

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Khamir

A.1. Tinjauan Umum Khamir (Yeast).

Khamir hidup pada habitat yang mengandung gula (misal: fruktosa) cukup banyak (Brock *et al.*, 1994). Khamir termasuk fungi yang bersifat uniseluler, sehingga pertumbuhan dan perkembangannya menjadi cepat. Sel khamir mempunyai ukuran yang bervariasi, yaitu dengan panjang 1-5 μ m sampai 20-50 μ m dan lebar 1-10 μ m. Bentuk sel khamir bervariasi, seperti bulat, oval, silinder, ogival yaitu bulat panjang dengan salah satu ujung runcing, segitiga melengkung (triangular), bentuk botol, bentuk apikulat atau lemon, dan membentuk pseudomiselium. Reproduksi vegetatif khamir dilakukan dengan cara pertunasan, pembelahan, pembelahan tunas dan pembentukan spora aseksual, sedangkan reproduksi generatifnya adalah melalui pembentukan spora seksual (Fardiaz, 1992).

Menurut Kratochvilova (1990), pertumbuhan dan perbanyakan sel khamir membutuhkan nutrisi yang cukup dan sesuai. Sel khamir mengambil nutrisi dari lingkungan atau medium. Komponen-komponen dasar untuk nutrisi dalam medium pertumbuhan khamir adalah : air; sumber karbon dan nitrogen, elemen-elemen penting untuk pembentukan dinding sel (elemen biogenik): oksigen, hidrogen, fosfor,

magnesium, dan kalsium; elemen-elemen yang dibutuhkan dalam jumlah sedikit (oligobiogenik) "trace element" atau mikronutrien; dan vitamin.

Air menyusun lebih dari 85 % massa sel dan berada dalam bentuk terikat maupun tidak terikat dengan sel. Air yang terikat berfungsi sebagai bahan penyusun struktur sel. Air yang tidak terikat berfungsi sebagai sarana transformasi selama metabolisme, tempat terjadinya reaksi metabolisme, penyimpanan sementara senyawa antara dan untuk membuang kelebihan panas (Kratochvilova, 1990).

Khamir adalah organisme kemoheterotropik yang membutuhkan karbon dan nitrogen, terutama dalam bentuk organik. Karbon yang dapat digunakan adalah gula heksosa, misalnya glukosa, fruktosa dan manosa. Pepton dan ekstrak yeast digunakan sebagai sumber nitrogen (Kratochvilova, 1990).

Pada umumnya khamir bersifat mesofil, temperatur terendah yang masih memungkinkan untuk pertumbuhan khamir adalah 4°C-5°C (Kratochvilova, 1990). Temperatur optimum untuk pertumbuhan khamir adalah 25 °C-30.5 °C dan temperatur maksimum untuk pertumbuhan khamir adalah 35 °C-47.5 °C. Khamir tumbuh baik pada suasana aerob, tetapi untuk jenis fermentatif dapat tumbuh secara anaerob walaupun secara lambat (Rahayu & Sudarmadji, 1989). Khamir tumbuh pada keadaan asam (pH 4.0-4.5) dan tidak dapat tumbuh pada medium basa kecuali telah beradaptasi (Fardiaz, 1992).

Pertumbuhan khamir berkaitan dengan pertumbuhan tunas (Berry, 1984). Kecepatan pertumbuhan khamir sangat penting untuk mendapatkan biomassa yang maksimal, terutama apabila medium sintesis digunakan sebagai substrat. Kecepatan pertumbuhan dapat diketahui dari jumlah sel atau biomassa yang diproduksi pada suhu, pH dan interval waktu tertentu (Kratochvilova, 1990).

A.2 Klasifikasi dan Identifikasi Khamir.

Klasifikasi khamir adalah pengelompokan khamir ke dalam suatu unit taksonomi atau taksa. Sedangkan identifikasi khamir adalah proses perbandingan sifat-sifat morfologi dan fisiologi antara khamir uji yang belum diketahui identitasnya dengan khamir yang telah ada deskripsi sifat-sifat morfologi dan fisiologinya dalam bentuk taksa dengan tujuan untuk mengetahui jenis atau spesies dari khamir uji tersebut (Kirsop *et al.*, 1984).

