi adalah 72 jam. Variasi rasio glukosa:xilosa yang terbaik adalah 1:5 dengan konsentrasi glukosa 9 g/L dan xilosa 45 g/L. Kadar xilitol yang diperoleh dari rasio tersebut meningkat lima kali lebih besar dibandingkan kadar xilitol tanpa penambahan glukosa, yaitu dari 0.57 g/L menjadi 2.85 g/L. Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa penambahan glukosa dapat meningkatkan produksi xilitol.

Kata kunci: xilitol, ko-substrat, *C. guilliermondii*, glukosa

1. PENDAHULUAN

Xilitol merupakan gula dengan jumlah atom C (karbon) lima yang tidak dapat difermentasi oleh bakteri *Streptococcus mutans* penyebab kerusakan gigi, sehingga bersifat nonkariogenik yang aman untuk kesehatan gigi (Uhari *et al.* 1996; Sampaio *et al.* 2003). Xilitol mempunyai tingkat kemanisan yang setara dengan sukrosa, namun nilai kalorinya (40%) lebih rendah dari kelompok karbohidrat lainnya. Xilitol dimanfaatkan pada industri farmasi, produk perawatan kesehatan, dan industri bahan makanan (Gurgel *et al.* 1995). Secara farmakologi, xilitol berperan untuk mencegah kerusakan gigi, infeksi telinga pada anak-anak, dan sebagai pengganti gula untuk pasien diabetes (Kiet *et al.* 2006; Rao *et al.* 2006). Xilitol ideal digunakan untuk pasien penderita diabetes, karena mempunyai indeks glikemik yang rendah dan dapat dimetabolisme oleh tubuh tanpa melibatkan insulin, serta secara lambat diserap oleh tubuh (Tochampa *et al.* 2005). Xilitol digunakan sebagai bahan utama untuk pembuatan permen, permen karet, dan minuman ringan. Selain itu xilitol juga banyak digunakan pada produk pasta gigi (Kiet *et al.* 2006).

Teknik produksi xilitol yang paling umum digunakan saat ini adalah teknik hidrogenasi xilosa. Produksi xilitol melalui proses tersebut

memerlukan biaya yang tinggi, karena memerlukan energi besar, bahan baku utama xilosa murni dan memerlukan proses pemurnian. Proses produksi ini membuat harga xilitol menjadi mahal serta boros energi (Soleimani *et al.* 2006). Oleh karena itu diperlukan upaya untuk meningkatkan produksi xilitol dengan harga yang murah dan hemat energi. Produksi xilitol dengan proses bioteknologi melalui fermentasi dengan memanfaatkan mikrob merupakan salah satu cara yang diharapkan dapat memberikan hasil yang lebih ekonomis

Penelitian ini menggunakan mikrob khamir spesies *C. guilliermondii* yang merupakan salah satu mikrob khamir penghasil xilitol terbaik (Silva *et al.* 2007; Rosa *et al.* 1998). Keberhasilan biokonversi xilosa menjadi xilitol secara fermentasi bergantung pada beberapa faktor, seperti suhu, pH, kondisi aerasi, konsentrasi substrat, dan keberadaan gula lain selain xilosa, seperti glukosa. Penelitian ini bertujuan menentukan waktu inkubasi optimum untuk pertumbuhan biomassa sel *C. guilliermondii* dan produksi xilitol, serta menentukan konsentrasi glukosa optimum yang ditambahkan ke dalam media fermentasi. Hipotesis dari penelitian ini adalah penambahan glukosa sebagai ko substrat dengan rasio konsentrasi glukosa:xilosa yang optimum dapat meningkatkan produksi xilitol. Hasil penelitian diharapkan dapat menambah informasi tentang produksi xilitol

menggunakan sel khamir (khususnya khamir *C. guilliermondii*).

