

Maria Erna Kustyawati

Saccharomyces Cerevisiae

Metabolit dan Agenia
Modifikasi Pangan



Saccharomyces Cerevisiae

**Metabolit dan Agensia
Modifikasi Pangan**

Maria Erna Kustyawati

 **GRAHA ILMU**

Saccharomyces Cerevisiae

Metabolit dan Agensia Modifikasi Pangan

Maria Erna Kustyawati



GRAHA ILMU

Saccharomyces cerevisiae: METABOLIT dan AGENSIA MODIFIKASI PANGAN

oleh Maria Erna Kustyawati

Hak Cipta © 2018 pada penulis



GRAHA ILMU

Ruko Jambusari 7A Yogyakarta 55283

Telp: 0274-889398; Fax: 0274-889057; E-mail: info@grahailmu.co.id

Hak Cipta dilindungi undang-undang. Dilarang memperbanyak atau memindahkan sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apa pun, secara elektronik maupun mekanis, termasuk memfotokopi, merekam, atau dengan teknik perekaman lainnya, tanpa izin tertulis dari penerbit.

Tajuk Entri Utama: Kustyawati, Maria Erna

Saccharomyces cerevisiae: METABOLIT dan AGENSIA MODIFIKASI PANGAN/Maria Erna Kustyawati

- Edisi Pertama. Cet. Ke-1. - Yogyakarta: Graha Ilmu, 2018
xvi + 140 hlm.; 24 cm

Bibliografi: 19, 36-38, 61-66, 92-95, 116-118, 125, 138-139,

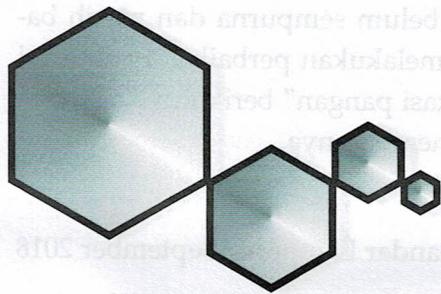
ISBN : 978-602-262-847-7

E-ISBN : 978-602-262-848-4

1. Mikroorganisme-Fungsi

I. Judul

579.5



KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbilalamiin, karena atas berkah dan rahmat Allah SWT penulis dapat menyelesaikan penulisan buku *Saccharomyces cerevisiae: METABOLIT dan AGENSIA MODIFIKASI PANGAN*. Buku ini sebagai buku pegangan atau acuan pemahaman mengenai manfaat khamir di dalam pangan. Morfologi, fisiologi dan reproduksi khamir telah diulas dalam buku Signifikansi Khamir dalam Pangan yang telah terbit. Buku tentang aplikasi khamir yang berbahasa Indonesia belum banyak tersedia. Sementara, penelitian mengenai aplikasi khamir telah cukup banyak dilakukan di Indonesia. Sehubungan dengan hal tersebut, penulis yang mengampu mata kuliah Mikrobiologi Pangan, dan Fermentasi menulis buku peranan *Saccharomyces cerevisiae* yang berkaitan dengan perkuliahan tersebut. Buku ini membahas pengertian modifikasi di dalam pengolahan pangan, kemampuan *S. cerevisiae* dalam merombak komponen pangan, produk metabolit yang dihasilkan oleh *S. cerevisiae*, modifikasi terhadap perubahan sifat beberapa produk pangan oleh *S. cerevisiae* seperti tapioka, tempe, modifikasi fermentasi kakao, dan fermentasi madu.

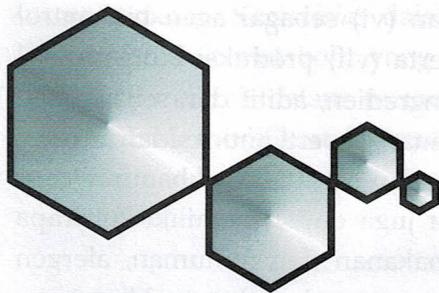
Buku ini ditulis berdasarkan pada teori-teori dan pendapat dari beberapa ahli dalam bidang mikrobiologi khamir yang ada dalam buku mikrobiologi pangan, dan hasil-hasil penelitian yang dilakukan penulis dan para peneliti di Indonesia yang dipublikasikan pada beberapa jurnal Nasional dan Internasional. Dalam buku ini juga terdapat hasil penelitian yang dilakukan di luar Indonesia yang dapat dijadikan acuan untuk melakukan penelitian di Indonesia.

Penulis menyadari bahwa buku ini belum sempurna dan masih banyak kekurangannya. Penulis akan terus melakukan perbaikan pada edisi buku "aktivitas *S. cerevisiae* dalam modifikasi pangan" berikutnya. Semoga buku ini memberikan manfaat bagi yang membacanya.

Bandar Lampung, September 2018

Wassalam,

Penulis



PENDAHULUAN

Modifikasi bahan pangan adalah proses perubahan karakteristik fisik, kimia, atau mikrobiologi bahan pangan atau produk pangan menjadi lebih baik dari karakteristik aslinya. Modifikasi bahan pangan umumnya bertujuan memperbaiki nutrisi, memberikan nilai tambah, meningkatkan fungsi, dan sensori. Proses perubahan sifat bahan pangan ini dapat berlangsung melalui perlakuan kimia, fisik, dan fermentasi, serta kombinasi antara perlakuan. Perlakuan kimia meliputi antara lain penambahan senyawa asam, alkali, dan enzim komersial; perlakuan fisik antara lain penggunaan panas, radiasi, dan tekanan tinggi; perlakuan fermentasi dengan mikroorganisme indigenus atau menambahkan kultur starter. *Saccharomyces cerevisiae* adalah khamir penting yang pernah dieksploitasi oleh manusia, karena telah digunakan selama beberapa ribu tahun untuk produksi berbagai makanan. Selain produk roti dan fermentasi beralkohol tradisional, *Saccharomyces cerevisiae* telah digunakan untuk keperluan industri yang beragam. Beberapa aplikasinya dalam produk industri antara lain: (i) fermentasi laktosa menjadi etanol, untuk menghasilkan susu bebas laktosa untuk penderita intoleransi laktosa; (ii) produksi berbagai alditols, seperti gliserol atau D-glucitol; (iii) produksi protein dari alkana dan limbah kertas-pulp; (iv) menyediakan enzim, seperti β -fructofuranosidase (invertase), α - dan β -galaktosidase dan lipase; (v) produksi senyawa untuk tujuan penelitian, seperti, novel ikatan karbon-

karbon dan methyldiols dari aldehida dan (vi) sebagai agen biokontrol karena mempunyai aktivitas antifungi, serta (vii) produksi biomassa sel (makanan dan pakan khamir), produksi ingredien, aditif dan sebagai alat bantu pengolahan untuk pengolahan makanan, seperti antioksidan, aroma, warna, rasa dan vitamin, khamir probiotik, dan biocatalysts khamir. Di sisi lain, keberadaan dan metabolisme khamir juga dapat memiliki beberapa aspek merugikan, seperti pembusukan makanan dan minuman, alergen makanan, keamanan pangan dan kesehatan yang terkait dengan khamir.

Aktivitas *S. cerevisiae* dalam melakukan perombakan komponen bahan pangan sangat berkaitan dengan enzim yang diproduksi olehnya. Disamping itu, *S. cerevisiae* dapat menghasilkan beragam metabolit sekunder, penghasil berbagai senyawa kimia, semacam pabrik sel mikroba. *S. cerevisiae* memiliki status yang GRAS (generally recognized as safe), yang merupakan keuntungan dalam produksi senyawa untuk konsumsi manusia (mis. pembentukan antioksidan dan senyawa aroma selama fermentasi). Sel khamir yang mengalami lisis susunan selnya hancur, terjadi degradasi enzimatik komponen makromolekul yang dibebaskan ke dalam lingkungan/substrat beserta enzimnya. *Saccharomyces cerevisiae* merupakan sumber yang kaya vitamin B dan kromium, dan telah banyak dipelajari secara ekstensif sebagai bahan obat. Telah dilaporkan penggunaan ragi (*Saccharomyces boulardii* atau *Saccharomyces cerevisiae*, khamir roti komersial) sebagai agen biotherapeutic potensial yang kombinasi dengan antibiotik standar untuk pengobatan diare yang disebabkan oleh *Clostridium difficile* dan kolitis. Sebagai sumber vitamin B, strain *Saccharomyces cerevisiae* dapat menghilangkan stres, depresi, mudah tersinggung, dan kelelahan dan juga membantu mengurangi beberapa efek penuaan. Sebagai sumber biotin, *Saccharomyces cerevisiae* bisa memperkuat rambut dan kuku, dan mengobati cradle cap dan diabetes neuropati. Sebagai sumber kromium, *Saccharomyces cerevisiae* dapat menurunkan kadar gula darah pada orang dengan diabetes tipe-2, mengurangi risiko kolesterol tinggi dalam darah, dan membantu dalam pengobatan jerawat kronis dan furunkulosis. Kromium merupakan senyawa yang sulit bagi tubuh untuk menyerap, tetapi lebih mudah diserap bila berada bersama sama dengan *Saccharomyces cerevisiae*. Selain itu, *Saccharomyces cerevisiae* juga memiliki beberapa mineral termasuk selenium, zinc, fosfor dan magnesium, yang sering digunakan untuk menghilangkan nafsu makan. Buku ini menjabarkan

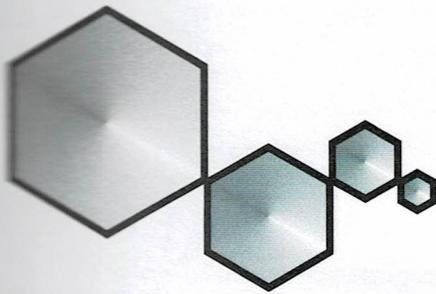
beberapa peran *S.cerevisiae* dalam perombakan komponen kimia bahan pangan, produk metabolit yang dihasilkan, struktur dan fungsi dinding sel, dan perannya dalam memodifikasi pangan seperti produk tapioka termodifikasi, modifikasi fermentasi kakao dan kopi, tempe termodifikasi, serta madu.

-oo0oo-

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR PUSTAKA	xx
DAFTAR ISI	xx
1. Peran <i>S.cerevisiae</i> dalam Perombakan Komponen Pangan Oleh Khamir	1
2. Produk Metabolit Khamir	21
3. Dinding Sel Khamir	39
4. Peran <i>S.cerevisiae</i> dalam Modifikasi Tapioka	67
5. Peran <i>S.cerevisiae</i> dalam Fermentasi Kakao	97
6. Peran <i>S.cerevisiae</i> dalam Pangan Terfermentasi	119
7. Peran <i>S.cerevisiae</i> dalam Fermentasi Kopi	127

-oo0oo-



DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	v
PENDAHULUAN	vii
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xv
Bab 1 Perombakan Komponen Pangan Oleh Khamir	1
Bab 2 Produk Metabolit Khamir	21
Bab 3 Dinding Sel Khamir	39
Bab 4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dalam Modifikasi Tapioka	67
Bab 5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dalam Fermentasi Kakao	97
Bab 6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dalam Pangan Terfermentasi	119
Bab 7 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dalam Fermentasi Kopi	127

-oo0oo-

***SACCHAROMYCES
CEREVISIAE***

Metabolit dan Agensia Modifikasi Pangan

SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Metabolit dan Agensia Modifikasi Pangan

Maria Erna Kustyawati



GRAHA ILMU

Saccharomyces cerevisiae: METABOLIT dan AGENSIA MODIFIKASI PANGAN

oleh Maria Erna Kustyawati

Hak Cipta © 2018 pada penulis



GRAHA ILMU

Ruko Jambusari 7A Yogyakarta 55283

Telp: 0274-889398; Fax: 0274-889057; E-mail: info@grahailmu.co.id

Hak Cipta dilindungi undang-undang. Dilarang memperbanyak atau memindahkan sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apa pun, secara elektronik maupun mekanis, termasuk memfotokopi, merekam, atau dengan teknik perekaman lainnya, tanpa izin tertulis dari penerbit.

Tajuk Entri Utama: Lisanawati, Go

Saccharomyces cerevisiae: METABOLIT dan AGENSIA MODIFIKASI PANGAN/Maria Erna Kustyawati

- Edisi Pertama. Cet. Ke-1. - Yogyakarta: Graha Ilmu, 2018

xvi + 140 hlm.; 24 cm

Bibliografi:

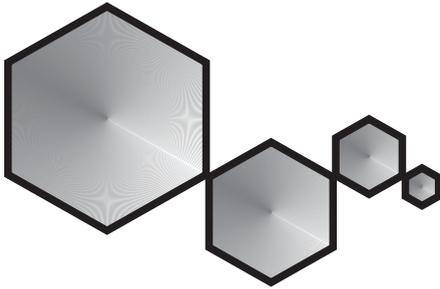
ISBN :

E-ISBN :

1.

I. Judul

.....



KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbilalamiin, karena atas berkah dan rahmat Allah SWT penulis dapat menyelesaikan penulisan buku *Saccharomyces cerevisiae: METABOLIT dan AGENSIA MODIFIKASI PANGAN*. Buku ini sebagai buku pegangan atau acuan pemahaman mengenai manfaat khamir di dalam pangan. Morfologi, fisiologi dan reproduksi khamir telah diulas dalam buku Signifikansi Khamir dalam Pangan yang telah terbit. Buku tentang aplikasi khamir yang berbahasa Indonesia belum banyak tersedia. Sementara, penelitian mengenai aplikasi khamir telah cukup banyak dilakukan di Indonesia. Sehubungan dengan hal tersebut, penulis yang mengampu mata kuliah Mikrobiologi Pangan, dan Fermentasi menulis buku peranan *Saccharomyces cerevisiae* yang berkaitan dengan perkuliahan tersebut. Buku ini membahas pengertian modifikasi di dalam pengolahan pangan, kemampuan *S. cerevisiae* dalam merombak komponen pangan, produk metabolit yang dihasilkan oleh *S. cerevisiae*, modifikasi terhadap perubahan sifat beberapa produk pangan oleh *S. cerevisiae* seperti tapioka, tempe, modifikasi fermentasi kakao, dan fermentasi madu.

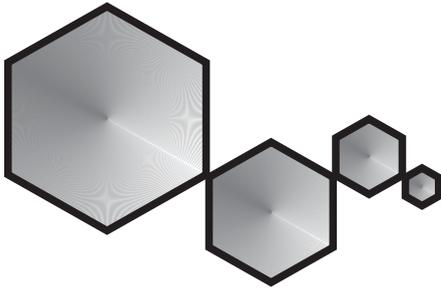
Buku ini ditulis berdasarkan pada teori-teori dan pendapat dari beberapa ahli dalam bidang mikrobiologi khamir yang ada dalam buku mikrobiologi pangan, dan hasil-hasil penelitian yang dilakukan penulis dan para peneliti di Indonesia yang dipublikasikan pada beberapa jurnal Nasional dan Internasional. Dalam buku ini juga terdapat hasil penelitian yang dilakukan di luar Indonesia yang dapat dijadikan acuan untuk melakukan penelitian di Indonesia.

Penulis menyadari bahwa buku ini belum sempurna dan masih banyak kekurangannya. Penulis akan terus melakukan perbaikan pada edisi buku "aktivitas *S. cerevisiae* dalam modifikasi pangan" berikutnya. Semoga buku ini memberikan manfaat bagi yang membacanya.

Bandar Lampung, September 2018

Wassalam,

Penulis



PENDAHULUAN

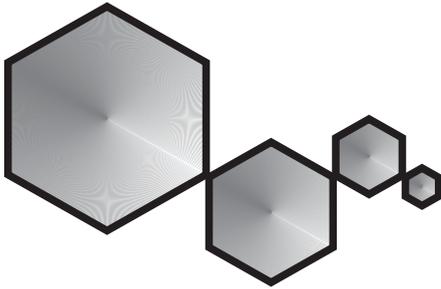
Modifikasi bahan pangan adalah proses perubahan karakteristik fisik, kimia, atau mikrobiologi bahan pangan atau produk pangan menjadi lebih baik dari karakteristik aslinya. Modifikasi bahan pangan umumnya bertujuan memperbaiki nutrisi, memberikan nilai tambah, meningkatkan fungsi, dan sensori. Proses perubahan sifat bahan pangan ini dapat berlangsung melalui perlakuan kimia, fisik, dan fermentasi, serta kombinasi antara perlakuan. Perlakuan kimia meliputi antara lain penambahan senyawa asam, alkali, dan enzim komersial; perlakuan fisik antara lain penggunaan panas, radiasi, dan tekanan tinggi; perlakuan fermentasi dengan mikroorganisme indigenus atau menambahkan kultur starter. *Saccharomyces cerevisiae* adalah khamir penting yang pernah dieksploitasi oleh manusia, karena telah digunakan selama beberapa ribu tahun untuk produksi berbagai makanan. Selain produk rerotian dan fermentasi beralkohol tradisional, *Saccharomyces cerevisiae* telah digunakan untuk keperluan industri yang beragam. Beberapa aplikasinya dalam produk industri antara lain: (i) fermentasi laktosa menjadi etanol, untuk menghasilkan susu bebas laktosa untuk penderita intoleransi laktosa; (ii) produksi berbagai alditols, seperti gliserol atau D-glucitol; (iii) produksi protein dari alkana dan limbah kertas-pulp; (iv) menyediakan enzim, seperti β -fructofuranosidase (invertase), α - dan β -galaktosidase dan lipase; (v) produksi senyawa untuk tujuan penelitian, seperti, novel ikatan karbon-

karbon dan methylidiols dari aldehida dan (vi) sebagai agen biokontrol karena mempunyai aktivitas antifungi, serta (vii) produksi biomassa sel (makanan dan pakan khamir), produksi ingredien, aditif dan sebagai alat bantu pengolahan untuk pengolahan makanan, seperti antioksidan, aroma, warna, rasa dan vitamin, khamir probiotik, dan biocatalysts khamir. Di sisi lain, keberadaan dan metabolisme khamir juga dapat memiliki beberapa aspek merugikan, seperti pembusukan makanan dan minuman, alergen makanan, keamanan pangan dan kesehatan yang terkait dengan khamir.

Aktivitas *S. cerevisiae* dalam melakukan perombakan komponen bahan pangan sangat berkaitan dengan enzim yang diproduksi olehnya. Disamping itu, *S. cerevisiae* dapat menghasilkan beragam metabolit sekunder, penghasil berbagai senyawa kimia, semacam pabrik sel mikroba. *S. cerevisiae* memiliki status yang GRAS (generally recognized as safe), yang merupakan keuntungan dalam produksi senyawa untuk konsumsi manusia (mis. pembentukan antioksidan dan senyawa aroma selama fermentasi). Sel khamir yang mengalami lisis susunan selnya hancur, terjadi degradasi enzimatik komponen makromolekul yang dibebaskan ke dalam lingkungan/substrat beserta enzimnya. *Saccharomyces cerevisiae* merupakan sumber yang kaya vitamin B dan kromium, dan telah banyak dipelajari secara ekstensif sebagai bahan obat. Telah dilaporkan penggunaan ragi (*Saccharomyces boulardii* atau *Saccharomyces cerevisiae*, khamir roti komersial) sebagai agen biotherapeutic potensial yang kombinasi dengan antibiotik standar untuk pengobatan diare yang disebabkan oleh *Clostridium difficile* dan kolitis. Sebagai sumber vitamin B, strain *Saccharomyces cerevisiae* dapat menghilangkan stres, depresi, mudah tersinggung, dan kelelahan dan juga membantu mengurangi beberapa efek penuaan. Sebagai sumber biotin, *Saccharomyces cerevisiae* bisa memperkuat rambut dan kuku, dan mengobati cradle cap dan diabetes neuropati. Sebagai sumber kromium, *Saccharomyces cerevisiae* dapat menurunkan kadar gula darah pada orang dengan diabetes tipe-2, mengurangi risiko kolesterol tinggi dalam darah, dan membantu dalam pengobatan jerawat kronis dan furunkulosis. Kromium merupakan senyawa yang sulit bagi tubuh untuk menyerap, tetapi lebih mudah diserap bila berada bersama sama dengan *Saccharomyces cerevisiae*. Selain itu, *Saccharomyces cerevisiae* juga memiliki beberapa mineral termasuk selenium, zinc, fosfor dan magnesium, yang sering digunakan untuk menghilangkan nafsu makan. Buku ini menjabarkan

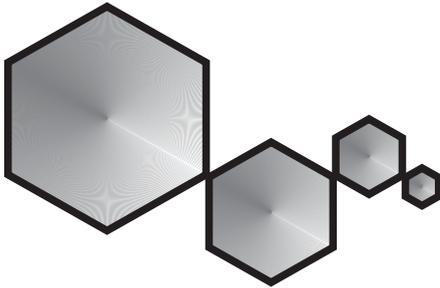
beberapa peran *S.cerevisiae* dalam perombakan komponen kimia bahan pangan, produk metabolit yang dihasilkan, struktur dan fungsi dinding sel, dan perannya dalam memodifikasi pangan seperti produk tapioka termodifikasi, modifikasi fermentasi kakao dan kopi, tempe termodifikasi, serta madu.

-oo0oo-



DAFTAR ISI

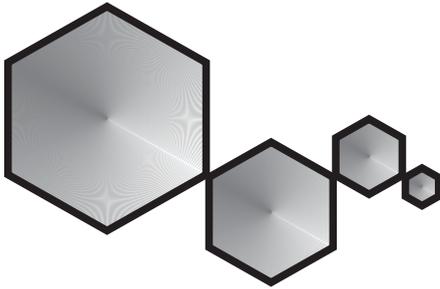
KATA PENGANTAR	v
PENDAHULUAN	vii
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xv
Bab 1 Perombakan Komponen Pangan Oleh Khamir	1
Bab 2 Produk Metabolit Khamir	21
Bab 3 Dinding Sel Khamir	39
Bab 4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dalam Modifikasi Tapioka	67
Bab 5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dalam Fermentasi Kakao	97
Bab 6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dalam Pangan Terfermentasi	119
Bab 7 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dalam Fermentasi Kopi	127



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1.	Berbagai jalur reaksi perombakan glukosa dan produk yang dihasilkan.	2
Gambar 1.2.	Perombakan glukosa menjadi etanol tanpa dihasilkan energi.	3
Gambar 1.3.	Pembentukan komponen flavor sebagai hasil perombakan gula.	4
Gambar 1.4	Metabolisme glukosa untuk menghasilkan energi.	4
Gambar 1.5	Pembentukan asam laktat dari glukosa	5
Gambar 1.6.	Proses fermentasi polisakarida dan protein oleh bakteri di dalam usus manusia.	6
Gambar 1.7	Pembentukan senyawa alkohol tinggi oleh khamir	7
Gambar 1.8.	Biosintesis feniletanol melalui daur Ehrlich oleh <i>S.cerevisiae</i> endogenus	8
Gambar 1.9.	Pembentukan asam suksinat, asam propionate, asam asetat dari glukosa.	9
Gambar 1.10.	Reaksi antara alanin dan glisin menghasilkan ammonia. (www.studentsguide.in/microbiology/microbial-p , diakses 20 Desember 2009).	11
Gambar 1.11.	Konversi biokimia biomasa berselulosa menjadi biofuel. Melalui satu tahap (selulosa menjadi asam itakonik melalui sakarifikasi dan fermentasi simultan), dan melalui dua tahap	14

	(sakarifikasi selulosa menjadi glukosa, dan fermentasi glukosa menjadi asam itakonik).	14
Gambar 1.12.	Jalur pembentukan gliserol sebagai tanggapan terhadap tekanan osmotik. FBP: fruktosa-1,6-bifosfat, G3P: gliseraldehid-3-fosfat, DHAP: dihidroksiaseton-laktoilglutasion.	16
Gambar 2.1	Perbedaan antara metabolisme glukosa dan maltosa dalam sel khamir.	30
Gambar 2.2.	Skema jalur titik cabang piruvat.	33
Gambar 3.1.	Struktur senyawa penyusun dinding sel	43
Gambar 4.1.	Profil reaksi iodine granula tapioka terfermentasi oleh <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	70
Gambar 4.2.	Proofing dan pengembangan roti manis dengan substitusi tapioka termodifikasi <i>Saccharomyces</i> .	89
Gambar 5.1.	Nilai uji belah kakao pada fermentasi alami dan fermentasi menggunakan kultur campuran.	102
Gambar 5.3.	Kotak fermentasi	106

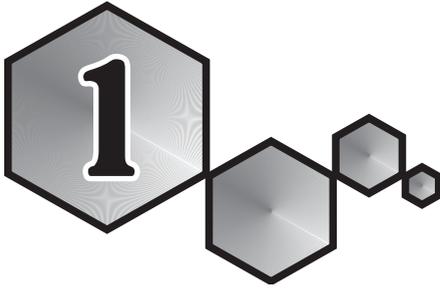


DAFTAR TABEL

Tabel 3.1.	Struktur makromolekul dinding sel <i>S. cerevisiae</i>	42
Tabel 3.2.	Produksi β -glukan sebagai berat kering pada <i>S.cerevisiae</i>	52
Tabel 4.1.	Komposisi kimia (bk/100g) dan karakteristik fisiko kimia tapioka dari lima varietas ubi kayu di Lampung.	69
Tabel 4.2.	Pati termodifikasi dan aplikasinya untuk produk pangan sesuai dengan sifatnya.	73
Tabel 4.3.	Aktivitas enzim ekstraseluler dari beberapa khamir	74
Tabel 4.4.	Komponen kimia dan sifat fisiko kimia tapioka (ubikayu varietas Kasetsart) termodifikasi dengan <i>S.cerevisiae</i> , Fermipan dan kultur campuran.	77
Tabel 4.5.	Formulasi pembuatan roti manis substitusi tapioka termodifikasi <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	87
Tabel 4.6.	Karakteristik roti manis substitusi tapioka termodifikasi <i>Saccharomyces</i> 50% pada berbagai perbandingan (tapioka termodifikasi:terigu dalam gram).	88
Tabel 5.1.	Efek penambahan kultur koktil terhadap sifat kimia Nib dan dibandingkan dengan SIN 2012.	103
Tabel 5.2.	Efek penambahan <i>S.cerevisiae</i> var <i>Chevalieri</i> terhadap derajat fermentasi kakao.	105
Tabel 5.3.	Efek penambahan <i>S.cerevisiae</i> dan aerasi pada kotak fermentasi terhadap Nib yang dihasilkan.	107

- Tabel 6.1. Efek khamir terhadap kandungan senyawa fungsional tempe 124
- Tabel 7.2. Nilai aktivitas aroma (OAV) komponen volatile yang mempengaruhi aroma Mead setelah fermentasi dengan *S.cerevisiae* QA23 pada pitching rate $1,5 \times 10^5$ sel/mL. 132
- Tabel 7.3. Konsentrasi senyawa volatile Mead setelah fermentasi oleh *S.cerevisiae* pada pitching rate $1,5 \times 10^5$ sel/mL, dan 4×10^7 sel/mL 132
- Tabel 7.4. Komposisi kimia Markisa kuning per 100 g bagian yang dapat dimakan. 135
- Tabel 7.5. Kandungan kimia nasi dengan kultur starter yang berbeda. 137

-oo0oo--



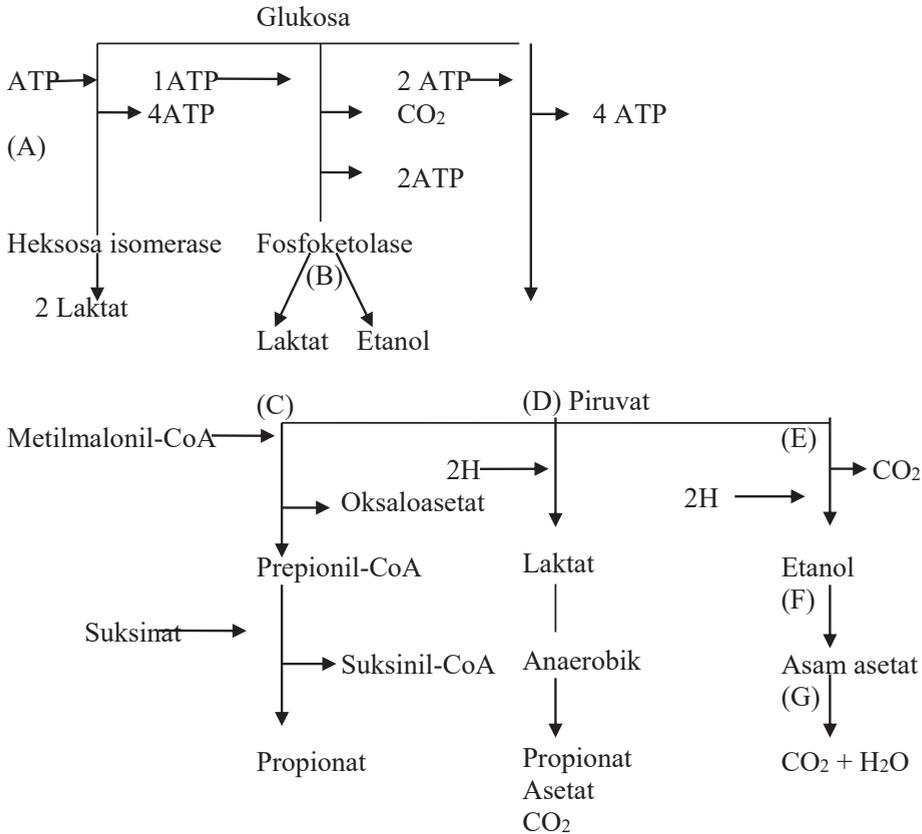
PEROMBAKAN KOMPONEN PANGAN OLEH KHAMIR

Aktivitas khamir dalam melakukan perombakan komponen bahan pangan sangat berkaitan dengan enzim yang diproduksi oleh khamir. Perubahan-perubahan kimia ini dapat memberikan manfaat atau keuntungan bagi manusia, tetapi dapat juga memberikan efek merugikan, misalnya menyebabkan pembusukan produk pangan. Perombakan beberapa komponen kimia pangan oleh khamir disajikan di dalam Bab ini. Setelah membaca Bab ini diharapkan pembaca memahami pengertian perombakan oleh khamir, menganalisis cara memanfaatkan hasil perombakan karbohidrat sesuai dengan yang diinginkannya, dan menjelaskan reaksi perombakan yang terlibat serta mampu memunculkan gagasan bagaimana meminimalkan hasil perombakan yang tidak dikehendaki.

1.1 Karbohidrat

Perombakan karbohidrat selama fermentasi merupakan pemecahan gula glukosa, fruktosa, sukrosa dan maltosa. Glukosa dapat difermentasi menjadi berbagai produk berdasarkan jenis mikroba yang melakukan perombakan (Gambar 1.1) serta produk yang dihasilkannya. Bakteri yang bersifat heterolaktik lebih penting dari pada homolaktik karena dapat menghasilkan komponen flavor dan aroma asetaldehid dan diasetil. Umumnya gula terdapat dalam makanan dan minuman sehingga mudah terjadi proses fermentasi oleh khamir. Jika menginginkan produk etanol

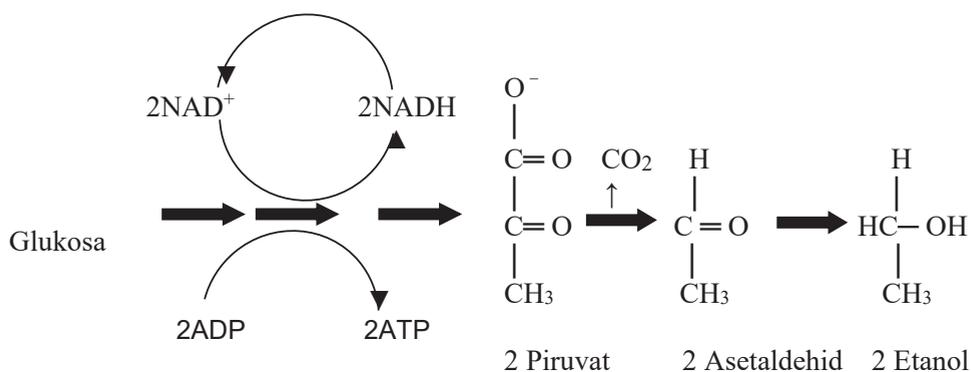
dan CO₂ maka gula-gula tersebut harus dalam bentuk monosakarida agar mudah terhidrolisa oleh khamir khususnya *Saccharomyces cerevisiae*.



Sumber: Jay, 2005

Gambar 1.1. Berbagai jalur reaksi perombakan glukosa dan produk yang dihasilkan. (A) golongan bakteri asam laktat yang bersifat homofermentatif merombak glukosa menghasilkan 2 mol asam laktat, (B) bakteri asam laktat yang bersifat heterofermentatif merombak glukosa menghasilkan asam laktat dan etanol, (C) dan (D) bakteri *Propionibacterium* merombak glukosa menghasilkan asam propionat, asam asetat dan CO₂, (E) khamir *Saccharomyces* spp merombak glukosa menghasilkan etanol dan CO₂, (F) *Acetobacter* spp mengoksidasi etanol menghasilkan asam asetat, (G) *Acetobacter* mengoksidasi asam asetat menghasilkan CO₂ dan H₂O.

Glukosa dirombak menjadi etanol sebagai produk utama dan tidak dihasilkan energi jika terjadi proses fermentasi atau respirasi anaerobic (Gambar 1.2). Proses ini berlangsung di dalam sel khamir maupun bakteri. Disamping gas CO_2 dan alkohol, perombakan gula oleh khamir selama fermentasi juga menghasilkan ratusan produk metabolit sekunder berupa komponen flavor yang dapat menimbulkan dampak nyata terhadap aroma dan rasa dalam suatu produk (Gambar 1.3). Senyawa metabolit tersebut dapat menimbulkan rasa manis yang segar, dan akan timbul aroma gas yang menyegarkan. Komponen flavor hasil perombakan gula dapat digolongkan dalam golongan alkohol (etanol dan alkohol tinggi), golongan ester (ester asetat, ester asam lemak rantai menengah), komponen karbonil (asetaldehid, diketon), komponen sulfur (hidrogen sulfit, sulfur dioksida) dan asam organik (asam-asam lemak rantai medium) (Boekhout and Robert, 2003).

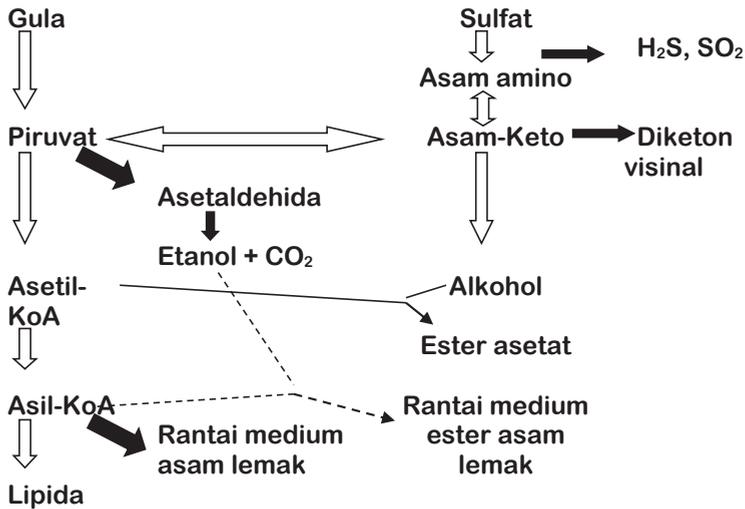


Sumber Ussery, 2000

Gambar 1.2. Perombakan glukosa menjadi etanol tanpa dihasilkan energi.

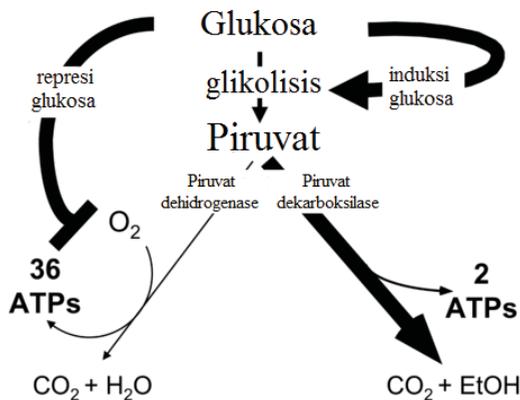
Glukosa juga dapat dimetabolisme menghasilkan energi seperti pada proses Gambar 1.4. Pada Gambar 1.4 proses respirasi anaerobik menghasilkan 2ATP yang berasal dari proses glikolisis, sedangkan pada respirasi aerobik menghasilkan 36ATP yang berasal dari glikolisis daur Krebs dan oksidasi fosforilasi. Proses perombakan karbohidrat dapat dilihat misalnya pada perombakan gula pada produk susu, dimana laktosa difermentasi oleh *Torula kefyri*, *T. koumiss*, *Saccharomyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluy. lactis*, dan *Candida pseudotropicalis*, dan menghasilkan minuman fermentasi sehat. *S.cerevisiae* tidak dapat merombak jenis gula disakarida misalnya laktosa dalam susu, karena tidak memiliki enzim untuk memecah ikatan antara

dua unit monosakarida. Oleh karena itu agar laktosa bisa diubah menjadi alkohol perlu peranan khamir *Kluyveromyces fragilis* yang memiliki enzim yang dapat mengkatalisa hidrolisis laktosa menjadi galaktosa dan glukosa. Selanjutnya glukosa ini akan lebih mudah difermentasi menjadi alkohol oleh *S.cerevisiae*.



Sumber : Boekhout and Robert, 2003

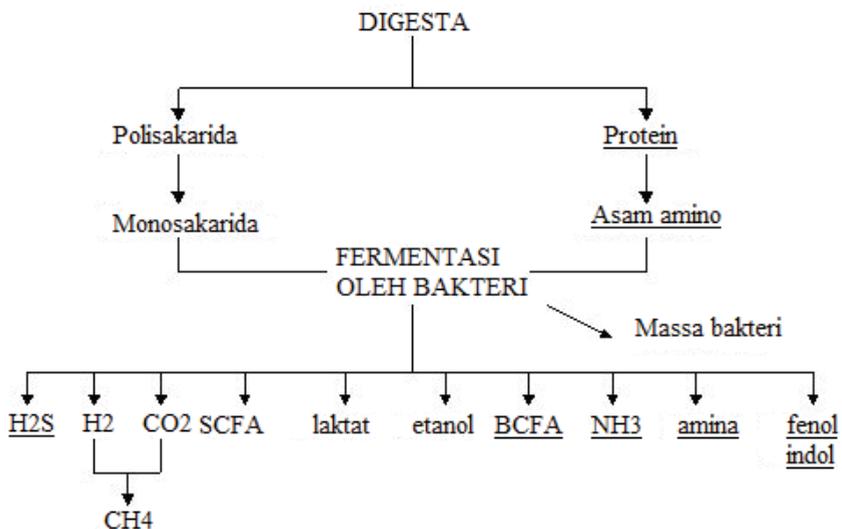
Gambar 1.3. Pembentukan komponen flavor sebagai hasil perombakan gula.