Sifat-sifat yang dapat digunakan untuk klasifikasi dan identifikasi khamir adalah : sifat-sifat morfologi, sifat-sifat kultur (pada medium cair dan padat), sifat-sifat fisiologi, dan reproduksi seksual (Fardiaz, 1992). Sifat morfologi digunakan untuk mengidentifikasi sampai genus, sedangkan sifat fisiologis digunakan untuk mengidentifikasi sampai spesies (Kirsop *et al.*, 1984).

Menurut Kirsop *et al.* (1984), sifat morfologi yang digunakan untuk identifikasi khamir meliputi :

1. Bentuk sel : bulat, oval, filamentous, elongasi,
2. Ukuran sel : diameter, panjang,
3. Cara reproduksi aseksual :
 - a. Pertunasan (bipolar, multipolar),
 - b. Miselium (semu, sejati),
 - c. Basidium (arthrospora, blastospora, ballistospora, khlamidospora, endospora),
4. Cara reproduksi seksual :
 - a. Askospora (bentuk askus, bentuk askospora, jumlah askospora dalam setiap askus),
 - b. Teliospora,
5. Karakteristik kultural :
 - a. Tumbuh pada medium cair : tipe depositnya, pelikel, cincin,
 - b. Tumbuh pada medium agar : warna koloni, tekstur, kenampakan permukaan.

Sifat fisiologi khamir dipengaruhi oleh kondisi lingkungan tempat pertumbuhannya. Sifat fisiologi khamir yang digunakan untuk identifikasi khamir meliputi proses fermentasi senyawa karbon, nutrisi untuk pertumbuhan, suhu pertumbuhan, produksi asam organik, aktivitas lipolitik dan aktivitas urease (Kirsop *et al.*, 1984).

Menurut Kreger-Van Rij (1987 dalam Barnett *et al.*, 1990), klasifikasi khamir yang dapat tumbuh menggunakan sumber karbon inulin adalah sebagai berikut:

Kingdom : Fungi

Divisio : Eumycota

Subdivisio :

1. Ascomycotina

Classis : Hemiascomycetes

Ordo : Endomycetales

Familia : Saccharomycetaceae

Sub familia : Saccharomycetoideae

Genus : *Citeromyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Kluyveromyces*,
Pichia, *Saccharomycopsis*, *Williopsis*, *Zygosaccharomyces*,
Schwaniomyces, *Torulasporea*

2. Basidiomycotina

Ordo : Ustilaginales

Familia : Filobasidiaceae

Genus : *Filobasidiella*

3. Deuteromycotina

Classis : Blastomycetes

Familia : Cryptococcaceae

Genus : *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Saitoella*.

B. Rhizosfer

Rhizosfer adalah suatu daerah yang terdapat di sekitar akar tanaman yang mengalami perubahan karakteristik tanah, karena adanya proses pelepasan materi-materi yang berasal dari akar dan aktivitas metabolisme akar (rhizodeposisi). Rhizodeposit tanaman dapat berupa senyawa gas, senyawa terlarut dan partikel senyawa. Komunitas mikroorganisme dalam tanah, dapat tumbuh dengan memanfaatkan senyawa-senyawa tersebut sebagai sumber nutrisi, melalui degradasi nutrisi dari bentuk kompleks ke bentuk yang lebih sederhana secara enzimatis (Klein, 1992). Pada umumnya mikroorganisme tanah dapat mensekresikan enzim ekstraseluler (Priest, 1992). Pada rhizosfer tanaman yang menyimpan cadangan karbohidratnya dalam bentuk inulin (misal: umbi dahlia), terdapat mikroorganisme penghasil inulinase (Tisnadjaja dkk., 1998).

C. Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.)

Klasifikasi tanaman dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.) menurut Tjitrosoepomo (1996), adalah sebagai berikut :

- Divisio : Spermatophyta
- Subdivisio : Angiospermae
- Classis : Dicotyledonae
- Subclassis : Sympetalae
- Familia : Compositae (Asteraceae)
- Genus : Dahlia
- Spesies : *Dahlia variabilis* Willd.