2. METODOLOGI

Candida guilliermondii

Sel khamir yang digunakan adalah sel *C. guilliermondii* yang berasal dari koleksi kultur LIPI Cibinong (BTCC). *C. guilliermondii* termasuk ke dalam kingdom Fungi, filum *Deuteromycotina*, famili *Tarulopsidaceae*, genus *Candida*, dan spesies *C. guilliermondii*. *C. guilliermondii* tergolong khamir patogen dan bagian dari flora normal manusia (Granstrom 2002) dan merupakan salah satu jenis khamir penghasil xilitol terbaik (Santos *et al.* 2008). Peremajaan kultur dilakukan sebelum produksi dalam media fermentasi dimulai. Prosedur yang dilakukan yaitu pembiakan *C. guilliermondii* sebanyak satu ose dalam media *Yeast Malt* (YM) dengan komposisi 3 g/L ekstrak khamir, 3 g/L ekstrak malt, 5 g/L bakto pepton, dan 20 g/L glukosa). Media tersebut kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sel yang dibiakkan ke dalam media YM yang telah steril sebanyak satu ose, kemudian media YM yang telah berisi biakan *C. tropicalis* diinkubasi dalam *waterbath* dengan kecepatan rotasi 120 rpm pada suhu 30°C selama 18 jam (Rao *et al.* 2005).

Pengukuran Kurva Pertumbuhan *C. guilliermondii*

Sel *C. guilliermondii* yang berasal dari media padat diambil sebanyak 1 ose, kemudian diinokulasi pada media *Yeast Malt* (YM) cair dengan komposisi: (ekstrak khamir 3 g/L, ekstrak malt 3 g/L, bakto pepton 5 g/L, dan glukosa 20 g/L) dengan pH larutan/pH

media 5. Selanjutnya kultur diinkubasi dan dilakukan pengocokan pada suhu 30°C dengan kecepatan 120 rpm, dan setiap 12 jam dilakukan pengambilan sampel sebanyak 1 mL kemudian ditentukan *optical density* (OD) kultur dengan spektrofotometer pada λ 600 nm.

Pengukuran Kurva Produksi *C. guilliermondii* (Rao *et al.* 2005)

Sel *C. guilliermondii* dari media padat diinokulasi pada media fermentasi dengan komposisi: (xilosa 45 g/L; ekstrak khamir 10 g/L; pepton 20 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L; K_2HPO_4 0,5 g/L; dan KH_2PO_4 0.5 g/L) dan pH larutan 5. Kultur kemudian diinkubasi dan dilakukan pengocokan pada suhu 30°C dengan kecepatan 120 rpm selama 18 jam. Selanjutnya sebanyak 1% inokulum dimasukkan ke dalam media fermentasi yang sama dan dilakukan inkubasi kembali dengan pengocokan pada suhu 30°C dan kecepatan 120 rpm. Penentuan kurva produksi dilakukan dengan mengambil sebanyak 3 mL kultur setiap 12 jam, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 g dan supernatan yang diperoleh ditentukan kadar xilitolnya.

Pengaruh Konsentrasi Glukosa Terhadap Produksi Xilitol

Pengaruh penambahan glukosa pada biokonversi xilosa menjadi xilitol oleh sel *C. guilliermondii* dilakukan dengan menambahkan glukosa pada media fermentasi dengan perbandingan glukosa:xilosa yaitu: 1:25 (glukosa 1.8 g/L), 1:12 (glukosa 3.75 g/L), 1:5 (glukosa 9 g/L), dan 1:2.5 (glukosa 18 g/L) kemudian diinkubasi pada suhu 30°C, kecepatan 120 rpm selama 72 jam. Sebagai kontrol digunakan media yang tidak ditambahkan glukosa.

Selanjutnya masing-masing sampel ditentukan kadar xilitolnya.