Sumber : Ussery, 2000

Gambar 1.4: Metabolisme glukosa untuk menghasilkan energi.

masuk ke jalur fermentasi atau perombakan secara anaerobik. Perombakan karbohidrat secara anaerobik umumnya menghasilkan produk akhir yang tak berbahaya atau bahkan menguntungkan, sedangkan perombakan protein secara anaerobik biasanya menghasilkan produk akhir yang berpotensi membahayakan kesehatan (Gambar 1.6). Misalnya, gas H_2S yang dihasilkan sangat reaktif dan menimbulkan efek negatif pada usus. Gas hidrogen (H_2), CO_2 dan metan (CH_4) tidak menimbulkan efek negatif, kecuali flatulensi. Asam lemak rantai pendek dan asam laktat menguntungkan mikroflora usus dengan menurunkan pH usus, dan sel-sel usus memerlukan asam lemak rantai pendek sebagai sumber energi. Etanol segera dimetabolisme oleh bakteri usus dan tidak menimbulkan efek negatif terhadap inang. Asam lemak rantai bercabang, amonia (NH_3), amina, fenol, dan indol menyebabkan iritasi sel usus, dan mungkin dapat menimbulkan efek negatif terhadap sistem imun jika terdapat dalam konsentrasi tinggi.



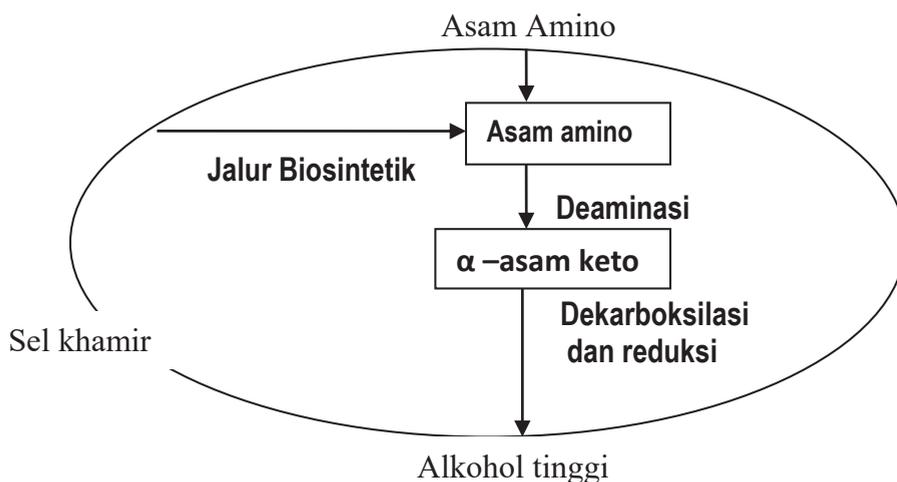
Sumber Ussery, D., 2000

Sumber Ussery, D., 2000

Gambar 1.6. Proses fermentasi polisakarida dan protein oleh bakteri di dalam usus manusia. Produk akhir yang digaris bawahi adalah hasil fermentasi protein. (SCFA = Short Chain Fatty Acids, BCFA = Branched Chain Fatty Acids).

Senyawa Nitrogen

Perombakan senyawa nitrogen oleh khamir menghasilkan senyawa-senyawa seperti asam amino, amina, urea, purin dan pirimidin. Metabolisme asam amino oleh khamir secara anaerobik menghasilkan alkohol, aldehid dan amina yang mempunyai dampak terhadap kualitas produk makanan. Oleh sebab itu produksi metabolit ini harus dikontrol dengan baik karena bila berlebihan bisa merusak produk fermentasi yang dikehendaki. Misalnya, pembentukan senyawa alkohol tinggi sebagai hasil perombakan asam amino yang terjadi dalam sel khamir (Gambar 1.7). Khamir *S.cerevisiae* dapat menggunakan berbagai asam amino sebagai sumber nitrogen utama, termasuk 3 asam amino aromatic L-triptofan, L-fenilalanin, dan L-tirosin. Hasil perombakan triptofan adalah triptopol, fenilalanin menjadi feniletanol, dan tirosin menjadi tirosol, yang bisa berlangsung melalui daur Ehrlich yang dikatalisa oleh enzim.

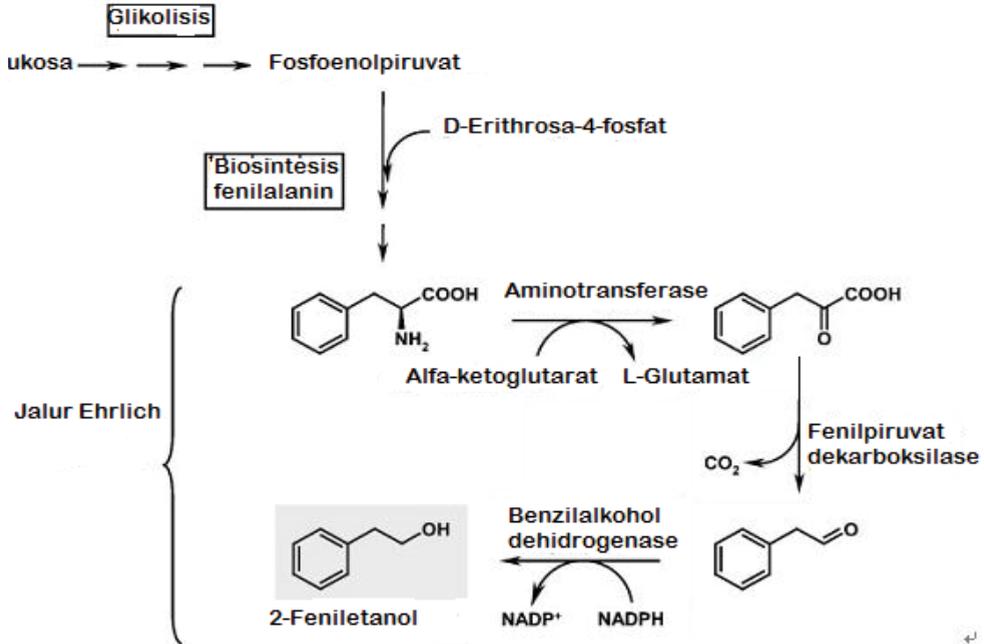


Sumber Boekhout and Robert (2003).

Gambar 1.7. Pembentukan senyawa alkohol tinggi oleh khamir

Dalam hal fenilalanin, asam amino ini mengalami deaminasi menjadi asam fenilpiruvat dan direduksi menjadi feniletanol (Gambar 1.8). Feniletanol merupakan senyawa flavor dengan aroma bunga mawar yang sering digunakan di dalam industri kosmetik. Senyawa aromatic feniletanol dapat diproduksi dari perombakan asam amino pada fermentasi buah-buahan

oleh *S. cerevisiae*, sedangkan pada fermentasi keju feniletanol dihasilkan dari asam amino oleh *Kluy. marxianus* dan *Debaryomyces hansenii*.



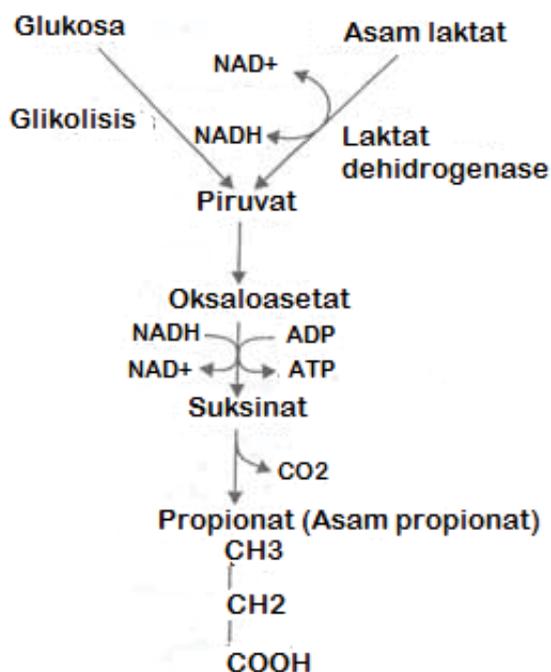
Sumber Vuralhan, et al. (2003)

Gambar 1.8. Biosintesis feniletanol melalui daur Ehrlich oleh *S.cerevisiae* endogenus

Asam-asam Organik

Khamir dapat memproduksi maupun memetabolisme asam organik dan mengakibatkan perubahan keasaman dan flavor suatu produk. Asam suksinat dan asam asetat merupakan produk utama hasil metabolisme karbohidrat, melalui siklus Krebs. Asam asam organik suksinat dan asetat tersebut mempunyai kontribusi pada kualitas sensori suatu produk. Asam organik dapat dioksidasi secara sempurna menghasilkan produk akhir CO₂ bila digunakan sebagai substrat secara aerobik (respirasi) melalui siklus Krebs, karena reaksi respirasi yang sempurna akan menghasilkan CO₂ dan air. Metabolisme asam asetat, suksinat dan propionat dari glukosa (Gambar 1.9). Asam sitrat dan asam malat dapat segera dirombak oleh khamir khususnya

pada kondisi aerobik (jalur asam trikarboksilat), dan akibatnya produk akan kehilangan asiditas dan meningkatnya pH pada suatu konsentrasi dimana bakteri pembusuk atau pathogen bisa tumbuh. Mekanisme ini sangat penting pada reaksi fermentasi produk susu dan sayuran, serta silase, dimana asam laktat, asam asetat, dan asam propionat akan dimetabolisme oleh khamir antara lain *Pichia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, dan *Debaryomyces*. Pada produk buah-buahan keasaman buah dikurangi dengan utilisasi asam malat dan asam sitrat oleh beberapa jenis khamir yang dapat memetabolisme asam malat dalam kondisi fermentatif (tanpa oksigen).



Sumber Wirahadikusumah (1985).

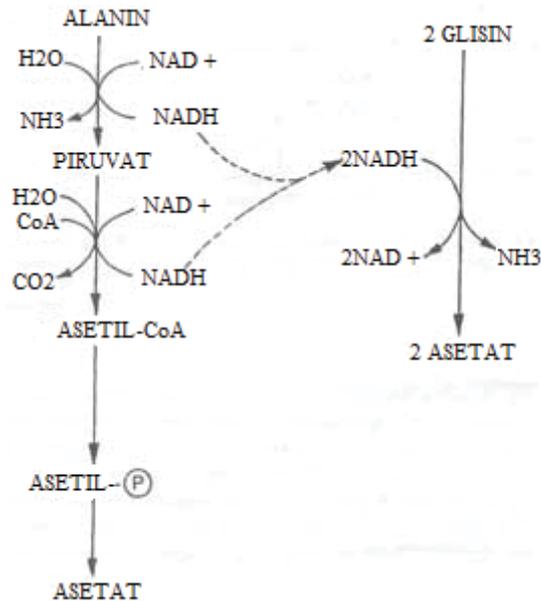
Gambar 1.9. Pembentukan asam suksinat, asam propionate, asam asetat dari glukosa.

Produksi asam organik dalam produk makanan dan minuman bervariasi tergantung jenis khamir yang melakukan metabolisme. Sementara itu, konsentrasi asam organik yang diproduksi oleh khamir dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, misalnya bila bahan pangan pada suhu rendah dan konsentrasi gula tinggi maka inokulasi dengan *S. cerevisiae*, *D. hansenii*

meningkatkan produksi asam asetat. Dengan demikian jenis *S. cerevisiae*, dan *D. hansenii* dapat digunakan dalam fermentasi sayur-sayuran, buah-buahan seperti acar (pikle), sayur asin, zaitun, ketimun dalam larutan garam atau kimchi. Produksi asam heksanoat, oktanoat dan dekanooat yang diproduksi oleh khamir menjadi perhatian yang cukup besar karena asam-asam tersebut mempunyai sifat antimikrobia yang mampu membatasi pertumbuhan khamir itu sendiri dan pertumbuhan mikroba yang lain. Asam organik yang mempunyai sifat antimikrobia dapat digunakan sebagai bahan pengawet atau mencegah terbentuknya metabolit lainnya yang dapat membahayakan kesehatan, misalnya aflatoksin pada pakan ternak dapat mempengaruhi produk susu yang dihasilkan. Seperti halnya bakteri, khamir *S. cerevisiae* juga mampu menciptakan suasana asam (pH rendah) dalam tubuh (usus) induk semang, dan akibatnya mikroorganisme patogen termasuk virus terdesak keluar dari lingkungannya karena tidak tahan terhadap suasana asam. Asam asetat juga merupakan faktor utama penyebab pembusukan makanan pada suhu rendah, misalnya pada jus buah.

Protein

Proteolisis oleh mikroorganisme merupakan kunci reaksi pembusukan pada makanan. Awalnya proteolisis menimbulkan flavor pahit dan diikuti oleh bau amoniak yang kuat dan selanjutnya pembusukan putrefaktif. Beberapa bakteri genus *Clostridium* (misalnya *C. sporogenes*, *C. botulinum*) dapat memfermentasi beberapa asam amino dalam suatu substrat dengan cara mengoksidasi satu asam amino dan menggunakan asam amino lain dalam substrat sebagai penerima elektron. Proses ini disebut reaksi *Stickland*, dan menghasilkan NH_3 , H_2S , asam lemak, dan CO_2 yang menyebabkan timbulnya bau tidak sedap terutama dalam produk fermentasi susu. Reaksi fermentasi perombakan antar asam amino oleh bakteri anaerobik ini dapat terjadi dalam makanan dengan protein tinggi. Misalnya reaksi *Stickland* pada fermentasi asam amino glisin dan alanin menghasilkan amonia dan CO_2 (Gambar 1.10), dimana reaksi oksidasi terjadi pada alanin sedangkan glisin sebagai penerima elektron (Boekhout&Robert,2003).



Gambar 1.10. Reaksi antara alanin dan glisin menghasilkan ammonia. (www.studentsguide.in/microbiology/microbial-p, diakses 20 Desember 2009).

Lemak

Peran mikroba penghasil lipase sangat penting dalam upaya penganeka ragam pangan. Sebagian besar khamir penghasil enzim ekstraseluler lipolitik dapat mendegradasi lemak dalam produk pangan secara signifikan. Trigliserida merupakan senyawa lipid utama dalam bahan makanan. Lipase mengkatalisis hidrolisa ikatan ester pada trigliserida menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol, yang memberikan ciri terhadap rasa, aroma dan struktur pada makanan. Pengaruh rasa dan aroma yang ditimbulkan oleh reaksi hidrolisa trigliserida tergantung pada jenis asam lemak bebas yang dibebaskan dan besarnya konsentrasi. Asam lemak bebas rantai pendek seperti asam butirat, asam kaproat dan asam kaproik menimbulkan bau tidak sedap pada lemak produk hasil fermentasi susu yang disimpan pada suhu ruang. Khamir lipolitik pada genera *Candida*, *Rhodotorula*, dan *Cryptococcus*. *Candida lipolytica* adalah penghasil lipase ekstraseluler yang sangat baik dan mampu menurunkan kadar lemak dalam produk hasil fermentasi susu, lemak daging, ikan dan minyak zaitun serta minyak.

Pati

Khamir yang memiliki kemampuan dalam degradasi pati telah menjadi perhatian para peneliti di seluruh dunia. Fokus penelitian terutama untuk mengetahui peran khamir amilolitik yang mampu memproduksi etanol dan biomass khamir dari zat pati, serta dapat dimanfaatkan untuk memproduksi minuman dan makanan berkarbohidrat rendah. Kebanyakan khamir memproduksi enzim amylase ekstraseluler, diantaranya amilase yang diproduksi oleh *Schwaniomyces occidentalis*, *Saccharomycopsis fibuliger*, *Sacch. diastiticus* dan *Candida* serta *Pichia*. Khamir amilolitik berpotensi penting sebagai penyumbang flavor yang dikehendaki terutama dalam produk fermentasi berbahan baku utama pati, misalnya flavor yang dihasilkan pada fermentasi beras/nasi, fermentasi tape beras ketan, dan fermentasi tape ubi kayu. Pada fermentasi sayur asin, khamir *Candida sake* dan *C. guilliermondii* menghasilkan asam-asam organik seperti asam laktat, asetat, suksinat, etanol dan gliserol sebagai hasil metabolisme glukosa yang berasal dari maltosa dan pati. Disamping sebagai penyumbang flavor khamir amilolitik juga mempunyai potensi sebagai pembusuk pada produk yang menggunakan pati sebagai substrat atau ingredien, misalnya produk sereal, dan beberapa produk seperti sosis daging, yogurt, fruit pulp, salad dressing, dan saus. Khamir *Saccharomyces diastiticus* juga diketahui dapat menyebabkan pembusukan pada fermentasi minuman berbahan baku karbohidrat (sake, bali brem, tuak).

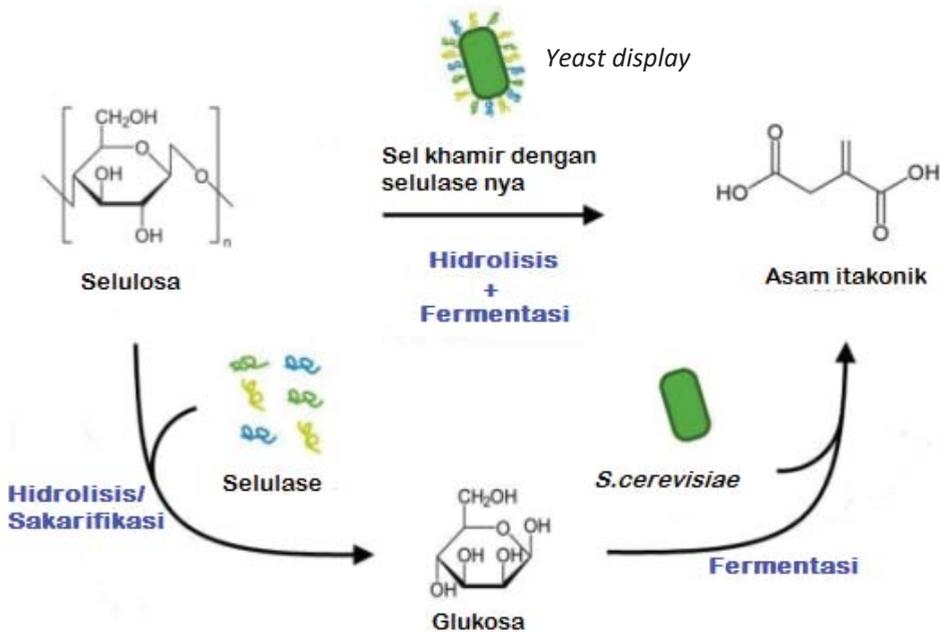
Selulosa, Pektin dan Xilan

Mikroorganisme yang memproduksi enzim ekstraseluler selulose, pektinase dan xilanase berperan dalam fermentasi buah-buahan dan sayuran karena enzim-enzim tersebut berfungsi dalam perombakan polisakarida yang terdapat dalam kulit buah dan sayuran. Belakangan ini enzim selulosa menjadi sangat penting karena peranannya dalam proses pembuatan biofuel dari limbah industri pertanian. Peranan khamir dalam degradasi selulose dapat dilihat dari proses pembuatan biofuel dari limbah industri yang mengandung selulosa, misalnya limbah pertanian dan rumput-rumputan. Limbah ini berfungsi sebagai sumber biomasa untuk menghasilkan asam itakonik (*itaconic acid*) sebagai prekursor bahan bakar. Konversi biokimia biomasa berselulosa menjadi biofuel melalui dua tahap (Gambar 1.11),

yaitu (1) sakarifikasi selulosa menjadi gula fermentable oleh enzim selulase, (2) fermentasi gula menjadi senyawa kimiawi oleh *S.cerevisiae*. *S.cerevisiae* memfermentasi gula menjadi bahan kimia organik. *S.cerevisiae* tidak memproduksi enzim selulase sehingga penambahan enzim komersial perlu dilakukan. Oleh karena itu proses fermentasi ini memerlukan biaya besar. Melalui rekombinan DNA, sakarifikasi dan fermentasi selulosa dapat berlangsung secara simultan menjadi asam itakonik oleh rekombinan khamir (dalam diagram digambarkan sebagai “yeast display”) tanpa penambahan enzim selulase. Namun, pengaruh rekombinan khamir dan metabolisme pembentukan asam itakonik masih dalam penelitian lebih lanjut (Jäger, G., dan Klement, T., 2010). Jenis khamir yang dapat memproduksi enzim selulase diantaranya khamir menyerupai kapang (yeast-like fungi) seperti: *Trichosporon*, *Aureobasidium*, dan *Geotrichum* memiliki sifat amilolitik (Jeffries 1990), tetapi belum diketahui kemampuannya untuk memecah selulosa. Khamir yang mampu mendegradasi senyawa xilan adalah *Cryp. albidus*, *Trichosporon*, *Pichia stipitis* dan *Aurebasidium*.

Jenis khamir *Kluy. marxianus*, *C. kefyri*, *C. famata*, *Cryp. albidus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* dan *Aureobasidium* dan beberapa strain dari *S. cerevisiae* dapat memproduksi enzim pektinase dan mampu menurunkan kadar pektin. Khamir yang bersifat pektinolitik sangat penting dalam fermentasi biji coklat dan biji kopi. Dalam fermentasi biji coklat dan biji kopi khamir dipergunakan untuk menurunkan kadar pektin sehingga dapat memberikan kesempatan bagi mikroba lain untuk berperan serta dalam pembentukan prekursor aroma dan flavor pada waktu proses pemasakan. Disamping itu, mikroorganisme yang memproduksi enzim ekstraseluler selulase, pektinase dan xylanase secara signifikan juga berpotensi sebagai pembusuk produk buah-buahan dan sayuran, dengan cara merombak polisakarida pada jaringan kulit. Pembusukan bawang merah oleh *Kluy marxianus* kemungkinan juga disebabkan oleh enzim pektinase yang diproduksinya. Jenis khamir berfilamen yang disebut sebagai *yeast-like fungi* yaitu *Trichosporon*, *Aureobasidium* dan *Geotrichum* memiliki kemampuan memproduksi enzim selulase, pektinase dan xylanase. Sebagai catatan, dalam upaya melakukan seleksi terhadap khamir penghasil enzim selulase, pektinase, dan xylanase, pemilihan metode yang digunakan untuk menyeleksi jenis-jenis khamir yang berpotensi dalam memproduksi

enzim-enzim tersebut perlu memperhatikan beberapa hal yaitu bahwa produksi enzim bersifat konstitutif yang artinya memerlukan substrat yang mengandung senyawa polisakarida untuk menginduksi sintesis enzim oleh khamir, dan bahwa produksi enzim akan ditekan oleh adanya senyawa glukosa.



Sumber Jäger and Klement (2010)

Gambar 1.11. Konversi biokimia biomasa berselulosa menjadi biofuel.

Melalui satu tahap (selulosa menjadi asam itakonik melalui sakarifikasi dan fermentasi simultan), dan melalui dua tahap (sakarifikasi selulosa menjadi glukosa, dan fermentasi glukosa menjadi asam itakonik).

Senyawa Sulfur Volatil

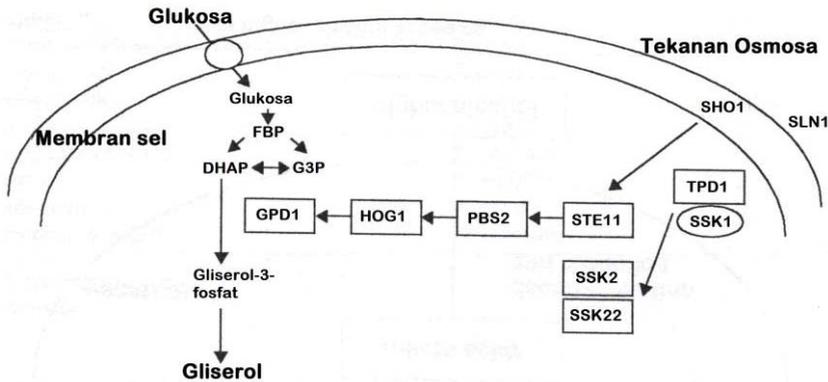
Senyawa-senyawa volatile seperti sulfur hydrogen, sulfur dioksida, dimetil sulfite, dan beberapa organik thiol perlu ada dalam konsentrasi yang cukup tinggi untuk dapat terdeteksi oleh indera manusia. Bila konsentrasinya dibawah ambang batas tidak akan terdeteksi oleh alat indera manusia. Senyawa senyawa tersebut dapat diproduksi oleh bakteri

dan menyebabkan pembusukan makanan terutama produksi senyawa putrefaktif sulfur. Produksi senyawa sulfur tidak hanya berpengaruh pada aroma dan flavor tetapi juga mempunyai sifat antimikrobia dan antioksidan yang dapat mempengaruhi kestabilan mikroorganisme dan kestabilan warna produk. Khamir yang memproduksi senyawa volatile sulfur yaitu *Pichia*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora* dan *Rhodotorula*.

Aktivitas khamir dalam konsentrasi gula dan garam tinggi

Pada studi biokimia khamir xerotoleran diketahui bahwa khamir beradaptasi dan tumbuh dalam medium dengan konsentrasi larutan dengan tekanan osmotik yang tinggi. (Fleet 1992) karena kemampuannya dalam sintesis glycerol dan akumulasi intraseluler gliserol sampai pada konsentrasi yang seimbang dengan tekanan osmotik membran sel. Khamir xerotoleran misalnya *Zygosacch.rouxii* dan *D.hansenii*. *Zygosacch.rouxi* mengakumulasi gliserol dalam sel sebagai tanggapan terhadap meningkatnya konsentrasi NaCl. Mekanisme serupa juga terjadi pada khamir *S.cerevisiae* yang memproduksi gliserol dengan konsentrasi tinggi sebagai tanggapan terhadap lingkungan dengan A_w rendah, tetapi *S.cerevisiae* tidak mampu menahan molekul gliserol dalam jumlah besar di dalam selnya sehingga sel pecah dan gliserol keluar ke lingkungan ekstraseluler. Mekanisme pembentukan gliserol dalam sel dapat dilihat pada Gambar 1.12. Pada saat glukosa masuk melalui dinding sel, glukosa dimetabolisme menjadi fosfat-dihidroksiaseton dan 1. selanjutnya dikonversi menjadi gliserol-3-fosfat. Gliserol-3-fosfat kemudian diubah menjadi gliserol. Keadaan ini menghambat kemampuan sel bertoleransi terhadap lingkungan dengan A_w rendah. Kaitan mekanisme tersebut dengan pembusukan makanan adalah bahwa khamir xerotoleran dan osmotoleran sangat tanggap terhadap lingkungan berkadar gula tinggi atau garam tinggi dengan cara memproduksi senyawa polyol. Senyawa polyol juga akan mempunyai dampak terhadap kualitas sensori produk. Jenis senyawa polyol yang diproduksi adalah gliserol, xilitol, arabitol, dulcitol, mannitol, tergantung pada spesiesnya serta dipengaruhi oleh lingkungan pertumbuhannya. Khamir xerotoleran memproduksi polialkohol seperti arabitol. Pada spesies *Zygosacch.rouxii* dan *Zygosacch.bailii*, etanol merupakan hasil utama produk akhir metabolisme pada lingkungan berkadar gula tinggi. Khamir yang tumbuh dalam lingkungan dengan kandungan gula

tinggi (50-60%) atau garam tinggi (10-20%) berpotensi menjadi penyebab pembusukan makanan. Contoh khamir yang mempunyai sifat tersebut adalah *Zygosacch.bailii* dan *Zygosacch.rouxii*, *Zygosacch.bisporus*, *Schizosacch.pombe*, *Candida lactis-condensi*, *C.famata*, dan *H.anomala*. Khamir tersebut biasanya tumbuh dalam lingkungan bergula, sedangkan *D.hansenii*, *C.famata*, *C.polymorpha*, *Pichia farinosa*, *Pichia miso*, dan *Zygosacch.rouxii* tumbuh dilingkungan berkadar garam tinggi. Spesies-spesies khamir tersebut tidak selalu memerlukan lingkungan berkadar garam tinggi atau berkadar gula tinggi, namun mereka juga bisa tumbuh baik pada lingkungan dengan kadar gula atau garam rendah. Bila akan membedakan spesies khamir xerotelant atau osmotolerant dengan spesies khamir yang lain misalnya *S.cerevisiae* yang tidak dapat tumbuh pada kadar garam atau gula tinggi, maka semua khamir yang di uji harus ditumbuhkan dalam media yang xerotoleran atau osmotoleran. Sifat lain khamir toleran kadar garam dan gula tinggi yaitu kemampuannya untuk tumbuh dalam substrat dengan $A_w < 0.85$.



Sumber Boekhout and Robert (2003)

Gambar 1.12. Jalur pembentukan gliserol sebagai tanggapan terhadap tekanan osmotik. FBP: fruktosa-1,6-bisofat, G3P: gliseraldehid-3-fosfat, DHAP: dihidroksiaseton-lak-toilglutatan.

Aktivitas Khamir pada Suhu Rendah

Pertumbuhan khamir pada makanan yang disimpan pada suhu refrigerasi dan suhu beku dapat mengakibatkan pembusukan makanan.

Lorenz dalam Fleet (1992) khamir dalam medium 10% glukosa, yaitu *Sacch cerevisiae*, *Zygosacch.bailii*, *Zygosacch.rouxii*, dan *D.hansenii* mampu tumbuh pada suhu 4°C, tetapi bila medium mengandung gula 50%, maka tidak ada khamir yang bisa hidup. Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa senyawa antioksidan, sodium bikarbonat, dan etanol dalam medium dapat menurunkan kemampuan khamir untuk tumbuh pada suhu 4°C. Suhu juga mempengaruhi karakter metabolisme dan proses biokimia dalam khamir yang dapat mengakibatkan pembusukan makanan. Dalam produksi jus buah-buahan, *S.cerevisiae* memproduksi alkohol, ester dan asam organik pada konsentrasi yang berbeda bila ditumbuhkan pada suhu rendah (5-10°C), dibandingkan bila ditumbuhkan pada suhu yang lebih tinggi (20-25°C). Daya toleransi khamir terhadap etanol sangat dipengaruhi oleh suhu. Umumnya toleransi terhadap etanol menurun pada suhu ekstrem tinggi (30°C) dan rendah (<5°C).

Sel Lisis

Lisisnya sel mikroorganisme dan dibebaskannya konstituen intraseluler ke dalam lingkungan tidak dianggap sebagai proses pembusukan. Terdapat dua mekanisme lisisnya sel khamir kedalam lingkungan produk pangan yaitu: (1) oleh aktivitas enzim eksogenus yang mendegradasi dinding sel khamir dan, (2) oleh proses otolisis. Sebagai contoh, pada pembusukan buah dan produk sereal, khamir tumbuh pada tahap awal pembusukan, selanjutnya khamir menghilang dan digantikan oleh bakteri. Hilangnya sel khamir ini ternyata sel tersebut mengalami lisis yang disebabkan oleh enzim yang diproduksi oleh mikroflora lain yang terdapat bersama-sama. Jumlah khamir (10^6 - 10^8 sel/gram) yang mengalami lisis dan dibebaskan ke dalam produk tentu akan mempengaruhi sifat sensori produk tersebut. Otolisis sel adalah terbukanya atau pecahnya sel dan keluarnya substansi dari dalam sel yang tidak diinginkan dan menyebabkan off-flavor pada substrat. Flavor yang ditimbulkan seperti *yeast-bite*, *broth-like*, *meaty*, *sulfury* dan *dirty-diaper*. Autolisis terjadi ketika sel telah melangsungkan pertumbuhannya secara lengkap. Pada tahap ini susunan sel hancur dan komponen makromolekuler sel didegradasi oleh enzim endogenus protease, lipase, nuklease dan karbohidrase. Produk yang terdegradasi serta enzim yang mendegradasi dibebaskan ke dalam lingkungan/substrat.

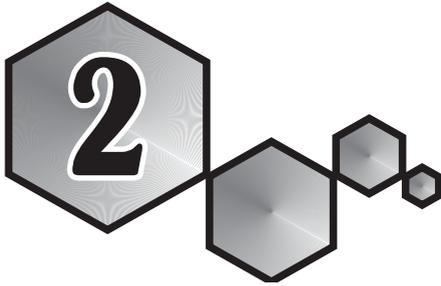
Apa yang terjadi pada khamir pada saat sel otolisis? Khamir membebaskan isi sel yang berupa asam amino, riboflavin, fosfor organik dan anorganik misalnya nukleotida ke dalam substrat. Ketika sel khamir telah rusak atau hancur terjadi pembebasan enzim proteolitik ke dalam substrat, dan enzim ini akan merombak protein substrat mengakibatkan meningkatnya protein. Rangkaian lipida terputus terbentuk asam lemak bebas yang dikeluarkan dari sel. Perombakan lipida ini merupakan komponen pembusuk. Komponen sel lisis juga menyebabkan peningkatan pH produk dan menimbulkan rasa pahit. Otolisis khamir dapat diamati pada fermentasi sari buah dan mengakibatkan meningkatnya kandungan asam amino dan asam lemak bebas dalam produk. Tergantung pada derajat otolisis, proses otolisis dapat memperbaiki flavor atau menyebabkan kerusakan flavor. Autolisis yang berlebihan dapat merusak flavor produk dan memberikan nutrisi bagi pertumbuhan bakteri pembusuk. Penyebab otolisis adalah (1) membran sel dari sel yang tidak sehat mudah mengalami lisis selama fermentasi jika berada dalam kondisi yang tak menguntungkan, (2) sel yang telah tua menjadi lemah dan kurang aktif selanjutnya membran selnya akan rusak, (3) kondisi pendinginan dan pemanasan cepat menyebabkan sel shock dan menyebabkan lisis atau sel injuri/luka, (4) pada pembuatan fermentasi minuman sari buah, autolisis terjadi bila sari buah yang masih mengandung khamir disimpan dalam jangka waktu lama. Disamping hal yang merugikan tersebut di atas, sebenarnya ekstrak khamir dan otolisis khamir merupakan bahan flavor yang sangat baik, dan sering digunakan secara komersial untuk mempertajam flavor dalam industri makanan. Oleh karena itu lisis khamir tidak dianggap sebagai penyebab pembusukan pada makanan dan minuman.

Latihan

1. Bagaimana kaitan aktivitas perombakan khamir dengan proses sel lisis.
2. Apakah perombakan karbohidrat oleh khamir menjadi alkohol dapat dikendalikan.
3. Bagaimana peranan khamir dalam memproduksi senyawa volatile?

Daftar Pustaka

- Boekhout and Robert, 2003. Boekhout, T. and V. Robert., 2003. Yeasts in Food: Beneficial and detrimental aspects. CRC Press, Woodhead Publishing Limited Cambridge England, pp 391-438.
- Ussery D. 2000. Harvesting energy from food: Glycolysis and Cellular Respiration. <http://www.cbs.dtu.dk/staff/dave.ch08.htm>, diakses tanggal 8 Maret 2010.
- Vuralhan, Z., Morais, M.A., Tai, Siew-Leng., Piper, D.W. Matthew, and Pronk, J.T., 2003. Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *S.cerevisiae*. *Applied and Environ Microbiology*, 69(8):4534-4541.
- Wirahadikusumah 1985. *Biokimia Pangan*, Institute Pertanian Bogor.
- Gernot Jäger G, Klement T. 2010. Direct Fermentation of Green Energy Plants to Platform Chemicals. <http://www.fuelcenter.rwth-aachen.de>, diakses tanggal 8 Maret 2010.
- Jeffries 1990 Jeffries, T.W., 1990. Fermentation of d-xylose and celobiose, in *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*, Verachtert, H., and DeMot, R., Eds., Marcel-Dekker, New York, p 349.
- Fleet 1992 Fleet G.H., 1992. Spoilage Yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12 (1/2): 1-20.
- Puspito and Fleet, 1985 Puspito, H.J., and Fleet, G.H. 1985. Microbiology of sayur asin fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22:442.



PRODUK METABOLIT KHAMIR

Selama pertumbuhannya di dalam substrat atau media pertumbuhan, mikroorganisme mensintesa energi dan senyawa pembentuk sel. Energi digunakan untuk mensintesa komponen pembentuk sel, baik langsung digunakan atau disimpan dahulu sebagai ATP. Selain menghasilkan energi, proses metabolisme substrat oleh mikroorganisme juga menghasilkan produk metabolit. Produk metabolit ini digunakan untuk menyusun sel atau dibebaskan keluar lingkungan sel. Produk metabolit meliputi senyawa penyebab pembusukan makanan, senyawa toksin, senyawa bermanfaat untuk meningkatkan kualitas makanan, senyawa yang dapat dimanfaatkan untuk mengawetkan pangan misalnya bakteriosin dan asam, senyawa yang dapat dimanfaatkan untuk memperbaiki tekstur pangan misalnya dekstran, dan senyawa untuk memperbaiki citarasa (flavor) misalnya diasetil. Produk senyawa metabolit digolongkan menjadi metabolit primer dan metabolit sekunder. Produk metabolit primer yaitu metabolit yang dihasilkan dari proses metabolisme primer selama fase tropofase meliputi asam amino, nukleotida, protein, asam nukleat, lipid, polisakarida, dan umumnya digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme itu sendiri. Metabolit sekunder dihasilkan selama fase idiofase yaitu pada akhir fase logaritmik sampai fase stasioner. Produksi senyawa metabolit sekunder dapat diupayakan dengan cara mengatur system fermentasinya, inokulumnya dan substratnya. Produk metabolit sekunder tidak terlibat dalam jalur metabolisme primer dan tidak digunakan untuk proses metabolisme,

namun memiliki efek menguntungkan pada kesehatan manusia. Produk metabolit yang telah dikomersialkan antara lain asam amino, vitamin, senyawa flavor, antioksidan, nukleotida, asam organik dan alkohol. *S. cerevisiae* dapat menghasilkan beragam metabolit sekunder yang memiliki status GRAS (generally recognize as safe). Dalam Bab ini diulas beberapa produk hasil metabolisme khamir terutama *Saccharomyces cerevisiae*. Setelah mempelajari Bab ini pembaca diharapkan dapat menjelaskan pengertian produk metabolit yang dihasilkan oleh khamir, memahami fungsi produk metabolit, dan menganalisis cara menerapkan hasil metabolit sesuai dengan peruntukannya.

Senyawa alkohol yang bukan etanol

Butan-1-ol dan gliserol

Butan-1-ol dapat dikategorikan sebagai biofuel yang lebih unggul dari etanol karena sifat hidrofobik yang lebih besar, dan kepadatan energi yang lebih tinggi. Produksi butanol mikroba umumnya oleh anggota dari genus *Clostridium* dan jenis khamir yang paling produktif, *C. beijerinckii* memiliki enzim 3-hydroxybutyryl-CoA dehidrogenase.

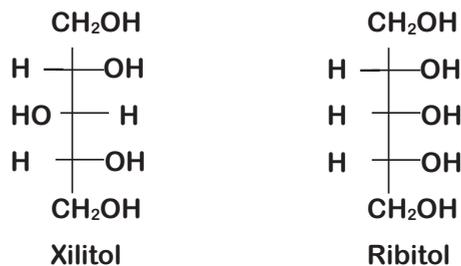
Gliserol memiliki efek positif pada sifat sensoris fermentasi minuman sari buah. Konsentrasi gliserol dalam fermentasi sari buah bervariasi antara 1 - 15 g/dm³ (Remize et al., 1999). Faktor pertumbuhan dan faktor lingkungan sangat mempengaruhi jumlah gliserol yang dihasilkan oleh *S.cerevisiae* dalam fermentasi minuman sari buah. Gliserol merupakan produk sampingan dari fermentasi gula menjadi etanol. Gliserol disintesis dalam sitosol dari dihidroksiaseton fosfat dalam dua tahap dan dikatalisis oleh enzim gliserol-3-fosfat dehidrogenase (GPDH) pada tahap pertama dan gliserol-3-fosfatase (GPP) pada tahap kedua. Enzim gliserol-3-fosfat dehidrogenase (GPDH) adalah enzim kunci dalam produksi gliserol, dan juga merupakan enzim. Pada proses fermentasi gula menghasilkan alkohol sebagai produk utama, gliserol merupakan salah satu by-produk dari fermentasi alkohol pada kondisi anaerobic.