Tanaman dahlia tumbuh sebagai perdu setinggi 1.5 m atau lebih, dan dikenal sebagai flora hias berumbi besar. Umbi tanaman dahlia merupakan umbi akar karena terbentuk dari akar yang jaringannya berubah bentuk menjadi tebal dan berubah fungsinya sebagai tempat penyimpanan cadangan makanan. Bentuk umbi akar dahlia bervariasi mulai dari bulat kecil sampai besar atau panjang sampai lonjong. Struktur umbi dahlia terdiri atas kulit umbi berwarna putih kekuning-kuningan sampai kecokelatan, daging umbi tebal berwarna putih atau bening dan mempunyai mata tunas (Rukmana, 2000).

Umbi tanaman dahlia mempunyai nilai komersial, karena mengandung inulin yang dapat digunakan sebagai bahan baku industri "High Fructose Syrup" atau sirup fruktosa. Setiap 100 g umbi dahlia mengandung inulin sebanyak 65.7%. Proses pengolahan umbi dahlia untuk produksi sirup fruktosa lebih produktif daripada jenis umbi-umbi lainnya, seperti ubi jalar dan ubi kayu. Umbi dahlia dapat menghasilkan rendemen sirup fruktosa sebanyak 95% dalam satu kali reaksi enzimatis. Sedangkan ubi jalar dan ubi kayu membutuhkan tiga tahap reaksi enzimatis dan hanya menghasilkan rendemen sirup fruktosa sebanyak 45% (Rukmana, 2000).

Di Indonesia tanaman dahlia mampu beradaptasi secara luas mulai dari dataran menengah (medium) sampai dataran tinggi (pegunungan), di tempat dengan ketinggian 560 m-1400 m (dpl.) dengan kisaran suhu udara 14°C-18°C (minimum) dan 19°C-30°C (maksimum), serta curah hujan antara 1900-3000 mm/tahun. Kondisi ideal untuk pertumbuhan tanaman dahlia adalah pada suhu 10°C-15°C dan tempat terbuka atau cukup mendapat sinar matahari (Rukmana, 2000).

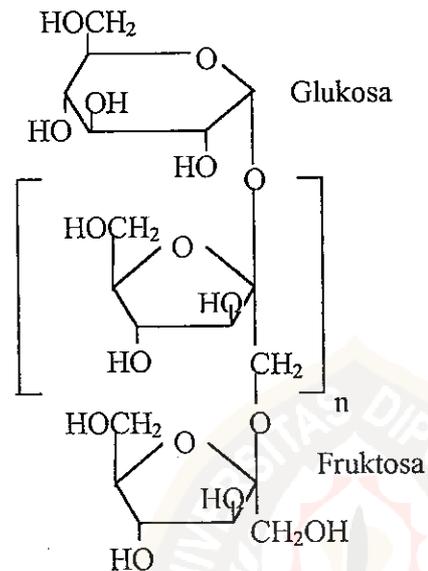
Tanaman dahlia mempunyai daya adaptasi luas terhadap jenis-jenis tanah pertanian, salah satunya adalah tanah latosol. Tanah latosol adalah tanah yang berwarna coklat sampai kuning, bertekstur liat dan berstruktur gembur serta biasanya berpH 4.5-6.5 (Rukmana, 2000). Berdasarkan hasil penelitian Yulandi (2003), kondisi tanah perkebunan tanaman dahlia di daerah Bandungan-Ambarawa merupakan tanah jenis latosol dengan kisaran pH 4.2-6.2 dengan suhu rata-rata 25 °C.

D. Inulin

Inulin adalah senyawa yang dapat dihidrolisis menjadi fruktosa, tidak memberi warna bila dalam larutan inulin ditambahkan yodium dan mudah larut dalam air panas (Mayes *et al.*, 1987). Inulin adalah substrat dalam produksi “High Fructose Syrup” atau sirup fruktosa dan terdapat sebagai cadangan karbohidrat pada umbi sejumlah tanaman yang termasuk ke dalam famili Compositae (misal: umbi dahlia) (Xiao *et al.*, 1988). Total prosentase gula sebagai fruktosa dalam inulin bervariasi antara 75%-98%, tergantung pada kondisi penyimpanan setelah umbi tanaman setelah dipanen (Byun & Nahm, 1978).