Penentuan Kadar Xilitol

Kadar xilitol diukur dengan metode Roche (kit D-sorbitol/D-xilitol). Kit yang digunakan merupakan kit spesifik untuk mengukur kadar xilitol. Sebanyak dua tabung sentrifus bertutup yang diberi label blanko dan sampel. Kemudian ditambahkan 0.6 mL larutan 1; 0.2 mL larutan 2; dan 0.2 mL larutan 3 ke dalam masing-masing tabung tersebut. Larutan 1 terdiri dari natrium fosfat atau bufer trietanolamin, pH 8.6 dan Triton X-100; larutan 2 terdiri atas enzim dioforase sekitar 4 µg dan NAD sekitar 28 mg, larutan 3 berisi idonitrotetrazolium klorida dan larutan 4 berisi liofilisasi SDH, sekitar 25 µg. Selanjutnya sebanyak 0.1 mL supernatan ditambahkan ke dalam tabung sentrifus yang berlabel sampel. Masing-masing tabung ditambahkan akuabides steril sebanyak 2 mL untuk blanko, dan 1.9 mL untuk sampel. Selanjutnya masing-masing tabung diukur absorban (A1) pada panjang gelombang 492 nm, dibiarkan 2 menit dan kembali diukur absorbannya. Jika selisih nilai A1 pada kedua pengukuran absorbansi lebih dari 0.01 maka tabung berisi sampel harus dikurangi zat pereduksinya. Jika selisih A1 kurang dari 0.01 maka langsung ditambahkan dengan 0.05 mL larutan 4 sehingga didapat volume akhir 3.05 mL untuk masing-masing tabung. Campuran dibiarkan selama 30 menit. Setelah itu diukur absorban (A2) pada panjang gelombang 492 nm. Jika reaksi tidak berhenti selama 30 menit kembali diukur absorbannya pada selang interval 5 menit hingga perubahan absorban stabil. Selanjutnya dihitung ΔA dengan persamaan:

$$\Delta A = (A2 - A1)_{\text{sampel}} - (A2 - A1)_{\text{blanko}}$$

Setelah itu ditentukan konsentrasinya dengan persamaan:

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A$$

Keterangan:

c = konsentrasi xilitol pada sampel (g/L)

V = volume akhir (mL)

MW = molecular weight (g/mol)

v = volume sampel (mL)

d = jalur cahaya (cm)

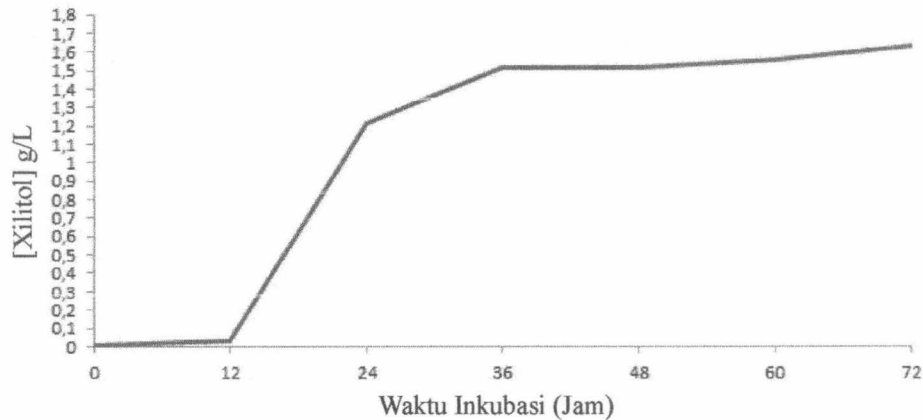
ϵ = koefisien ekstensi senyawa INT-formazan pada 492 nm = 19.9 (L/mmol cm)

3. HASIL

Pertumbuhan Biomassa Sel dan Produksi Xilitol

Pertumbuhan pada khamir *C. guilliermondii* meliputi beberapa fase, yaitu fase adaptasi (jam ke 0 hingga jam ke-12), pada fase ini pertumbuhan sel cenderung lambat (Gambar 1). Kemudian fase eksponensial (jam ke-12 hingga jam ke-36), pada fase ini terlihat adanya kenaikan jumlah sel secara signifikan. Fase terakhir yaitu fase stasioner pada jam ke-36, pada fase ini pertumbuhan sel masih terlihat meningkat namun peningkatan jumlah sel tidak sebanyak pada fase logaritmik, hal ini disebabkan nutrisi yang tersedia sudah mulai berkurang (Gambar 1). Terhambatnya pertumbuhan pada fase ini disebabkan ketersediaan nutrisi yang tidak memadai, akumulasi produk limbah dan berbahaya (Tortora *et al.* 2006).