Asam organik: asam piruvat, asam laktat dan asam malat

Saccharomyces cerevisiae tidak secara alami menghasilkan asam organik dalam jumlah besar, namun karena ketahanan dan toleransinya terhadap pH maka *S. cerevisiae* sangat penting dimanfaatkan dalam upaya produksi asam organik. Salah satu upaya memproduksi asam yaitu dengan cara menghalangi pembentukan etanol yang dilakukan melalui penghapusan empat gen struktural untuk enzim alkohol dehidrogenase tepatnya enzim piruvat dekarboksilase (PDC). Fermentasi aerobik pada pH 5.0 menghasilkan asam piruvat, sedangkan untuk produksi asam laktat dengan cara menghapus satu atau lebih dari tiga gen encoding untuk enzim piruvat dekarboksilase, dan menambahkan enzim bovine laktat dehidrogenase (L-LDH). Sementara itu aktivitas dua enzim yaitu piruvat karboksilase dan malat dehidrogenase yang diproduksi oleh *S. cerevisiae* berperan dalam akumulasi asam L-malat.

Gula alkohol

Gula alkohol (poliol) dapat disintesis dari karbohidrat sebagai hasil dari reduksi gugus karbonil menjadi satu hidroksil dan dapat digunakan sebagai sweeteners. Xylitol adalah gula alkohol yang paling populer karena nilai energi yang lebih rendah dibandingkan sukrosa dengan nilai kemanisan yang sebanding. Toivari et al. (2007) bahwa *Saccharomyces cerevisiae* rekombinan strain menghasilkan xylitol dan ribitol dari D-glukosa dalam satu langkah fermentasi tunggal.



Konversi D-xilulosa menjadi etanol oleh *S.cerevisiae*.

D-xylose adalah produk utama dari hidrolisis hemiselulosa dari berbagai bahan tanaman. Hemiselulosa dapat menghasilkan lebih dari 60%

gula (Chiang et al., 1981). Etanol dapat diproduksi dari fermentasi tidak hanya gula dengan 6 atom karbon tetapi juga dapat diproduksi dari fermentasi gula dengan 5 atom karbon. Proses fermentasi D-xyloza menjadi etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* dipengaruhi oleh beberapa faktor meliputi pH, suhu, densitas sel, dan jenis gula yang terdapat di dalam substrat fermentasi. Beberapa hasil penelitian melaporkan bahwa produksi etanol dari D-xyloza dapat di rampungkan oleh aktivitas *S.cerevisiae* dan enzim komersial xyloza isomerase melalui tahapan proses isomerisasi dan fermentasi. Hal ini karena khamir tidak dapat memfermentasi D-xyloza menjadi etanol, walaupun beberapa bakteri dan kapang berfilamen diketahui dapat memfermentasi D-xyloza menjadi etanol. Sementara itu khamir tertentu dapat memproduksi etanol dari D-xyloza dengan adanya enzim D-xyloza-isomerisasi yaitu melalui proses isomerisasi D-xylose menjadi D-xylulose yang dikatalisis oleh enzim isomerisasi (enzyme-catalyzed isomerization), dan dilanjutkan proses fermentasi D-xylulosa menjadi etanol oleh aktivitas khamir. Penggunaan *S.cerevisiae* komersial lebih menguntungkan dibanding sediaan *S.cerevisiae* murni karena selnya dalam keadaan aktif dan mempunyai densitas sel yang tinggi sehingga lebih mudah melakukan proses fermentasi.

Tahap awal metabolisme D-xilosa oleh khamir adalah melalui reaksi oxidoreduksi. Dalam reaksi ini, D-xylose mengalami reduksi menjadi xylitol oleh nicotinamide adenine dinukleotida fosfat-dependent aldoreduktase, dan xylitol kemudian dioksidasi menjadi D-xylulosa oleh enzim nicotinamide adenine dinukleotida fosfat-dependent D-xylose reductase. Selanjutnya D-xyloza mengalami fosforilasi menjadi D-xylulosa-5-phosphate yang kemudian dikonversi menjadi piruvat melalui kedua daur pentose phosphate dan daur Embden-Myerhof. Uji laboratorium menemukan bahwa khamir mengubah D-xylose langsung menjadi xylitol tetapi tidak dapat memfermentasi baik D-xyloza maupun xylitol menjadi etanol. Berbagai khamir *S.cerevisiae*, *Candida utilis* dan *C.dididensii* dapat langsung memfermentasi D-glukosa dan D-xylulosa menjadi etanol dan *S.cerevisiae* sebagai khamir yang paling efektif memproduksi etanol dari D-xylulosa. Kerapatan sel berpengaruh linier terhadap produksi etanol dari D-xylulosa, dimana konsentrasi sel yang tinggi menurunkan waktu fermentasi dan menghasilkan etanol lebih tinggi. Pada konsentrasi sel lebih rendah (<100g/L) waktu fermentasi meningkat signifikan. Akumulasi

etanol di dalam sel khamir dapat menurunkan aktivitas enzim alkohol dehidrogenase dan viabilitas sel sehingga menurunkan laju produksi etanol. Suhu optimal fermentasi biasanya lebih tinggi dari suhu optimal pertumbuhan mikroba. Walaupun demikian, suatu hal yang tidak mudah untuk mengatur kemampuan khamir melakukan fermentasi pada suhu lebih tinggi.

Produksi Single Cell Protein (SCP)

Pertumbuhan *S. cerevisiae* sangat tergantung pada substrat/komposisi media (total nitrogen, gula), pH inisial dan laju aliran udara. Dalam system batch fermentasi, pertumbuhan *S. cerevisiae* lebih tinggi dengan konsentrasi nitrogen tinggi, aliran udara tinggi dan konsentrasi gula lebih rendah. Biomasa sel khamir merupakan sumber vit B dan chromium yang berdaya guna di dalam industry obat-obatan. Sebagai sumber vit B dan biotin, *S. cerevisiae* dapat menghilangkan stress, depresi, kelelahan, mengurangi efek penuaan. Sebagai sumber biotin, *S. cerevisiae* dapat menguatkan rambut, kuku dan mengurangi diabet neuropathy. Sebagai sumber chromium, *S. cerevisiae* dapat mengurangi gula darah pada penderita diabet tipe 2, mengurangi bahaya kolesterol darah tinggi, membantu dalam pengobatan acne kronis dan furunculosis. Chromium tidak mudah diserap oleh tubuh manusia, tetapi jika dikonsumsi bersama dengan brewer's yeast akan lebih mudah diabsorpsi tubuh. Disamping itu, *S. cerevisiae* jga mengandung beberapa mineral seperti selenium, zinc, phosphorus dan magnesium, maka sering digunakan untuk kekurangan nafsu makan.

Asam lemak

Asam lemak sangat menarik karena pentingnya untuk diaplikasikan di bidang farmasi dan gizi. Bagi sel sendiri, asam lemak diperlukan untuk fungsi sel seperti regulasi fluiditas membran. *Saccharomyces cerevisiae* mampu mensintesis *de novo* hanya beberapa asam lemak jenuh dan monounsaturated/asam lemak tak jenuh tunggal, terutama asam C-16 dan C-18. Untuk produksi asam lemak rantai panjang lainnya dan asam lemak polyunsaturated tak jenuh jamak, perlu introduksi gen dari enzim yang sesuai seperti desaturases dan elongases, misalnya pada Gen enzim *A. thaliana* oleat desaturase (FAD2) atau desaturase asam lemak dari jamur *M.*

alpina. Karena pentingnya peran dari asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) dalam kesehatan manusia dan nutrisi, sejumlah desaturases dari beberapa sumber yang berbeda mis. *Mucor rouxii*, *M. alpine* telah diekspresikan secara fungsional dalam *S. cerevisiae* untuk pembentukan PUFA (Chemler et al., 2006).

Komposisi asam lemak membran sangat bervariasi dan dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti suhu, oksigen, keterbatasan nutrisi dan laju pertumbuhan sel. Komposisi membran asam lemak khamir mengalami perubahan dengan perubahan suhu: semakin rendah suhu, semakin tak jenuh asam lemak komposisi membran. Selain itu, beberapa produk metabolit seperti etanol, asam asetat, asetaldehida dan asam lemak rantai sedang (MCFA) dapat bersifat racun pada *S.cerevisiae*. Komposisi asam lemak dalam media juga tergantung pada kondisi fermentasi yang sedang berlangsung, misalnya ketersediaan oksigen, sebagai hasil dari metabolisme khamir. Ketika fermentasi dilakukan dalam kondisi anaerob menghasilkan asam lemak rantai pendek. Sebaliknya, ketika fermentasi dilakukan dalam kondisi aerobik atau semi-aerobik, menghasilkan lebih sedikit asam lemak rantai menengah, dan lebih banyak asam lemak tak jenuh. Asam lemak dan esternya memiliki penting peran dalam fermentasi alkohol. Bahkan, diketahui bahwa hexanoic, oktanoat, dekanoat dan asam dodecanoic dan esternya, bersama-sama dengan etanol, dapat menghambat pertumbuhan khamir. Mendes-Fereira et al. (2004) mengatakan bahwa *Slow atau Sluggish fermentation* (fermentasi lambat) adalah jika fermentasi memerlukan waktu yang lebih lama dari rata-rata waktu untuk mencapai *dryness*, sedangkan *Stuck fermentasi* yaitu bila gula yang tersisa lebih tinggi dari 2g/L. Nitrogen diketahui sebagai salah satu faktor pembatas utama pada pertumbuhan khamir dan kinerja fermentasi, sehingga menyebabkan timbulnya *sluggish* fermentasi.

Proses Biotransformations oleh sel khamir

Saccharomyces cerevisiae dapat dianggap sebagai penghasil berbagai senyawa kimia, semacam pabrik sel mikroba. Namun, *S.cerevisiae* umumnya diterapkan sebagai biocatalysis sel dalam proses biotransformasi. Biotransformasi adalah reaksi berdasarkan transformasi enzimatik senyawa kimia. Saat ini, biotransformasi adalah metode yang telah digunakan untuk

menghasilkan senyawa murni dan untuk mengembangkan efisiensi sintesis senyawa sasaran. Secara umum, biotransformasi dilakukan oleh enzim hidrolase atau oksidoreduktase. Enzim lain seperti transferase, isomerase, liases dan ligases juga semakin meningkat penggunaan dalam proses biotransformasi.

Biotransformasi dapat dilakukan dengan menggunakan enzim terisolasi atau sel mikroorganisme yang memproduksi enzim (Biocatalysis whole-cell). Aplikasi enzim terisolasi dan enzim yang lebih dimurnikan lebih menguntungkan karena dapat menghindari pembentukan produk samping yang tidak diinginkan. Sedangkan pada sistem biotransformasi seluler kemungkinan pembentukan produk yang tidak diinginkan sering terjadi karena adanya enzim lain atau adanya katalisis simultan pada beberapa reaksi. *S.cerevisiae* memiliki potensi yang besar sebagai katalis dalam kimia organik karena mudah penanganannya, mudah beradaptasi dengan substrat dan menghasilkan produksi berbagai kelas enzim. *S. cerevisiae* dapat digunakan dalam bentuk kering dan padat, seperti ragi mentah atau biomassa liofilisasi dan mampu mengkatalis berbagai reaksi dalam air atau media organik. Performa ini sangat penting bagi ahli kimia, karena laboratorium kimia biasanya tidak dilengkapi dengan peralatan mikrobiologi yang diperlukan untuk budidaya jamur.

Efek Kluyver, Efek Crabtree dan Efek Custer

Berdasarkan fisiologi yang berkaitan dengan pembentukan energi dari metabolisme gula, khamir dikelompokkan menjadi nonfermentatif, fakultatif fermentative, dan obligat fermentative. Khamir nonfermentatif melangsungkan metabolisme respirasi dan tidak dapat melangsungkan fermentasi alkohol dari glukosa (seperti pada *Rhodotorula glutinis*). Khamir obligat fermentative hanya mampu memetabolisme glukosa melalui fermentasi alkohol (seperti pada *Candida slooffii*). Kebanyakan khamir termasuk dalam fakultatif fermentative. Berdasarkan pada kondisi pertumbuhannya, jenis gula, konsentrasi gula, dan ketersediaan oksigen, khamir dikelompokkan ke dalam khamir bersifat respirasi penuh, metabolisme fermentative, dan melangsungkan ke duanya sekaligus yaitu metabolisme fermentative respirasi (seperti pada *S.cerevisiae*, *Candida utilis*). Komposisi gula dalam media dan ketersediaan oksigen merupakan dua

faktor utama yang berdampak kuat terhadap fisiologi metabolisme. Oksigen merupakan faktor kunci dalam regulasi metabolisme gula dalam sel khamir. Dengan adanya oksigen, hampir semua ragi dapat melangsungkan respirasi mengubah gula menjadi CO₂ dan air. Sebagian besar khamir juga dapat memfermentasi gula menjadi etanol dan CO₂. Namun, kemampuan khamir untuk memfermentasi gula menjadi etanol tidak berarti bahwa khamir juga mempunyai kemampuan untuk tumbuh dalam kondisi anaerob. Bahkan, sebagian besar khamir yang bersifat fakultatif anaerobik tidak tumbuh dengan baik dalam kondisi tanpa adanya oksigen, atau bahkan di dalam media yang kompleks sekalipun. *Saccharomyces cerevisiae* sebagai satu satunya khamir yang mampu tumbuh pada kondisi anaerobik, walaupun hanya tersedia sterol dan asam lemak tidak jenuh. Golongan khamir tidak mampu mensintesa sterol dan asam lemak tidak jenuh pada kondisi anaerobik.

Fenomena fisiologi metabolisme yang berkaitan dengan kebutuhan oksigen di dalam sel khamir dikelompokkan ke dalam empat 'effect' (Weusthuis et al., 1994). Penggolongan tersebut tergantung pada spesies khamir dan ketersediaan gula sebagai substrat. Ke empat efek tersebut adalah *Effek Pasteur*, *Effek Custers*, *Efek Crabtree*, dan *Efek Kluyver*. *Effek Pasteur* didefinisikan sebagai penghambatan metabolisme gula fermentasi (*fermentable glucose*) oleh oksigen, atau disebut sebagai penghambatan aktivitas perombakan gula dari jalur fermentasi oleh respirasi (oksigen). Sebaliknya, *Efek Custers* adalah fenomena yang diketahui sebagai penghambatan fermentasi alkohol oleh tidak adanya oksigen, yang terjadi pada jenis khamir *Brettanomyces* dan *Dekkera*. Ke dua khamir tersebut mampu memfermentasi glukosa menjadi etanol dan asam asetat pada kondisi aerobik. Namun jika kondisi berubah menjadi anaerobik maka fermentasi alkohol terhambat sangat nyata.

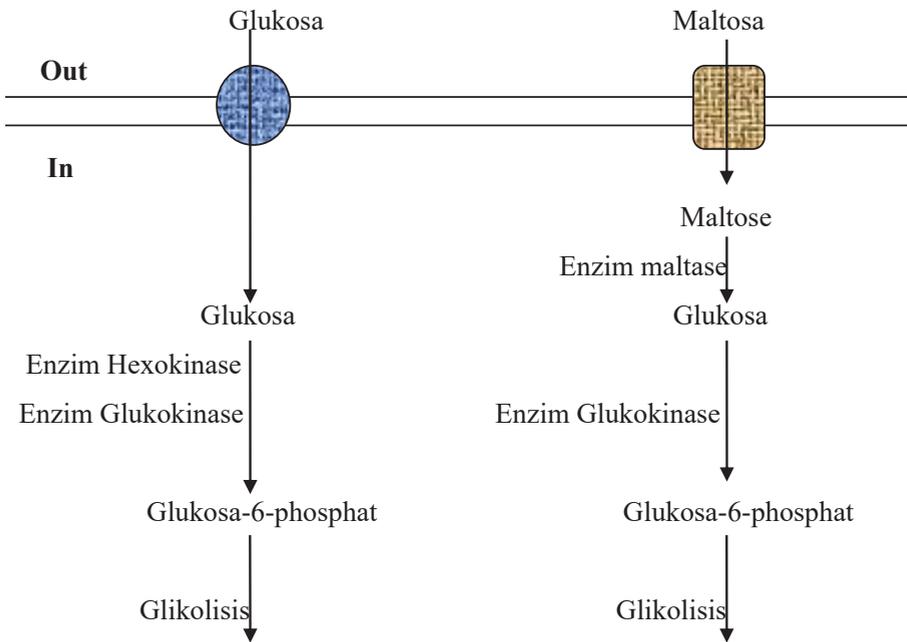
Efek Crabtree adalah fenomena dimana *S.cerevisiae* memproduksi etanol (alkohol) pada kondisi aerobik dalam konsentrasi glukosa tinggi (konsentrasi glukosa rendah 5-10 mg/100 mL), dari pada memproduksi biomasa (melalui siklus Asam Trikarboksilat/TCA), yang biasa terjadi pada khamir genus *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Brettanomyces*, *Torulopsis*, *Nematospora*, dan *Nadsonia*. *Saccharomyces* yang menghasilkan alkohol secara aerobik dalam glukosa berlebih disebut sebagai *Crabtree positif*. Fenomena efek *Crabtree* dapat terjadi karena sebagai berikut: meningkatnya konsentrasi glukosa mempercepat proses glikolisis

(yaitu perombakan gula), dan mengakibatkan produksi ATP berlebih (produksi ATP melalui fosforilasi substrat). Keadaan ini menutunkan proses fosforilasi oksidasi oleh siklus TCA melalui rantai transport elektron, dan oleh karena itu konsumsi oksigen menurun. Fenomena efek Crabtree berlangsung oleh karena adanya represi terhadap sintesis enzim respirasi oleh adanya laju fermentasi yang tinggi, dan tergantung pada substrat. Ketika *S.cerevisiae* tumbuh secara eksponensial pada glukosa atau fruktosa sebagai sumber karbon ditambah sumber energi dan kondisi aerobik, maka perombakan glukosa berlangsung secara fermentasi aerobik. Ketika *S.cerevisiae* tumbuh pada manosa atau galaktosa, perombakan berlangsung secara simultan melalui respirasi dan fermentasi. Analisis perhitungan efek Crabtree berdasarkan ratio antara mikro mole glukosa yang terfermentasi dengan mikro mole glukosa yang teroksidasi (respirasi). Efek Crabtree adalah positif jika nilai ratio > 1 , dan negative bila rasionya < 1 . Pada kondisi ada udara *S.cerevisiae* dapat tumbuh dengan glukosa, fruktosa, manosa atau galaktosa sebagai sumber karbon (C) ditambah energi dengan laju konsumsi yang sama untuk setiap jenis gula. Pada kondisi lingkungan alami spesies khamir menggunakan sumber karbon dari polyol, alkohol, asam organik, dan asam amino yang mendukung pertumbuhannya namun khamir lebih menyukai memetabolisme jenis gula (heksosa meliputi glukosa, fruktosa, galaktosa atau manosa), dan golongan disakarida seperti maltose atau sukrosa, juga dengan senyawa yang memiliki dua karbon (etanol atau asetat).

Fenomena keempat yaitu *efek Kluyver*, kemampuan khamir, tergantung pada jenisnya, dapat merombak gula disakarida secara aerobik (respirasi) dan tidak secara anaerobik (fermentasi), namun bisa merombak gula monosakarida heksosa secara anaerobik. Ketidakmampuan khamir dalam memfermentasi gula disakarida maltosa menjadi etanol dan CO_2 walaupun memetabolisme maltosa secara respirasi (ada O_2) dan fermentasi alkohol gula heksosa (monosakarida) bisa terjadi. Intinya *Efek Kluyver* ini terjadi karena perbedaan dalam memfermentasi antara gula monosakarida dan disakarida. Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.1, diagram tersebut menunjukkan tiga kemungkinan proses metabolisme yaitu transport gula, hidrolisis disakarida atau mekanisme regulasi gula tertentu.

Seperti *Efek Kluyver* yang ditemui pada *C.utilis* menunjukkan adanya ketidakmampuan memfermentasi disakarida tertentu dan bukan

terletak pada ketersediaan oksigen. Dalam oksigen terbatas *C.utilis* yang ditumbuhkan dalam media maltosa menunjukkan bahwa jumlah maltose yang terfermentasi terbatas oleh ketersediaan oksigen untuk respirasi. Ketika ketersediaan oksigen berkurang, maka hanya sebagian maltose yang dikonsumsi dan tidak terjadi fermentasi. Sebaliknya pertumbuhan *C.utilis* dalam glukosa pada oksigen terbatas, berlangsung secara respirasi dan fermentasi yang terjadi secara simultan. Khamir *Kluyver-negatif S.cerevisiae* melangsungkan metabolisme respiro-fermentatif selama pertumbuhan pada oksigen terbatas baik dalam media glukosa maupun maltose.



Sumber Weusthuis et al. (1994).

Gambar 2.1 Perbedaan antara metabolisme glukosa dan maltose dalam sel khamir. Pada gambar bahwa phosphorylasi unit glukosa berasal dari maltose terjadi hanya oleh enzim glukokinase. Sementara glukosa yang di ambil dari medium dapat difosforilasi oleh kedua glukokinase dan hexokinase.

Pada kondisi aerobik dan glukosa berlebih, *S.cerevisiae* melangsungkan proses *Efek Crabtree*. Fenomena *Efek Crabtree* yaitu fermentasi alkohol dalam kondisi aerobik ketika konsentrasi glukosa melebihi batas ambang tertentu

(Verduyn et al., 1990). *Saccharomyces cerevisiae* mempunyai kemampuan yang luar biasa karena dapat tumbuh di bawah kondisi strik anaerobic untuk melakukan fermentasi alkohol. Bahkan dalam kondisi sepenuhnya aerobik etanol dapat diproduksi oleh *S. cerevisiae* yaitu ketika konsentrasi gula dalam substrat berlebih. Pada kondisi glukosa berlebih, fermentasi aerobic menjadi etanol menghasilkan energi yang diperlukan untuk pembentukan biomasa sel. Khamir '*Non-Saccharomyces*' memerlukan pasokan oksigen untuk memicu fermentasi alkohol karena oksigen sebagai faktor pembatas pertumbuhannya. Namun, tidak adanya oksigen mengakibatkan terhentinya pertumbuhan dan karena itu, pada akhirnya, melangsungkan proses fermentasi alkohol. Dalam khamir, fermentasi alkohol juga tergantung pada jenis gula, misalnya *Candida utilis* yang bersifat fakultatif fermentatif tidak memfermentasi maltosa bahkan di bawah kondisi pertumbuhan oksigen terbatas meskipun maltosa tersebut mendukung pertumbuhan oksidatif. Kondisi perkembang biakan secara aerobik dengan substrat terbatas pada system kultivasi fed-batch bisa dilakukan untuk mencapai hasil biomassa yang optimal, dan pembentukan produk sampingan (*by-product*) minimal. Namun, dalam reaktor besar, karena ketidak sempurnaan proses pencampuran, gradien antara substrat dan oksigen tidak dapat dihindari.

Golongan khamir fakultatif fermentasi dapat dibagi berdasarkan efek *Crabtree* yaitu terjadinya fermentasi alkohol dalam kondisi aerobik obligat dengan adanya kelebihan gula. Ketika mengkulturkan khamir yang bersifat *Crabtree-positif* pada kondisi gula terbatas tiba-tiba dipapar pada kondisi kelebihan gula (misalnya terjadi karena tidak sempurnanya proses pencampuran dalam reaktor besar) maka etanol dapat seketika diproduksi. Produksi etanol disertai dengan munculnya metabolit lain seperti asam asetat, asam piruvat dan etilasetat. Etanol dapat mengakibatkan efek yang mematikan terhadap pertumbuhan khamir karena meningkatkan permeabilitas membran dan penghambatan sejumlah enzim esensial. Ketika khamir yang bersifat *Crabtree-negatif* dikulturkan dalam substrat yang mengandung gula terbatas dalam kemostat aerobik, maka khamir *Crabtree-negatif* tersebut memiliki glukosa dengan sifat afinitas substrat yang tinggi. Oksigen sebagai parameter kunci yang menentukan laju fermentasi alkohol.

Khamir *Crabtree-positive* termasuk *S.cerevisiae* mempunyai kecenderungan kuat untuk melakukan proses fermentasi alkohol. Namun

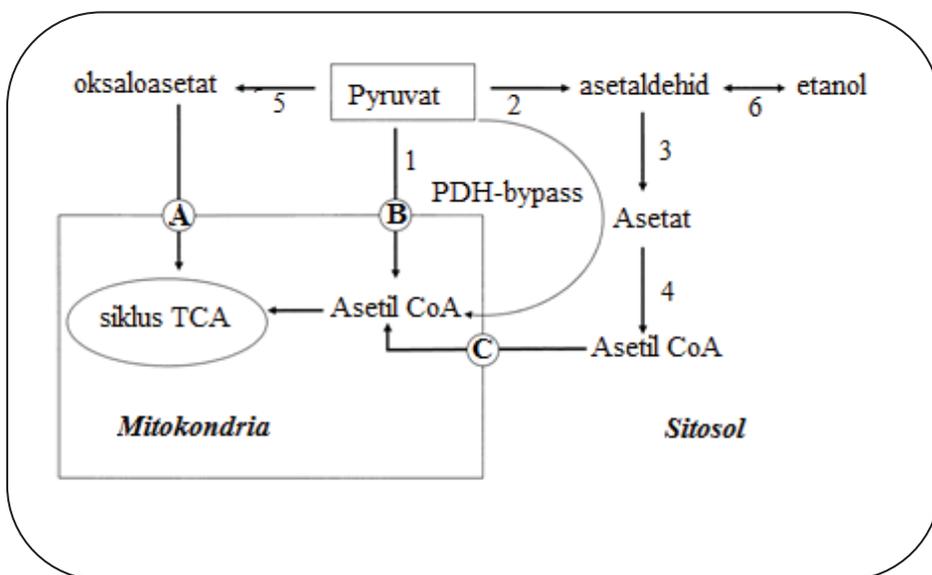
demikian, pembentukan etanol oleh *S.cerevisiae* dapat dihindari oleh kondisi pertumbuhan yang sepenuhnya aerobik dengan suplai gula terbatas. Pada kondisi pertumbuhan oksigen terbatas laju fermentasi baik pada khamir *Crabtree-positif* dan *Crabtree-negatif* hampir sama. Pada khamir *Crabtree-positif S.cerevisiae*, enzim utama piruvat decarboxylase (PDC) aktif pada kondisi pertumbuhan aerobik dan glukosa terbatas. Sebaliknya aktivitas PDC sangat rendah pada khamir *Crabtree-negatif C.utilis*. Aktivitas enzim PDC meningkat tajam ketika *C.utilis* ditumbuhkan pada kondisi oksigen terbatas, sehingga disimpulkan bahwa oksigen menjadi kunci utama regulasi aktivitas PDC di dalam khamir *Crab-tree-negatif*. Khamir *Crabtree-positif* dan *Crabtree-negatif* memiliki regulasi metabolisme gula yang berbeda di tingkat piruvat.

Proses Glikolisis pada *S.cerevisiae*.

Setelah glukosa masuk ke dalam sel, glukosa intrasel akan mengalami disimilasi dan atau asimilasi oleh proses metabolisme. Begitu glukosa di dalam sel, glukosa mengalami fosforilasi oleh enzim kinase menjadi glukosa-6-fosfat dan kemudian mengalami isomerisasi menjadi fruktosa-6-fosfat oleh enzim fosfoglukosa isomerase. Selanjutnya enzim fosfofruktokinase membantu metabolisme fosforilase fruktosa-6-fosfat menjadi fruktosa-1,6-bisfosfat. Tahapan ini merupakan bagian awal dari proses glikolisis yang memerlukan energi dalam bentuk ATP. Aktivitas berikutnya melibatkan enzim aldolase, triosefosfat isomerase, gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenase, fosfoglisarat kinase, fosfoglisarat mutase, enolase dan piruvat kinase. Tahap akhir proses glikolisis adalah pembentukan piruvat yang berkaitan dengan produk net energi dan pengurangan equalensi. Jalur glikolitik sangat esensial bagi seluruh spesies khamir.

Pada jalur titik cabang piruvat (sebagai hasil produk akhir glikolisis) (Gambar 2.2), piruvat mengalami tiga jalur metabolisme yang berbeda tergantung pada spesies khamir dan kondisi lingkungan, yaitu (1) setelah piruvat dibawa masuk ke dalam mitokondria oleh mitokondrial piruvat carrier, piruvat langsung dikonversi menjadi asetil-cofaktor A (CoA) oleh kompleks multienzim mitokondria piruvat dehidrogenase (PDH); (2) piruvat dapat juga dikonversi menjadi asetil-CoA di dalam sitosol melalui asetaldehid dan asetat oleh jalur bypass-PDH. Jalur bypass-PDH memerlukan tiga

aktivitas enzim yaitu (a) piruvat dekarboksilase mengubah piruvat menjadi asetaldehid, (b) asetaldehid dehidrogenase (ALD) mengubah asetaldehid menjadi asetat, dan (c) asetil-CoA sintetase (ACS) mengubah asetat menjadi sitosol asetil-CoA yang kemudian ditransport secara tidak langsung ke dalam mitokondria melalui system enzim asetiltransferase karnitin. Pada Gambar menyajikan bahwa kompleks PDH mitokondrial mempunyai afinitas piruvat yang lebih tinggi dibanding piruvat dekarboksilase sitosol, dan oleh karena itu sebagian besar piruvat mengalir menuju kompleks PDH dengan laju reaksi glikolisa rendah. Namun, pada konsentrasi glukosa meningkat, maka laju reaksi gliolisis meningkat dan terbentuk piruvat lebih banyak, saturasi PDH-bypass dan mengubah aliran karbon melalui produksi



Sumber Rodrigues *et al.* (2005).

Gambar 2.2. Skema jalur titik cabang piruvat.

Keterangan: A = pembawa oksaloasetat mitokondria, B = pembawa piruvat mitokondria, C = karnitin asetiltransferase. Piruvat yang terbentuk dari glikolisis diubah menjadi asetil-kofaktor-A (asetil Co-A) dan/atau oksaloasetat dimana ke dua produk ini merupakan senyawa intermediate dari siklus trikarboksilat (TCA). 1. Komplek piruvat dehidrogenase, 2. Piruvat dekarboksilase, 3. Asetaldehid dehidrogenase, 4. Asetil-Co-A sintetase, 5. Piruvat karboksilase, dan 6. Alkohol dehidrogenase.

Metabolism secara aerobik pada *S.cerevisiae*

Metabolism aerobik meliputi fosforilasi oksidasi dan keseimbangan redoks. Selama metabolisme secara respirasi, kedua NADH sitosol dan mitokondria mengalami reoksidasi oleh rantai respirasi. Namun, tidak sama dengan kebanyakan sel eukariotik termasuk spesies khamir lain, *S.cerevisiae* tidak memiliki multi-sub-unit kompleks-I-tipe NADH dehidrogenase. Melainkan *S.cerevisiae* memiliki sebuah single-subunit- NADH: ubiquinon oksidoreduktase yang berpasangan dengan oksidasi intramitokondria NADH pada rantai respirasi. Enzim ini (encoding *NDII*) sebagai enzim internal NADH dehidrogenase yang berfungsi mengkatalisis transfer dua elektron dari intramitokondria NADH ke ubiquinon. Seperti pada sel tanaman, mitokondria sel khamir memiliki aktivitas internal mitokondrial NADH dehidrogenase dan mitokondria eksternal NADH dehidrogenase. *S.cerevisiae* memiliki dua gen encoding eksternal NADH dehidrogenase isoenzim yaitu *NDE1* dan *NDE2* dimana kedua enzim ini merupakan gen yang mengekspresikan sifat aerobik. Cirri khas lain jalur respirasi *S.cerevisiae* yaitu rantai respirasi *S.cerevisiae* berbeda dari kapang dan tanaman karena NADH dehidrogenase tidak berpasangan dengan pompa proton dan tidak memiliki enzim sianida-sensitif-alternatif oksidase yang mengkatalisa oksidasi ubiquinon secara langsung melalui molekular oksigen tanpa menghasilkan proton motive force.

Metabolism anaerobic *S.cerevisiae*

Berdasarkan sifat fisiologi yang berkaitan dengan metabolisme gula khamir dikelompokkan tiga yaitu nonfermentatif, fakultatif fermentative, dan obligat fermentative. Fermentasi alkohol diketahui sebagai katabolisme glukosa menjadi etanol, 2 mol ATP dihasilkan dari setiap mol glukosa yang diubah menjadi etanol) yang berfungsi sebagai energi utama untuk pertumbuhan khamir. Selama pertumbuhan kondisi anaerobik selain metabolisme glukosa juga terjadi sintesis gliserol. Gliserol dihasilkan dari reduksi glikolitik intermediate dihidroksiaseton fosfat menjadi gliserol-3-fosfat dan dikatalisa oleh enzim NAD⁺-dependent-gliserol-3-fosfat dehidrogenase (*GPD1* dan *GPD2*) dan diikuti dengan defosforilasi gliserol-3-

fosfat menjadi gliserol yang dikatalisa oleh enzim gliserol-3-fosfat. *S.cerevisiae* dan beberapa jenis khamir lain juga mampu menghasilkan asam asetat baik secara aerobic maupun anaerobic. Metabolism asam asetat melalui asetil-Co-A sintetase sebagai sumber utama sitosilik asetil-CoA yang merupakan biding blok biosintesis ama lemak.

S.cerevisiae sebagai khamir fakultatif anaerob mampu tumbuh baik dalam aerobic menggunakan molecular oksigen, maupun anaerobic menggunakan senyawa lain. Pertumbuhan anaerobic menghasikan energi yang lebih rendah dibanding kondisi aerobic. Hal ini karena laju konsumsi substrat gula lebih tinggi pada kondisi anaerobic, dan oksigen digunakan sebagai sumber utama akseptor elektron akhir. *S.cerevisiae* memerlukan suplai eksternal berupa sterol dan asam lemak untuk dapat tumbuh cepat dalam kondisi anaerobic. Pergeseran pertumbuhan dari kondisi anaerobic (dimana energi adalah faktor pembatas) ke aerobic (dengan kemampuan menghasilkan ATP 1,4-5,4 kali lebih banyak per mol gula) member efek menguntungkan. Bagi *S.cerevisiae* fermentasi alkohol pada kondisi pertumbuhan aerobic mampu memetabolisme hampir semua gula dan hanya sekitar 5-10% glukosa, maltose atau fruktosa tidak termetabolisme.

Efek asam lemah dan Efek asam lemak terhadap aktivitas *S.cerevisiae*

Asam Lemah. Regulasi sel pada umumnya adalah bahwa membran plasma mikroorganisme hanya permeable terhadap asam organik dalam bentuk undisosiasi, sehingga dapat melalui membrane secara difusi pasif. Setelah masuk ke dalam sitosol, asam akan terdisosiasi oleh karena pH sitosol 7 adalah lebih tinggi dari pada pK dari asam lemah. Hal ini mengakibatkan terjadi transfer proton dari medium menuju sitosol. Dalam upaya mencegah pengasaman sitosol, maka influks proton harus dijaga keseimbangannya/ diseimbangkan dengan cara melalui ekstrusi proton oleh enzim ATPase membrane plasma pada ketersediaan ATP. Proton yang masuk ke dalam sel harus dikeluarkan oleh kompleks ATPase membran plasma yang memompa proton, untuk mencegah pengasaman intraseluler.

Asam Lemak. *S.cerevisiae* tidak dapat melakukan sintesis asam lemak tidak jenuh atau ergosterol dalam kondisi tanpa oksigen (anaerobic)

(Verduyn et al., 1990). Jumlah asam lemak tidak jenuh menurun ketika sel yang semula tumbuh secara aerobik kemudian ditransfer ke dalam kondisi anaerobic dengan tanpa adanya sterol dan asam lemak. Jumlah asam lemak yang terbatas dapat menyebabkan perubahan sifat membrane sel yang mengakibatkan influks proton pasif yang hanya dapat di keluarkan menggunakan ATP. Sebaliknya jika asam lemak berlebih dapat mengakibatkan menurunnya produksi biomasa. Penyisipan asam lemak rantai menengah ke dalam struktur membrane sel khamir dapat menurunkan sifat hidrofobisitas lipid dalam membrane dan meningkatkan permeabilitas membrane. Namun, hal ini tidak terjadi jika terdapat asam lemak oleat, karena asam lemak rantai panjang (>C10) tidak efektif dalam merusak struktur membrane sel *S.cerevisiae*.

Latihan

1. Apakah efek Crabtree dan efek Kluver, dan berikan contohnya.
2. Bagaiman cara menstimulasi dan mengendalikan proksi metabolit oleh khamir?
3. Apakah xylitol?
4. Apakah produk SCP termasuk ke dalam produk metabolit?

Daftar Pustaka

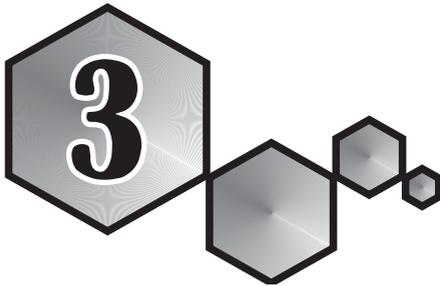
- Barnett, J. A., Payne, R. W. & Yarrow, D. (1990). *Yeast: characteristics and identzjcation*, 2nd edn. Cambridge : Cambridge University Press.
- Białecka-Florjańczyk E, and Kapturowska AU. 2012. Genetically Modified Baker's Yeast *Saccharomyces cerevisiae* in Chemical Synthesis and Biotransformations, Chemical Biology, Prof. Deniz Ekinci (Ed.), ISBN: 978-953-51-0049-2, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/chemical-biology/genetically-modified-baker-s-yeast-saccharomyces-cerevisiae-in-chemical-synthesis-and-biotransformat.chapter11.pp> 211-234.
- Camacho-Ruiz L, Pérez-Guerra N, Pérez Roses R. 2003. Electronic J.Enviro. Agric.Food Chem), 2(5):531-542. Diakses 28-12-2016,

- Deken, 1966. (Alda J. Rodrigues, Kristina Hanspers, Egon Willighagen, Marvin Martens, et al. <https://www.wikipathways.org/index.php/Pathway:WP3631> (diakses 8 Mei 2018).
- Degn, H. & Lloyd, D. (1988). The influence of oxygen and organic hydrogen acceptors on glycolytic carbon dioxide production in *Brettanomyces anomalus*. *Yeast* 4, 249-255.
- Lin Y, Zhang W, Li C, Sakakibara K, Tanaka S, Kong H. 2012. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass and Bioenergy* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.019>
- Lloyd, D. & James, C. J. 1987. The Pasteur effect in yeasts: mass spectrometric monitoring of oxygen uptake, and carbon dioxide and ethanol production. *FEMS Microbiol Lett* 42, 27-31.
- Mendes-Faia and Leão C. 2004. Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry, *Journal of Applied Microbiology*, 97, 540-545 doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02331.x
- Pereira AP, Mendes-Ferreira A, Oliveira JM, Estevinho LM, Mendes-Faia A. 2013. High-cell-density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for the optimisation of mead production. *Food Microbiology* 33:114-123.
- Rodrigues F, Ludovico P and Leao C. Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. Chapter 6.
- Sims, A. P. & Barnett, I. A. (1978). The requirement of oxygen for the utilization of maltose, cellobiose and D-galactose by certain anaerobically fermenting yeasts (Kluyver effect). *J Gen Microbiol* 106, 277-288.
- Verduyn C, Postma E, Alexander WS, vanDijken JP. 1990. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures, *Journal of General Microbiology* (1990), 136, 395-403.
- Weusthuis RA, Vissert W, Pronk JT, Scheffers WA, and vanDijken JP, 1994. Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a

continuous-culture study of the Kluver effect. *Microbiology*, 140:703-715.