Inulin merupakan polifruktan yaitu polimer fruktosa rantai linier dengan ikatan β -2,1-fruktanosidik dan satu unit terminal glukosa (Xiao *et al.*, 1988). Menurut Byun & Nahm (1978), struktur molekul dari senyawa inulin secara umum adalah G-F-F_n, dimana G adalah glukosa, F adalah fruktosa dan F_n adalah sejumlah unit fruktosa. Bagian terminal struktur molekul dari senyawa inulin adalah sukrosil (G-F-), yaitu molekul yang

terdiri dari ikatan antara glukosa dan fruktosa. Menurut De Lenheer & Hoebregs (1994), struktur molekul dari senyawa inulin secara umum ditunjukkan dengan gambar sebagai berikut:



Keterangan:

n = sejumlah unit fruktosa yang berligasi dengan terminal glukosa.

Gambar 01. Struktur molekul dari senyawa inulin

E. Enzim

E.1. Tinjauan Umum Enzim.

Enzim adalah protein yang diproduksi oleh sel hidup dan berfungsi sebagai katalis dalam reaksi kimia (Parker, 1986). Menurut Pelczar (1986), enzim adalah katalis hayati, yang meskipun dalam jumlah sedikit mempunyai kemampuan untuk mempercepat berlangsungnya reaksi kimiawi tanpa enzim itu sendiri

terkonsumsi atau berubah setelah reaksi selesai. Katalis bersifat spesifik, artinya suatu katalis tertentu akan berfungsi pada suatu jenis reaksi tertentu saja.

Enzim sebagai produk sel menyebabkan enzim hanya dapat disintesis jika sel mempunyai gen untuk enzim tersebut (Sadikin, 2002). Suatu organisme harus mempunyai gen struktural untuk menentukan sintesis struktur enzim dalam hal urutan asam-asam aminonya, yang diperlukan untuk kehidupannya. Terdapat pengendalian genetis yang menyebabkan terjadinya induksi dan represi sintesis enzim dalam sel. Proses induksi terjadi jika suatu substrat dari reaksi yang dikatalisis oleh enzim berperan sebagai induser untuk terjadinya sintesis enzim tersebut. Penggabungan represor dan induser akan membentuk kompleks yang tidak aktif sehingga tidak dapat berada pada gen operator dan mRNA dapat disintesis oleh gen-gen struktural sebagai produk enzim. Proses represi terjadi jika suatu substrat dari reaksi yang dikatalisis oleh enzim berperan sebagai korepresor sehingga enzim tersebut tidak dapat disintesis. Korepresor yang bergabung dengan represor membentuk kompleks aktif dan berada pada gen operator sehingga menyebabkan mRNA tidak dapat disintesis oleh gen-gen struktural sebagai produk enzim (Pelczar, 1986).

Ada dua tipe enzim, yaitu enzim intraselular (endoenzim) dan enzim ekstraselular (eksoenzim). Sintesis kedua enzim tersebut terjadi di dalam sel. Enzim intraselular adalah enzim yang berfungsi di dalam sel untuk mensintesis bahan seluler dan menguraikan nutrien untuk menyediakan energi yang dibutuhkan oleh sel (Pelczar, 1986).

Enzim ekstraseluler adalah enzim yang berfungsi di luar sel, berfungsi melangsungkan perubahan-perubahan pada nutrien di sekitarnya sehingga memungkinkan nutrien tersebut memasuki sel (Pelczar, 1986) dan biasanya disekresikan oleh mikroorganisme tanah, misal khamir (Priest, 1992).

Berdasarkan ada tidaknya substrat dan pembentukan enzim, maka enzim dibedakan menjadi dua tipe, yaitu enzim konstitutif dan enzim adaptif. Enzim konstitutif adalah enzim yang selalu dihasilkan oleh sel, sedangkan enzim adaptif (terinduksi) adalah enzim yang dihasilkan oleh sel sebagai respon terhadap adanya substrat tertentu. Substrat atau senyawa yang strukturnya menyerupai substrat yang dapat menyebabkan proses pembentukan enzim (induksi enzim) disebut induser (Pelczar, 1986).