Kurva produksi yang diperoleh dari hasil penelitian (Gambar 2) mempunyai pola kurva yang mirip dengan kurva pertumbuhan yang menunjukkan meningkatnya biomassa sel *C.*



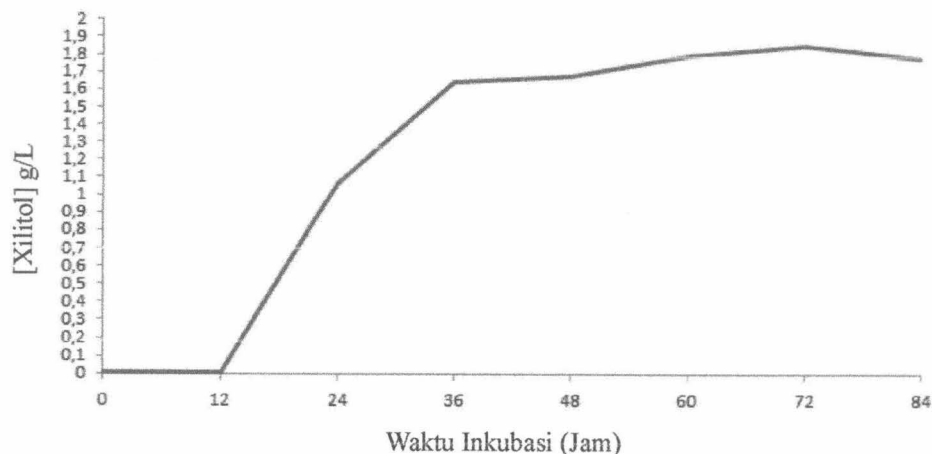
Gambar 1 Kurva turbiditas pertumbuhan *C. guilliermondii* pada media *Yeast Malt* (YM).

guilliermondii seiring dengan meningkatnya konsentrasi xilitol yang dihasilkan. Tipe fermentasi yang berkorelasi positif seperti ini dikenal sebagai *growth associated*. Produksi xilitol tertinggi dihasilkan pada jam ke-72, sebesar 0,57 g/L. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Puspita (2010) dengan menggunakan khamir *C. tropicalis*, produksi xilitol pada media kontrol (xilosa saja) mampu menghasilkan xilitol sebesar 14,08 g/L dari 30 g/L xilosa pada jam ke-48. Perbedaan hasil produksi dapat dipengaruhi oleh kemampuan masing-masing mikroba untuk mengkonversi

xilosa menjadi xilitol, selain itu waktu inkubasi optimum yang dibutuhkan berbeda antara *C. tropicalis* dan *C. guilliermondii*. Tipe fermentasi ini menunjukkan bahwa xilitol yang dihasilkan pada fase log merupakan metabolit primer, karena terlibat langsung dalam metabolisme sel, sedangkan metabolit sekunder dihasilkan ketika sel berada pada fase stasioner.

Rasio Glukosa:Xilosa Optimum

Xilitol yang dihasilkan dari variasi rasio glukosa:xilosa 1:25, 1:12, 1:5, 1:2,5 berturut-turut adalah 1,94, 2,18, 2,85, 1,29 g/L (Gambar



Gambar 2 Kurva produksi xilitol oleh *C. guilliermondii* pada media fermentasi.