Weusthuis RA, Luttik MAH, Pronk JT, Scheffers WA, and van Dijken JP. 1994. Is the Kluver effect in yeasts caused by product inhibition? *Microbiology*, 140:1723-1729.

-oo0oo-



DINDING SEL KHAMIR

Khamir adalah mikroorganisme penting yang pernah dieksploitasi oleh manusia, karena telah digunakan selama beberapa ribu tahun untuk produksi berbagai makanan. Selain produk roti dan fermentasi beralkohol tradisional, khamir telah digunakan untuk keperluan industri yang beragam. Khamir telah digunakan dalam beberapa aplikasi (Fleet, 2007): (i) fermentasi laktosa menjadi etanol, untuk menghasilkan susu bebas laktosa untuk penderita intoleransi laktosa; (ii) produksi berbagai alditols, seperti gliserol atau D-glucitol; (iii) produksi protein dari alkana dan limbah kertas-pulp; (iv) menyediakan enzim, seperti β -fructofuranosidase (invertase), α - dan β -galaktosidase dan lipase; (v) produksi senyawa untuk tujuan penelitian, seperti, novel ikatan karbon-karbon dan methyldiols dari aldehida dan (vi) sebagai agen biokontrol karena mempunyai aktivitas antifungi. Produksi Biomassa sel (makanan dan pakan khamir), produksi ingredien, aditif dan sebagai alat bantu pengolahan untuk pengolahan makanan, seperti antioksidan, aroma, warna, rasa dan vitamin, khamir probiotik, dan biocatalysts khamir. Di sisi lain, keberadaan dan metabolisme khamir juga dapat memiliki beberapa aspek merugikan, seperti pembusukan makanan dan minuman, alergen makanan, keamanan pangan dan kesehatan yang terkait dengan khamir.

Saccharomyces cerevisiae merupakan sumber yang kaya vitamin B dan kromium, dan telah banyak dipelajari secara ekstensif sebagai bahan obat.

Telah dilaporkan penggunaan ragi (*Saccharomyces boulardii* atau *Saccharomyces cerevisiae*, khamir roti komersial) sebagai agen biotherapeutic potensial yang kombinasi dengan antibiotik standar untuk pengobatan diare yang disebabkan oleh *Clostridium difficile* dan kolitis. Sebagai sumber vitamin B, strain *Saccharomyces cerevisiae* dapat menghilangkan stres, depresi, mudah tersinggung, dan kelelahan dan juga membantu mengurangi beberapa efek penuaan. Sebagai sumber biotin, *Saccharomyces cerevisiae* bisa memperkuat rambut dan kuku, dan mengobati cradle cap dan diabetes neuropati. Sebagai sumber kromium, *Saccharomyces cerevisiae* dapat menurunkan kadar gula darah pada orang dengan diabetes tipe-2, mengurangi risiko kolesterol tinggi dalam darah, dan membantu dalam pengobatan jerawat kronis dan furunkulosis. Kromium merupakan senyawa yang sulit bagi tubuh untuk menyerap, tetapi lebih mudah diserap bila berada bersama sama dengan *Saccharomyces cerevisiae*. Selain itu, *Saccharomyces cerevisiae* juga memiliki beberapa mineral termasuk selenium, zinc, fosfor dan magnesium, yang sering digunakan untuk menghilangkan nafsu makan (Camacho-Ruiz et al., 2016). Buku ini memberikan ulasan mengenai aktivitas khamir dalam perombakan komponen pangan, produk metabolit yang dihasilkan oleh khamir, dan peranan aktivitas khamir dalam mengubah beberapa sifat bahan pangan menjadi lebih baik. Ulasan mengenai dinding sel khamir, dan fungsi komponen dinding sel khamir akan dijabarkan di dalam Bab ini. Setelah membaca Bab ini diharapkan pembaca mampu memahami susunan dinding sel khamir dan komponen penyusunnya, dan mampu menjelaskan fungsi dinding sel.

Struktur Dinding Sel Khamir

Perbedaan substansial dalam komposisi dinding sel bakteri dan khamir berdampak pada respon antigenik. Semua bakteri mengandung molekul gula dengan berat molekul tinggi berkaitan dengan protein yang membentuk struktur kaku disebut peptidoglikan. Bakteri Gram negative berbeda dengan bakteri Gram positif terhadap konsentrasi kandungan lipid di dalam dinding selnya. Bakteri Gram negative mengandung lipid hingga 20% terdiri dari lipopolisakarida (LPS), sedangkan bakteri Gram positif mengandung lipid lebih sedikit di dalam dinding selnya, tetapi mengandung asam lipoteikoat (LTA). Dinding sel khamir tersusun atas paling sedikit dua lapisan, yaitu

lapisan luar mengandung kombinasi manosa yang berkaitan dengan protein membentuk phosphopeptidomanan (PLM) (umumnya disebut manan) atau kombinasi manosa dengan lemak yang disebut phospholipomanan (PLM). Lapisan bagian dalam tersusun oleh kitin, 1,3- β - dan 1,6- β -glukan. Pada organism hidup, pertahanan pertama melawan serangan mikroba disebut *innate immunity*. *Innate immunity* tergantung pada pengenalan antigen pola molekul yang berhubungan dengan pathogen, disebut pathogen-associated molecular pattern (PAMP) oleh protein spesifik yaitu reseptor pengenalan pola (pattern-recognition receptors/PRRs). Peptidoglikan, LPS dan LTA yang terdapat di dalam dinding sel bakteri, dan PLM, PPM dan glikan yang terdapat di dalam dinding sel khamir, semua adalah disebut PAMPs dan dikenali oleh PRRs yang berbeda beda, dan oleh karena itu dapat menjelaskan respon yang berbeda beda dari mikroorganisme tersebut, dan disebut sebagai *immunobiotik* (Janeway et al., 2002).

Komposisi Dinding Sel

Komposisi kimia dari dinding sel *S. cerevisiae*, dinding sel menempati 15 sampai 30% dari berat kering sel dan 25 sampai 50% dari volume berdasarkan perhitungan dari elektron mikroskopik. Dinding sel sebagian besar tersusun dari manoprotein dan fibrous β -1,3-glukan. Terdapat juga cabang β -1,6-glukan yang menghubungkan beberapa komponen lain dari dinding sel. Komponen minor yang penting adalah kitin, yang berkontribusi pada insolubilitas serat. Kompleks β -1,3-glukan-kitin adalah konstituen utama dari dinding bagian dalam. Glukan β -1,6 menghubungkan komponen dinding dalam dan luar. Pada permukaan luar dari dinding sel adalah manoproteins, yang semuanya berupa O- dan N-terglikosilasi. Manoprotein tersusun padat-kompak dan berfungsi membatasi permeabilitas dinding sel terhadap larutan. Ikatan kovalen yang menghubungkan antara masing-masing komponen dalam dinding sel kini telah diidentifikasi. Struktur komponen dinding sel terdiri dari glukan, manoprotein, kitin seperti disajikan pada Tabel 3.1.

1. Susunan Modular

Glukan β -1,3 merupakan komponen utama dan membentuk serat fibrous penutup dinding. Dengan perbandingan ukuran polimer terhadap

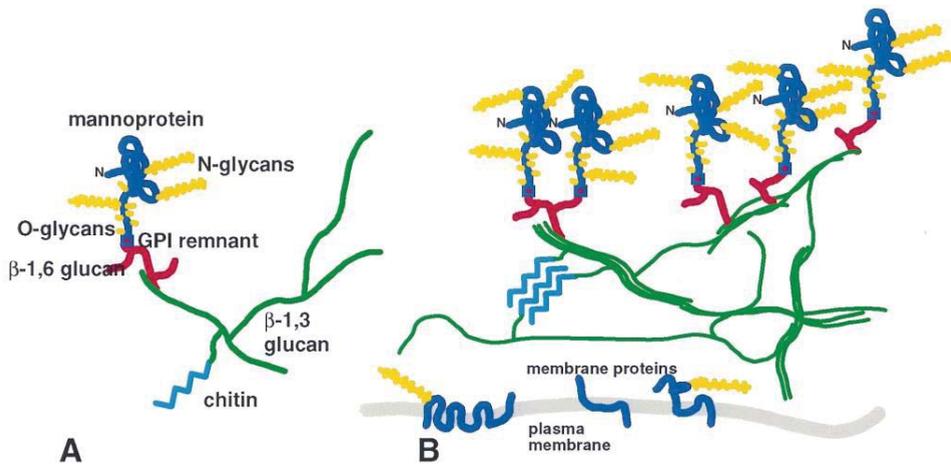
kandungan glukukan selular diperoleh gambaran angka sekitar 1×10^6 sampai 3×10^6 rantai glukukan per sel (Lipke dan Ovalle, 1998). Terdapat jumlah yang sama antara molekul glukukan β -1,6 yang melekat pada β -1,3 glukukan. Jika kita memperkirakan ukuran rata-rata manoproteins sebagai 100 hingga 200 kDa, maka jumlah manoprotein juga sama. Khitin dalam jumlah kecil (1% dari berat kering tidak termasuk tunas sel/bud) merupakan rantai lurus sekitar 120 unit, berada dalam ratio molar dari 0,1 hingga 0,3. Senyawa kitin ini berikatan kovalen membentuk kompleks makromolekul yang dirakit membentuk dinding yang utuh. Para penulis menyebut kovalen kompleks ini sebagai "kisi-kisi jaringan" (latticework) daripada struktur yang solid karena kovalen kompleks ini hanya menempati hanya 10 sampai 20% dari keseluruhan volume dinding sel. "Lattice/kisi-kisi jaringan" adalah suatu unit modul yang terakit, setiap unit tersusun mengelilingi molekul β -1,3 glukukan (Gambar 15A). Sebuah prototipe unit modul memiliki sebuah rantai glukukan β -1,3 dengan 4 sampai 50 cabang dan termasuk satu atau dua gugus β -1,6 glukukan serta satu gugus manoprotein. Satu unit modu minoritas memiliki rantai kitin yang melekat pada β -1,3 atau glukukan β -1,6. Unit-unit Modul ini terkait melalui interaksi ikatan nonkovalen di dalam lapisan glukukan-kitin dan melalui ikatan kovalen lintas-link di lapisan manoprotein (Gambar 15B) termasuk juga ikatan disulfida antara manoproteins. Sedangkan nov ikatan manoprotein-glukukan belum diidentifikasi.

Tabel 3.1 Struktur makromolekul dinding sel *S. cerevisiae*

Makromolekul	% dari masa dinding sel	Mean Mr (DP)(kDa)
Manoprotein ^b	30-50	Highly variabel
1,6-beta-glukan	5-10	24(150)
1,3-beta-glukan	30-45	240 (1500)
Kitin	1,5-6	25(120)

Sumber Klis et al. (2006)

Keterangan: Komponen dinding sel tersusun berurutan dari luar ke bagian dalam. Stress pada Dinding sel dapat menyebabkan meningkatnya level kitin secara drastic. DP= degree of polimerisasi. ^b=kandungan protein sesungguhnya adalah 4-5%, masa yang tersisa adalah rantai cabang karbohidrat mengandung manosa yang berikatan dengan protein (protein-linked mannose-containing carbohydrate side chains).



Sumber Lipke and Ovalle, (1998)

Gambar 3.1. Struktur senyawa penyusun dinding sel

2. Glukan

Glukan β -1,3 membentuk jaringan fibrosa yang terlihat melalui pemindaian mikroskop elektron dari permukaan dalam dari dinding dan juga membentuk komponen amorf. Rata-rata derajat polimerisasi 1.500 sesuai dengan massa molekul 240.000 dan panjang serat maksimum sekitar 600 nm. Panjang ini kira-kira tiga sampai enam kali rata-rata ketebalan dinding, atau 1/10 dari lingkaran sel. Percabangan polimer (sekitar 3% cabang poin) secara substansial dapat mengurangi panjang serat tersebut, tergantung pada panjang cabang. Sebagian besar glukan β -1,3 memiliki konformasi heliks, berdasarkan penelitian *in vitro*, dan sekarang telah dikonfirmasi oleh metode *Solid state nuclear magnetic resonance* untuk sel khamir utuh. Heliks tersebut terdiri dari rantai polisakarida tunggal atau tiga rantai ikatan hidrogen (triple helix). Dengan teknik mikroskop elektron serat mempunyai 10 sampai 30 nm diameter, konsisten dengan asosiasi lateral beberapa rantai, masing-masing rantai dengan diameter 0,5-1 nm. Enzim β -1,3-glukan synthase terletak di membran plasma. Mikroskop elektron menunjukkan bahwa polisakarida adalah produk ekstraseluler. Dengan demikian, kompleks bertindak sebagai enzim transferase glikosil dan juga transporter. Percabangan dapat dibentuk secara ekstraseluler oleh enzim putative branching, *Bgl2p*, yang memiliki aktivitas yang analog dengan enzim pada percabangan molekul pati. Glukan

β -1,6 adalah polisakarida bercabang yang menghubungkan komponen dari setiap unit modul bersama-sama. Titik sintesis dan cara sintesis glukukan β -1,6 tidak begitu jelas, walaupun telah dianalisis secara biokimia maupun genetika. Karena glukukan adalah reseptor utama untuk "K1 killer factor" khamir.

3. *Kitin*

Kitin terkait dengan non- mengurangi cabang β -1,3 glukukan dan β -1,6 glukukan dengan ikatan glycosida (Gbr. 1A) (Lipke dan Ovalle, 1998). Rantai α -kitin dari beberapa unit modul anneal untuk membentuk microdomains kristal α -kitin, yaitu bentuk sangat umum ditemui dalam lingkungan aqueous dan bentuk pada dinding jamur yang lain. Struktur α -kitin mirip dengan struktur dari selulosa, yaitu berikatan hidrogen antiparalel terhadap rantai unit N- acetylglucosamine. Ikatan hidrogen melibatkan gugus amida (yang tidak ditemui dalam selulosa) untuk lebih lanjut menstabilkan kristal. Ikatan ekstra ini bersama dengan inti hidrofobik yang dibentuk oleh kelompok metil asetamido berfungsi mencegah invasi oleh air, dan disolusi kristal. Sintesis kitin adalah vectorial, dengan substrat dan sisi regulasi intraseluler dan produk ekstraseluler, berdasar pada aktivitas kerja enzim, dan mikroskopis. Adanya kitin dalam gugus molekul dinding sel sangat penting untuk menjaga insolubilitas dinding sel, dan keterikatan dengan kitin menghasilkan transfer material dinding sel dari yang larut dalam alkali ke fraksi yang tidak larut dalam alkali.

4. *Manoprotein*

Mannoproteins dalam dinding sel khamir adalah polipeptida glikosylated, 50 sampai 95% karbohidrat by weight, dan dengan demikian dianggap sebagai proteoglikan khamir (Lipke dan Ovalle, 1998). Manoprotein mengikat N-linked glycans dengan struktur inti "*Man10-14GlcNAc2-Asn*". Struktur ini sangat mirip dengan rantai high mannose N-glycan pada mamalia. "Outer rantai" yang terdapat pada sebagian N-glycans khamir terdiri dari 50 sampai 200 unit mannose tambahan yang terkait, dengan α -1,6-linked backbone yang berikatan dengan rantai samping α -1,2- dan α -1,3 cabang pendek. Terdapat sepuluh N-glycans besar per glycopeptide, sehingga gula yang terikat-N (N-linked-sugar) dapat menambahkan 50.000

sampai 100.000 Da manoprotein. Fosforilasi rantai samping mannosyl menyebabkan khamir memiliki muatan permukaan anionic. N-rantai perpanjangan tidak penting untuk biogenesis dinding, tetapi kurangnya rantai luar didalam mutan- *mnn9* meningkatkan permeabilitas dinding dan menurunkan integrity.

Struktur Molekuler Dinding Sel

Saccharomyces cerevisiae memerlukan energi metabolic yang sangat besar untuk menyusun dinding sel. Tergantung pada kondisi pertumbuhan, masa dinding selnya dalam berat kering terdapat sekitar 10-25% dari total masa sel. Masa dinding sel tersebut tersusun atas lapisan bagian dalam mengandung komponen paling utama polisakarida yang bertindak sebagai penutup pelindung dari lapisan bagian luar manoprotein yang meluas hingga ke bagian tengah dinding sel. struktur molekuler dinding sel disajikan pada Tabel 3 (Frans et al., 2006). Polisakarida merupakan rantai cabang 1,3-beta-glukan. Oleh karena adanya rantai cabang, molekul 1,3-beta-glukan hanya dapat berhubungan melalui ikatan hydrogen dan menghasilkan formasi yang berkesinambungan yaitu three-dimention network/jaringan. Jaringan ini sangat elastic dan meluas pada kondisi osmotic normal. Ketika sel dipindahkan ke larutan hipertonik, maka sel tersebut menyusut dengan cepat dan kehilangan volume nya hampir 60% dari volume aslinya, dan hal ini sebanding dengan kehilangan permukaan sekitar 40-50%. Penyusutan ini bersifat reversible yang dapat dilihat jika sel dipindahkan ke medium semula asalnya. Sifat elastisitas dinding sel dapat juga dilihat setelah fiksasi sel, maka sel akan menyusut dan lebih kecil dari sel hidup. Elastisitas dinding sel mencerminkan struktur molekul 1,3-beta-glukan yang mempunyai bentuk heliks yang fleksibel seperti kawat pegas yang bisa mempunyai beberapa bentuk. Ketika beberapa jenis khamir seperti *Candida spp*, *Cryptococcus spp*, *Pichia spp* dan *Schizosaccharomyces spp* dipapar pada larutan hipertonik, mereka segera menyusut dengan cepat, maka hal ini menunjukkan bahwa kombinasi kekuatan mekanik dan elastisitas merupakan prinsip arsitektur penyusunan dinding sel khamir.

Non-reducing end dari molekul 1,3-beta-glukan berfungsi sebagai sisi pengikatan dari ikatan kovalen dengan polisakarida lain. Pada sisi eksternal jaringan 1,3-beta-glukan, cabang 1,6-beta-glukan banyak

ditemukan yang kemudian disambungkan ke manoprotein GPI-modified. Pada sisi dalam jaringan 1,3-beta-glukan rantai kitin terikat tetapi hanya setelah terjadi sitokinesis. Dengan kata lain, dinding lateral tempat dimana terjadi pertumbuhan tunas umumnya tidak mengandung kitin. Hal ini menunjukkan bahwa kitin bukan esensial terhadap kekuatan mekanik dan elastisitas dinding lateral sel. Kitin tidak hanya menjadi terikat secara glikosidik pada non-reducing end 1,3-beta-glukan tetapi juga pada rantai 1,6-beta-glukan, khususnya dalam respon dinding sel.

Fungsi Dinding Sel

Dinding sel khamir memiliki 4 fungsi utama (Klis et al., 2006):

1. Menstabilkan kondisi osmotik internal.
Osmolalitas sitoplasma *S.cerevisiae* dan beberapa fungi lain biasanya lebih tinggi dari pada diluar sel untuk membatasi influx air yang dihasilkan yang dapat mengganggu kondisi reaksi internal dan menyebabkan pembengkakan sel berlebihan akhirnya mengarah pada pecahnya membrane plasma, maka khamir membangun dinding yang kokoh dan elastic. Pelebaran dinding menimbulkan suatu tekanan penangkal oleh dinding yang memberhentikan influx air.
2. Perlindungan terhadap stress fisik.
Dinding sel tidak hanya terlibat dalam memelihara homeostatic osmotik tetapi juga fungsinya sebagai sebuah mantel pelindung. Kombinasi kekuatan mekanik yang besar dan elastisitas tinggi memudahkan dinding untuk meemindahkan dan menyebarkan tekanan gangguan fisik, oleh karena itu memberikan perlindungan efisien melawan kerusakan mekanik.
3. Memelihara bentuk sel
Pemeliharaan bentuk sel merupakan prasyarat untuk morfogenesis. Sel khamir dapat tumbuh berbentuk sel oval, atau lebih berbentuk elongasi selama keterbatasan nitrogen atau jika pseudohifa tumbuh. Pembentukan sebuah struktur kawin/mating dalam respon terhadap feromon dari pasangan mating yang berlainan juga digambarkan dalam fungsi dinding sel. bentuk spektakuler khamir tingkat tinggi adalah contoh yang jelas bagaimana dinding sel dapat berkontribusi pada morfogenesis.

4. Dinding sel sebagai *scaffold*/perancah untuk protein

Polisakarida sebagai bantalan stress/tekanan dari dinding sel baker's yeast dan kapang lain yang berfungsi sebagai perancah terhadap lapisan eksternal glikoprotein. Secara kolektif glikoprotein dan terutama karbohidrat berikatan dengan N- pada rantai samping, membatasi permeabilitas dinding sel untuk makromolekul, sehingga menjadi perisai polisakarida skeletal dari serangan protein asing. Glikosilasi protein dinding sel dan adanya gugus fosfat bermuatan negative pada rantai karbohidrat berkontribusi pada penyimpanan air.

Lapisan eksternal protein dari dinding sel selalu tersusun oleh paling sedikit 20 macam glikoprotein yang berbeda dan perbedaan ini tergantung pada kondisi pertumbuhan sel. Hal ini yang menyebabkan bahwa sel mempunyai berbagai fungsi. Protein dinding sel membiarkan sel flokulasi, mengenali mating pasangannya, membentuk biofilm dan tumbuh membentuk pseudohifa maupun menyebar. Lapisan protein ini juga membantu sel untuk mengikat Fe dan membantu serapan sterol dan diperlukan untuk pertumbuhan anaerobic. Protein dinding sel sangat mempengaruhi hidropobisitas sel yang sangat penting untuk perlekatan pada polystyrene dan komponen abiotik lain di permukaan. Konstruksi penyusunan dinding sel dikontrol dengan sangat ketat. Komposisi polisakarida, struktur dan ketebalan dinding bervariasi sangat besar, tergantung pada kondisi lingkungan. Tidak mengherankan jika pembentukan dinding sel sangat ketat berkoordinasi dengan siklus sel. misalnya, gen protein-encoding dinding sel diatur oleh siklus sel.

Fungsi β -Glucan asal Khamir

Yeast beta-glucan atau β -glucan khamir dengan rumus kimia (1-3), (1-6)-P-D-glucan (Poly- (1-6)-P-D-glucopyranosyl- (1,3)-p-D-glucopyranose). Dipasarkan dengan nama *Biothera beta-glucan khamir*, yaitu produk yang mengandung ekstrak beta-glucan khamir dalam bentuk bubuk semprot-kering dengan kecoklatan (beige). Produk Biothera β -glucan khamir mengandung setidaknya 70% β -1,3/1,6-glucan larut air, dengan bentuk fisik bola berongga sel. Selain mengandung sejumlah kecil (trace) protein dan lipid, di dalam produk ini juga mengandung β -1, 6-glucan dan kitin.

Khamir β -glucan diproduksi sesuai dengan standar Good Manufacturing Practices (cGMP) menggunakan reagen food grade dan bahan-bahan yang tepat. *S. cerevisiae* yang digunakan dalam produksi ragi beta-glucan adalah standar food grade *Baker* ragi, yang ditumbuhkan pada industri *Biothera* di bawah kondisi yang terkendali didalam wadah fermentasi stainless steel. Sel-sel khamir dilisiskan untuk mengekstrak komponen beta-glucan dari dinding selnya, yang kemudian dimurnikan untuk menghasilkan produk akhir. Autolisis dari campuran fermentasi terjadi dalam wadah fermentasi di mana sel-sel dilisiskan menggunakan proses thermal yang berlangsung selama beberapa hari. Ekstrak khamir kemudian dipisahkan dari dinding sel menggunakan pemisahan sentrifugal. Setelah sentrifugasi, kandungan padatan total dinding sel adalah 10 sampai 12% dari total massa original. Dinding sel isolat yang telah dipisahkan kemudian mengalami perlakuan asam yang menghasilkan depolimerisasi dan deasetilasi kitin untuk membentuk glukosamin hidroklorida bebas, dan penghilangan kitin. Selanjutnya, slury dinding sel khamir mengalami sterilisasi dan tahap penyesuaian pH sehingga menghasilkan larutan steril dengan pH 5-6. Hasil akhir larutan mengandung padatan 6-12% terutama β -1,3/1,6-glucan murni. Larutan campuran ini kemudian diperlakukan dengan semprot-kering, dan ketika sudah kering, bubuk disaring melalui ayakan mesh. Produk akhir β -1,3 /1,6-glucan kemudian dikemas ke dalam kardus dengan 10 kg dengan kemasan lapisan dalam ganda (inner bags) yang terbuat dari polyethylene.

β -Glucan adalah kelompok polisakarida yang terdiri dari unit glukosa terkait bersama dengan ikatan beta-glikosidik. β -Glucan telah digunakan di banyak industri, seperti farmasi, makanan dan pakan, dan industri kosmetik. β -Glucan juga menunjukkan sifat obat, seperti antitumor, antimikroba dan aktivitas antioksidan plus penyerapan mikotoksin, serta digunakan untuk stimulasi respon imun pada hewan, seperti udang, disapih babi dan tikus, dan pengurangan kadar kolesterol darah dan glukosa. Pengaruhnya untuk membantu immunitas tergantung pada struktur β -Glucan, berat molekul dan derajat percabangan, β -Glucans dengan rantai percabangan panjang yang paling efektif. β -Glucan telah ditemukan di banyak sumber alam, seperti bakteri, ragi, jamur dan tanaman, tetapi berbeda dalam struktur dan sifat fungsionalnya. Dinding sel *Saccharomyces cerevisiae*, khamir bertunas

dalam family Saccharomycetaceae, telah dianggap sebagai sumber β -Glukan yang potensi. Terdapat sekitar 30% dari berat kering sel dan terdiri dari 15% protein dan 85% polisakarida. β -Glucans menyusun sekitar 55 - 65% w/w dari dinding sel khamir, yaitu terdiri dari rantai panjang β -1,3-glukan (sekitar 85% dari total) dan rantai pendek β -1,6-glukan. β -Glukan khamir diisolasi dari dinding sel khamir (*S. cerevisiae*) dan terdiri terutama dari β -1,3-glukan (paling sedikit 70%). Bahan ingredient β -glukan dipasarkan sebagai *BetaRight*@ 3-6 (mengandung paling sedikit 70% β -glukan) atau *WGP*@ 3-6 (mengandung paling sedikit 75% β -glukan). Ingredient β -glukan untuk digunakan dalam sejumlah produk makanan, termasuk kue, minuman pengganti makan, sarapan, granola dan pangan mengandung protein, susu kedelai, probiotik minuman, yogurt, dan minuman yoghurt, minuman buah, minuman, dan smoothie, soft candy, dan sup pada tingkat 200 mg ingredient β -glukan per porsi. Khamir β -glukan diproduksi sesuai dengan *cGMP*, sangat stabil di bawah kondisi penyimpanan yang sesuai, dan produk akhir memenuhi spesifikasi food grade sesuai. Ingredien *Biothera*- β -Glukan adalah komponen karbohidrat dinding sel khamir yang tidak larut dalam air. Manusia tidak dapat mencerna polimer karbohidrat yang memiliki cabang beta-glikosida, dan karena itu penyerapan oleh epitel usus dan paparan sistemik glukan tidak akan terjadi (Freimund et al., 2003). Namun demikian paparan terjadi pada pemberian secara oral. Degradasi oksidatif dari partikel glukan kemudian terjadi selang beberapa hari. Hal ini berbeda dengan paparan β -glukan khamir melalui intraperitoneal atau jalur intravena, yang menghasilkan akumulasi yang signifikan dari karbohidrat dalam organ-organ sistem retikuloendotelial.

S. cerevisiae dapat dengan mudah dan cepat tumbuh di beragam media kultur pada biaya produksi rendah dan seluruh genomnya sudah diketahui. β -glukan dari *S. cerevisiae* memiliki berbagai properti yang lebih diterima dibanding yang ditemukan dari sumber-sumber lain (Dixit and Gandhi, 2006). Sebagai contoh, struktur rantai samping bercabang panjang β -glukan dari *S. cerevisiae* diketahui sebagai sumber meningkatkan kekebalan tubuh paling efektif dan dapat meningkatkan sifat fungsional dari beberapa produk makanan. Dengan demikian, *S. cerevisiae* sumber produksi β -glukan yang baik. Namun, efek penambahan senyawa additive untuk meningkatkan produksi β -glukan oleh sel *S.cerevisiae* belum ada informasinya. Contohnya,

Botryosphaeria rhodina dirangsang untuk menghasilkan β -glukan dengan penggunaan media emulsi, sementara induksi sintetase β -glukan dalam mushroom dicapai dengan mengkultur mushroom dalam limbah pabrik zaitun (Edwards-Ingram et al., 2007).

Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi morfologi dan komponen dari dinding sel selama proses pertumbuhan, yaitu meliputi jenis media kultur, sumber karbon, pH, suhu, tingkat aerasi dan kondisi pembiakannya. Produksi β -Glukan oleh *S. cerevisiae* dalam fermentor batch menjadi optimal bila ditumbuhkan dalam media *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) pH 4.0, dengan galaktosa sebagai sumber karbon, pada suhu 37°C dan kondisi aerasi yang baik $\rho_{O_2} > 50\%$ saturasi (Fleet, 1991) Selain itu, media *Congo-Red* langsung bisa menghambat sintesis β -glukan di protoplas. Studi tentang mekanisme enzimatik dan genetik yang terkait dengan sintesis b-glukan diketahui bahwa penambahan EDTA, fluoride dan GTP ke dalam media kultur merangsang aktivitas enzim sintase β -1,3-glukan dalam *S.cerevisiae*. Beberapa laporan menyatakan bahwa NaCl bisa merangsang aktivitas enzim *phosphoglucomutase* (PGM2) dan enzim *uridin difosfoglukosa pyrophosphorylase* (UGPase), yaitu enzim terlibat dalam sintesis UDP-glukosa dan akumulasi trehalosa. Selain meningkatkan kadar garam juga meningkatkan translasi gen ACT1 (aktin biosintesis), tetapi juga merangsang penggantian trehalosa omset. Studi lain, SDS 0,003% b/v, 3 mg/l higromisin B dan 3 μ g/mL β -1,6-glukan dan toksin pembunuh K1 dilaporkan meningkatkan β -1,6-glukan dan total -glukan jika digunakan sebagai aditif selama pertumbuhan *S.cerevisiae* pada agar YPD. Selain itu, SDS 0,02% w/v merangsang gen terjemahan-FKS1 dan pembentukan aktin sitoskeleton. Dengan demikian, jelas bahwa zat aditif penyebab kondisi stress dapat merangsang aktivitas enzim sintase β -1,3-glukan di dalam khamir. Konsekuensinya, produksi b-glukan dapat diangsang melalui mekanisme penggunaan zat aditif untuk stimulasi kondisi stress. Namun demikian mekanisme penggunaan zat aditif untuk meningkatkan produksi b-glukan belum ada informasinya. Pengaruh aditif EDTA, SDS dan NaCL untuk meningkatkan aktivitas enzim sintase b-1,3-glukan terhadap pertumbuhan *S.cerevisiae*, morfologi sel dan peningkatan produksi b-1,3-glukan diketahui bahwa penambahan SDS di dalam medium merupakan metode sederhana untuk meningkatkan produksi b-glukan selama pertumbuhan *S.cerevisiae*.

Data menunjukkan bahwa penambahan SDS 100 µg/mL menghasilkan sel elongation paling rendah (0,84 µm bentuk bulat), jumlah scar tunas paling tinggi dan kandungan b-glukan 8,16% yaitu 1,4 kali lebih tinggi dari kontrol. Khamir yang digunakan dalam penelitian ini meliputi khamir komersial *S. cerevisiae* Fermipan[□] and *S. cerevisiae* Angel[□], dan kultur *S. cerevisiae* TISTR 5059. Semua khamir ditumbuhkan dalam medium YPD pada pH 4,0 pada suhu 30°C selama 48 jam dalam waterbath shaker 200 rpm. Sel khamir dipanen dengan sentrifugasi pada 8000 x g selama 10 menit, selanjutnya pellet dikumpulkan dan di beku-keringkan sebelum analisis b-glukan. Analisis b-glukan menggunakan *Yeast b-Glukan Assay Kit* (Megazyme, Ireland) dan menentukan presentase berat kering sel khamir (Kotowska et al., 2005). Laju pertumbuhan khamir dan corresponding model pertumbuhan kemudian di duga diestimasi menggunakan regresi non-linier. Kurva pertumbuhan sigmoida dapat diterangkan dengan persamaan log shifted (*shiefted logistic equation*) dibawah ini (Mongkontanawat et al., 2011):

$$\Delta y_{(t)} = \Delta y_{asym} \left\{ \frac{1}{1 + \exp \left[k \left(t_c - t \right) \right]} - \frac{1}{1 + \exp \left[k t_c \right]} \right\}$$

Dimana: merupakan rasio log $N(t)/N_0$ pada waktu (t), merupakan rasio log $N(t)/N_0$, yang merupakan pertumbuhan pada fase stasioner, t_c waktu untuk mencapai laju pertumbuhan paling tinggi. yaitu titik dimana infleksi kura sigmoidal, dan k adalah slope, titik yang merupakan laju pertumbuhan. Konsentrasi optimum dari beberapa kombinasi aditif yang digunakan selanjutnya di kalkulasikan dengan program komputer MATHEMATICA.

Penentuan rata-rata ukuran, sebagai panjang axis major dan minor, serta elongasi menggunakan *Confocal microscope in differential contrast* (DIC) mode pada 400 x pembesaran menggunakan kamera NIKON C1 Digital Eclipse, Japan. Pengukuran elongasi adalah perbedaan panjang axis major dan minor setiap sel tunggal, yang selanjutnya merupakan perubahan bentuk sel. Keseluruhan bentuk sel diamati menggunakan *SEM scanning elektron microscope JEOL, model JSM-5410LV, Japan, pada perbesaran 5,000 x* untuk melihat perubahan bentuk sel dan 20,000 x untuk melihat permukaan dinding sel. Produksi b-glukan oleh ketiga khamir selama pertumbuhan disajikan pada Tabel 3.2. Produksi b-glukan paling tinggi dihasilkan

oleh *S.cerevisiae* Angel dan terendah diproduksi oleh *S.cerevisiae* Fermipan (Mongkontanawat et al., 2011).

Tabel 3.2. Produksi b--glukan sebagai berat kering pada *S.cerevisiae*

Strain	b-glukan (% w/w sel)	Yield (% berat kering sel)
<i>S. cerevisiae</i> Fermipan	7.10 ± 1.55 ^b	0.43 ± 0.13
<i>S. cerevisiae</i> Angel	8.95 ± 0.66 ^a	0.35 ± 0.05
<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5059	8.54 ± 1.15 ^a	0.14 ± 0.03

Keterangan: Data ditampilkan sebagai mean ± satu SD dan berasal dari tiga ulangan. ** Berarti dalam kolom diikuti oleh huruf yang berbeda adalah berbeda secara signifikan ($\rho < 0,05$) (Mongkontanawat et al., 2011).

Isolasi

β -Glukan adalah biopolimer glukosa yang luas didistribusikan ke seluruh biosfer. Berbagai jenis β -glukan biasanya ditemukan dalam ragi roti dan bir, tetapi juga di beberapa jamur, kapang, ganggang dan di dedak gandum dan sereal. β -Glucans berasal dari berbagai sumber memiliki struktur yang sama, tetapi perbedaan-perbedaan struktur kecil berpengaruh pada aktivitas biologis nya. Lapisan terdalam dinding sel khamir dibangun dari β -glukan, protein, mannan dan sejumlah kecil kitin (Vetvicka, et al., 2002). Jadi, khamir, sebagai mikroorganisme terkenal yang digunakan dalam bioteknologi sejak zaman kuno, adalah sumber yang baik dari β -glukan. Struktur dan komposisi dari dinding sel khamir tergantung pada spesies dan galur serta pada kondisi tempat pertumbuhannya. Komponen β -glukan di dinding sel *Saccharomyces cerevisiae*, yang fungsinya menjaga kekakuan dan bentuk sel, adalah sering disebut sebagai glukan atau glukan hamir. Polisakarida terutama terdiri dari backbone utama D-glukosa terkait dalam posisi β -(1→3) dengan cabang samping glukosa (β -(1→6)-linkage) dengan berbagai ukuran, yang terjadi pada interval yang berbeda sepanjang backbone utama (Gardiner, 2000). *Triple heliks multimer* memberikan struktur dan dukungan untuk dinding sel khamir. Struktur asli β -glukan demikian juga aktivitas biologisnya bisa diubah selama isolasi jika prosedur yang ketat diterapkan. Struktur primer, kelarutan, derajat percabangan dan berat molekul, serta muatan polimer mereka dan struktur dalam media air,

berperan terhadap aktivitas biologi β -glukan. Kelarutan β -glukan meningkat dengan menurunnya derajat percabangan, kation sehingga klasifikasi dari glukan dapat dibuat menurut sifat kelarutannya.

Selama proses purifikasi β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-glukan dari fraksi dinding sel baker yeast *S. cerevisiae*, komponen sel lain seperti protein, lipid, asam nukleat, mineral dan mannans dikeluarkan untuk sebagian besar (Lee et al., 2001). Ketidakmurnian proses dapat menyebabkan efek samping yang tidak diinginkan (protein yang menimbulkan alergi kadang-kadang dikatakan sebagai suatu kemungkinan, meskipun sangat jarang terjadi). Hal ini lebih penting bahwa ketidakmurnian dapat mengganggu pengenalan terhadap molekul aktif- β -glukan β -(1 \rightarrow 3), β -(1 \rightarrow 6), sehingga penghilangan senyawa pengganggu perlu dilakukan. Tergantung pada prosedur isolasi struktur asli β -glukan dapat terdegradasi, menghasilkan perubahan pada aktivitas biologisnya. Senyawa dinding sel khamir tidak larut air dikenakan pada perlakuan alkali dan asam dilanjutkan dengan sonikasi dan spray-drying partikel β -glukan. β -Glukan dari berbagai sumber memiliki perbedaan karakteristik dan akibatnya β -glukan banyak memiliki berbagai sifat, oleh karena itu immunopotentiality hanya merupakan salah satu dari sifat tersebut (Zeković et al., 2005). Glukan bercabang atau linear (1 \rightarrow 4) memiliki aktivitas yang terbatas dan β -glukan dengan konfigurasi 1,3 dengan tambahan rantai cabang pada posisi C-6 dari residu gugus 1 \rightarrow 3-D-glukosa memiliki aktivitas imunostimulan paling tinggi (Freimund et al., 2003). Sumber biologis alternatif untuk persiapan β -glukan adalah barley, gandum, jamur, alga dan bakteri, β -glukan ini memiliki struktur berbeda dan akibatnya efek biologinya juga berbeda. Komersial β -(1 \rightarrow 3)-glucans, diisolasi dari bakteri atau ganggang, tidak memiliki poli-percabangan.