Enzim dapat berupa protein murni atau gabungan antara protein dan gugus non protein. Protein enzim disebut apoenzim, sedangkan gugus non protein enzim disebut kofaktor. Kofaktor ada dua macam, yaitu yang terikat kuat pada enzim disebut sebagai gugus prostetik dan yang tidak terikat kuat pada enzim disebut sebagai koenzim (Pelczar, 1986). Penggabungan antara apoenzim dan kofaktor menghasilkan molekul yang disebut holoenzim. Apoenzim dan kofaktor jika tidak bergabung menyebabkan enzim menjadi tidak aktif, sedangkan jika apoenzim dan kofaktor membentuk holoenzim maka enzim menjadi aktif (Poedjiadi, 1994).

Enzim akan terdenaturasikan oleh panas, terpresipitasikan (terendapkan) oleh etanol atau garam-garam anorganik berkonsentrasi tinggi seperti ammonium sulfat, dan tidak dapat melewati membran semipermeabel atau membran selektif (tidak terdialisis). Fungsi utama enzim adalah mengurangi energi aktivasi dari suatu reaksi kimia. Energi aktivasi ialah jumlah energi yang dibutuhkan pada suatu mekanisme kerja enzim untuk membawa suatu substrat ke status reaktifnya pada saat terbentuk kompleks enzim-substrat, sehingga memungkinkan substrat ditransformasi oleh kerja enzim (Pelczar, 1986). Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, pH, suhu, dan inhibitor (Poedjiadi, 1994).

Konsentrasi dari enzim dapat diungkapkan oleh aktivitas katalitiknya, sehingga perubahan konsentrasi enzim akan terlihat sebagai perubahan aktivitas katalitik enzim. Aktivitas biologis enzim adalah sebagai biokatalis, yaitu yang mempermudah perubahan substrat menjadi produk (Sadikin, 2002). Adanya enzim akan mengurangi jumlah substrat dan bersamaan dengan itu menambah konsentrasi produk. Menurut Pelczar (1986), reaksi enzimatis dinyatakan dengan persamaan reaksi keseluruhan sebagai berikut :



Menurut Sadikin (2002), gerak termodinamik mengakibatkan terjadinya tumbukan antara molekul enzim dan substrat. Aktivitas enzim pada suhu rendah akan berkurang karena berkurangnya gerak termodinamik. Pada suhu tinggi enzim akan

terdenaturasi sehingga menjadi tidak aktif untuk mengikat molekul substrat dan mengurangi aktivitas enzim.

Konsentrasi ion H atau pH mempengaruhi berbagai rantai samping asam-asam amino dari suatu enzim untuk mengalami ionisasi dan polarisasi yang tepat pada saat pembentukan struktur tiga dimensi enzim, yang penting dalam aktivasi enzim. Tidak sesuai pH yang digunakan dalam penentuan aktivitas enzim dapat menyebabkan denaturasi struktur tiga dimensi enzim dan berkurangnya aktivitas enzim (Sadikin, 2002).

Inhibitor merupakan senyawa yang dapat menghambat kerja enzim sehingga mengurangi aktivitas enzim. Penghambatan terjadi karena terikatnya inhibitor pada enzim baik secara reversibel maupun secara irreversibel, sehingga menyebabkan enzim tidak dapat mengikat substrat (Sadikin, 2002).

Dalam penetapan aktivitas enzim secara kuantitatif, perlu diketahui mengenai sifat reaksi yang dikatalisis, konsentrasi substrat, pH optimum, suhu optimum dan metoda analisis untuk menentukan lenyapnya substrat atau munculnya produk-produk reaksi (Pelczar, 1986). Uji aktivitas enzim dilakukan dengan menggunakan parameter aktivitas enzim dan aktivitas spesifik enzim. Penentuan aktivitas enzim secara kuantitatif dinyatakan dalam unit enzim. Unit enzim adalah sejumlah enzim yang mengkatalisis transformasi satu mikromol substrat setiap menit pada temperatur, konsentrasi substrat dan pH tertentu (Unit (U)/ml substrat/menit). (Parker, 1986). Aktivitas spesifik enzim adalah parameter yang biasanya digunakan dalam proses pemurnian enzim. Nilai aktivitas spesifik enzim (aktivitas enzim/mg protein) akan naik bila enzim berada dalam keadaan yang lebih murni (Schumm, 1993).