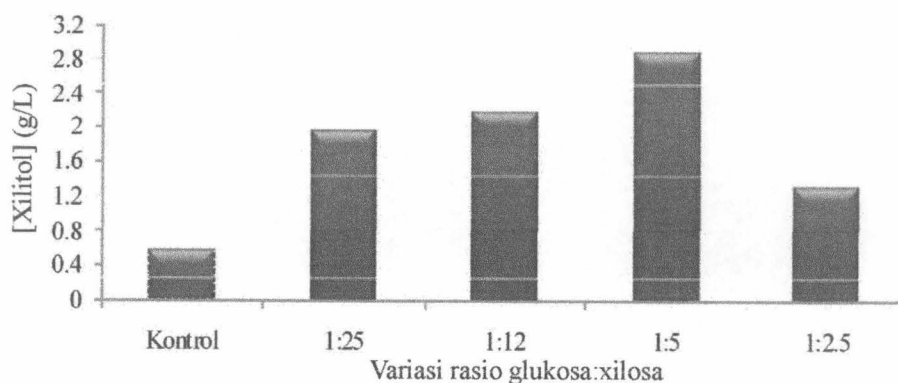
3). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa rasio glukosa:xilosa 1:5 menghasilkan konsentrasi xilitol paling tinggi, yaitu sebesar 2.85 g/L dengan *product yield* (Y_p/s) sebesar 6.32%, sedangkan pada kontrol yang hanya mengandung xilosa saja (45 g/L) menghasilkan xilitol sebesar 0.57 g/L dengan *product yield* sebesar 1.28% (Tabel 1). Berdasarkan hasil tersebut, terjadi peningkatan produksi xilitol lima kali lipat dari media yang hanya mengandung xilosa 45 g/L (kontrol). Hasil penelitian juga menunjukkan terjadi peningkatan konsentrasi xilitol dari rasio glukosa:xilosa 1:25 – 1:5. Hal ini menunjukkan semakin besar konsentrasi glukosa yang ditambahkan ke dalam media fermentasi semakin besar pula kadar xilitol yang dihasilkan.

4. PEMBAHASAN

Pertumbuhan Biomassa Sel dan Produksi Xilitol

Pertumbuhan sel *C. guilliermondii* dilakukan pada media YM. Glukosa pada media digunakan sebagai sumber karbon oleh sel, sedangkan ekstrak khamir, ekstrak malt, dan bakto pepton digunakan sebagai sumber nitrogen. Biomassa sel *C. guilliermondii* diamati dengan mengukur kekeruhan/turbiditas larutan pada

panjang gelombang 600 nm. Semakin keruh larutan maka semakin banyak jumlah sel yang tumbuh. Pola kurva turbiditas pertumbuhan sel ditunjukkan pada Gambar 1, yang meliputi fase adaptasi, eksponensial (fase log), dan stasioner. Hasil pengamatan pada kurva turbiditas pertumbuhan tidak terlihat adanya fase adaptasi, hal ini disebabkan sel *C. guilliermondii* yang diinokulasikan ke dalam media pertumbuhan telah melalui masa pengaktifan selama 18 jam. Fase selanjutnya yaitu fase eksponensial yang merupakan fase pertumbuhan sel yang meningkat secara signifikan. Pada fase ini terjadi pembelahan sel dan kenaikan jumlah sel ditunjukkan dengan kemiringan pada kurva pertumbuhan. Kemiringan kurva pada fase eksponensial terlihat sangat tajam. Fase terakhir dari pertumbuhan sel adalah fase stasioner. Pada fase ini pertumbuhan sel masih terlihat meningkat namun peningkatan jumlah sel tidak sebanyak pada fase logaritmik, hal ini disebabkan nutrisi yang tersedia sudah mulai berkurang. Kurva turbiditas pertumbuhan ini digunakan sebagai acuan untuk menentukan lama inkubasi aktivasi inokulum. Berdasarkan kurva yang diperoleh, disimpulkan bahwa inkubasi aktivasi sel *C. guilliermondii* dapat dilakukan hingga 18 jam



Gambar 3 Hubungan antara variasi rasio glukosa:xilosa dengan konsentrasi xilitol (g/L).

Tabel 1 Variasi rasio glukosa:xilosa

Glukosa:Xilosa	Glukosa g/L	Xilitol g/L	Y p/s %
Kontrol	-	0.57	1.28
1:25	1.80	1.94	4.30
1:12	3.75	2.18	4.85
1:5	9.00	2.85	6.32
1:2.5	18.00	1.29	2.88

Y p/s = *product yield* (g xilitol yang dihasilkan / g xilosa yang dikonsumsi)

yang diduga akhir fase eksponensial.