Mekanisme aktivitas biologis β -glukan belum sepenuhnya dijelaskan. Terdapat berbagai pendapat dimana struktur molekul dapat menjelaskan efek fisiologis β -glukan (Tokunaka et al., 2000). Beberapa faktor fisikokimia (struktur primer, konformasi, muatan polimer, kelarutan, dimensi partikel) sangat penting untuk aktivitas biologi β -glukan (Tzianabos, 2000). Struktur esensial atau biologis dari β -glukan belum pernah dijelaskan secara rinci, tetapi beberapa penulis menganggap bahwa triple helix merupakan konformasi yang paling aktif (Hromádková et al., 2003), sedangkan penulis lain mengklaim bahwa struktur heliks tidak memiliki pengaruh pada

aktivitas β -glukan sama sekali (Ha et al., 2002). Meskipun beberapa β -glukan kehilangan aktivitas biologisnya selama proses isolasi karena prosedur yang ketat namun β -glukan masih bisa memiliki manfaat lain yang berguna untuk aplikasi non-medis.

Efek β -Glukan Dalam Meningkatkan System Imun

β -Glukan adalah polisakarida glukosa yang dapat diproduksi oleh organism prokariotik dan eukariotik (Petraovic-Tominac et al., 2010). β -Glukan mempunyai banyak manfaat yang menguntungkan dan oleh karena itu beta glukan banyak dimanfaatkan sebagai obat manusia dan hewan, farmasi, kosmetik dan industri kimia demikian juga pangan dan pakan. β -Glukan mengaktifkan respon imunitas melalui sel imun, disebut *macrophage*, menunjukkan bahwa beta glukan mempunyai pengaruh terapeutik. β -glukan senyawa yang aman dan sangat potensial sebagai modifier respon biologi (BRM/biological response modifier). β -Glukan bermanfaat dalam melawan bakteri, virus, parasit, dan kapang. Immunomodulasi oleh β -glukan diyakinkan dengan kedua uji in vivo dan vitro pada sejumlah manusia dan hewan uji meliputi penyakit tumor, kanker payudara, paru, dan saluran pencernaan. Sifat β -Glukan sebagai imunomodulasi dan kankerostatik menyebabkan senyawa ini berpotensi untuk melawan kanker dalam jangka panjang. Pada waktu yang sama hanya beberapa jenis obat yang memiliki manfaat serupa dengan β -Glukan. Di Jepang, β -Glukan digunakan sebagai imunostimulan alami untuk pengobatan kanker sejak 1980. β -Glukan juga efektif melawan tumor *allogeneic*, *syngeneic*, dan bahkan *autochthonous*. β -Glukan juga memiliki fungsi antioksidan yang sudah dibuktikan mempunyai aktivitas menyembuhkan luka. β -Glukan yang larut dalam air dan yang tidak larut dalam air (particulate) memiliki dapat diaplikasikan di dalam bidang medis. Pemberian secara oral sediaan mikropartikel cocok untuk consumer dan efektivitas penggunaan secara oral telah terbukti. β -Glukan yang ditelan melalui lambung sesungguhnya tidak berubah, karena beta glukan tahan asam. Selanjutnya, usus tidak mempunyai enzim untuk merombak β -glukan menjadi molekul molekul yang dapat diabsorpsi melalui dinding usus. Terdapat reseptor selular dan protein pengikat plasma (plasma binding protein) di dalam tubuh manusia yang specific untuk β -glukan. Aktivitas reseptor glukan teridentifikasi pada ke dua sel imun dan

sel non-imun, meliputi monosit, macrophage, neutrofil, dan sel *Langerhans*, eosinofil, sel natural Killer (*NK cell*), sel endothelium, sel epetelium alveolar, dan fibroblast (Brown dan Gordon, 2005). Diketahui bahwa (1,3)- β -glukanoheptasaccharide merupakan fragmen sel paling kecil yang dapat diikat pada reseptor beta-glukan, seperti, dectin-1, CR3 complement receptor, glukan receptor on neutrofil. Kebanyakan b-glukan adalah tidak larut dalam air sehingga penggunaannya pada manusia sangat terbatas. Ketika diinjeksikan, sediaan mikroparticulate menyebabkan pembentukan granuloma, inflamasi, ngilu. Sediaan β -glukan larut dalam air yang dibuat dari derivatisasi kimia, akan mempunyai manfaat yang mudah diaplikasikan secara intravena. Panjang molekul β -glukan dapat selanjutnya dimodifikasi menggunakan enzim atau perlakuan ultrasonic.

Telah diketahui bahwa aktivitas biologis yang paling penting dari β -glukan adalah kemampuannya untuk merangsang sistem kekebalan tubuh (Gardiner, 2007). Sistem kekebalan tubuh adalah luar biasa kompleks pada manusia dan dirancang untuk melindungi kita dari serangan pathogen mikroba atau pengaruh berbahaya dari racun lingkungan dan karsinogen yang dapat menyebabkan kerusakan atau penyakit. Sistem kekebalan tubuh adalah pertahanan alam primer terhadap penyakit dan bahkan penuaan. Tetapi, glukan tidak disintesis oleh tubuh manusia oleh karena itu glukan perlu dikenali oleh sistem kekebalan tubuh, merangsang kekebalan tubuh tanggapan. Studi *In vitro* dan *in vivo* pada hewan dan manusia menunjukkan bahwa beta-glukan yang berasal dari jamur dan khamir memiliki imunomodulasi properti. Paling sering dievaluasi efeknya terhadap aktivitas leukosit. Respon imun dipengaruhi oleh parenteral dan pemberian enteral β -glukan (Volman et al., 2008). Nilai gizi β -Glukan gizi mendorong regenerasi system kekebalan tubuh. Beberapa publikasi menyatakan bahwa β -glukan adalah bahan bakar untuk sistem kekebalan tubuh agar lebih aktif, lebih cepat, lebih baik, lebih tanggap terhadap response. Untuk tujuan tersebut maka β -glukan khamir yang tidak larut air, dengan partikel 1-2 μ perlu digunakan.

Aktivitas immunoregulatory β -glukan terutama berkaitan dengan kemampuannya untuk merangsang atau menghambat pelepasan makrofag sitokin yang terlibat dalam kontrol sistem kekebalan tubuh atau untuk memodulasi fagositosis makrofag (Vetvicka et al., 2007). Dalam studi

vivo pada hewan menunjukkan bahwa pemerian secara oral β -glukan mengaktifkan sel darah putih, seperti makrofag, granulosit dan monosit, bertanggung jawab terhadap pertahanan terhadap infeksi, dan mendukung perbaikan jaringan yang rusak dari dalam tubuh. Dalam hal ini maka β -glukan khamir dengan (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6)- *linkage-glycosidic* menunjukkan aktivitas imunomodulator yang sangat kuat mempengaruhi respon imun dari inang dan sering digambarkan sebagai pengubah respon biologis (*biological respond modifier*).

Semua sel yang terlibat dalam reaksi imun berasal dari prekursor umum yaitu sel induk yang berasal dari sumsum tulang. Jadi, β -glukan merangsang produksi sel prekursor di sumsum tulang, akibatnya di dalam aliran darah terdapat imunosit baru yang mengalir ke berbagai organ limfoid di seluruh tubuh. Meningkatnya jumlah imunosit dalam peredaran berarti meningkatkan perlindungan dari gangguan yang potensial. Hal ini penting terutama dalam kasus stres yang ekstrim (misalnya dalam kasus kanker), ketika sistem kekebalan tubuh habis oleh terapi seperti iradiasi dan kemoterapi. β -Glukan tidak menunjukkan kerusakan *genotoksik* dan atau *clastogenic*, sehingga menjadi sangat penting membantu dalam kemoterapi, disamping itu juga memiliki fungsi untuk mengurangi efek samping obat (Oliveira et al., 2006).

Aplikasi medis β -Glukan

β -Glukan, yang berasal dari khamir, bisa memiliki banyak aplikasi di dalam menyembuhkan pasien dengan meningkatkan sistem kekebalan tubuh mereka. Di antara sifat yang paling menarik dari β -glukan adalah aktivitasnya melawan berbagai jenis kanker dan penyakit menular. β -Glukan bisa juga mencegah pengaruh negatif paparan radiasi, syok septik, rhinitis alergi, kolesterol darah tinggi dan asam lemak dan membantu dalam penyembuhan luka, arthritis dll.

Sel-sel kanker memiliki mekanisme untuk menyerang pertahanan tubuh dan membuat pertahanan tubuh ini sulit untuk menghancurkan. Sel-sel ini telah mengubah karakteristik normalnya dan terus-menerus menyerang tubuh dalam upaya baik mengatasi sistem kekebalan tubuh yang setelah beberapa waktu menjadi lemah, atau menghindar dari sistem pengenalan, dan selanjutnya penghancuran oleh mekanisme pertahanan

alami. Sel Kanker mengalahkan sel-sel kekebalan tubuh, termasuk makrofag, darah putih sel, sel dendritik dan sel NK. β -Glukan memiliki pengaruh pada sel NK dan makrofag, yang merupakan garis pertama pertahanan dan melindungi tubuh terhadap setiap jenis yang menyerang sel - termasuk sel-sel kanker. Sel NK merupakan subtipe khusus limfosit "bloodthirsty/haus darah", dengan fungsi untuk spesifik mengenali dan membunuh sel-sel tumor. Dalam tubuh yang sehat, sel pertahanan ini berhasil mengelola perlawanan terhadap invasi sel patogen dan sel-sel tumor. Namun demikian, banyak faktor, seperti stres, alergi, polutan dan usia, memiliki efek negatif pada daya kekuatan pertahanan alami ini (Ross et al., 1999). Dalam kondisi normal, Sistem kekebalan tubuh mampu mengatasi invasi sel kanker, tetapi pada kondisi ekstrim, kekebalan tubuh tidak mampu. beberapa faktor ketidak nyamanan seperti faktor fisik dan mental stres, UV-radiasi dan diet yang tidak seimbang dapat mengganggu fungsi kekebalan tubuh. Jadi, ketika sistem kekebalan tubuh terganggu, imunomodulator, seperti β -(1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6)-glukan dapat mengimbangi faktor ketidak nyamanan tersebut, dan membantu sel-sel kekebalan tubuh. β -Glukan mengikat permukaan makrofag dan sel NK, berinteraksi dengan permukaan molekul, dan dengan cara ini β -Glukan memicu proses aktivasi. Akibatnya, proses-proses tersebut mengaktifkan sel killer di dalam tubuh, menyusuri dan mencari sel target dan menghancurkannya (Volman et al., 2008).

Banyak studi tentang kemampuan β -glukan yang bermanfaat dalam fungsi kekebalan tubuh dan upaya tubuh untuk melindungi diri dari penyakit. Percobaan praklinis telah menunjukkan bahwa produk β -glukan khamir komersiil yang larut air, yang berasal dari dinding sel *Saccharomyces cerevisiae*, di kombinasi dengan monoklonal antibodi tertentu atau vaksin kanker, meningkatkan kelangsungan hidup jangka panjang yang lebih baik dari pada antibodi monoklonal sendiri (Ross et al., 1999).

Glukan lain yaitu β -(1 \rightarrow 6) bercabang β -(1 \rightarrow 3)-glukan diperoleh dari purifikasi dinding sel *S. cerevisiae* (Hong et al., 2003). Aktivitas antitumor disebabkan oleh mekanisme pembunuhan yang melibatkan neutrofil yang di *primed* dengan sediaan β -glukan dan yang biasanya tidak terlibat dalam memerangi tumor. Ketika neutrofil mengikat sel-sel tumor, sediaan β -glukan membiarkan neutrofil untuk mengenali kanker, sebagai khamir patogen dan cara tersebut memiliki sistem yang mematikan. Kenyataannya, β -glukan

bergabung dengan neutrofil dalam melawan sel tumor, meningkatkan sinergis efektivitas antibodi monoklonal dan vaksin melalui mekanisme killing yang berbeda. β -glukan meningkatkan pengaruh semua *complement-activating monoclonal antibodies* yang diujikan, termasuk kanker payudara, hati dan kanker paru-paru. Komplek complement-antibodi membunuh sel tumor.

Pencegahan Infeksi

Salah satu aktivitas biologis yang paling penting dari β -glukan adalah pencegahan infeksi bakteri. Aktivitas ini dapat meningkatkan resistensi terhadap patogen secara umum dan mengurangi risiko infeksi. Sejumlah penelitian dan uji klinis telah membuktikan bahwa β -glukan larut dalam air meningkatkan ketahanan terhadap infeksi bakteri (Dellinger et al., 1999). Pemberian secara oral khamir β -glukan tidak larut air sejumlah (2-20 mg/kg) memberikan perlindungan maksimal pada antrax pada tikus, tanpa menggunakan antibiotik (Vetvicka et al., 2002). β -(1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6)-glukan meningkatkan resistensi terhadap banyak penyakit yang meningkatkan aktivitas antiinfeksi leukosit dalam seluruh darah manusia, tanpa meningkatkan produksi sitokin inflamasi (Wakshull et al., 1999). Ekstrak β -glukan *S. cerevisiae* terbukti memiliki aktivitas antimikroba pada tikus, terhadap *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap antibiotik. Pemberian β -glukan membantu eliminasi bakteri dan meningkatkan jumlah monosit dan neutrofil. Percobaan In vitro pada tikus meningkatkan aktivitas maksimal β -glukan dan antibiotik melawan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Ini adalah contoh sinergisme dari β -glukan dan antibiotik.

Menurunkan Kolesterol Darah

Khamir β -glukan adalah umumnya diakui sebagai aman (*generally recognized as safe/GRAS*) produk yang dapat digunakan sebagai aditif makanan. Selain itu, β -glukan dari berbagai sumber memiliki sifat yang efektif menurunkan kolesterol dan lipid darah (Mason, 2001). Diketahui bahwa β -glukan adalah aman, powerful dan memiliki cara murah untuk menurunkan kolesterol darah dan tingkat lipid yang tinggi. Penurunan lipid darah dan kolesterol total dan LDL adalah cara terbaik untuk mencegah tekanan darah tinggi dan arteriosclerosis. Sediaan β -glukan alami seperti

susu oat, barley atau sediaan khamir β -glukan yang ditambahkan ke minuman jus dapat digunakan sebagai pengganti obat yang mahal dengan berbahaya efek samping.

Penyembuh Luka

Diketahui bahwa aktivitas makrofag berperan utama dalam penyembuhan luka, dari pembedahan atau trauma. Ada banyak studi klinis menggunakan khamir β -glukan larut air dan seluruh partikel glukan. Dalam studi baik hewan maupun manusia, terapi dengan β -glukan menunjukkan perbaikan, seperti mengurangi kematian, menurunkan infeksi, dan penguatan daya lentur jaringan dari bekas luka jaringan (Brown and Gordon, 2005). Berdasarkan hasil tersebut peneliti menyimpulkan bahwa imunomodulator yang meningkatkan aktivitas makrofag memiliki efek positif pada biosintesis kolagen di jaringan luka dalam percobaan menggunakan model hewan dan manusia.

Aplikasi β -Glukan Non-Medis

Kosmetika

Beberapa dekade terakhir beta-glukan diperkenalkan di beberapa aplikasi nonclinical sebagai pencegahan penuaan dan agensia retensi kelembaban dalam kosmetik. β -Glukan dapat diaplikasi dalam produksi kosmetik, krim dan lotion untuk kulit sensitif dan kulit yang teriritasi (Wheatcroft et al., 2002). Sediaan β -glukan yang diisolasi dari oat, yang mengandung β -glukan, dapat digunakan untuk iritasi kulit oleh penyebab yang berbeda. Karakteristik β -glukan dapat menghidrasi kulit cepat, melembutkan kulit yang kasar dan mengalami iritasi (Pillai et al., 2005). Salah satu solusi untuk menjaga kulit dalam kesehatan adalah suplementasi dengan senyawa biologis aktif. Aplikasi β -glukan dalam kosmetik adalah salah satu kegunaan berpotensi menguntungkan. β -Glukan sangat aktif untuk meningkatkan dan mencegah penyakit kulit atau iritasi, sehingga β -Glucans biasanya digunakan karena aktivitasnya menjaga kelembaban kulit, pencegahan penuaan dan pemulihan luka kulit. Selain itu, mereka memiliki efek antioksidan, dan kelating radikal bebas. Beberapa peneliti mengungkapkan bahwa β -glukan mempunyai sifat mendorong regenerasi rambut dan pertumbuhan rambut dengan cara aktivasi folike rambut.

Dalam kebanyakan formula kulit, β -glukan digunakan untuk retensi kelembaban dan memberikan kelembaban dalam formula yang tepat. β -glukan juga digunakan sebagai penstabil dalam emulsi kosmetik atau formulasi produk gel untuk memperoleh tekstur yang disukai. Efek yang menarik dari aplikasi topikal dari β -glukan yang diamati pada kulit tidak-terluka dengan beberapa tanda-tanda penuaan. Revitalisasi, seperti mengurangi jumlah, kedalaman dan panjang keriput, serta penebalan dan mengurangi kekasaran, dan kekeringan pada kulit, telah dibuktikan oleh studi dalam kelompok relawan perempuan. β -Glukan juga memiliki efek sinergis dengan agensia antiageing topikal lainnya. Aplikasi dari β -glukan bisa menjadi alternative lain untuk pengobatan lebih invasive untuk pengurangan kerut.

Keistimewaan β -Glukan mampu mengaktivasi epidermis dari sel makrofag (*Langerhans sel*) dan efek mengkelat/*scavenging* radikal bebas, maka β -glukan bisa diterapkan sebagai agensia *photoprotective* dalam tabir surya. Aplikasi β -glukan mengakibatkan pengurangan eritema akibat imbas sinar UV, dan menjaga jumlah sel *Langerhans* di epidermis sebagai imbas UV. Produk tabir surya komersial mencegah luka bakar, tetapi produk ini tidak dapat menjamin pencegahan terhadap beberapa kanker kulit, termasuk melanoma. Sinar UV menyebabkan hilangnya sel *Langerhans* dan bahkan ketika kulit sudah berwarna kecokelatan. Dengan demikian, fungsi imunologi produk akan berkurang. Suatu kombinasi antara tabir surya dan glukan sangat dianjurkan, karena glukan yang ditambahkan dalam produk tabir surya membantu dalam menjaga sel *Langerhans*. Kemungkinan aplikasi β -glukan dalam tabir surya juga disebutkan oleh Wheatcroft et al. (2002).

Dalam Produk Pangan

Aplikasi dari β -glukan yang berasal dari *brewer's yeast* digunakan sebagai pengganti lemak pada mayones (Worrasinchai, 2004). Lemak sebagian digantikan oleh β -glukan pada tingkat 25, 50, dan 75%. Mayones dengan lemak total/full fat (FF) (100% minyak) tanpa substitusi β -glukan digunakan sebagai eksperimen kontrol. Analisis fisikokimia, rheologi, mikrobiologi, dan evaluasi sensorik dari mayones dengan FF dan mayones rendah lemak/reduced fat (RF) yang dilakukan menghasilkan bahwa semua mayones RF mengandung energi dan lemak secara signifikan lebih rendah tetapi kadar

air yang lebih tinggi daripada mayones FF. Perbedaan ini meningkat dengan meningkatnya tingkat substitusi β -glukan. Berkenaan dengan pH, tidak ada perbedaan yang signifikan antara FF dan RF mayonnaises setelah satu hari penyimpanan. Namun, nilai pH mayones RF menurun dengan meningkatnya substitusi β -glukan setelah penyimpanan 2 bulan. Dalam hal tekstur, 50 dan 75% substitusi beta-glukan menunjukkan nilai firmnes dan kerekatan yang tidak berbeda dari sampel FF. Analisis mikrostruktur mayones dengan 100% minyak (FF) dan 25% substitusi beta-glukan menunjukkan struktur droplet berukuran besar dan kompak sedangkan mayones dengan 50 dan 75% substitusi beta-glukan menunjukkan struktur longgar dengan droplet berukuran kecil. Evaluasi sensorik menunjukkan bahwa mayonnaises substitusi dengan β -glukan tidak lebih dari 50% yang dapat diterima. Hal ini menunjukkan potensi β -glukan brewer's yeast bisa digunakan sebagai pengganti lemak replacer pada mayones.

Latihan

1. Apakah struktur dinding sel khamir mempunyai fungsi yang sama? Jelaskan pendapat kalian.
2. Mengapa dinding sel khamir dapat memberikan manfaat bagi manusia?

DAFTAR PUSTAKA

- Adams DJ. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150: 2029–2035.
- Aa Ku'hle, A., Skovgaard, K. and Jespersen, L. 2005. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int J Food Microbiol* 101, 29–39.
- Araujo E A, Carvalho AF, Eleana SL, Furtado MM, Moraes CA. 2009. Production of cottage-like symbiotic cheese and study of probiotic cells survival when exposed to different stress levels. *Pesqui. Agropecu. Tropical* 39(2): 111-118.
- Brown G. D., Gordon S. (2005). Immune recognition of fungal β -glucans. *Cell Microbiol* 7: 471-479

- Cox.Donald J 2008. Yeast Beta-Glucan Gras Notice. Biothera, Inc. January 11.
- Dellinger E. P., Babineau T. J., Bleicher P., Kaiser A. B., Seibert G. B., Postier R. G., Vogel, J. Norman S. B., Kaufman D., Galandiuk S., Condon R. E. 1999. Effect of PGG-glucan on the rate of serious postoperative infection or death observed after high-risk gastrointestinal operations. *Arch Surg* 134: 977-983
- Fietto JLR, Araujo RS, Valadao FN. 2004. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. *Can J Microbiol.*, 50: 615-21.
- Freimund S., Sauter M., Kapelli O., Dutler H. 2003. A new nondegrading isolation process for 1,3- β -glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydr Polym* 54:159-171.
- Fleet GH, and Manners DJ. 1976. Isolation and composition of an alkali-soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* 94: 180-192.
- Gardiner T. 2000. β -glucan biological activities: A review, *Glycoscience and Nutrition*, 1, 1- 6.
- Ha CH, Lim KH, Kim YT, Lim ST, Kim CW. 2002. Analysis of alkali-soluble glucan produced by *Saccharomyces cerevisiae* wild type and mutants. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 58:370-377.
- Hennequin C, Thierry A, Richard GF. 2002. Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J Clin Microbiol*, 39: 551-9.
- Hong F, Yan J, Baran JT, Allendorf DJ, Hansen RD, Ostroff GR, Xing PX, Cheung N.-KV, Ross GD. 2004. Mechanism by which orally administered β -1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *J Immunol* 173: 797-806.
- Hromádková Z, Ebringerová A, Sasinková V, Šandulá J, Hříbalová V, Omelková J. (2003). Influence of the drying method on the physical properties and immunomodulatory activity of the particulate

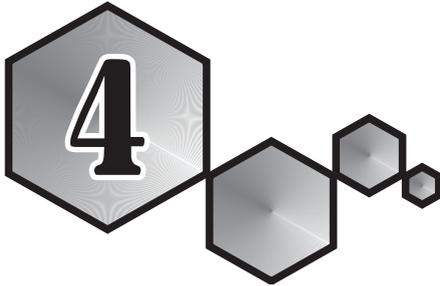
- (1→3)- β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydr Polym* 51: 9-15.
- Jonkers D, Penders J, Masclee A, Pierik M. 2012. Probiotics in the management of inflammatory bowel disease. *Drugs* 72(6):803–823
- Kelesidis T, Pothoulakis C. 2012. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Ther Adv Gastroenterol* 5(2):111–125. doi:10.1177/1756283X11428502
- Klis FM, Boorsma A, and De Groot PWJ. 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 23: 185–202. Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/yea.1349.
- Kuo SM. 2013. The interplay between fiber and the intestinal microbiome in the inflammatory response. *Adv Nutr: Intern Rev J* 4(1):16–28. doi:10.3945/an.112.003046.
- Kurtzman&Fell 2006;
- Lee SK, Kim HJ, Chi SG. 2001. *Saccharomyces boulardii* activates expression of peroxisome proliferators-activatedreceptor-gamma in HT29 cells. *Korean J Gastroenterol* 2005; 45: 328–324.
- Lipke, PN, and R.Ovalle. 1998. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges, *J. of Bacteriology*, *J. Bacteriol.* 180(15):3735-3740.
- McCullough MJ, Clemons KV, McCusker JH, Stevens DA. Species identification and virulence attributes of *Saccharomyces boulardii* (nom. inval.). *Journal of Clinical Microbiology*. 1998;36(9):2613-7.
- MacFarland dan Bernasconi, 1996. *Saccharomyces boulardii* is not *Saccharomyces cerevisiae*. *Clin.Infect Dis* 1996; 22: 200–1.
- Marcin Łukaszewicz, 2012. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* – Probiotic Yeast. <http://dx.doi.org/10.5772/50105>
- Marteau P, Minekus M, Havenaar R. and Huis In't Veld JHJ. 1997. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of stomach and small intestine: validation and the effect of bile. *J Dairy Sci* 80, 1031–1037.

- Mongkontanawat N, Sanguandeeikul R, Prakitchaiwattana C, Xiao H, McLandsborough LA, and Methacano P. 2011. Effect of three additives on the cell morphology and beta-glucan production in *Saccharomyces cerevisiae*, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2(4): 283-296, ISSN:0975-8585.
- Mason R. 2001. What is beta-glucan? In: Safe goods. New Century Publishing 2000, pp 4-36. Printed in USA: http://www.youngagain.org/book_what_is_beta_glucan.htm
- Oliveira RJ, Matuo R, Silva AF, Matiazi HJ, Mantovani MS, Ribeiro LR. 2006. Protective effect of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. *Toxicol In Vitro* 21: 41-52.
- Peleg, M. Advanced quantitative microbiology for foods and biosystems; Models for predicting growth and inactivation. Reference Publications, CRC Press, New York. USA, 2006, pp 151-160.
- PETRAVIC-TOMINAC Vlatka, Vesna ZECHNER-K R PAN, Slobodan GRBA, Siniša SRECEC, Ines PANJKOTA-KRBAVCIC, Lana VIDOVIC, 2010. Biological Effects of Yeast β -Glucans. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 75 (4):149-158.
- Pennacchia C, Ercolini D, Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G. and Villani F. 2004. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics, *Meat Sci* 67, 309-317.
- Pereira AP, Mendes-Ferreira A, Oliveira JM, Estevinho LM, Mendes-Faia A. 2013. High-cell-density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for the optimisation of mead production. *Food Microbiology* 33:114-123.
- Pillai R., Redmond M., J. Röding J. 2005. Anti-wrinkle therapy: significant new findings in the non-invasive cosmetic treatment of skin wrinkles with β -glucan. *IFSCC Magazine* 8: 17-21.
- Ramirez CNL. 2009. Identification of thermotolerant lactic bacterias isolated from cooked meat products to be used as probiotics. *Rev. Iber. Tec. Dairy Foods*. 9(1): 81-88.

- Ross GD, Vetvicka V, Yan J, Xia Y, Vetvickova J. 1999. Therapeutic intervention with complement and β -glucan in cancer. *Immunopharmacology* 42: 61-74.
- Salyers AA, Gupta A, Wang Y. 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol*, 12: 412-6.
- Tomioka H, Tomioka K, Sato K. and Saito H. 1992. The protective activity of immunostimulants against *Listeria monocytogenes* infection in mice. *J Med Microbiol* 36, 112-116.
- Tokunaka K, Ohno N, Adachi Y, Yadomae T. 2000. Immunopharmacological and immunotoxicological activities of a water soluble β -(1 \rightarrow 3)-glucan, CSBG from *Candida* spp. *Int J Immunopharmacol* 22: 383-394.
- Tzianabos AO. 2000. Review-Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clin Microbiol Rev* 13: 523-533.
- Vetvicka V, Vetvickova J. 2007. An evaluation of the immunological activities of commercially available β -1,3glucans. *JANA* 10:25-31
- Vetvicka V, Terayama K, Mandeville R, Brousseau P, Kournikakis B, Ostroff G. 2002. Pilot study: Orally-administered yeast β -1,3-glucan prophylactically protects against antrax infection and cancer in mice. *JANA* 5: 1-6
- Volman JJ, Ramakers JD, Plat J. 2008. Dietary modulation of immune function by β -glucans. *Physiology and Behavior* 94:276-284
- Wheatcroft R, Kulandai J, Gilbert RW, Sime KJ, Smith CG, Langeris WH. 2002. Production of β -glucan-mannan preparations by autolysis of cells under certain pH, temperature and time conditions. US Patent 6,444,448.
- Watson RR, Preedy VR., 2010. Bioactive foods in promoting health: probiotics and prebiotics. Academic Press
- Wakshull E, Brunke RD, Linderemuth J, Fisette L, Nathans RS, Crowley JJ, Tuft sJC, Zimmerman J, Mackin W, Adams DS. 1999. PGG-glucan, a soluble β -(1,3)-glucan, enhances the oxidative burst response, microbicidal activity and activates an NF-kappa B-like factor in

- human PMN:evidence for glycosphingolipid β -(1,3)-glucan receptor. *Immunopharmacology* 41: 89-107.
- Worrasinchai, S. 2004. Application of β -Glukan prepared from spent Brewer's Yeast as a fat replacer in mayonnaise, Thesis, Fac. of Grad. Studies, Mahidol Univ, 86 pp. ISBN 974-04-5065-2.
- Yadav V, Sharma L, Binny T, Moza AH (2012). An overview on nutraceuticals as pharmacological agents. *Adv. Biores.* 3(3): 113128.
- Zamora-Vega R, Montañez-Soto JL, Cruz LG, Martínez-Flores HE, Bernardino-Nicanor A. 2013. Development and characterization of a symbiotic cheese added with *Saccharomyces boulardii* and inulin. *African Journal of Microbiology Research*, 7(23): 2828-2834, DOI: 10.5897/AJMR2013.5566. ISSN 1996-0808. <http://www.academicjournals.org/AJMR>
- Zekovic DB, Kwiatkowski S, Vrvic MV, Jakovljevic D, Moran CA. 2005. Natural and modified (1-3)- β -D-glucans in health promotion and disease alleviation. *Crit Rev Biotechnol.*, 25:205-230

-oo0oo-



SACCHAROMYCES CEREVISIAE **DALAM MODIFIKASI TAPIOKA**

Tapioka (pati ubikayu) merupakan sumber pati potensial yang berasal dari ekstrak ubi kayu (*Manihot esculenta*). Tapioka tersusun dari dua makromolekul polisakarida amilosa (15-25%) dan amilopektin (75-85%), dan ke dua molekul tersebut tersimpan dalam butiran granula pati. Amilosa mempunyai polimer struktur lurus dengan ikatan α -(1,4)-D-glukosa dan amilopektin mempunyai polimer lurus α -(1,4)-D-glukosa dengan rantai cabang dengan ikatan α -(1,6)-D-glukosa. Dalam suatu molekul pati jumlah ikatan α -(1,6)-D-glukosa ini hanya sebanyak 4-5% dari berat total. Tapioka merupakan komponen karbohidrat yang dapat dimodifikasi lebih lanjut menghasilkan karakteristik fisiko kimia tertentu yang dapat dikembangkan untuk produk industry yang lebih luas. Pati termodifikasi adalah pati dimana gugus hidroksilnya telah diubah lewat suatu reaksi kimia seperti esterifikasi, eterifikasi atau oksidasi atau dengan mengganggu struktur awalnya dengan beberapa perlakuan dengan tujuan untuk meningkatkan gizi nilai, mengurangi toksisitas dan memperbaiki sifat fungsional serta memberikan karakteristik produk dan karakteristik flavour. Modifikasi tapioka dapat dilakukan dengan cara fisik, kimia dan biologi/fermentasi.

Fermentasi tapioka menggunakan starter kultur baik digunakan tunggal maupun dalam campuran oleh enzim hidrolitik yang disebut enzim amilolitik. Berbagai macam organism termasuk khamir sebagai produsen enzim amilolitik. Terdapat lebih dari 150 spesies khamir mampu mendegradasi pati, misalnya *Saccharomycopsis fibuligera* memproduksi

amylase yang sering dimanfaatkan dalam sakarifikasi zat pati dalam fermentasi produk pangan. Walaupun *S.fibuligera* produsen amylase terbaik namun khamir ini tergolong khamir penyebab penyakit bawaan makanan. *S.fibuligera* memproduksi dua jenis enzim amylase yaitu endo-acting- α -amylase, dan exo-acting glukamilase, sehingga mampu mendegradasi pati. Dalam Bab ini ulasan mengenai modifikasi tapioka dibatasi pada modifikasi tapioka melalui proses fermentasi menggunakan beberapa kultur starter. Setelah membaca Bab ini, diharapkan pembaca mampu memahami tentang tapioka dan proses modifikasi tapioka, mampu menjelaskan pengertian tapioka termodifikasi, dan mampu menganalisis dan menerapkan sesuai dengan keperluannya.

Sifat Fungsional Tapioka Alami

Tapioka memiliki karakteristik pasting tipe A yang dicirikan dengan viskositas puncak yang tinggi dan diikuti dengan pengenceran yang cepat selama pemanasan. Pati dengan karakteristik pasting tipe-A kurang aplikatif untuk diterapkan pada produk yang diolah menggunakan panas dan pengadukan, dan kandungan amilopektin yang tinggi 50-49-51% juga merupakan kendala dalam pemanfaatan tapioca secara meluas dalam berbagai industri. Kadar amilosa, lemak dan abu, kristalinitas dan perbedaan kapasitas pembengkakan mempengaruhi sifat pasting dan tekstur gel tapioka. Perbedaan varietas ubikayu menghasilkan tapioka dengan karakteristik fisiko-kimia, fungsional dan daya cerna yang berbeda (Tabel 4.1).

Sifat fungsional tapioka menentukan kegunaannya baik di dalam pengembangan industri pangan maupun beberapa industri non pangan. Salah satu cara untuk memprediksi sifat fungsional pati dan pengembangan aplikasinya dilihat dari sifat pasta patinya. Beberapa hasil analisis yang dapat mengindikasikan sifat sifat fungsional tapioka yaitu pembentukan reaksi warna dengan iodine, suhu gelatinisasi, daya serap air dan kelarutan dalam air. Pembentukan reaksi warna dengan iodine bertujuan untuk mengetahui karakteristik amilosa dan amilopektin, dan juga untuk menunjukkan panjang polimer glukosa dalam suatu molekul pati (Gambar 4.1). Adanya amilosa ditunjukkan oleh warna biru karena bereaksi dengan iodine, sementara warna merah keunguan menunjukkan adanya reaksi amilopektin dengan

iodin. Pembentukan warna oleh iodin dalam pati dapat menunjukkan panjang polimer molekul pati, warna merah keunguan sebagai indikasi semakin pendek rantai polimer pati. Gelatinisasi sebagai fase transisi granula pati dari bentuk teratur ke bentuk tidak beraturan, merupakan fenomena penting yang dialami oleh pati bila disuspensikan dalam air berlebih dengan aplikasi panas, maka granula akan kehilangan sifat kristalinitas dan birefringence, serta akan menyerap air dan membengkak. Pada suatu suhu dan lama tertentu granula akan menyerap air dalam jumlah besar sehingga terjadi granula pecah yang irreversible dan suspensi yang semula keruh menjadi jernih.

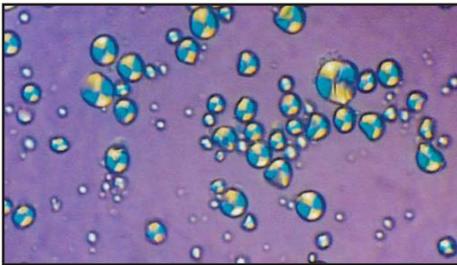
Tabel 4.1. Komposisi kimia (bk/100g) dan karakteristik fisiko kimia tapioka dari lima varietas ubi kayu di Lampung.

Parameter	Var Thailand	Kasetsar	Pucuk biru	Faroka	Adira 4
Air	14,22 ± 0,02	12,24 ± 0,01	15,69 ± 0,01	13,18 ± 0,09	13,63 ± 0,07
Abu	0,19 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,11 ± 0,00
Lemak	0,76 ± 0,00	0,33 ± 0,00	0,53 ± 0,01	0,51 ± 0,00	0,56 ± 0,01
Protein	0,13 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,1 ± 0,00
Pati	83,55 ± 0,16	82,62 ± 1,32	80,16 ± 1,09	79,78 ± 1,23	81,19 ± 1,77
Amilosa	33,1 ± 0,16	31,81 ± 0,04	30,88 ± 0,25	30,92 ± 0,12	31,13 ± 0,12
Amilopektin	50,42 ± 0,51	50,80 ± 1,28	49,28 ± 0,85	48,85 ± 1,35	50,0 ± 1,66
Kapasitas pembengkakan (g/g BK).	15,01 ± 0,02 ^c	10,35 ± 0,6 ^a	10,12 ± 0,4 ^a	10,92 ± 0,3 ^a	13,03 ± 0,3 ^b
Solubilitas (%)	10,9 ± 0,7 ^b	5,3 ± 0,8 ^a	4,89 ± 0,3 ^a	6,03 ± 0,1 ^a	13,2 ± 0,9 ^b
Viskositas					
Puncak (Cp)	6335,0 ± 25,4 ^b	6244,0 ± 1,1 ^b	6115,5 ± 3,1 ^{ab}	6744,0 ± 0,0 ^c	5895,5 ± 1,7 ^a
T pasting (°C)	67,3 ± 0 ^a	71,1 ± 0,2 ^b	70,5 ± 0,4 ^b	70,5 ± 0,0 ^b	71,1 ± 0,2 ^b
T puncak (°C)	79,2 ± 0,0 ^{ab}	79,4 ± 0,3 ^b	78,6 ± 0,3 ^{ab}	78,4 ± 0,0 ^a	79,0 ± 0,3 ^{ab}

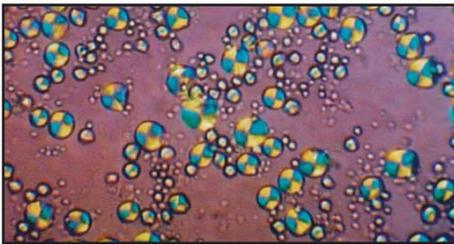
Sumber Syamsir et al. (2013).