Aktivitas enzim biasanya digunakan untuk menggambarkan jumlah enzim. Metoda spektrofotometri dapat digunakan untuk menentukan aktivitas enzim. Pada metode ini, tiap senyawa (misal: enzim) mampu menyerap cahaya secara maksimum pada panjang gelombang cahaya tertentu. Penyerapan cahaya tersebut menyebabkan intensitas cahaya pada panjang gelombang tersebut akan berkurang, sehingga cahaya yang keluar dari "cuvel" spektrofotometer yang mengandung larutan senyawa tersebut juga berkurang. Menurut hukum Beer-Lambert, penurunan intensitas cahaya atau disebut "Optical Density" (O.D) berbanding lurus dengan konsentrasi senyawa yang menyerap cahaya tersebut. Pengukuran ini dilakukan dengan alat spektrofotometer yang menggunakan absorpsi atau serapan cahaya pada panjang gelombang tertentu (Sadikin, 2002).

E.2. Inulinase (E.C. 3.2.1.7).

Inulinase (E.C. 3.2.1.7) adalah enzim yang digolongkan sebagai 2,1- β -D-fructan-fructanohydrolase. Inulinase terdapat secara alami pada umbi tanaman yang mengandung inulin (misal: umbi dahlia) atau pada mikroorganisme, misal: khamir (Xiao *et al.*, 1988). Pada khamir, inulinase terdapat sebagai enzim ekstraseluler (Rouwenhorst^b *et al.*, 1990).

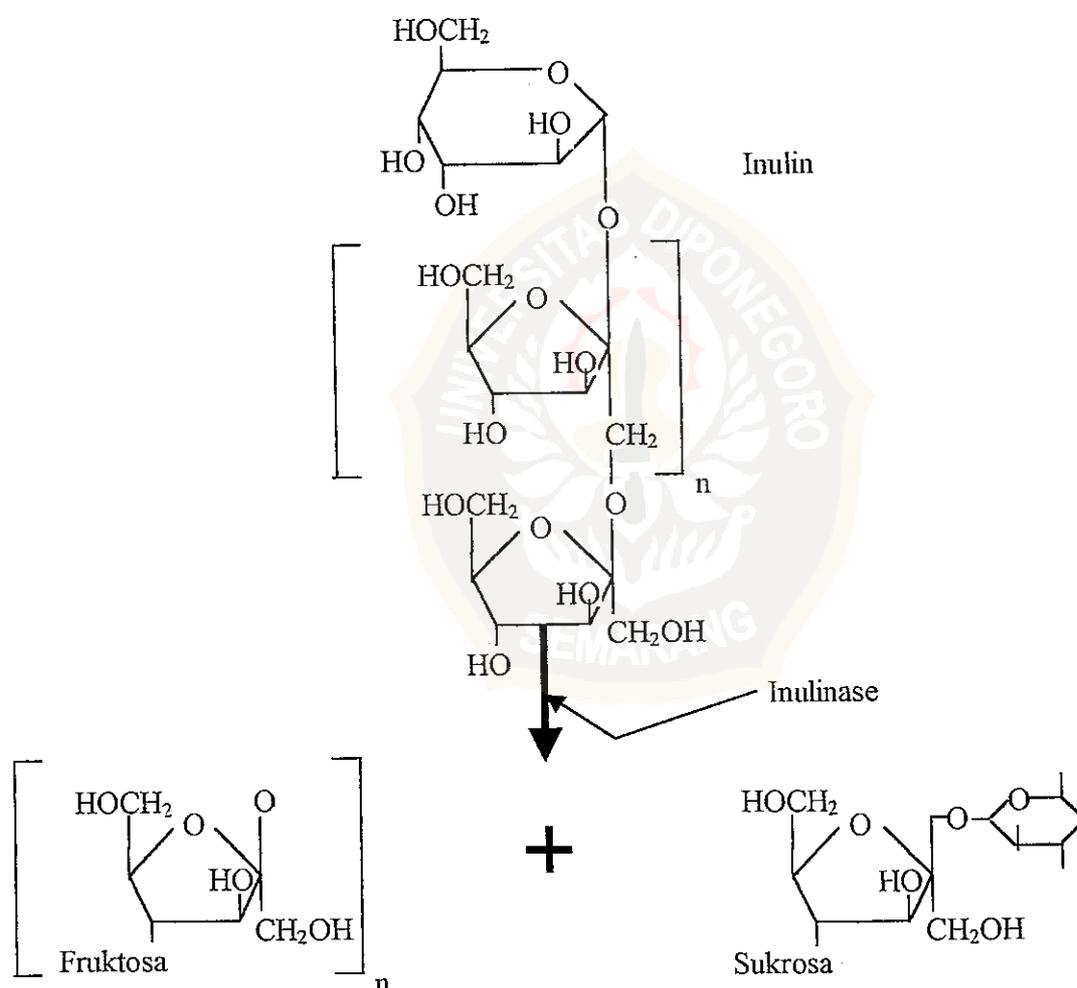
Inulinase digolongkan sebagai enzim hidrolase, yang berfungsi mengkatalisis reaksi hidrolisis inulin menjadi fruktosa dalam suatu proses tunggal atau "single step" (Tisnadjaja dkk., 1998). Inulinase ekstraseluler menghidrolisis ikatan β , 2-1 fruktanosidik polimer fruktosa (misal: inulin), menjadi fruktosa dan glukosa (Byun & Nahm, 1978).