Peremajaan kultur *C. guilliermondii* pada media YM dilakukan sebelum fermentasi untuk mendapatkan sel *C. guilliermondii* yang berada pada tahap eksponensial. Selanjutnya sel *C. guilliermondii* dari media YM diinokulasikan ke dalam media baru (inokulum). Media yang digunakan untuk menumbuhkan biomassa sel (media YM) tidak sama dengan media fermentasi dan inokulum. Perbedaan media fermentasi dengan media pertumbuhan terletak pada komponen penyusun media, dalam hal ini sumber karbon yang digunakan. Pada media pertumbuhan digunakan glukosa sebagai sumber karbon, sedangkan pada media fermentasi digunakan xilosa. Aktivasi pada media inokulum bertujuan agar sel *C. guilliermondii* dapat menyesuaikan/adaptasi terhadap media fermentasi/produksi yang mengandung xilosa sebagai sumber karbon utamanya. Selain itu, inokulasi *C. guilliermondii* ke dalam media xilosa juga dilakukan untuk memperoleh informasi saat sel *C. guilliermondii* menghasilkan kadar xilitol tertinggi (Gambar 1). Komponen penting lain yang mempengaruhi produksi xilitol adalah garam ammonium sulfat dan mineral berupa kalsium klorida. Menurut Carvalho *et al.* (2007), penambahan ammonium sulfat ke dalam media dapat membantu penyerapan xilosa dan garam kalsium berperan dalam memenuhi kebutuhan mineral untuk

pertumbuhan sel *C. guilliermondii*, sehingga xilitol dapat diproduksi.

Kurva produksi yang diperoleh dari hasil penelitian mempunyai pola kurva yang mirip dengan kurva pertumbuhan. Peningkatan biomassa sel *C. guilliermondii* seiring dengan peningkatan konsentrasi xilitol yang dihasilkan. Menurut Yulianto (2001), tipe fermentasi yang berkorelasi positif seperti ini dikenal sebagai *growth associated*. Tipe fermentasi ini menunjukkan bahwa xilitol yang dihasilkan pada fase log merupakan metabolit primer, karena terlibat langsung dalam metabolisme sel. Berdasarkan hasil pengamatan dan perhitungan diperoleh konsentrasi xilitol tertinggi pada jam ke-72, sebesar 0.57 g/L (Gambar 1). Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Silva dan Felipe (2006), yaitu terjadi penurunan konsentrasi xilitol yang dihasilkan setelah jam ke-72 pada kondisi berkurangnya xilosa pada media.

Rasio Glukosa:Xilosa Optimum

Variasi rasio glukosa:xilosa pada media fermentasi bertujuan untuk mengetahui pengaruh glukosa terhadap produksi xilitol dan menentukan konsentrasi glukosa optimum yang perlu ditambahkan ke dalam media. Rasio glukosa:xilosa berkisar antara 1:25 hingga 1:2.5. Pemilihan rasio ini didasarkan pada rasio glukosa:xilosa yang terkandung di dalam

hidrolisat ampas tebu dengan perbandingan 1:25 (Silva *et al.* 2007). Konsentrasi xilitol yang dihasilkan meningkat jika dibandingkan dengan kontrol (sumber karbon xilosa). Xilitol yang dihasilkan dari variasi rasio glukosa:xilosa 1:25, 1:12, 1:5, 1:2.5 berturut-turut adalah 1.94, 2.18, 2.85, 1.29 g/L (Gambar 2). Konsentrasi xilitol tertinggi dihasilkan pada rasio glukosa:xilosa 1:5, yaitu sebesar 2.85 g/L meningkat lima kali lipat dari media yang hanya mengandung xilosa 45 g/L(kontrol), yaitu sebesar 0.57 g/L. Hasil perhitungan *product yield* (Yp/s) xilitol dari rasio glukosa:xilosa 1:5 adalah 6.32 %, sedangkan pada kontrol sebesar 1.28 % (Tabel 1).