Nah, suhu pada saat granula pecah tersebut disebut suhu gelatinisasi. Pati ubikayu mempunyai suhu gelatinisasi pada kisaran 52 - 64 °C, dimana suhu ini berkaitan dengan imbibisi air dan pembengkakan granula. Suhu gelatinisasi berkorelasi positif dengan tingkat kristalinitas dan berkorelasi negatif dengan kadar abu, lemak, protein dan amilosa, dimana pati dengan kristalinitas rendah memiliki suhu pasting rendah. Struktur amilopektin terutama proporsi dari rantai cabang amilopektin dengan derajat polimerisasi (DP) ≥ 37 berkontribusi pada pembentukan struktur kristalin

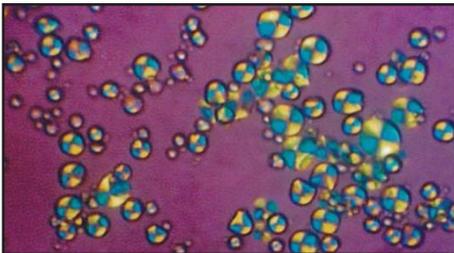
yang kuat karena adanya pembentukan dobel heliks dan mengakibatkan penghambatan pembengkakan granula. Pati dengan kandungan lemak, abu, dan amilosa yang tinggi memiliki suhu pasting rendah karena abu diduga menyumbangkan muatan ionik sejenis yang saling tolak menolak, meningkatkan jarak antar polimer pati dan memfasilitasi masuknya air dan akibatnya pasting berlangsung pada suhu yang lebih rendah. Daerah amorfous memiliki ikatan hidrogen yang relatif lemah sehingga mudah ditembus oleh air, dan tingkat kiralinitas rendah memiliki daerah amorfous yang tinggi.



- A. Reaksi iodin granula tapioka terfermentasi oleh *S. cerevisiae* selama 36 jam/32°C. Berwarna biru yang mengindikasikan mengandung amilosa.



- B. Reaksi iodin granula tapioka terfermentasi oleh *S. cerevisiae* selama 24jam/32°C berwarna merah keunguan yang mengindikasikan amilopektin



- C. Reaksi iodin granula tapioka terfermentasi oleh *S. cerevisiae* selama 12 jam/32°C berwarna biru keunguan yang mengindikasikan adanya rantai polimer amilosa yang terpotong.

Gambar 4.1. Profil reaksi iodin granula tapioka terfermentasi oleh *Saccharomyces cerevisiae*

Suhu gelatinisasi tergantung kekentalan larutan pati, makin kental makin lambat tercapai. Suhu gelatinisasi dapat berubah dan perubahan ini merupakan indikasi terjadi perubahan karakteristik pati. Misalnya suhu

gelatinisasi tapioka termodifikasi *Saccharomyces* (Tabel 4.4) lebih tinggi dari tapioka alami. Hal ini mengindikasikan adanya tingkat kristalinitas yang tinggi, kadar amilosa yang rendah dan amilopektin yang tinggi, kadar abu yang rendah, menyebabkan rendahnya ikatan hidrogen dan kontribusi ikatan ionik akibatnya memerlukan energi yang lebih tinggi untuk mengalami pasting. Peningkatan kandungan protein juga meningkatkan suhu pasting karena protein akan membentuk struktur yang kuat dalam granula pada pemanasan sehingga sulit ditembus oleh air. Suhu puncak pasting adalah suhu pada saat viskositas pasta maksimum tercapai. Suhu puncak dipengaruhi oleh kadar amilopektin dan komponen minor protein. Amilopektin membentuk struktur kristalin yang sulit ditembus oleh air sehingga peningkatan amilopektin mengakibatkan kenaikan suhu puncak. Kadar amilopektin tapioka termodifikasi *Saccharomyces* lebih tinggi dari tapioka alami dan demikian juga kadar proteinnya (Tabel 4.4). Protein yang mengembang saat pemanasan berkontribusi pada peningkatan viskositas dan mengakibatkan kenaikan suhu puncak. Suhu puncak pasting berkorelasi positif dengan kadar amilopektin (pada $r = 0,1$ dan $\alpha 0,0$) dan protein (pada $r = 0,82$ dan $\alpha 0,045$) (Syamsir et al., 2013). Viskositas puncak terjadi ketika jumlah pati yang membengkak seimbang dengan jumlah pati yang rusak atau lisis, dimana nilai viskositas merefleksikan kemampuan granula untuk mengikat air dan mempertahankan pembengkakan selama pemanasan. Oleh karena itu kadar dan ratio amilosa/amilopektin, berat molekul, derajat polimerisasi amilosa dan amilopektin serta jumlah percabangan amilopektin maupun keberadaan komponen minor juga ukuran granula mempengaruhi nilai viskositas puncak. Nilai Viskositas balik (VB-R) mengindikasikan potensi pembentukan gel dan kecenderungan retrogradasi. Tapioka Thailand lebih tahan terhadap proses pemanasan dibandingkan dengan empat tapioka lainnya yang ditunjukkan oleh nilai VBD-R yang lebih rendah (Tabel 4.1), dan nilai VB-R tapioka Thailand juga rendah mengindikasikan kecenderungan retrogradasi rendah. Pati dengan retrogradasi rendah berarti mempunyai kemampuan yang tinggi untuk mempertahankan tekstur selama penyimpanan. Nilai VBD-R dan VB-R berkorelasi negative dengan amilosa, SP, dan komponen minor abu dan lemak. Granula dengan SP yang tinggi mengikat sebagian besar air bebas dan menghambat interaksi antar amilosa, dan menghambat proses lisis amilosa yang keluar dari granula dan akibatnya viskositas dapat dipertahankan selama pemanasan. Pada

saat pendinginan, karena amilosa yang tersedia untuk proses retrogradasi menjadi lebih sedikit maka kecenderungan retrogradasi menjadi lebih rendah atau nilai VB-R rendah.

Viskositas breakdown merupakan salah satu faktor penting ketika pati diaplikasikan pada produk yang menunjukkan kestabilan pasta pati terhadap pemanasan. Semakin kecil nilai viskositas breakdown maka pati akan semakin stabil pada kondisi pemanasan. Penurunan nilai breakdown dan setback dari perlakuan mengindikasikan kestabilan pada pengadukan pada pasta pati termodifikasi. Penurunan viskositas puncak ini mengindikasikan bahwa granula pati termodifikasi memiliki daya mengembang dan daya penyerapan air yang lebih rendah. Hal ini dipengaruhi oleh struktur granula pati yang makin rigid akibat dari interaksi inter dan intramolekul granula yang semakin kuat dan rapat yang akan menghambat penetrasi air sehingga pembengkakan menjadi terbatas. Terdapatnya interaksi rantai amilosa-amilosa, dengan rantai amilosa-amilopektin yang terjadi selama proses HMT menyebabkan ikatan antar molekul menjadi semakin rapat dan air semakin sulit untuk berpenetrasi ke dalam granula. Sementara itu, penurunan viskositas puncak dipengaruhi oleh adanya ikatan amilosa lemak selama proses modifikasi yang dapat membatasi interaksi molekul pati dengan molekul lain di luar granula. Hal ini diduga terjadi karena pati suweg masih mengandung lemak dalam jumlah kecil.

Kekerasan gel pati berkaitan dengan proses retrogradasi yang terjadi selama proses pendinginan dan penyimpanan setelah pemanasan (setelah proses gelatinisasi). Sistem pasta pati dapat dianggap sebagai system dua fase yaitu fase terdispersi yang berupa granula yang membengkak, sedangkan amilosa yang lisis sebagai fase pendispersi. Jika jumlah pendispersi lebih tinggi, maka proses agregasi selama pendinginan menghasilkan gel yang kuat. Hal ini karena pada proses agregasi molekul amilosa bebas membentuk ikatan hydrogen baik dengan sesama amilosa maupun dengan percabangan amilopektin yang menjulur dari granula yang membengkak dan akibatnya amilopektin juga berperan dalam pembentukan kekerasan gel. Nilai Kekerasan gel tapioka termodifikasi *Saccharomyces* (Tabel 6) lebih tinggi dibanding tapioka alami, mengindikasikan telah terjadi pemotongan ikatan glikosida rantai panjang molekul polisakarida amilosa penyusun granula menjadi rantai yang lebih pendek sehingga terjadi peningkatan

fase pendispersi. Selama proses fermentasi kemungkinan terjadi hidrolisis polisakarida amilosa oleh enzim ekstraseluler *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan disakarida disakarida yang memiliki gugus OH lebih banyak dan pada saat pendinginan akan membentuk ikatan hydrogen dengan disakarida yang lain atau dengan komponen minor (protein) menghasilkan kekerasan. Kadar amilopektin yang tinggi juga memberikan sumbangan pada peningkatan kekerasan gel.

Daya serap air tepung atau kapasitas hidrasi tepung adalah persentase jumlah air yang dapat diserap tepung dalam bentuk adonan dengan air. Untuk menghitungnya perlu dilakukan sentrifugasi terhadap adonan pada 2000 rpm selama 5 menit. Sementara kelarutan tepung dalam air adalah banyaknya tepung dalam gram yang dapat larut dalam air per mililiter pelarut air. Sifat kelarutan merupakan indikasi panjang polimer molekul pati, rantai polimer mulekul pati pendek menghasilkan nilai kelarutan yang tinggi. Modifikasi pati pada umumnya berupaya meningkatkan kelarutan pati dengan memotong rantai polimer molekul pati atau sesuai produk yang diinginkan. Tapioka termodifikasi sesuai dengan sifat pastinya dapat diaplikasikan untuk berbagai produk pangan seperti disajikan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2. Pati termodifikasi dan aplikasinya untuk produk pangan sesuai dengan sifatnya.

Modifikasi pati	Sifat	Aplikasi
Pati pre-gelatinisasi	Larut dalam air dingin, bahan pengisi.	Sup instan, puding, saus campuran bakery, makanan beku.
Pati hidrolisis asam	Viskositas rendah, retrogradasi tinggi, gel kuat.	Confectionary, baking, perisa, rempah dan minyak.
Dekstrin	Stabilizer, perekat, pengeje, penjernih.	Formulasi pangan , gum.
Pati encer	Stabilizer	Sup, puding, makanan beku.
Pati ester	Stabilizer, bahan pengisi, penjernih.	Permen, emulsi.
Pati reaksi silang	Bahan pengisi, stabilizer, texturizer.	Pengisi pie, roti, makanan beku, bakery, puding, makanan instan, sup, salad dressing, saus.

Aktifitas *Saccharomyces cerevisiae* Dalam Fermentasi Tapioka

Khamir yang bersifat amilolitik dapat dimanfaatkan untuk memproduksi minuman dan makanan dengan karbohidrat rendah, disamping mampu memproduksi etanol dan biomass khamir dari zat pati. Khamir amilolitik mempunyai potensi penting sebagai penyumbang flavor yang dikehendaki dalam produk fermentasi yang menggunakan pati sebagai bahan utamanya, misalnya flavor yang dihasilkan pada fermentasi beras/nasi, fermentasi tape beras ketan, fermentasi tape ubi kayu. Beberapa spesies khamir mempunyai aktivitas enzim ekstraseluler disajikan pada Tabel 4.3 di bawah ini. *Saccharomyces cerevisiae* merupakan salah satu khamir penghasil amilase yang cukup berpotensi, selain bakteri dan kapang.

Tabel 4.3. Aktivitas enzim ekstraseluler dari beberapa khamir

Family	Spesies	SDA	LipA	PrA	PecA	ChA	EsA
Ascomycetes	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	+	+				+
	<i>Pichia membranifaciens</i>	+	+		+		+
	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> .						+
	<i>Candida sake</i>	+	+	+	+		+
	<i>Geotrichum calbani</i>	+	+	+			
Mikroorganisme menyerupai khamir (yeast-like)	<i>Aureobasidium pullulans</i>		+	+	+	+	+
Basidiomycetes		+					
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	+	+		+	+
	<i>Rhodotorula mucilabinosa</i>		+			+	+

Sumber Buzzini dan Martini (2002).

Keterangan: SDA= starch degrading activity, EsA= esterase activity, LipA=lipase activity, PrA=protease activity, PecA=pectinase activity, ChA=chitinase activity.

Khamir *Saccharomyces cerevisiae* tidak memproduksi enzim protease ekstraseluler, tetapi aktivitas enzim protease terdapat dalam filtrate biakan khamir (Fleet 1992). Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas protease *S.cerevisiae* berasal dari dalam sel (intracellular activity) dan baru terukur bila terjadi autolysis dari sel khamir tersebut. Enzim amilase tergolong enzim ekstraseluler yaitu yang diproduksi di luar sel oleh beberapa jenis khamir antara lain *Saccharomycopsis fibuliger*, *S. diaticus*, *Saccharomyces cerevisiae*,

Schwaniomyces occidentalis, dan *Candida* serta *Pichia*. *S. fibuligera*, walaupun merupakan khamir amilolitik penghasil α -amilase, glukoamilase dan α -glukosidase yang mampu merombak zat pati, namun *S. fibuligera* masih tergolong dalam khamir penyebab penyakit pada manusia. Sementara itu, khamir amilolitik *S. cerevisiae* mempunyai potensi penting dalam pengolahan produk-produk berbahan pati, karena aktivitas enzim amilase terutama isoamilase dapat menghidrolisa ikatan ranati cabang α -(1,6)- pada amilopektin. Disamping berfungsi dalam perombakan zat pati, khamir amilolitik juga berperan dalam memproduksi etanol dan biomassa khamir dari bahan dasar yang mengandung zat pati, memproduksi minuman dan makanan berkarbohidrat rendah melalui fermentasi beras, juga mampu memproduksi enzim amilase selama fermentasi tape ketan. Potensi khamir dalam pengembangan produk pangan masih sangat perlu digali dan mempunyai prospek yang sangat besar.

Alfa-amilase adalah golongan glikoprotein, disekresi ekstraseluler ke dalam mediun dalam beberapa bentuk yang mempunyai sifat serupa. Alfa-glukosidase adalah komponen dari ekstraseluler amilolitik khamir *Saccharomyces*. Alfa-glukosidase juga ditemukan di dalam dinding sel khamir. Alfa-amilase memiliki pH optimum 5-6.2 dengan suhu optimum 40-50°C. Alfa-glukosidase ekstraseluler dan alfa-glukosidase dinding sel memiliki pH optimum 5,5 dan suhu optimum 42,5 – 52,5°C. Glukoamilase adalah glikoprotein ekstraseluler yang terdapat dalam berbagai bentuk. Secara umum pada proses hidrolisis pati, α -amilase mendegradasi rantai α -(1,4)-amilosa dan amilopektin menjadi unit-unit glukosa, β -amilase mendegradasi ikatan α -(1,4)-amilosa dan amilopektin menjadi unit-unit maltose, namun β -amilase tidak dapat bereaksi dengan ikatan α -1,6-glukosa. Sementara itu, amiloglukosidase mendegradasi ikatan α -(1,4) dan α -(1,6)-glukosa pada rantai polisakarida pati menjadi glukosa.

Kustyawati et al. (2013) menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae* sebagai starter untuk memfermentasi tapioka secara terendam. Fermentasi tapioka menggunakan *S.cerevisiae* merupakan salah satu upaya untuk mengubah karakteristik fungsional tapioka, yang disebut sebagai modifikasi, termasuk memperkaya nilai nutrisi yang dimiliki oleh pati alami untuk membentuk karakteristik produk akhir yang diinginkan. *S.cerevisiae* berpengaruh terhadap struktur granula pati dan memiliki sifat biokimia yang lebih

baik bila dibandingkan dengan pati ubi kayu tanpa penambahan *S. cerevisiae* (Tabel 6). Penambahan *S. cerevisiae* dapat digunakan sebagai agen modifikasi untuk pati ubi kayu dan meningkatkan kandungan protein dan kelarutannya. Fermentasi pati ubi kayu dengan menggunakan ragi instan dan lama fermentasi 36 jam merupakan pati terbaik setelah dilakukan uji organoleptik. Hasil pengamatan yang diperoleh yaitu aromanya sedikit khas tapioka, aroma fermentasi, tekstur menyerupai terigu, dan warnanya kekuningan. Fermentasi tapioka menggunakan ragi instan selama 48 jam, memiliki kandungan protein yang tinggi sebesar 2,17 % dengan kadar pati sebesar 77,37 % yang terdiri dari kadar amilosa 24,83 % dan kadar amilopektin 52,543 %. Pati termodifikasi dengan *S. cerevisiae* mempunyai kadar amilosa lebih rendah dan amilopektin lebih tinggi, kelarutan tinggi, protein lebih tinggi yang mengindikasikan proses gelatinisasi terjadi pada suhu yang lebih tinggi karena protein menghambat proses gelatinisasi. Kultur campuran *S. cerevisiae* dan *Lactobacillus plantarum* secara bersamaan juga dapat berperan sebagai starter dalam fermentasi tapioka secara terendam (Kustyawati et al., 2016). Semakin lama waktu fermentasi pati ubi kayu maka dapat menurunkan derajat keasaman (pH) dan total gula reduksi, serta meningkatkan total asam dalam suspensi pati tapioka ini. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Saccharomyces cerevisiae* dan *Lactobacillus plantarum* dapat tumbuh bersamaan dalam suspensi pati ubi kayu sebagai inokulum campuran tetapi *Saccharomyces cerevisiae* lebih dominant pertumbuhannya dibandingkan *Lactobacillus plantarum*. Penambahan *Lactobacillus plantarum* tidak mempengaruhi mikroflora selama fermentasi. Penambahan inokulum campuran berupa *Saccharomyces cerevisiae* dan *Lactobacillus plantarum* dapat mengubah sifat fisikokimia dari tapioka yaitu meningkatkan kadar pati, kadar amilopektin, kadar air, kadar protein, dan menurunkan kadar amilosa, serta merusak struktur granula pati. Pada fermentasi pembuatan Mocaf dengan *Saccharomyces cerevisiae* dan lama fermentasi 3 hari meningkatkan kandungan protein sebesar 2,29% dan lemak 3,66% (Kurniati et al., 2012). *S. cerevisiae* menggunakan gula tereduksi untuk memproduksi protein (Tesfaw and Assefa, 2014), karena *S. cerevisiae* sebagai mikroorganisme non amilolitik, BAL atau mikroorganisme lain menghidrolisa pati menjadi monosakarida glukosa dan selanjutnya glukosa diutilisasi oleh khamir. Seperti halnya pada kultur campuran *Lactobacillus spp* dan *S. cerevisiae* dalam fermentasi ulit ubi kayu untuk meningkatkan protein (Uboh, 2006), dan fermentasi selulosa/hemiselulosa yang terlebih dahulu dihidrolisa oleh

selulase dan xylanase *Geotrichum lucidum* menjadi gula monosakarida dan selanjutnya dihidrolisa oleh *S.cerevisiae* untuk memproduksi protein.

Tabel 4.4. Komponen kimia dan sifat fisiko kimia tapioka (ubikayu varietas Kasetsart) termodifikasi dengan *S.cerevisiae*, Fermipan dan kultur campuran.

Komponen kimia (% bk)/pasting	Native/ alami	Bio-Tapioka 1 (<i>S.cerevisiae</i> 3%)	Bio-tapioka 2 (Fermipan)	Bio-tapioka 3 (Campuran)	Bio-tapioka 4 (<i>S.cerevisiae</i> 10%)
pH	3,86 ±0,30	3,91± 0,04	4,97± 0,21	3,89 ± 0,17	5,1±0,72
Air	10,7±0,88	10,3±0,88	10,3 ± 0.19	10,7±0,62	10,2±0,54
Abu	0,48 ±0,13	0,01± 0,02	0,01 ±0,0	0,18± 0,13	0,17±0,81
Lemak					
Protein	0,28±0,12	0,85± 0,05	2,06± 0,12	1,5± 0,03	2,03±0,44
HCN	0,36	0,27	0,26	0,29	0,032
Pati	81,16±1,12	80,12± 0,50	77,37± 0,77	71,16± 1,87	81,2±1,51
Amilosa	30,34±0,17	27,26±1,21	24,83±3,12	31,38 ±4,94	33,24±1,11
Amilopektin	50,82±0,24	52,86±0,16	52,54±1,35	68,61± 4,41	56,76±2,55
Swelling power (g/mL)	16,31±0,02	13,32±0,01	13,48±0,01	13,50±0,02	13,35±0,31
Kelarutan (%) pada pemanasan 90°C / 30 menit	68±0,21	44±0,24	44±0,14	41±0,31	39±0,11
Suhu gelatinisasi (°C)	70,4±0,27	71,95 ± 0,22	71,95±0,32	72,1±0,12	71,5±0,43
Viskositas maksimum (BU)	1326±1,18	910±2,13	1134±0,45	920±0,98	1150±2,32
Viskositas balik (BU)	682±0,51	253±0,22	288±0,37	268±0,63	255±0,21
Breakdown	744±2,1	653±2,02	666±0,82	637±1,45	624±2,13
Setback	260±0,98	548±1,92	469±1,87	465±0,67	588±1,24
Aroma	Khas tapioka				
Tekstur	Tapioka	Menyerupai terigu	Menyerupai terigu	Menyerupai terigu	Menyerupai terigu
Warna	Sangat putih	Putih kekuningan	Putih kekuningan	Putih kekuningan	Putih kekuningan
Kekuatan gel (g/f gram/force)	18,55±0,0	27,65±0,31	28,50±0,0	25,75±0,22	28,80±0,67

Sumber Kustyawati et al. (2012), Kustyawati et al (2016), Mutia (2011).

Keterangan : Bio-Tapioka 1=*Saccharomyces cerevisiae* 3%, Bio-Tapioka 2= fermipan, Bio-Tapioka 3= kultur campuran *S.cerevisiae* + *Lactobacillus plantarum*, Bio-Tapioka 4=*S.cerevisiae* 10%. Lama fermentasi 24 jam, suhu 31±2°C

Tapioka termodifikasi *Saccharomyces* memiliki kandungan amilosa dan kadar abu yang lebih rendah dan suhu pasting yang relatif sama dan lebih tinggi dari tapioka alami. Sifat pasta dipengaruhi oleh keberadaan

komponen minor di dalam pati misalnya kandungan protein, abu dan mineral. Amilosa memiliki berat molekul rendah dan mudah larut ke dalam air pada pemanasan. Pemanasan dalam air yang berlebih menyebabkan melemahnya ikatan dalam granula. Perbedaan gaya pengikatan dari granula pati mengindikasikan adanya perbedaan sifat swelling power dan kelarutan. Interaksi yang kuat akan mengurangi jumlah OH bebas untuk mengikat air (hidrasi) dan mengurangi masuknya air ke dalam interior granula dan akibatnya menurunkan SP dan kelarutan. *Swelling power dan kelarutan granula tapioka termodifikasi Saccharomyces pada suhu pemanasan 90°C selama 30 menit.* Tapioka termodifikasi *Saccharomyces* (Biotapioka) mempunyai kelarutan dan SP yang lebih rendah dari tapioka alami mengindikasikan adanya interaksi yang kuat dalam granula mengurangi jumlah gugus OH bebas yang tersedia untuk mengikat air, ratio amilosa/amilopektin kecil, penurunan kadar amilosa sehingga molekul yang larut dalam air rendah (amilosa memiliki BM rendah akan larut dalam air). Fermentasi oleh *Saccharomyces* juga diduga mengakibatkan menurunnya kadar amilosa karena terjadi pemotongan rantai panjang amilosa menjadi rantai pendek sehingga meningkatkan gugus OH bebas untuk mengikat air. Namun protein yang meningkat selama pemanasan akan mengembang dan berinteraksi membentuk ikatan kompleks dengan rantai pendek amilosa sehingga mengurangi masuknya air ke dalam granula.

Aktivitas Bakteri Asam Laktat Dalam Fermentasi Tapioka

Bakteri asam laktat (BAL) dapat berfungsi sebagai sumber protein sel tunggal. Aplikasi BAL dalam fermentasi ubi kayu memperbaiki sifat kimia tapioka yang meliputi kadar amilopektin, total asam, total gula, meningkat dengan meningkatnya lama fermentasi. Sementara nilai pH, kadar amilosa menurun dengan meningkatnya lama fermentasi. Sifat pasta tapioka meliputi waktu, suhu, puncak viskositas, trough, final viskositas, meningkat, sedangkan set back dan breakdown menurun. Tapioka yang telah mengalami modifikasi dengan bakteri asam laktat ini cocok sebagai bahan improver pada produk pangan yang berkaitan penting dengan sifat viskositas, retrogradasi, dan sineresis (Kartikasari *et al.*, 2016). Pada penelitian ini, bakteri asam laktat diperbanyak dengan cara menimbang 0,5 g starter, 50 g gula, 50 g chip MOCAF kering, dan 1000 mL air di dalam

gelas Beker 1000 mL, selanjutnya difermentasi selama 24 jam pada suhu ruang untuk menghasilkan konsentrasi bakteri asam laktat 100 ppm. Proses fermentasi tapioka menggunakan starter bakteri asam laktat berlangsung dengan perbandingan starter dan substrat sebesar 1:9 dan berlangsung pada lama fermentasi hingga 72 jam. Bakteri asam laktat dan *Bacillus* mampu berkontribusi pada penurunan senyawa sianida dalam medium fermentasi ubikayu dan daun ubikayu. Bakteri asam laktat terutama *Leuconostoc mesenteroides* dan *Lactobacillus lactis* memproduksi enzim linamarinase yang berkontribusi pada proses detoksifikasi. Hidrolisa glukosida sianogenik pada fermentasi ubi kayu berlangsung pada lingkungan asam dengan pH 3,8 sedangkan pada fermentasi daun ubi kayu berlangsung pada lingkungan basa pH 8,5. Penurunan pH disebabkan oleh produksi asam organik oleh bakteri asam laktat, sedangkan lingkungan basa kemungkinan disebabkan oleh produksi amina oleh *Bacillus pumilus* karena bakteri ini menggunakan asam sianohidrik sebagai sumber nutrisinya.

Fermentasi pembuatan mocaf menggunakan *Lactobacillus plantarum* dapat memperbaiki nutrisinya terutama protein meningkat sebesar 8,56% dan lemak 2,81% dengan lama fermentasi 5 hari (Kurniati *et al.*, 2012).

Aktivitas Kultur Campuran Dalam Fermentasi Tapioka

Bakteri, ragi, jamur, dan algae merupakan sumber bio- protein yang sangat mungkin dapat diaplikasikan pada fermentasi ubikayu maupun tapioka. Di alam, mikroorganisme berada dalam kondisi saling berinteraksi satu dengan yang lainnya, sehingga sebagian besar mikroorganisme lebih efektif aktivitasnya bila tumbuh bersamaan dengan kelompok mikroorganisme lainnya. Fermentasi menggunakan kultur campuran yang umumnya terdiri dari dua atau lebih mikroorganisme. Biladibandingkan dengan fermentasi monokultur, kultur campuran jenis fungi mempunyai kelebihan dalam utilisasi substrat yang lebih baik, produksi meningkat, mudah beradaptasi terhadap perubahan kondisi fermentasi, dan resistensi terhadap kontaminasi mikroorganisme yang tidak dikehendaki meningkat. Kekurangan nutrisi juga dapat diatasi dengan menggunakan kultur campuran karena adanya rekasi sinergistik dimana produk hasil hidrolisa enzim dari satu jenis mikrorganisme dapat berfungsi sebagai substrat bagi jenis mikroorganisme yang lain. Bio-modifikasi tapioka menggunakan

beberapa kultur starter baik sebagai tunggal maupun dalam campuran telah dilakukan oleh beberapa peneliti. Mikroorganisme yang sering dimanfaatkan adalah bakteri asam laktat, khamir, dan juga kapang. Putri *et al.* (2014) membuat kultur kering campuran *Lactobacillus sp* dan *Saccharomyces cerevisiae* dalam media tepung jagung dengan perbandingan substrat dan kultur campuran 94:6 dengan masa inkubasi 24 jam pada suhu ruang. Komposisi jumlah mikroba di dalam substrat yang telah dikeringkan, masing-masing adalah $2,2 \times 10^9$ cfu/mL untuk BAL dan $3,0 \times 10^8$ cfu/mL untuk *S.cerevisiae*. Pembuatan kultur kering diawali dengan menumbuhkan masing-masing kultur di dalam media both (10 mL) yang sesuai yaitu MRS broth untuk BAL dan YPD broth untuk *S.cerevisiae*, selama 24 jam pada suhu 27°C. Untuk perbanyak, masing-masing kultur ditumbuhkan pada 3% tepung jagung di dalam aquades steril sebagai adaptasi terhadap media fermentasi tepung jagung. Setelah ditambahkan bahan pengisi ke dalam substrat yang bertujuan untuk mempertahankan aktivitas kultur starter selama pengeringan, selanjutnya kultur campuran di dalam substrat jagung dan bahan pengisi dikeringkan menggunakan vacuum drying pada suhu 45°C selama dua jam. Kultur kering campuran mempunyai masa simpan 4 minggu pada suhu refrigerasi. *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum* dan *S.cerevisiae* merupakan mikroorganisme indigenus sereal. Pada fermentasi tapioka, kultur campuran antara BAL dan *Saccharomyces cerevisiae* meningkatkan produksi asam oleh BAL karena khamir sebagai mikroorganisme kalatase positif mendegradasi hydrogen peroksida yang merupakan inhibitor pertumbuhan BAL.

Kapang *Aspergillus niger* dan *Rhizopus oligosporus* mengandung enzim glukoamilase yang dapat diproduksi secara komersial. Glukoamilase (GA) adalah enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis pati menjadi glukosa. GA penting dalam industry pengolahan pati terutama untuk produksi glukosa kristal dan high fructose sugar (HFS). GA yang berasal dari *A.niger* mempunyai kelebihan antara lain lebih stabil pada suhu tinggi (termostabil), lebih tinggi aktivitasnya dalam fermentasi fermentasinya padat (SSF) dibanding fermentasi terbenam (Sub-merged fermentation-SmF). Pati sebagai substrat SSF sebaiknya dilakukan proses gelatinisasi lebih dahulu karena sebagian besar mikroorganisme lebih mudah tumbuh pada pati tergelatinisasi dari pada pati mentah. Namun pati tergelatinisasi mempunyai

kelemahan yaitu tekstur pati rusak, masa lengket dan menggumpal sehingga porositas bahan menjadi rendah dan kemampuan untuk transfer panas berkurang. Oleh karena itu untuk menghindari proses gelatinisasi dapat dilakukan fermentasi pada substrat tapioka dengan isolate atau starter kapang yang mampu menguraikan pati mentah. Sebagai contoh, *Aspergillus fumigates* KIBGE-IB33 memproduksi amylase dan amiloglukosidase. Kedua campuran enzim ini digunakan untuk memfermentasi tapioka slurry (tapioka dalam air) dan menghasilkan glukosa hingga 40,0 g/L, dan selanjutnya difermentasi lebih lanjut oleh *Saccharomyces cerevisiae* untuk menghasilkan alkohol hingga 84,0% (Prevez *et al.*, 2014).

Kapang *Rhizopus oryzae* mampu menghidrolisa zat pati dari tapioka dan menggunakan karbon sebagai sumber energi untuk menghasilkan asam laktat (Hartatik). Medium fermentasi berupa substrat tapioka dalam aquades sebesar 10% dengan starter *R.oryzae* 1% yang mengandung $\pm 10^8$ spora/ml, pH 6 ± 0.1 dan inkubasi pada waterbath shaker 90 rpm selama 3 hari menghasilkan asam laktat dengan konsentrasi 10.94 g/L dengan laju produksi $5,4 \times 10^4$ g/1 h. *Rhizopus oryzae* diketahui mampu mensekresi enzim linamarinase ekstraseluler sehingga *R.oryzae* juga dapat berfungsi sebagai detoksifikasi dalam fermentasi ubikayu. Penggunaan *R.oryzae* pada pembuatan Mocaf dengan lama fermentasi 3 hari juga dapat meningkatkan kandungan lemak 3,76% dan protein 4,72% dibanding Mocaf biasa (Kurniati *et al.*, 2012). Kultur campuran yang terdiri dari *Rhizopus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae* dan *Aspergillus niger* juga digunakan untuk pengembangan produk ubi kayu diperkaya dengan protein. Sementara campuran kultur *Lactobacillus delbruckii*, *Lactobacillus coryneformis* dan *S.cerevisiae* dengan perbandingan 2:1:1 sebagai starter sebanyak 1% dapat diaplikasikan pada fermentasi ubikayu parut dengan ketebalan lapisan 2 cm. *Rhizopus oligosporus* sebagai starter dalam fermentasi ampas tapioka selama lima hari dapat meningkatkan nilai kandungan protein sebesar 19,63 % (Abidin, 2009).

Muhidin *et al.* (2014) melakukan fermentasi alami untuk mengurangi kandungan sianida dalam umbi ubikayu. Ubi kayu varietas tertentu mengandung banyak glikosida sianogenik yaitu linamarin dan lotustralin. Glikosida sianogenik dapat dihidrolisis menjadisasam sianida (HCN) oleh enzim endogen linamarinase ketika jaringan tanaman atau umbi ubi kayu mengalami kerusakan oleh luka selama panen, pengolahan atau proses

mekanis lain. Mikroba yang toleran terhadap sianidofilik/sianida berperan dalam degradasi glukosida sianogenik. Pengeringan ubi kayu yang tidak efektif dapat mendorong tumbuhnya kapang *Aspergillus flavus* (pathogen), *A. fumigates*, *A. japonicas*, *A.niger*, *Penicillium rubrum*. Hydrogen sianida (HCN) yang juga dikenal sebagai racun biru berisifat racun terhadap kesehatan manusia. Umbi ubi kayu yang masih segar dan utuh tidak ada luka dan masih terlindung oleh kulitnya, maka glukosida sianogenik tetap utuh dalam bentuk linamarin dan lotaustralin. Bila struktur seluler terganggu, maka glukosida intraselular terpapar pada enzim ekstraselular linamarase, dan menghasilkan asam hidrosianat (HCN). Reaksi pembentukan HCN terjadi dalam dua tahap yaitu: (1) glukosida sianogenik terdegradasi menjadi gula dan sianohidrin (x-hydroxynitrile), (2) sianohidrin mengalami disosiasi menjadi keton dan asam hidrosianida. Oleh karena itu, pada linamarin, glukosida pertama kali dihidrolisa oleh linamarinase menjadi β -D-glukopiranosida dan 2- hidroksiisoleitronotrit atau aseton-sianohidrin, selanjutnya aseton-sianohidrin terdegradasi menjadi aseton dan HCN. Sianohidrin merupakan hasil aktivitas enzim linamarinase. Sianohidrin molekul yang stabil pada kondisi sedikit asam (pH 4.0), pada keadaan basa atau netral sianohidrin melangsungkan hidrolisis spontan menghasilkan HCN. Dari keterangan tersebut dapat diketahui bahwa sianida di dalam ubi kayu berada dalam tiga bentuk yaitu dalam bentuk glukosida (linamarin dan lotaustralin), sianohidrin, dan HCN bebas.

Modifikasi Tapioka Secara Enzimatis

Pati termodifikasi adalah pati yang telah mengalami perlakuan fisik atau kimia secara terkendali sehingga mengubah satu atau lebih dari sifat alaminya, seperti suhu awal gelatinisasi, karakteristik selama proses gelatinisasi, ketahanan selama pemanasan, pengadukan, dan kecenderungan retrogradasi. Modifikasi tapioka dapat dilakukan dengan menggunakan enzim hidrolisis. Proses hidrolisis tapioka dapat menggunakan beberapa enzim yang termasuk dalam kelompok endoenzim dan kelompok eksoenzim. Golongan endoenzim berfungsi memecah satu molekul pati menjadi dua molekul secara acak, sedangkan eksoenzim memutuskan ikatan glukosida pati dari ujung nonpereduksi menjadi monosakarida atau disakarida. Setiap enzim mempunyai mekanisme dan pola pemutusan ikatan yang spesifik,

misalnya ikatan α -1,4-glikosidik dapat diputus oleh alfa-amilase dari bakteri maupun pankreatin, serta beta-amilase, sedangkan ikatan bercabang α -1,6-glikosidik hanya diputus oleh pullulanase. Enzim hidrolisis pada fermentasi tapioka bekerja secara spesifik yaitu pada pemutusan ikatan glosidik, pola pemutusan, aktivitasnya dan spesifitas substrat serta produk yang dihasilkan. Dalam hidrolisa enzimatik terjadi pemutusan ikatan-ikatan glukosida dari amilosa dan amilopektin dan menghasilkan glikosa, maltosa, atau oligosakarida. Dimana produk akhir yang akan dihasilkan bergantung pada jenis enzim yang digunakan.

Debranching enzymes

Debranching enzymes dapat diaplikasikan dalam modifikasi tapioka secara enzimatik karena enzim ini mampu menghidrolisa ikatan α -(1,6)-D-glukosa pada pati. Pullulanase, salah satu debranching enzim untuk fermentasi tapioka, yang bersifat stabil terhadap panas, bekerja pada rantai sisi cabang terluar dari dua atau lebih unit glukosa dan menghidrolisis pati secara lambat namun sempurna. Pullulanase dapat menghidrolisis ikatan α -(1,6)- pada pullulan dan amilopektin, dibandingkan isoamilase hanya dapat menghidrolisis ikatan α -(1,6)- pada amilopektin. Wong *et al.* (2007) mengaplikasikan pullulanase dalam modifikasi pati sagu (*Metroxilon sagu*) dengan konsentrasi pati 5% dan menggunakan enzim 2% (v/b) selama 24 jam, menghasilkan pati yang memiliki rantai linier panjang dengan kenaikan amilosa dari 24,9% menjadi 33,2%. Perlakuan enzimatik menggunakan pullulanase ini didahului oleh proses gelatinisasi secara otoklaving pada suhu 105°C selama 15 menit, dan dilanjutkan dengan proses pendinginan disertai pengadukan dengan stirrer hingga mencapai suhu 40°C.

Sementara itu, Harianie *et al.* (2009) mengaplikasikan pullulanase untuk modifikasi tapioca dari ubi kayu (*Manihot esculenta*) untuk menghasilkan tapioca kadar amilosa tinggi sebagai bahan pembuatan maltose. Tapioka sebagai substrat pada konsentrasi 15% (b/v) diberikan perlakuan pemasakan pada suhu 105°C selama 15 menit sebagai proses gelatinisasi, selanjutnya hidrolisa enzimatik dengan menambahkan 2% pullulanase (v/b tapioca) yang dilanjutkan inkubasi selama 12 jam. Hasil yang diperoleh adalah amilosa sebesar 41,12%. Tahap hidrolisis tapioka amilosa tinggi oleh β -amilase menghasilkan maltosa 30,84% dan

maltotriosa 2,90%, dibandingkan dengan tapioka tanpa proses debranching enzim menghasilkan maltose 26,47% dan maltotriosa 1,86%. Otoklaving tapioka dimaksudkan agar mudah terhidrolisa oleh enzim pululanase dan membantu meningkatkan amilosa. Pada proses otoklaving terjadi fenomena gelatinisasi dan retrogradasi. Sementara itu, ketersediaan air dan suhu yang cukup selama otoklaving dapat mengoptimalkan proses gelatinisasi sehingga pada proses pendinginan dan pengeringan tapioca memacu terjadinya retrogradasi. Pada proses retrogradasi, potongan lurus dari dua untai pati atau lebih dapat membentuk ikatan sederhana, dan akibatnya pati membentuk struktur yang lebih teratur, selanjutnya granula pati bergabung menjadi struktur yang kompak dan stabil karena ikatan hydrogen. Industry yang memproduksi sirup tinggi maltosa sebaiknya memanfaatkan aktivitas enzim debranching untuk meningkatkan yield maltose dan memperpendek waktu reaksi. Hal ini karena jika proses hidrolisis amilosa hanya menggunakan enzim β -amilase memberikan hasil yang tidak maksimal karena β -amilase tidak dapat memotong ikatan percabangan α -(1,6)- atau tidak dapat menghidrolisa amilopektin pada tapioca.