Terdapat dua tipe inulinase berdasarkan tempat aktivasinya pada substrat inulin, yaitu eksoinulinase dan endoinulinase. Eksoinulinase memecah inulin dari ujung non reduktif, sedangkan endoinulinase memecah inulin secara acak menjadi oligosakarida (Allais *et al.*, 1986).

Pertumbuhan khamir pada medium yang mengandung inulin sebagai satu-satunya sumber karbon akan menyebabkan terjadinya sintesis inulinase, inulin merupakan inducer dalam sintesis inulinase karena enzim ini bersifat adaptif (Xiao *et al.*, 1988). Inulinase disintesis selama terjadi pertumbuhan khamir dan mencapai maksimum pada fase stasioner (Byun & Nahm, 1978). Inulinase yang terdapat pada kultur cair disebut sebagai inulinase supernatan (Rouwenhorst^b *et al.*, 1990) dan bersifat termotoleran (Park *et al.*, 2001). Produksi inulinase ekstraseluler dari kultur cair digunakan sebagai sumber inulinase supernatan (Rouwenhorst^b *et al.*, 1990).

Produksi “High Fructose Syrup” atau sirup fruktosa dapat dilakukan melalui hidrolisis inulin. Ada dua cara untuk menghidrolisis inulin, yaitu hidrolisis inulin dengan menggunakan senyawa asam dan hidrolisis inulin secara enzimatik (Park *et al.*, 2001). Hidrolisis inulin dengan menggunakan senyawa asam (pH 1-2) pada suhu 80°C-100 °C memberikan hasil dengan kualitas rendah karena fruktosa mudah terdegradasi pada pH yang rendah dan diperoleh hidrolisat berwarna gelap serta terbentuknya senyawa “difructose anhydride” sebagai hasil samping yang tidak diinginkan. Hidrolisis inulin secara enzimatik tidak menghasilkan kedua hal tersebut (Xiao *et al.*, 1988).

Satu unit aktivitas inulinase dinyatakan sebagai sejumlah enzim yang mengkatalisis pembebasan satu mikromol fruktosa setiap menit pada pH 4.5 dan suhu 50°C (Rouwenhorst^b *et al.*, 1990). Pemecahan inulin oleh inulinase terjadi pada kondisi lingkungan yang bersifat asam, karena inulinase aktif pada suasana asam (Rouwenhorst^a *et al.*, 1990) Reaksi hidrolisis inulin oleh inulinase secara keseluruhan ditunjukkan oleh gambar sebagai berikut :



Gambar 02. Total reaksi hidrolisis inulin oleh inulinase