Penambahan glukosa sebagai ko-substrat dapat meningkatkan konsentrasi xilitol yang dihasilkan. Penelitian Silva *et al.* (2007) menggunakan media yang mengandung glukosa:xilosa 1:5 (glukosa 9 g/L: xilosa 45 g/L) juga menghasilkan xilitol dengan konsentrasi terbesar (26.9 g/L xilitol). Penelitian yang dilakukan oleh Silva dan Felipe (2006) juga menemukan peningkatan *product yield* (Yp/s) dan produktivitas volumetrik (Qp) pada rasio glukosa:xilosa 1:5 berturut-turut sebesar 15.69% dan 23.26% dibandingkan dengan rasio glukosa:xilosa 1:25. Peningkatan produksi xilitol ini disebabkan karena glukosa terlibat dalam regenerasi kofaktor NADPH serta dapat meningkatkan biomassa sel.

Peningkatan produksi xilitol dari rasio glukosa:xilosa 1:25 sampai 1:5 juga terjadi (Gambar 3). Hal ini menunjukkan semakin besar konsentrasi glukosa yang ditambahkan ke dalam media fermentasi semakin besar pula kadar xilitol yang dihasilkan. Namun, terdapat penurunan produksi xilitol dari rasio konsentrasi glukosa:xilosa 1:5 ke rasio 1:2.5 (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa ada konsentrasi

optimal yang dapat ditambahkan ke dalam media fermentasi untuk meningkatkan kadar xilitol. Penambahan konsentrasi glukosa yang lebih besar dari kondisi optimumnya (perbandingan 1:2.5) dapat menurunkan produksi xilitol, kemungkinan hal ini terjadi karena sel *C. guilliermondii* memanfaatkan glukosa untuk produksi etanol (Sene *et al.* 2001; Silva and Felipe 2006).

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Any Hardiany, MSi staf Biokimia IPB serta semua pihak yang bekerjasama dalam penyelesaian penelitian dan penulisan jurnal ilmiah ini.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Carvalho W, Canilha L, Silva da SS. 2007. Semi-continuous xylitol production in sugarcane bagasse hydrolysate: effect of nutritional supplementation. *Brazilian J Pharma Sci* 43.
- Gurgel PV, Mancilha IM, Pecanha RP, Siqueira JFM. 1995. Xylitol recovery from fermented sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresource Technology* 52: 219-223.
- Kiet A, Milgrom P, Rothen M. 2006. Xylitol, sweeteners, and dental caries. *Pediatric Dentistry* 28: 154-163.
- Rao RS, Jyothi CP, Prakasam RS, Sarma PN, Rao LV. 2006. Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysate by *Candida tropicalis*. *Bioresource Technology* 97: 1974-1978.
- Rosa SMA, Felipe MGA, Silva SS, Vitolo M. 1998. Xylose reductase production by *Candida guilliermondii*. *Appl Biochem Biotechnol* 70-72: 127-135.
- Sampaio et al. 2003. Screening of filamentous fungi for production of xylitol from D-xylose. *Brazilian Journal of Microbiology* 34: 325-328.

- Silva DDV, Felipe MGA. 2006. Effect of glucose: xylose ratio on xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities from *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. *J.Chem Technol Biotechnol* 81: 1294-1300.
- Silva DDV, Mancilha IM, Silva SS, Felipe MGA. 2007. Improvement of biotechnological xylitol production by glucose during cultive of *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. *Brazilian Archive of Biology and Technology* 50: 207-215.
- Soleimani M, Tabil L, Panigrahi S. 2006. Bioproduction of polyalcohol (xylitol) from lignocellulosic resources: a review. *Dept Agri Biores Eng* 06-106.
- Tochampa, Sirisansaneeyakul S, Vanichsriratana W, Srinophakun P, Bakker H, Chisti Y. 2005. A model of xylitol production by the yeast *Candida mogii*. *Bioprocess Biosyst Eng* 28: 175-183.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. 2006. *Microbiology: an Introduction* 9th ed. San Francisco: Pearson Education.
- Uhari M, Kontiokori T, Koskela M, Niemela M. 1996. Xylitol chewing gum in prevention of acute otitis media: double blind randomized trial. *Br Med J* 313: 1180-1184.
- Yulianto WA. 2001. Pengaruh pH, kadar xilosa dan kadar glukosa terhadap produksi xilitol oleh *Candida shehatae* WAY 08. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 12: 156-162.