Alfa Amylase

Modifikasi tapioka menggunakan enzim α -amilase menghasilkan pati termodifikasi alfa amilase. Pati Termodifikasi α -amilase yaitu pati dipecah menjadi unut-unit yang lebih kecil yaitu dengan memotong ikatan-ikatan glikosidiknya oleh enzim α -Amilase. Enzim α -Amilase bekerja secara acak mendegradasi amilosa (disebut amilolisis) dengan sempurna dan cepat menghasilkan maltose dan maltotriosa. Hasil kerja enzim α -amilase ini dapat teridentifikasi pada tapioka oleh adanya penurunan kekentalan dan kemampuannya mengikat iodium sangat cepat. Hasil kerja α -amilase berikutnya adalah hidrolisis oligosakarida membentuk glukosa dan maltose. Suryani dan Nisa (2015) memodifikasi tapioka dari ubikayu *Manihot esculenta* menggunakan enzim α -amilase (*EC.3.2.1.1*) yang bersumber dari *Bacillus sp.* untuk produksi maltodekstrin yang mendekati gelatin sebagai agensia pembuih untuk diaplikasikan pada produk *marshmallow*. Pada industry pangan gelatin merupakan salah satu polimer larut air yang dapat difungsikan sebagai agensia pembentuk gel, pengental, penstabil, pembuih, dan pengemulsi. Tapioka merupakan sumber polisakarida yang dapat

dikembangkan menjadi produk *gelatin alternative* sebagai foaming agent. Tapioka yang dikembangkan menjadi gelatin alternative sebaiknya yang mengandung zat pati tinggi yaitu 85%. Hidrolisis tapioka menggunakan enzim α -amilase pada konsentrasi 5 mg/100g dengan lama inkubasi 10 menit menghasilkan produk marshmallow yang diterima oleh panelis melalui uji *triangle* dan *acceptable method*.

Aplikasi Tapioka Termodifikasi

Tapioka sebagai salah satu bahan yang mempunyai potensi sebagai substitusi tepung terigu dalam industri pembuatan roti baik roti tawar maupun roti manis. Tapioka memiliki komposisi kimia zat pati yang tinggi 73,3-84,9%, walaupun kandungan lemak, protein dan abu sangat rendah. Kandungan protein tapioka alami hanya 0,03-0,06% dan lemak 0,08-1,54%, serta abu 0,02-0,33%. Syarat penting dalam pembuatan roti adalah adanya protein di dalam tepung karena berperan dalam proses pengembangan roti. Keistimewaan tepung terigu adalah adanya gluten yang berperan penting dalam menahan gas hasil fermentasi yang mengakibatkan volume roti menjadi membesar. Disamping itu, gluten juga berfungsi dalam membentuk tekstur roti. Tepung terigu berasal dari tanaman gandum yang tidak tumbuh di bumi Nusantara, oleh karena itu perlu impor. Kenaikan impor tepung terigu yang semakin meningkat dari tahun ke tahun memerlukan upaya untuk mengganti tepung gandum dengan tepung yang berasal dari umbi-umbian yang tumbuh di Indonesia. Tapioka dari ubi kayu (*Manihot esculenta*) memiliki kelemahan sifat fisiko kimianya sehingga menghambat aplikasi secara luas dalam proses pengolahan produk pangan. Tapioka alami terlalu lengket, tidak tahan perlakuan asam, tidak memiliki daya kembang, suhu gelatinisasinya tinggi, kandungan protein rendah, kelarutannya terbatas di dalam air, dan gel patinya mudah mengalami sineresis.

Roti manis

Kustyawati dan Fauzi (2010) dapat mensubstitusi 50% tapioka termodifikasi dengan *Saccharomyces cerevisiae* pada pembuatan roti manis. Roti manis terbuat dari adonan manis yang telah mengalami fermentasi, mengandung kurang lebih 10% gula dan dipanggang. Tepung terigu sebagai

bahan baku utama roti manis, air, ragi roti, dan garam, sedangkan bahan pembantu meliputi gula, susu bubuk, shortening, telur dan pengembang (Pomeranz & Shelleberger 1991). Tapioka termodifikasi dengan *S.cerevisiae* memiliki kadar protein 2,07% sehingga dapat digunakan untuk membuat roti manis sebagai substitusi terigu. Ketidak beradaan protein gluten dalam tapioka alami mengakibatkan terganggunya pembentukan dan penyerapan gas CO₂ selama fermentasi dan mutu organoleptik roti. Pada pembuatan roti dibutuhkan bahan baku yang memiliki kandungan protein tinggi agar memiliki sifat mudah tercampur, terfermentasi, daya serap airnya tinggi, elastis dan mudah digiling. Protein tinggi juga membantu memberikan volume yang baik terhadap hasil jadi roti, seperti pada gambar roti sebelum proof dan sesudah proof (Gambar 17). Semakin tinggi kadar protein maka akan semakin tinggi pula kandungan gluten yang terdapat di dalamnya. Kualitas protein sangat dibutuhkan dalam proses pembuatan roti, karena berperan dalam dua hal yaitu produksi gas dan daya menahan gas (gas retention) yang diperlukan dalam roti. Gas yang dihasilkan dari ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) pada proses fermentasi adalah CO₂, sedangkan gas retention adalah kemampuan dari gluten untuk menahan gas CO₂ yang dihasilkan oleh ragi tersebut, dimana fungsi protein adalah sebagai rangka penopang struktur roti. Kualitas protein yang bagus adalah yang dapat menahan gas dengan baik (extensible), sehingga mendapatkan volume roti yang besar. Kualitas protein juga akan mempengaruhi pada kualitas roti termasuk volume roti, serat atau remah, dan struktur roti. Pembuatan roti manis dilakukan dengan cara straight dough yaitu dengan cara mencampurkan semua bahan baku untuk 200 gr bahan lalu diaduk sampai kalis. Formula adonan pada Tabel 4.5. Setelah adonan kalis selanjutnya adonan diistirahatkan selama 15 menit. Kemudian dilakukan penimbangan dan pembulatan adonan lalu diistirahatkan kembali selama 10 menit dan dibuang gas yang ada di dalamnya dengan cara ditekan-tekan. Selanjutnya adonan dibagi-bagi dengan berat 50 g lalu dibulatkan. Adonan disusun di atas loyang yang telah disemir dengan mentega dan dibiarkan mengembang (proofing) dalam ruang tertutup selama 90 menit. Kemudian dilanjutkan dengan pemanggangan dengan suhu 175°C selama 12-15 menit sampai warna roti kuning kecoklatan. Berdasarkan pada analisis derajat pengembangan roti dihasilkan bahwa substitusi pati ubikayu termodifikasi sebesar 50%

menghasilkan roti manis dengan derajat pengembangan yang baik 80,13% dibandingkan dengan roti yang dibuat dengan formula 100% terigu mempunyai derajat pengembangan 83,78%. Pada Gambar 4.2 disajikan proses proofing dan pengembangan roti dengan formula 100% tepung terigu (a) dan roti dengan formulasi 50% tapioca termodifikasi (b). Pembuatan roti manis dengan substitusi tapioka termodifikasi *Saccharomyces cerevisiae* sebesar 50% menghasilkan roti terbaik (menurut 30 panelis semi terlatih) berdasarkan daya terima, volume roti, derajat pengembangan roti, nilai proksimat, dan uji organoleptik. Roti manis dengan bahan substitusi tapioka termodifikasi *Saccharomyces* 50% mempunyai cirri-ciri organoleptik sebagai berikut disajikan pada Tabel 4.6 menurut panelis semi terlatih.

Tabel 4.5. Formulasi pembuatan roti manis substitusi tapioka termodifikasi *Saccharomyces cerevisiae*.

Formulasi	F1	F2	F3	F4	F5
TMS (g)	0	50	100	150	200
Terigu (g)	200	150	100	50	0
Air (mL)	100	100	100	100	100
Ragi (g)	4	4	4	4	4
Garam halus (g)	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
Gula (g)	40	40	40	40	40
Susu bubuk (g)	20	20	20	20	20
Mentega (g)	20	20	20	20	20
Margarine (g)	20	20	20	20	20
Kuning telur (butir)	1	1	1	1	1
Pengembang adonan (g)	1	1	1	1	1

Sumber: Bogasari yang dimodifikasi

Keterangan: F=tapioka termodifikasi : terigu (g). F1= 0 : 100, F2= 25:75, F3= 50:50, F4= 75:25, F5= 100: 0

Beberapa faktor penting yang harus dimiliki oleh bahan baku tepung untuk pembuatan roti antara lain swelling power, suhu gelatinisasi, dan kandungan protein. Swelling power yang besar menunjukkan kemampuan adonan pati mengembang ketika diberi perlakuan suhu, sehingga swelling power yang tinggi berpengaruh pada pengembangan roti yang dihasilkan. Volume air dalam pembuatan roti sangat krusial dan harus sesuai dengan daya serap air yang dimiliki suatu tepung yang menjadi bahan dalam pembuatan roti, karena akan menghasilkan adonan yang terhidrasi dan

mengembang dengan baik setelah difermentasi, dan membentuk adonan dengan sifat viskoelastis yang optimal.

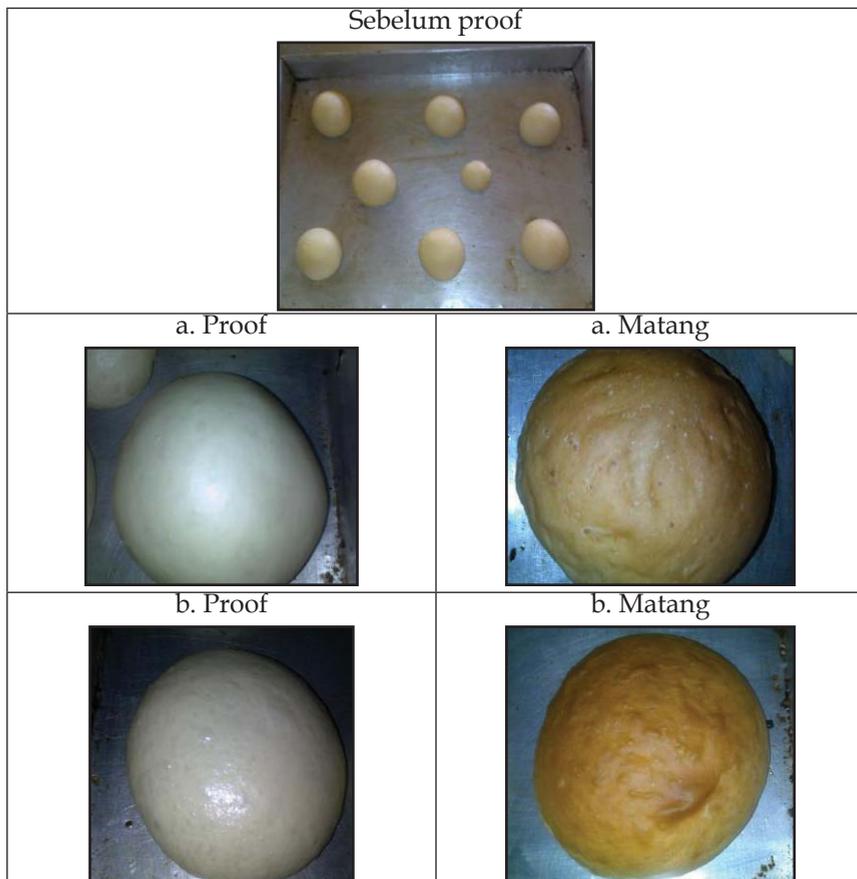
Tabel 4.6. Karakteristik roti manis substitusi tapioka termodifikasi *Saccharomyces* 50% pada berbagai perbandingan (tapioka termodifikasi:terigu dalam gram).

Karakteristik	F1	F2	F3	F4	F5
Derajat pengembangan roti.	83,82±1,1	83,87±1,3	80,13±0,91	76,81±1,2	60,56±2,2
Organoleptik - Penerimaan keseluruhan	3,6±0,22	3,9±0,31	3,9±1,3	3,7±0,71	3,0±0,52
- Warna	2,94	3,06	3,24	3,2	3,54
- Tekstur	4,07	4,06	3,07	2,6	3,0
- Rasa	3,6	3,8	3,07	3,07	2,94
- Aroma	3,94	4,0	3,6	2,94	3,14

Sumber Fauzi (2010).

Keterangan: F=tapioka termodifikasi : terigu (g). F1= 0:100, F2= 25:75, F3= 50:50, F4= 75:25, F5= 100: 0

Tapioka termodifikasi lain yaitu tepung tapioka asam, adalah modifikasi tapioka melalui fermentasi selama 9 hari menggunakan *Lactobacillus plantarum* (Sudaryati dan Andriyanto, 2013). Tepung tapioka asam dapat diaplikasikan untuk membuat roti manis dengan substitusi 30% dengan penambahan Na-bikarbonat 0,5%. Tepung tapioka asam ini mempunyai nilai gizi protein 0,32%, dibuat melalui fermentasi suspensi endapan pati basah ubikayu menggunakan 3% *L.plantarum* (bb pati basah) yang kemudian ditambah air 3-5 cm di atas permukaan endapan pati untuk membuat kondisi fermentasi terendam. Roti manis dari tapioka asam ini mempunyai nilai gizi protein 8,41%, volume pengembangan 253,7% dan dengan tekstur, aroma, rasa serta aroma disukai oleh panelis.



Sumber Fauzi (2010).

Gambar 4.2. Proofing dan pengembangan roti manis dengan substitusi tapioka termodifikasi saccharomyces. a). Sebelum proof, sesudah proof, dan roti matang pada roti tanpa substitusi (100% terigu), b). roti dengan substitusi 50% tapioca termodifikasi Saccharomyces.

Roti tawar

Tapioka termodifikasi telah banyak digunakan sebagai substitusi gandum dalam pembuatan roti tawar. Roti tawar adalah produk pangan berbahan dasar tepung terigu dan dibuat melalui tahapan proses yaitu pengadonan, fermentasi dan pemanggangan. Gluten merupakan komponen

yang berperan penting dalam pembuatan roti tawar. Proses pengadonan bertujuan membentuk sifat elastic kohesif dari gluten yang mengikat air. Terbentuknya sifat elastisitas diawali dengan terjadinya ikatan hydrogen antar molekul protein tepung terigu sehingga membentuk struktur melingkar, selain itu juga terbentuk ikatan disulfide (-S-S-) (Pomeranz & Shelleberger, 1991). Pada saat penambahan air maka protein tepung terigu (gluten) mengikat air hingga keseluruhan adonan menjadi *kalis* jika jumlah air sesuai dengan kemampuan protein untuk mengikatnya. Jika terjadi over pengadonan/ pengadonan yang dilakukan terus maka akan terjadi pengenduran lebih lanjut karena adonan menjadi lembek dan lengket yang disebabkan oleh pemutusan ikatan disulfide yang berlebihan. Pada proses fermentasi adonan terjadi degradasi pati dan gula/sukrosa yang ditambahkan. Enzim alfa dan beta amylase indigenus dalam tepung terigu menghidrolisis pati menjadi maltose. Sementara itu, yeast/khamir *Saccharomyces cerevisiae* yang ditambahkan menghasilkan enzim maltase yang menghidrolisis maltose menjadi glukosa dan sukrosa yang ditambahkan dihidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa, kemudian dipecah lagi menjadi CO₂ dan etanol. Selanjutnya pada proses pemanggangan, CO₂ dibebaskan karena kenaikan suhu hingga 48,9°C, CO₂ yang dibebaskan dijerap oleh gluten sehingga akan menaikkan tekanan dan terjadi pengembangan adonan. Saat kenaikan suhu hingga 54,4°C, granula pati mulai mengembang diikuti penyerapan air dari bahan lain. Bersamaan dengan kenaikan suhu hingga 60°C terjadi kenaikan metabolise di dalam sel khamir yang terus meningkat hingga titik thermal kematian sel, aktivitas enzim amylase juga meningkat membantu reaksi produk hingga system enzim rusak oleh panas tinggi. Pada suhu mendekati 73,3°C alkohol yang dihasilkan sel khamir dibebaskan dan membantu menambah pengembangan dari sel gas. Dimana granula pati bertambah ukurannya dan menjadi lebih terikat di dalam gluten. Kemudian air yang diperlukan oleh pati diambil dari struktur gluten sehingga adonan menjadi lebih kuat dan kental (terjadi proses gelatinisasi). Selain gelatinisasi pati, protein gluten mulai mengalami denaturasi, pemanasan awal menyebabkan pencairan gluten selanjutnya pemanasan yang diteruskan menyebabkan pelepasan air gluten yang dipindahkan ke dalam system jaringan pati. Selanjutnya terjadi reaksi pencoklatan (Maillard) antara gula pereduksi dengan gugus amina primer, dan disertai pembentukan aroma dan tekstur roti tawar.

Miyazaki *et al.* (2005) membuat roti tawar dengan substitusi 20% tapioka termodifikasi hydroxypropylated tapioca starch (HTS) menghasilkan roti tawar yang lebih lembut dibandingkan dengan roti tawar substitusi 20% tapioka alami. Sementara itu roti tawar yang dibuat dari substitusi acetylated tapioca starch (ATS) dan phosphorylated cross-linked tapioca starch (PTS) menghasilkan roti tawar yang lebih kaku/kokoh dari tapioka alami. Substitusi 10% tapioka termodifikasi asetilasi menghasilkan baking expansion yang lebih besar serta volume spesifik yang lebih tinggi dibandingkan dengan tapioka alami. Hasil uji sensori, panelis menyukai roti tawar substitusi tapioka termodifikasi asetilasi dibandingkan roti tawar substitusi tapioka alami. Basuki *et al.* (2015) berhasil membuat roti tawar substitusi 10% tapioka alami dengan penambahan gliserol monosterat 4% dengan volume pengembangan 347%, ukuran pori-pori 1,214%mm², dan tingkat kekerasan tekstur 0,915%. Panelis kurang menyukai roti tawar substitusi tapioka dan gliserol monostearat. Mekanisme gliserol monostearat adalah bahwa gliserol monostearat berfungsi sebagai emulsifier buatan yang tersusun dari radikal asam stearat sebagai gugus non-polar dan mempunyai dua gugus hidroksil dari gliserol sebagai gugus polar. Satu dari dua gugus hidroksil polar (-OH) pada akhir rantai gliserol monostearat bereaksi dengan molekul-molekul amilosa secara heliks. Akibatnya reaksi tersebut membentuk ikatan antar molekul-molekul amilosa sehingga selama fermentasi gas CO₂ dapat tertahan/terjerap dan adonan menjadi mengembang. Gliserol monostearat juga dapat menekan pembengkakan pati selama pemanggangan karena adanya lemak sehingga nilai tekstur meningkat atau empuk (pengukuran dengan penetrometer).

Bioplastik pati

Bioplastik adalah plastic yang dibuat dari senyawa - senyawa asal tanaman (*plant based substances*) seperti pati, selulosa, lignin; maupun asal hewan (*animal based substances*) seperti kasein, protein, dan lipid. Darni *et al.* (2008) mengaplikasikan pati pisang sebagai bahan utama pembuatan bioplastik dengan menambahkan gliserol sebagai plasticizer untuk memperbaiki sifat fleksibilitas dan elastisitas. Namun bioplastik berbahan dasar pati ini mempunyai kekurangan dalam hal kekuatan tarik, perpanjangan dan *Modulus Young*, serta sifatnya yang hidrofilik. Penggunaan biopolymer

seperti gelatin dapat memperbaiki kekurangan bioplastik pati -based tersebut. Lembaran plastic tipis (*plastic film*) yang dibuat dengan formulasi bahan dasar pati pisang, plasticizer, dan dengan penambahan gelatin 40% belum menghasilkan produk dengan sifat mekanik yang baik, struktur permukaan bioplastik masih berongga (dengan uji *SEM scanning elektrone microscope*) sehingga mudah menyerap air dan hal ini juga disebabkan oleh gugus fungsi bioplastik yang tersusun dari komponen hidrofilik (uji FTIR).

Latihan

1. Apakah yang disebut modifikasi tapioka? Jelaskan jawaban kalian.
2. Mengapa tapioka dapat dimodifikasi dan sebutkan manfaat nya.
3. Apakah bioplastik dapat dibuat dari tapioka?

Daftar Pustaka

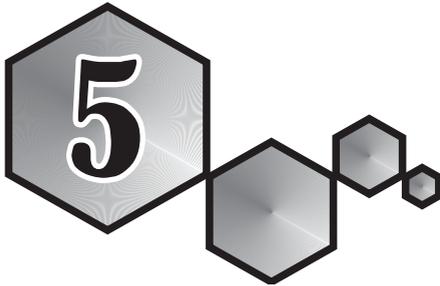
- Ardhana, M. 1982. *The Microbial Ecology og Tape Ketan Fermentation*. Thesis. The University of New South Wales University, Sydney.
- Bartolini, C. A. 2010. *Starches Characterization, Properties and Aplication*. Publishing Taylor and Francis Group, LLC.
- Basuki EK, Yulistiani R, Hidayat R, 2015. Kajian substitusi tepung tapioka ejournal.upnjatim.ac.id/index.php/rekapangan/article/.../412/313, 125-137
- Buzzini, P and A. Martini. 2002. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 1020-1025
- Copeland L, Blazek J, Salman H, dan Tang MC. 2009. Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*, 23: 1527-1534.
- Darni, Y., A. Chici, dan D. Sri Ismiyati. 2008. Sintesa bioplastik dari pati pisang dan gelatin dengan plasticizer gliserol. Prosiding Sem Nas Sains dan Teknologi II, Universitas lampung, 17-18 Novemever 2008.
- Fauzi, F. 2010. Pengaruh Formulasi Pati Ubi Kayu Termodifikasi dan Tepung Terigu Terhadap Sifat Fisik, Kimia, dan Organoleptik Roti Manis. Skripsi S1 Uniersitas Lampung.

- Hostinove E. 2002. Amylolytic enzymes produced by the yeast *Saccharomycopsis fibuligera*. *Biologia*, Bratislava, 57/Suppl. 11:247-251.
- Harianie L, Yuniarta, Argo BD. 2009. Pembuatan pati tinggi amilosa secara enzimatis dari pati ubikayu (*Manihot esculenta*) dan aplikasinya untuk pembuatan maltose. *El-Hayah* 1(1):14-24
- Herawati, H. 2011. Peluang pemanfaatan tapioka termodifikasi sebagai fat replacer pada keju rendah lemak. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Pp 411-420
- Hartatik. Fermentasi asam laktat dari tepung ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz) oleh *Rhizopus oryzae* dengan variasi konsentrasi substrat dan waktu fermentasi.
- Haryati, T.2009. Pengaruh penambahan *S.cerevisiae* terhadap sifat fisik, kimia tapioka, Skripsi, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Lampung.
- Hustiany, R. 2006. Modifikasi Asilasi dan Suksinilasi Pati Tapioka sebagai Bahan Enkapsulasi Komponen *Flavor*. *Disertasi, IPB*.
- Kartikasari SN, Sari P, Subagio A. 2016. Karakterisasi sifat kimia, profil amilografi (RVA) dan morfologi granula (SEM) pati singkong termodifikasi secara biologi. *Jurnal Agroteknologi* 10(1): 12-25.
- Kurniati LI, Aida N, Gunawan S, dan Widjaja T. 2012. Pembuatan mocaf dengan proses fermentasi menggunakan *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, dan *Rhizopus oryzae*. *JURNAL TEKNIK POMITS*. 1(1):1-6.
- Kustyawati ME, Sari M, Haryati T. 2013. Efek fermentasi dengan *Saccharomyces cerevisiae* terhadap karakteristik biokimia tapioka. *AGRITECH* 33(3): 281-288.
- Kustyawati ME, Rangga A, Setyani S. 2016. The role of *Saccharomyces cerevisiae* as modification agent on the cassava starch. *The Internationalseminar on Food security (UISFS)*. Pp 117-124.

- Kustyawati ME, Rangga A, Setyani S. 2017. The dynamic growth and chemical change of mixed cultures inoculation on tapioca fermentation. *Microbiology Indonesia*. 11(3):
- Miyazaki M, Van Hung P, Maeda T, Morita N. 2006. Recent advances in application of modified starches for breadmaking. *Food Science and Technology*, 17 (11): 591599.
- Oboh G. 2006. Nutrient Enrichment of Cassava Peels Using a Mixed Culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* spp. Solid Media Fermentation Techniques. *Electronic J. of Biotechnology*. (Online). Vol. 5, No. 1. (<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol9/issue1/full/1/index.htm.article>, diakses 24 November 2007)
- Pervez,S., Aman,A., Iqbal,S., Siddiqui, NN., and Qader SAU. 2014. Saccharification and liquefaction of cassava starch: an alternative source for the production of bioethanol using amylolytic enzymes by double fermentation process. *BMC Biotechnology* 14(49):1472–1482. <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/14/49>.
- Pomeranz & Shelleberger, 1991. *Bread Science & Technology*. AVI. Westport. Connecticut.
- Putri WDR, Widyaningsih D, Ningtyas DW. 2008. Produksi biolaktat kering kultur campuran *Lactobacillus* sp dan *S.cerevisiae*. *Jurnal Teknologi pertanian* 9(2):38-149)
- Muhiddin NH, Djide MN, dan As'ad S. 2014. Kandungan gizi umbi ubi kayu pahit (*Manihot aipi Phol.*) pada tahapan pengolahan sebelum fermentasi dan Wikau Maombo hasil fermentasi tradisional. *Biowallacea* 1(2):63-70.
- Sari, Merlya, 2009. Pengaruh penambahan *S.cerevisiae* terhadap sifat mikrobiologi tapioka, Skripsi, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Lampung.
- Subagio, A. 2006. Ubi Kayu substitusi berbagai tepung-tepungan. *Food Review*, 1 (3):

- Sudaryanto dan Andryanto N. 2013. Penurunan kandungan gluten pada roti manis dengan substitusi tepung tapioka asam. *Jurnal Rekapangan* 7(1):20-36.
- Suryani R. dan Nisa FC. 2015. Modifikasi pati singkong (manihot esculenta) dengan enzim α -amylase sebagai agen pembuih serta aplikasinya pada proses pembuatan marshmallow. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 3(2):723-733).
- Syamsir E, Hariyadi P, Fardiat D, Andarwulan N dan Kusnandar F. 2013. Karakterisasi tapioka dari lima varietas ubikayu (*Manihot utilisima* Crantz) asal Lampung. *Jurnal Agrotek* 5(1):93-105
- Tesfaw A dan Assefa F. 2014. Co-culture: A great promising method in single cell protein production. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. 9(2):12-20. DOI:10.5897/BMBR2014.0223.
- Winarno, 2002. *Kimia Pangan dan Gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Wong CW, Muhamad SKS, Dzukifly MH. 2007. Enzymatic production of linear long chain dextrin from sago (metoxylon sago). *Journal of Food Chemistry*. 100:774-780.

-oo0oo-



SACCHAROMYCES CEREVISIAE **DALAM FERMENTASI KAKAO**

Penanganan pascapanen kakao (*Theobroma cacao*) dimulai sejak pemetikan buah, fermentasi sampai pengeringan dan pengemasan. Pengolahan coklat bertujuan untuk mencapai coklat biji atau kakao biji yang memenuhi persyaratan mutu perdagangan yaitu kering, bebas dari sisa-sisa selaput berdaging (*pulp*), berwarna coklat, segar, merata, tidak pecah dan tidak keriput, bersifat rapuh, dan jika dibelah warna coklatnya merata pada belahan. Tahapan proses pengolahan kakao yang sangat penting adalah fermentasi yang bertujuan untuk meniadakan daya hidup biji, menjadikan selaput berdaging (*pulp*) mudah dihilangkan dari kulit biji, dan memberikan kesempatan terjadinya proses yang menuju ke pembentukan warna, rasa dan aroma. Demikian juga menghasilkan biji yang tahan terhadap hama dan jamur, selama penyimpanan dan menghasilkan biji dengan warna yang cerah dan bersih. Proses fermentasi kakao pada umumnya berlangsung secara alami oleh mikroorganisme yang terdapat dalam pulp itu sendiri (mikrobia indigenus) dan berlangsung di areal perkebunan. Fermentasi ini berlangsung selama 6 hari dengan pembalikan pada hari ke dua fermentasi dan setiap 24 jam untuk meningkatkan aerasi (Schwan, 1998). Fermentasi alami tidak terkontrol dan sering terjadi fermentasi yang tidak sempurna, atau terjadi over-fermentation. Keadaan ini menyebabkan masalah keasaman kakao biji dan kurangnya flavor, atau terjadi pembusukan. Jenis dan populasi mikroba akan mempengaruhi waktu fermentasi yang menghasilkan flavor kakao biji yang baik. Selaput berdaging (*pulp*) menyelimuti biji, berwarna putih dan

mengandung nutrisi untuk pertumbuhan mikrobia. Dalam biji kakao terjadi penguraian senyawa polifenol, protein dan gula oleh enzim. Penguraian senyawa-senyawa tersebut akan menghasilkan calon aroma, perbaikan rasa dan perubahan warna. Faktor yang berpengaruh terhadap keberhasilan fermentasi adalah wadah fermentasi, waktu, aerasi, pembalikan, aktivitas mikroba dan penguraian kandungan pulp. Wadah/alat fermentasi yang dibutuhkan yaitu kotak fermentasi terbuat dari lembaran papan atau berupa keranjang bamboo, daun pisang, karung goni. Lamanya fermentasi berlangsung berbeda-beda bervariasi antara 2 sampai 12 hari tergantung varietas kakao, dan dengan waktu pembalikan setelah 48 jam agar fermentasi biji merata. Fermentasi dapat diakhiri apabila pulp mudah dibersihkan dari kulit biji, kulitbiji berwarna coklat merata, temperatur telah turun menjadi 35, biji berwarna coklat dan agak kering serta aroma cuka yang menonjol, dan penampang biji nampak berongga, berwarna coklat dan warna ungu sudah hilang. Setelah membaca Bab ini diharapkan pembaca (1) mampu memahami tentang fungsi *Saccharomyces* dalam fermentasi kakao, (2) mampu menjelaskan perubahan kimia selama fermentasi dan perbaikan fermentasi menggunakan kultur starter *Saccharomyces cerevisiae*, (3) mampu menganalisis potensi *Saccharomyces* untuk memperpendek waktu fermentasi kakao.

Mikrobiologi Coklat

Lebih dari 40 spesies mikroorganisme tumbuh selama fermentasi kakao (Ardhana dan Fleet, 2003). Tetapi tidak semua mikroba tersebut mempunyai peran penting dalam fermentasi, sehingga seleksi perlu dilakukan terhadap mikroba yang mempunyai peran utama dalam pembentukan aroma, warna, flavor dan komponen kimiawi kakao biji. Hasil identifikasi dan profil pertumbuhan setiap jenis mikroorganisme yang terlibat dalam fermentasi tradisional biji coklat yang berasal dari tiga lokasi di pulau Jawa meliputi *Penicillium citrinum*, *Kloeckera apis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus plantarum* dan *Acetobacter pasteurianus*. Selama fermentasi kakao terjadi suksesi pertumbuhan mikroorganisme. Pada awal 24 jam fermentasi khamir mendominasi fermentasi, kemudian menurun dan digantikan oleh pertumbuhan bakteri asam laktat. Semula, peranan bakteri asam laktat dalam fermentasi kakao tidak diketa-

hui dengan jelas, sampai ditemukannya *Lactobacillus plantarum* yang konsisten berada selama fermentasi (Thompson *et al.*, 2001). Selanjutnya bakteri asam asetat mendominasi fermentasi dan memproduksi asam asetat, pada saat pulp mulai mencair dan oksigen mengalir ke dalam kotak fermentasi. Selama pertumbuhan bakteri asam asetat suhu dalam kotak meningkat ke sekitar 50°C, dan terjadi difusi asam dan panas ke dalam biji yang mengakibatkan kematian biji. Selanjutnya dimulai proses pembentukan warna, aroma, dan flavor melalui perombakan gula, asam amino, dan peptidapeptida secara enzimatik di dalam biji. *Saccharomyces cerevisiae* dan *Candida tropicalis* merupakan dominan khamir selama fermentasi kakao karena tingkat survival yang tinggi, 10⁷ cfu/g selama 36 jam (Ardhana dan Fleet, 2003). Jenis bakteri asam laktat *Lactobacillus cellobiosus* dominan sampai 48jam dan *Acetobacter pasteurianus* merupakan golongan bakteri asam asetat yang paling lama bertahan hidup dibanding *Acetobacter aceti* yang aktif pada 24 jam pertama fermentasi. Pada akhir fermentasi, bakteri pembentuk spora mulai tumbuh dan memproduksi *taint*, mikroorganisme didominasi oleh *Bacillus* spesies terutama *Bacillus pumilus* dan *Bacillus licheniformis*. Selama fermentasi konsentrasi tiga komponen utama dalam pulp yaitu alcohol, asam laktat dan asam asetat awalnya meningkat kemudian menurun, hanya konsentrasi asam asetat yang masih terdapat sampai akhir fermentasi

Proses Biokimiawi selama fermentasi kakao

Pulp berwarna putih dan mengandung 14% gula, 1,5% pektin, dan pH 3,5 (Schwan, *et al.*, 1998). Pulp merupakan media yang cocok untuk tumbuhnya mikrobia. Selama fermentasi aktivitas mikrobia dalam pulp akan memproduksi alcohol, asam, dan membebaskan panas (reaksi eksothermal). Adanya reaksi eksothermal ini menyebabkan difusi zat-zat metabolit tersebut ke dalam biji, akibatnya biji mati dan selanjutnya terjadi reaksi enzimatik pembentukan flavor, aroma dan warna. Proses perubahan biokimiawi dalam fermentasi kakao merupakan hasil aktivitas pertumbuhan yeast, bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat (Ardhana dan Fleet, 2003). Peran utama khamir adalah (1) merombak asam sitrat dalam pulp yang mengakibatkan naiknya pH dari 3.2 ke 4.2 dan akan mendorong pertumbuhan bakteri, (2) menghasilkan alcohol dalam kondisi low-oxygen dan kadar gula tinggi (3) menghasilkan asam organik (oxalate, phosphate, suksinat, malat dan

asetat) yang mempunyai permeabilitas tinggi sehingga dapat berdifusi kedalam biji dan mematikan biji (kotiledon), (4) menghasilkan senyawa organic volatile yang berperan dalam pembentukan precursor flavor kakao, dan (5) mensekresi pektinase yang menurunkan viskositas pulp sehingga terjadi aerasi dalam pulp. Proses ini didominasi oleh aktivitas pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*. Bakteri asam laktat pada umumnya merombak glukosa melalui jalur Embden-Meyerhof-Parnas, dan menghasilkan lebih kurang 85% asam laktat. Tetapi beberapa spesies bakteri asam laktat juga merombak glukosa melalui jalur Hexosa-monophosphate-Shunt, yang memproduksi 50% asam laktat ditambah alkohol, asam asetat, glyserol, mannitol dan CO₂. Bakteri asam laktat yang mendominasi pertumbuhan adalah jenis *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus lactis*. Oleh bakteri asam asetat alkohol dioksidasi menjadi asam asetat dan asam asetat dioksidasi menjadi CO₂ dan air. Reaksi oleh bakteri asam asetat ini berlangsung secara eksotermal sehingga menyebabkan suhu dalam pulp meningkat. Dengan demikian bakteri asam asetat berperan dalam pembentukan keasaman kakao biji, suhu tinggi dalam mass fermentasi, dan difusi serta hidrolisis protein dalam kotiledon. Bakteri asam asetat yang mendominasi pertumbuhan adalah jenis *Gluconobacter oxydans subsp. Suboxydans*, dan *Acetobacter aceti*. Bakteri aerobik pembentuk spora, *Bacillus sp*, memproduksi berbagai komponen kimia meliputi 2,3-butadienol, pyrazines, asam asetat, dan asam laktat pada kondisi fermentatif, yang dapat menyebabkan keasaman biji dan menimbulkan off-flavor. Ho *et al.* (2014) mengungkapkan bahwa bakteri asam laktat tidak signifikan berperan dalam proses fermentasi kakao, dan menemukan bahwa *Saccharomyces cerevisiae* secara signifikan berperan selama fermentasi kakao dengan menyumbangkan flavor dan efektivitas fermentasi.

Pada awal 24 jam fermentasi khamir mendominasi fermentasi, kemudian menurun dan digantikan oleh pertumbuhan bakteri asam laktat. Pada saat pulp mulai mencair oksigen mengalir ke dalam kotak fermentasi, bakteri asam asetat mulai tumbuh memproduksi asam asetat, dan suhu dalam kotak meningkat ke sekitar 50°C, terjadi difusi asam dan panas ke dalam biji, dan mengakibatkan kematian biji. Kemudian dimulai proses pembentukan warna, aroma, dan flavor secara enzimatik di dalam biji. Selama fermentasi, konsentrasi lemak menurun pada fraksi monogliserida,

digliserida, trigliserida, asam lemak bebas dan asam fosfatida, sedangkan kenaikan terjadi pada fraksi 'phosphatidyl choline', phosphatidyl serine', 'phosphatidyl inositol' dan 'phosphatidyl ethanolamine. Sementara konsentrasi lemak biji coklat yang tidak difermentasi sekitar 48.51% dan naik 2-6% setelah difermentasi (Rohaman, M.Maman, 2001).

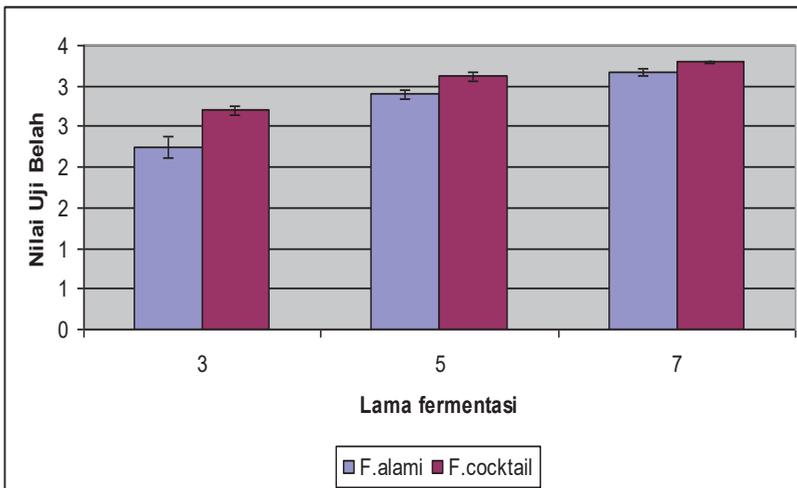
Perbaikan Fermentasi Kakao

1. Melalui fermentasi menggunakan kultur koktil *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis* dan *Acetabacter aceti*

Berdasarkan pada suksepsi pertumbuhan mikroba selama fermentasi maka perlu dilakukan fermentasi menggunakan kultur starter dalam upaya memperbaiki kualitas biji kakao Nib. Penggunaan inokulum starter dapat perlu melibatkan satu atau lebih jenis mikroba yang mewakili tiga kelompok mikroba yaitu kelompok yeast, bakteri asam laktat, dan kelompok bakteri asam asetat. Jenis yeast harus bersifat fermentatif yang tinggi dan mempunyai aktivitas enzim pektinolitik. *Saccharomyces cerevisiae* dipilih sebagai starter karena pertumbuhannya sangat dominan, memproduksi enzim pektinase yang dapat memfermen semua gula dalam pulp pada pH 3.5 sampai 4.2, toleran terhadap alkohol, dan tumbuh pada awal fermentasi yang berlangsung alami. Jumlah populasi yeast yang akan diinokulasi ditentukan berdasarkan atas kesamaan terhadap jumlah alkohol yang dihasilkan oleh yeast pada fermentasi alami. Densitas populasi yeast pada awal fermentasi alami sekitar 10^8 sel/g (Kustyawati dan Setyani, 2012). *Lactobacillus lactis* dan *Lactobacillus plantarum* dapat digunakan sebagai inokulum starter yang mewakili kelompok bakteri asam laktat, karena kedua jenis bakteri ini termasuk dalam kelompok homolaktik. *Lac.plantarum* adalah kelompok lactobacillus yang sangat umum dalam fermentasi laktat, mampu memfermen gula dalam jumlah besar, toleran terhadap keasaman substrat (pH 3.5), dan terdapat hampir disetiap fermentasi kakao. Jumlah populasi bakteri asam laktat pada fermentasi alami sekitar 10^7 sel/g yang diperoleh setelah 24jam fermentasi). Bakteri asam asetat jenis *Acetobacter aceti* dan *Gluconobacter oxydans* ditemukan dalam fermentasi kakao (Schwan, 1998), bakteri ini dapat tumbuh dalam konsentrasi alkohol 6.0%, toleran terhadap suhu sampai 45°C pada pH 3.5. *Acetobacter aceti* mampu mengoksidasi alkohol menjadi asam asetat dan selanjutnya mengoksidasi asam asetat

menjadi air dan CO₂. Jumlah populasi bakteri asam asetat yang diperoleh pada 48 jam fermentasi alami sebesar 10⁸ sel/g.

Fermentasi kakao dengan penambahan inokulum campuran yang terdiri dari *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis* dan *Acetobacter aceti* mempengaruhi perubahan kimiawi substrat selama fermentasi karena perubahan ekologi mikroflora di dalamnya (Kustyawati dan Setyani, 2012). Metode penambahan inokulum pada awal fermentasi mempercepat proses fermentasi pulp dan kematian biji, sedangkan penambahan inokulum secara bertahap menyebabkan kenaikan suhu dini dan mengakibatkan fermentasi kurang sempurna. Penambahan starter kultur pada fermentasi kakao dan lama fermentasi tidak berpengaruh terhadap kadar air, dan kadar benda asing, kadar biji pecah dan kadar gula reduksi namun berpengaruh terhadap organoleptik warna dan aroma, kadar lemak dan uji belah. Konsentrasi inokulum campuran terbaik sebagai starter dalam fermentasi kakao 10⁸ sel/kg dengan metode penambahan pada awal fermentasi, dan dapat mempersingkat fermentasi dari 7 hari menjadi 3 hari berdasarkan uji Belah (Cut Test) (Gambar 5.1, Tabel 5.1). Indeks fermentasi untuk mengetahui bahwa fermentasi dapat diakhiri. Indeks fermentasi menggunakan Cut Test untuk mengetahui fermentasi telah sempurna.



Sumber Kustyawati dan Setyani (2012)

Gambar 5.1. Nilai uji belah kakao pada fermentasi alami dan fermentasi menggunakan kultur campuran.

Tabel 5.1. Efek penambahan kultur koktil terhadap sifat kimia Nib dan dibandingkan dengan SIN 2012.

Parameter	F1L1	F1L2	F1L3	F2L1	F2L2	F3L3	SNI
Kadar air (%)	7,22± 0,01	6,88± 0,9	6,73± 0,3	7,32 ±0,6	6,88± 0,3	6,63± 0,2	7,5
Aroma	1,19	2,90	2,77	2,90	1,35	1,44	
Warna	3,69	3,69	2,85	3,73	2,29	2,25	
Kadar benda asing (%)	0,08 ±0,0	0,08 ±0,0	0,08 ±0,0	0,07± 0,0	0,08 ±0,0	0,09± 0,0	0,2
Kadar biji pecah (%)	1,76± 0,06	1,90 ±0,2	2,48 ±0,2	1,43± 0,2	2,16 ±0,06	2,49 ±0,1	2
Kadar lemak (%)	47,93± 1,1	48,54±1,1	41,93±2,3	50,01±2,7	45,27±0,61	39,05±0,6	
Kadar gula reduksi (%)	2,83± 0,07	2,410,17	1,27± 0,1	2,28±0,07	1,60 ±0,17	1,23± 0,1	
Nilai Uji Belah (%)	2,25 ±0,1	2,90± 0,1	3,17± 0,0	2,70± 0,0	3,12± 0,1	3,29± 0,0	

Sumber Novita (2009), Kustyawati&Setyani (2012)

Keterangan: F1=fermentasi alami,F2=penambahan kultur koktil, L=lama fermentasi 1,2,3 hari.

Fermentasi kakao *Theobroma cacao varietas Lindak* yang berasal dari Gedong Tataan Kabupaten Pesawaran, Lampung menggunakan campuran mikroorganisme yang terdiri dari *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis* dan *Acetobacter aceti* dipalorkan oleh Kustyawati dan Setyani (2012) (Tabel 5.2). Fermentasi dengan variasi yang terdiri dari: (1) fermentasi alami atau tanpa penambahan mikroorganisme; (2) fermentasi terkontrol dengan penambahan mikroorganisme yang terdiri dari *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis* dan *Acetobacter aceti* secara bersamaan yang ditambahkan pada awal fermentasi pada hari ke-0; (3) fermentasi dengan penambahan mikroorganisme secara bertahap yaitu *Saccharomyces cerevisiae* pada hari ke-0, *Lactobacillus lactis* pada hari ke-1, dan *Acetobacter aceti* pada hari ke-2. Penambahan mikroorganisme masing-masing sebanyak 10⁸ sel/1kg biji kakao, berdasarkan pada jumlah total mikrobia tersebut pada saat fase logaritmik selama fermentasi alami. Fermentasi dilakukan dalam kotak fermentasi berkapasitas 5 kg kakao segar, pada suhu ruang (33-35°C), selama 5 hari. Pola pertumbuhan khamir pada ke tiga variasi fermentasi tidak berbeda yaitu menurun secara perlahan. Demikian juga, bahwa penambahan mikroba campuran mengakibatkan kenaikan jumlah total bakteri asam laktat secara signifikan pada hari ke 1, dan menunjukkan pola pertumbuhan bakteri asam asetat berbeda-beda pada masing-masing variasi fermentasi (secara alami, penambahan mikroba campuran, penambahan mikroba

secara bertahap). Penambahan mikroba yang terdiri dari *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis* dan *Acetobacter aceti* dalam fermentasi kakao tidak mempengaruhi pertumbuhan dan populasi khamir dalam pulp kakao, tetapi menyebabkan populasi bakteri asam laktat lebih tinggi. Penambahan mikroba secara bertahap memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan bakteri asam asetat. Dari analisis mikroba diketahui bahwa yeast merupakan mikroba indigenus yang jumlahnya cukup signifikan, sebagai konsekuensi dari kondisi substrat fermentasi (pulp) yang mengandung gula dan senyawa pektin. Khamir mempunyai peran penting dalam fermentasi kakao dalam hal menghasilkan alkohol dalam kondisi oksigen yang terbatas dan kadar gula tinggi, yang selanjutnya alkohol dikonversi menjadi asam asetat. Khamir juga mensekresi pektinase untuk merombak pulp sehingga viskositas pulp menurun dan terjadi aerasi dalam pulp. Pertumbuhan khamir menghasilkan asam-asam terutama asetat, aerasi yang cukup dan keasaman biji karena terjadinya difusi asam asetat. Aerasi akan mendorong pertumbuhan bakteri asam asetat dan selanjutnya pertumbuhan bakteri asam asetat akan menekan laju pertumbuhan khamir. Disamping itu, tidak semua jenis khamir dapat bertahan hidup dalam alkohol. Sehingga alkohol dapat merupakan faktor pembatas bagi pertumbuhan khamir. Penghitungan jumlah mikroorganisme menggunakan media de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) dengan suplementasi 0,01% cycloheximide untuk bakteri asam laktat melalui inkubasi pada suhu 30°C selama 48jam, agar acetic acid medium (AAM) yang mengandung 1,5% pepton, 0,8% yeast ekstrak, 1% glukosa, 0,3% asam asetat, 0,5% etanol, 3% agar dan 0,01% cycloheximide untuk menghitung bakteri asam asetat pada suhu 42°C selama 96jam, dan media yeast ekstrak, pepton dan dextrose (YPD) yang mengandung 1% yeast extract, 2% peptone, 2% gluosa, dan 2% agar dan 0,01% chloramphenicol dan 0,015% biphenyl untuk menghitung jumlah khamir pada suhu 30°C selama 48jam.

Penggunaan starter *Saccharomyces cerevisiae* var *Chevalieri* yang ditambahkan dalam fermentasi kakao menunjukkan adanya perubahan senyawa penting penyumbang flavor Nib dan memperpendek waktu fermentasi (Cempaka et al., 2014). Derajat fermentasi yang digunakan sebagai indikator berakhirnya fermentasi sempuran adalah mengukur pH, indeks fermentasi dan total polifenol. Dibanding fermentasi kakao tanpa penambahan kultur, penambahan *S.cerevisiae* var *Chevalieri* menurunkan pH

Nib yang mengindikasikan produksi asam organik meningkat, kandungan polifenol menurun lebih tinggi, dan fermentasi secara sempurna lebih cepat dicapai terindikasi dari indeks fermentasi lebih tinggi (Tabel 5.2).

Tabel 5.2. Efek penambahan *S.cerevisiae var Chevalieri* terhadap derajat fermentasi kakao.

Parameter	Fermentasi alami	Penambahan starter
pH pulp	3,59 0,02	4,76 0,14
pH Nib	6,12 0,02	5,19 0,01
Total polifenol (mg/g)	1,13 0,13	0,81 0,27

Sumber Cempaka *et al.* (2014)

Pendekatan metode baru digunakan untuk menentukan peran khamir dalam fermentasi kakao dan kontribusinya terhadap kualitas cokelat (Ho *et al.*, 2013). Fermentasi biji kakao dilakukan dengan penambahan 200 ppm Natamycin untuk menghambat pertumbuhan khamir, dan resultan ekologi mikroba dan metabolisme, kimia Nib dan kualitas cokelat dibandingkan dengan (kontrol) fermentasi alami atau fermentasi normal. Khamir *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia kudriavzevii* dan *Kluyveromyces marxianus*, bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum* dan bakteri asam asetat *Acetobacter pasteurianus* dan *Gluconobacter frateurii* adalah spesies utama yang ditemukan dalam fermentasi kontrol. Di dalam fermentasi dengan penambahan Natamycin, spesies bakteri yang sama tumbuh namun pertumbuhan khamir adalah terhambat. Karakteristik fisik dan kimia Nib (kakao biji) menunjukkan bahwa fermentasi tanpa khamir meningkatkan kandungan shell, produksi etanol, alkohol tinggi (higher alcohol) dan ester lebih rendah seluruh fermentasi dan produksi pirazin pada biji kakao sangrai lebih rendah. Karakteristik mutu Nib hasil fermentasi biji kakao tanpa khamir memiliki warna keunguan-violet dan tidak sepenuhnya cokelat, dan cokelat yang dibuat dari biji kakao mempunyai rasa lebih asam dan tidak memiliki karakteristik flavor coklat. Kakao biji yang difermentasi dengan indikasi pertumbuhan khamir sepenuhnya berwarna coklat dan memberi cokelat dengan karakter khas coklat yang nyata disukai oleh panelis. Hal ini menunjukkan bahwa pertumbuhan dan aktivitas khamir penting untuk fermentasi biji kakao dan pengembangan karakteristik flavor cokelat.

2. Melalui Fermentasi dengan Modifikasi Aerasi

Modifikasi fermentasi melalui modifikasi jumlah lubang pada kotak fermentasi. Lubang pada kotak berfungsi sebagai aerasi selama proses fermentasi. Aerasi selama fermentasi kakao mempunyai peran sangat penting terhadap sifat kakao Nib terutama aroma kakao pada saat proses penyangraian. Penambahan starter *Saccharomyces cerevisiae* dalam fermentasi biji kakao *Theobroma cacao varietas Mulia* dan jumlah lubang aerasi pada kotak fermentasi (Gambar 5.2) berperan terhadap mutu biji kakao kering sesuai Standard Nasional Indonesia. Penambahan *S.cerevisiae* berpengaruh nyata terhadap suhu, hasil uji belah dan kadar lemak ($\rho < 0.05$), dan jumlah lubang berpengaruh terhadap hasil uji belah dan kadar lemak, walaupun interaksi kedua faktor penambahan *S.cerevisiae* dan jumlah lubang aerasi tidak berpengaruh nyata (Kristanto *et al.*, 2017). Modifikasi Fermentasi menggunakan starter *S.cerevisiae* dalam bentuk kering 0, 5% (b/b) dan jumlah lubang aerasi adalah 30 dengan diameter 0,015m³ dalam tiap 5,0 kg volume kotak (26x25x23mm) menghasilkan Nib dengan kadar air, lemak, dan pH terbaik selama fermentasi 3hari (Tabel 5.3).



Sumber Kustyawati dan Setyani, 2008

Gambar 5.3 Kotak fermentasi



Tabel 5.3. Efek penambahan *S.cerevisiae* dan aerasi pada kotak fermentasi terhadap Nib yang dihasilkan.

Parameter uji	Fermentasi alami	Modifikasi fermentasi	SNI
Kadar air Nib (% bb)	7,38±0,21	6,07±0,03	7,5
Kadar pH Nib	5,20±0,45	5,13±0,17	
Kadar lemak Nib (%)	43,05±0,32	50,21±0,11	

Sumber Kristanto (2017)

Keterangan: Modifikasi fermentasi= penambahan *S.cerevisiae* dan jumlah lubang 30 lubang dalam kotak fermentasi kapasitas 5,0 kg

Jenis dan populasi bakteri dalam suatu fermentasi berkaitan erat dengan kondisi ekstrinsik dan intrinsik. Dalam hal fermentasi kakao, tempat fermentasi, jenis kakao, dan kondisi geografis tempat tumbuh kakao mempunyai pengaruh terhadap ekologi mikrobial yang terlibat dalam fermentasi. Dengan alasan tersebut, maka jumlah bakteri asam laktat sedikit bervariasi pada suatu penelitian dengan penelitian yang lain. Bakteri asam laktat pada umumnya merombak glukosa melalui jalur Embden-Meyerhof-Parnas, dan menghasilkan lebih kurang 85% asam laktat. Namun, beberapa spesies bakteri asam laktat juga merombak glukosa melalui jalur Hexosa-monophosphate-Shunt, yang memproduksi 50% asam laktat ditambah alkohol, asam asetat, glyserol, mannitol dan CO₂ (Schwan *et al.*, 1998). Pertumbuhan bakteri asam laktat akan segera menurun karena pertumbuhan golongan bakteri ini akan mendorong pertumbuhan bakteri asam asetat. Walaupun pulp mengandung asam organik tetapi bakteri asam asetat tidak beraktivitas pada awal fermentasi karena kondisi ekstrinsik tidak tersedianya oksigen. Laju pertumbuhan bakteri asam asetat meningkat setelah tersedianya oksigen dan alkohol hasil perombakan bakteri asam laktat dan yeast. Oleh bakteri asam asetat, alkohol dioksidasi menjadi asam asetat dan asam asetat dioksidasi menjadi CO₂ dan air (air ini akan keluar dari box fermentasi). Reaksi oleh bakteri asam asetat berlangsung secara eksotermal sehingga menyebabkan suhu dalam pulp meningkat. Dengan demikian bakteri asam asetat berperan dalam pembentukan keasaman coklat biji, meningkatnya suhu dalam substrat fermentasi, dan difusi asam serta hidrolisis protein dalam kotiledon. Hasil penelitian fermentasi kakao dengan penambahan *Acetobacter aceti* pada hari ke 2 dapat memperpanjang masa pertumbuhannya, dan keadaan ini

sangat memungkinkan mempengaruhi proses kematian biji dan reaksi didalam biji. Bakteri asam asetat juga memetabolisme gula dan asam organik menghasilkan berbagai aldehid, keton dan beberapa produk volatil yang mempengaruhi sifat organoleptik biji kakao.

Suhu Fermentasi

Volume fermentasi, proses pembalikan, variasi kandungan komponen dalam substrat dan aerasi mempengaruhi perubahan suhu (Senanayake *et al.*, 1996). Suhu tinggi pada saat fermentasi disebabkan oleh reaksi eksotermis yang terjadi pada saat perubahan gula pulp menjadi etanol oleh aktivitas khamir yang mengakibatkan pulp meleleh, tetesan air dan oksigen bisa mengalir ke dalam tumpukan biji. Aerasi ini menyebabkan kenaikan suhu yang tajam dan mengakibatkan kematian biji. Pada saat biji mati maka akan dimulailah reaksi kimiawi di dalam kotiledon. Reaksi ini berperan dalam pembentukan flavor biji kakao. Terdapat dua fase penting selama fermentasi kakao yaitu: pertama, aktivitas khamir yang mengubah gula pulp menjadi alkohol selama fermentasi anaerobik di awal fermentasi dan kedua, aktivitas bakteri asam asetat mengoksidasi alkohol menjadi asam asetat dan selanjutnya menjadi CO₂ dan H₂O. Bila terjadi penurunan suhu pada fermentasi kakao, hal ini bisa disebabkan oleh proses aerasi yang berlebihan, dan akibatnya terjadi kehilangan panas dari tumpukan biji kakao ke luar lingkungan.

Nilai pH

Nilai pH ditentukan oleh besarnya konsentrasi H⁺ yang disumbangkan oleh asam-asam lemah di dalam substrat, dalam hal ini adalah asam sitrat, asam laktat dan asam asetat yang merupakan hasil perombakan gula oleh khamir, bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat. Ardhana dan Fleet (2003) yang melakukan fermentasi coklat asal Indonesia secara alami diketahui bahwa pH pulp sebelum fermentasi 3,7-3,9 dan meningkat menjadi 4,8-4,9 di akhir fermentasi (selama 5 hari). Keadaan ini menyebabkan terjadinya difusi asam dan hidrolisis protein di dalam kotiledon setelah biji mati. Oleh karena itu, bakteri asam asetat mempunyai peran dalam pembentukan flavor biji kakao.

Uji Belah (Cut Test)

Uji belah (cut test) digunakan sebagai standar untuk mengetahui apakah biji kakao sudah cukup terfermentasi dengan sempurna atau disebut sebagai derajat fermentasi (Senayake *et al.*, 1995). Berdasarkan kriteria visual, biji kakao fermentasi tanpa khamir memiliki kadar shell/kulit yang lebih tinggi, dan mengindikasikan pulpa belum sepenuhnya terdegradasi sehingga tetap melekat pada testa. *K. marxianus* berperan dalam mendegradasi pectin pulp. Fermentasi biji yang melibatkan khamir menghasilkan Nib yang memenuhi kriteria kadar shell, karena biji Nib kering berkualitas kadar shell tidak boleh melebihi 12-16% dari berat kering kacang. Fermentasi Nib tanpa khamir menghasilkan biji berwarna keunguan-violet dan tidak sepenuhnya cokelat, sehingga tidak lolos uji Belah (Cut test). Biji berwarna ini disebut sebagai fermentasi tidak sempurna (under fermented).

Dalam hal ini dikatakan bahwa aktivitas glikosidase biji diperlukan untuk mengkonversi anthocyanin biji (Ungu-merah) menjadi bentuk tidak berwarna, dan aktivitas enzim polyphenoloxidase biji dibutuhkan untuk mengubah senyawa fenolik menjadi polimer coklat dan etanol dapat memfasilitasi aktivitas enzim glycosidases (Kyi *et al.*, 2005). Disamping etanol, terbatasnya ketersediaan oksigen karena perombakan pulp yang tidak sempurna juga menyebabkan aktivitas enzimatik terganggu. Coklat yang dibuat dari biji terfermentasi tanpa khamir memiliki penampilan coklat muda/cerah, memiliki flavor coklat kurang intens dan kurang disukai dari pada biji terfermentasi dengan adanya khamir.

Nilai uji belah yang baik adalah sekitar 3,00, yaitu biji rata-rata berwarna coklat keunguan dengan warna coklat lebih dominan dan biji kakao dikatakan baik jika lebih dari 50% terfermentasi sempurna yaitu warna coklat dominan-coklat penuh (Senanayake *et al.*, 1995). Berdasarkan nilai rata-rata pada perlakuan tersebut, menunjukkan bahwa fermentasi dengan penambahan inokulum berpengaruh terhadap waktu fermentasi. Semakin meningkatnya aktivitas mikroba maka aerasi lebih baik dan suhu maksimum segera dicapai. Pada saat biji sudah mati, warna kotiledon kakao secara bertahap akan berubah dari ungu menjadi coklat. Selama fermentasi berlangsung terjadi perubahan senyawa kimia dalam pulp dan kotiledon. Asam asetat yang terbentuk dari oksidasi alkohol oleh

mikrobia dan suhu tinggi mengakibatkan kematian embrio biji. Proses ini merupakan prasyarat untuk inisiasi reaksi biokimia dalam biji yang akan membentuk flavor, terutama reaksi yang melibatkan komponen polifenol. Selain itu antosianin sebagai hasil hidrolisis polifenol dapat mengubah warna biji menjadi ungu sedangkan jika terjadi oksidasi senyawa tanin oleh enzim polifenol oksidase mengakibatkan terbentuknya warna coklat pada biji. Munculnya warna coklat pada biji menandakan bahwa fermentasi sempurna dan dapat diakhiri. Fermentasi sempurna dicapai pada hari ke tiga oleh fermentasi dengan penambahan inokulum, sedangkan pada hari kelima oleh fermentasi alami.

Perubahan warna dalam Nib sebagai Indek fermentasi indikator berakhirnya fermentasi diukur secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer (Gourieva dan Tserevitinov, 1979). Ekstraksi Nib menggunakan campuran methanol dan HCl 50 mL (97:3) untuk 0,5g bubuk Nib, dilanjutkan dengan pendinginan refrigerator terhadap filtrate selama 16 hingga 19 jam dan dipanen dengan cara penyaringan vakum. Indeks fermentasi diperoleh dengan menghitung ratio absorbansi pada 460 nm dan 530 nm.

Kadar lemak Nib

Nilai kadar lemak Nib hasil fermentasi baik fermentasi koktail maupun fermentasi alami sangat mungkin disebabkan oleh aktivitas mikroba. Lemak dalam biji kakao merupakan komponen yang paling mahal karena sebagai komponen utama yang memberikan cita rasa khas produk kakao. Kandungan lemak biji kakao dipengaruhi oleh musim tanam, dan perlakuan pengolahan. Biji kakao dari pembuatan musim hujan mempunyai kadar lemak tinggi. Sifat fisik biji kakao Nib setelah pengolahan yang meliputi kadar air, tingkat fermentasi dan kadar kulit berpengaruh pada rendemen lemak biji kakao. Pada proses fermentasi yang berlangsung secara anaerob, aktivitas mikroorganisme meningkatkan kandungan lemak dengan mengubah senyawa-senyawa seperti polifenol, protein, dan gula, misalnya oleh *Streptococcus lactis* dan *Saccharomyces cerevisiae*. Sementara itu, molekul lemak tidak mudah langsung digunakan oleh mikroba jika dibandingkan dengan protein dan karbohidrat, namun beberapa khamir dan bakteri dapat memperoleh kebutuhan karbon dan

energi dari persenyawaan lemak. Mikrobia yang tumbuh dalam kondisi anaerobik pada media yang mengandung lemak mengubah lemak tersebut menjadi karbondioksida dan etanol, lalu mengubah menjadi asam asetat. Hal inilah yang dapat menjelaskan kadar lemak menurun pada akhir fermentasi. Nilai kadar lemak yang tertinggi untuk fermentasi dengan penambahan starter kultur pada hari ketiga, dan hari kelima pada fermentasi alami (Kustyawati dan Setyani, 2012). Penurunan kadar lemak mungkin juga dikarenakan terjadi pengurangan komponen bukan lemak oleh aktivitas mikroba pada keping biji kakao. Sebagian komponen tersebut larut dalam air dan terurai menjadi komponen-komponen lain yang lebih kecil dan terdifusi keluar keping biji, sehingga kadar lemak relatif meningkat.

Kadar gula reduksi

Fruktosa dan glukosa sebagian besar dimanfaatkan oleh khamir selama fermentasi kakao. Sebaliknya, gula tersebut kurang dimanfaatkan ketika pertumbuhan khamir terhambat, dan meninggalkan residu fruktosa (16,5 mg/g) dan glukosa (35,5 mg/g) lebih tinggi di dalam pulp dan berpotensi untuk berdifusi ke dalam biji (kotiledon) (Ho *et al.*, 2013). Sementara biji kakao tanpa fermentasi mengandung sukrosa (17 mg/g) sebagai komponen gula utama dan glukosa pada konsentrasi rendah (0,5 mg/g) dan fruktosa (1 mg/g). Konsentrasi gula pereduksi dalam fermentasi kakao sangat penting berperan dalam pengembangan cokelat flavor melalui reaksi Maillard dengan asam amino selama penyangraian biji kakao. Sukrosa dalam Nib mengalami hidrolisis seluruhnya selama fermentasi baik dalam keberadaan khamir maupun tidak, dan mengakibatkan peningkatan secara progresif terhadap konsentrasi fruktosa dan glukosa. Hal ini menyebabkan meningkatnya aktivitas invertase selama fermentasi, namun konsentrasi fruktosa dan glukosa yang tinggi tidak menunjukkan adanya difusi ke dalam biji (kotiledon), atau kemungkinan dimetabolisme menjadi senyawa lain. Pada hal gula tersebut mempunyai peran dalam pembentukan flavor kakao.

Nilai kadar gula reduksi kakao menurun dengan semakin lamanya fermentasi pada setiap perlakuan penambahan inokulum campuran (*Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis* dan *Acetobacter aceti*) (Kustyawati

dan Setyani, 2012). Gula reduksi yang berasal dari penguraian karbohidrat oleh *Saccharomyces cerevisiae* dalam pulp semakin menurun karena khamir hanya dapat hidup pada awal fermentasi. Hasil perombakan karbohidrat oleh *Saccharomyces cerevis* kemudian dilanjutkan oleh bakteri *Lactobacillus lactis* yang memanfaatkan gula sebagai sumber energinya sehingga gula reduksi semakin menurun sampai akhir fermentasi. Disamping itu, kelompok bakteri asam laktat homofermentatif mengubah kira-kira 95% glukosa dan heksosa lainnya menjadi asam laktat (Jay, 2005). Sementara itu, kelompok heterofermentatif memecah glukosa menjadi asam laktat, CO₂, etanol, asam asetat dan asam format.

Etanol adalah metabolit utama dari fermentasi pulp dan sebagai agensia utama dalam proses kematian biji serta menginisiasi pengembangan cokelat flavor. Produksi etanol berkorelasi dengan pertumbuhan khamir dan fermentasi gula dalam pulp oleh khamir dimana konsentrasi etanol dalam pulp meningkat dan kemudian menurun dengan berlangsungnya proses fermentasi. Penurunan alkohol pada tahap fermentasi selanjutnya adalah diduga disebabkan oleh proses oksidasi menjadi asam asetat oleh bakteri asam asetat, dan akibat penguapan oleh meningkatnya suhu dalam massa kakao. Gliserol merupakan produk sekunder yang penting sebagai hasil metabolisme gula oleh khamir. Gliserol memberikan kontribusi terhadap sifat sensori mouth bernuansa rasa manis, sedangkan produksi mannitol dalam pulp (9-35mg/g) dan biji (1,5-5 mg /g) selama fermentasi biji kakao (Papalexandratou *et al*, 2011). Hal ini terkait dengan pertumbuhan *L. fermentum* oleh kemampuannya untuk memetabolisme fruktosa langsung menjadi manitol. Mannitol memiliki rasa manis dan sejuk yang berkontribusi terhadap karakteristik sensorik cokelat.

Asam sitrat, asam asetat dan asam laktat memiliki peran kunci dalam pengembangan karakter coklat (De Vuyst *et al*, 2010). Terlepas dari fungsinya langsung pada kualitas sensorik, mobilitas molekul asam asam tersebut keluar masuk biji/kotiledon mempengaruhi keasaman/pH biji dan aktivitas enzim biji seperti protease dan invertase, dimana enzim ini berperan dalam produksi asam amino bebas, peptida dan gula reduksi, yang semuanya berdampak pada cokelat flavor. Asam sitrat adalah asam utama dalam unfermented cocoa pulp (5-40 mg/g) dan biji (2-9 mg/g) (Ardhana dan Fleet, 2003). Kinetika pemanfaatan asam dalam pulp

maupun dalam biji selama fermentasi tidak berbeda baik ada atau tidak adanya khamir. Pemanfaatan asam lebih berkaitan dengan pertumbuhan bakteri asam laktat seperti *Lactococcus lactis* dan *L. fermentum*, tetapi tidak *L. plantarum*. Namun, perubahan konsentrasi asam dalam pulp tidak nyata sebagai perubahan konsentrasi asam dalam biji, menunjukkan ketidakmampuan asam berdifusi secara bebas ke dalam biji. Sangat mungkin asam ini mengadakan metabolisme sendiri di dalam biji.

Produksi asam asetat pada konsentrasi 1-2% selama fermentasi diperlukan untuk membunuh biji/Nib, dapat berasal dari oksidasi etanol oleh bakteri asam asetat (Thompson *et al.*, 2013). Hadirnya bakteri asam laktat baik heterofermentatif maupun bakteri asam laktat bersifat homofermentatif dapat menghasilkan asam asetat dari gula fermentable dalam kondisi tertentu serta dari transformasi fruktosa menjadi manitol dan metabolisme sitrat. Disamping itu, dua mekanisme lain untuk produksi asam asetat yaitu (1) selain etanol pengoksidasi, bakteri asam asetat juga dapat menghasilkan asam asetat langsung dari metabolisme gula; (2) khamir juga dikenal menghasilkan asam asetat melalui metabolisme gula. Produksi etanol oleh khamir mungkin mempercepat tingkat pembentukan asam asetat dan akibatnya mematikan biji, namun demikian etanol tidak harus ada untuk mencapai konsentrasi asam asetat yang diperlukan untuk mematikan biji. Fermentasi biji kakao dengan tidak adanya khamir selalu menghasilkan pH pulp dan pH biji lebih rendah dibanding jika khamir berpartisipasi dalam fermentasi. Hal ini dapat terjadi bahwa dengan tidak adanya pertumbuhan khamir akan ada fermentasi pulp yang lebih cepat oleh bakteri asam laktat dan memproduksi asam laktat. Namun demikian asam laktat yang terdapat di dalam biji berasal dari asam laktat dari luar biji yang berdifusi ke dalam biji, dan bukan berasal dari adanya metabolisme di dalam biji.

Peran khamir dalam flavor kakao

Senyawa kimia penyusun flavor cokelat sangat kompleks, yaitu lebih dari 500 komponen non-volatil dan volatile berkontribusi pada karakter flavor cokelat (Lima *et al.*, 2011). Beberapa komponen volatile merupakan senyawa intrinsik dalam biji, beberapa komponen merupakan hasil dari proses metabolisme biji setelah mati, beberapa sebagai metabolit

yang berasal dari aktivitas mikroba yang berpartisipasi selama fermentasi, dan beberapa merupakan hasil reaksi Maillard dan reaksi lain yang terjadi selama penyangraian biji. Khamir berperan dalam semua proses kimia tersebut baik langsung maupun tidak langsung. Secara langsung, khamir melangsungkan fermentasi gula pulp menghasilkan berbagai jenis metabolit yang mudah menguap (misalnya, alkohol tinggi, asam organik, ester, aldehida, keton, dll) yang terkenal sebagai senyawa aromatik dan bersifat avorant. Dalam kasus fermentasi biji kakao, tidak jelas bagaimana senyawa volatil tersebut berdampak pada coklat flavor, dengan alasan bahwa pertama, senyawa tersebut harus berdifusi ke dalam biji dan, kedua, sangat mungkin bahwa senyawa tersebut akan sebagian besar hilang oleh penguapan atau sebaliknya mengalami transformasi membentuk senyawa lain selama proses penyangraian biji. Dalam beberapa literatur disebutkan bahwa senyawa metabolit berkontribusi pada pembentukan senyawa yang khas seperti estery, fruity, floral dan beberapa aroma khas yang membentuk karakter coklat. Semua senyawa alkohol tinggi (higher alcohol), ester, aldehid dan keton termasuk sebagai kunci volatil yang berkontribusi terhadap aroma coklat dan flavor, dan yang paling menonjol kontribusinya adalah phenylacetaldehyde, benzaldehida, phenylethanol, 3-metil-1-butanol, phenylethylacetate dan 2heptanone. Ester, etil asetat dan isoamil asetat (juga dikenal sebagai isopentil asetat) juga diproduksi selama fermentasi. Hampir tidak ada senyawa alkohol tinggi atau ester ditemukan didalam pulp atau biji yang difermentasi tanpa khamir, sehingga menunjukkan bahwa ragi dan bukan bakteri asam laktat atau bakteri asam asetat berperan dalam produksi senyawa tersebut dan efeknya pada coklat flavor. Sehubungan dengan aldehida, aldehid hanya sedikit diproduksi di dalam pulp, dibandingkan di dalam biji, dan menunjukkan bahwa aldehid sebagian besar dihasilkan selama fermentasi oleh reaksi biokimia dalam biji. Produksi aldehid juga tidak dipengaruhi oleh keberadaan khamir *S.cerevisiae*. Senyawa keton yang paling banyak ditemukan adalah 2-heptanone dan 2-nonanone, dimana kedua sintesis kedua senyawa ini tidak dipengaruhi oleh aktivitas mikroba. Senyawa pyrazin merupakan senyawa volatile yang paling berkontribusi pada flavor coklat. Pirazin muncul di dalam biji terfermentasi setelah penyangraian dan senyawa volatile yang dominan adalah 2,3,5,6, tetrametil pirazin. Biji terfermentasi tanpa khamir mempunyai volatile pirazin

kurang menghasilkan karakter coklat. Pirazin terutama dibentuk selama penyangraian oleh reaksi antara gula reduksi dan asam amino bebas. Oleh karena itu, khamir mempunyai peran penting berkontribusi pada tingkat konsentrasi gula reduksi dan asam amino bebas di dalam biji. Asam amino bebas di dalam biji meningkat selama fermentasi dan ditimbulkan oleh aktivitas enzim endoprotease dan eksoprotease yang mendegradasi protein cadangan di dalam biji. Selama fermentasi konsentrasi asam amino meningkat 2-3 kali lipat demikian juga konsentrasi asam amino hidrofobik seperti fenilalanin, leusin, dan tyrosin. Khamir tidak berperan di dalam peningkatan asam amino di dalam biji. Pirazin tidak ditemukan di dalam pulp atau biji yang tidak terfermentasi, golongan khamir, bakteri asam laktat, dan bakteri asam asetat yang terlibat di dalam fermentasi biji kakao juga tidak melakukan sintesis pirazin. Namun beberapa studi mengatakan bahwa produksi pirazin selama fermentasi berkaitan dengan pertumbuhan *Bacillus sp* (Hashim *et al.*, 1998).

Berkaitan dengan produksi asam amino bebas, pemecahan protein biji menghasilkan berbagai peptida yang dianggap berkontribusi khusus pada coklat flavors. Pembentukan peptida tersebut muncul dari aktivitas protease tertentu dan berkombinasi dengan keasaman biji pada kisaran pH 5,0-5,5 menghasilkan chocolate flavor yang khas. Hal ini diperkuat dengan hasil penelitian yang menunjukkan nilai pH Nib/biji menurun selama fermentasi dari 6,5-7,0 menjadi 4,5 - 5,5 (Ho *et al.*, 2013). Nilai pH dalam biji selalu sedikit lebih rendah ketika aktivitas pertumbuhan khamir dalam fermentasi terhambat. Namun tidak berpengaruh pada sintesis asam amino dalam biji. Polifenol, epicatechin (10-40 mg/g) dan catechin (0.2-10 mg/g) dan alkaloid, theobromine (1-25 mg/g) dan kafein (0,06-8 mg/g) adalah komponen penting dari biji kakao yang tidak difermentasi dan berkontribusi pada rasa pahit dan getir (astringency) pada karakter coklat. Konsentrasi senyawa polifenol dan alkaloid tersebut menurun sekitar 10-20% selama fermentasi karena terjadi proses difusi keluar dari nibs. Namun, pertumbuhan khamir tidak mempunyai dampak terhadap perubahan senyawa polifenol dan alkaloid tersebut.

Khamir terutama *Pichia kluyveri* dan *Kluyveromyces marxianus* diketahui member kontribusi terhadap flavor coklat, walaupun kedua khamir tersebut tidak dominan pertumbuhan nya selama fermentasi

(Crafack *et al.*, 2013). Produk coklat yang dibuat dari biji Nib hasil fermentasi dengan menambahkan *P.kluyveri* dan *K.marxianus* mempunyai flavor berbeda dan lebih baik dari coklat dari Nib hasil fermentasi alami.

Latihan

1. Apakah terjadi suksesi pertumbuhan mikroorganisme selama fermentasi kakao? Jelaskan jawaban kalian.
2. Mengapa penambahan kultur starter dapat mempercepat proses fermentasi?
3. Apakah terjadi perubahan kimia dalam Nib dengan adanya penambahan starter fermentasi?

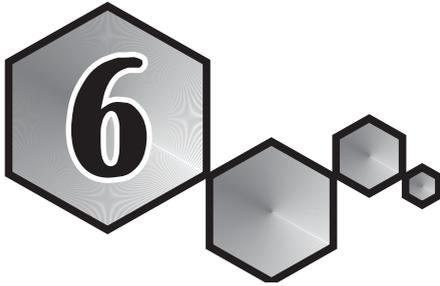
DaftarPustaka

- Ardhana, M. and G.H. Fleet. 2003. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *Inter. J. of Food Microbiol.* 86:87-99.
- Boekhout, T. and V.Robert., 2003. *Yeasts in Food: Beneficial and detrimental aspects.* CRC Press, Woodhead Publishing Limited Cambridge England, pp 391-438.
- De Vuyst L, Lefeber T, Papalexandratou Z, Camu, N. 2010. The functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation. In: Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G.M. (Eds.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria – Novel Applications.* Wiley-Blackwell, USA, pp. 301-325.
- Delves-Broughton, J., Thomas, L.V., Doan, C.H., Davidson, P.M., 2005. Natamycin, In:Cempaka L, Aliwarga L, Purwo S dan Kresnowati MTAP. 2014. Dynamics of Cocoa Bean Pulp Degradation during Cocoa Bean Fermentation: Effects of Yeast Starter Culture Addition. *J. Math. Fund. Sci.*, Vol. 46, No. 1, 2014, 14-25
- Crafack M, Mikkelsen MB, Saerens S, Knudsen M, Blennow A, Lowor S, Takrama J, Swieger JH, Petersen GB, Heimdal H, Nielsen DS. 2013. Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 167:103-116.

- Gourieva, K. & Tserevitinov, O. 1979, Method of Evaluating the Degree of Fermentation of Cocoa Beans, U. Patent, Editor.
- Hashim, P., J. Selamat, S.K.S.Muhammad, dan A.Ali. 1998. Effect of mass and turning time on free amino acids, Peptide-N, sugar, and Pyrazine concentration during cocoa fermentation. *J.Sci.Food Agric.*78: 543-550 Ho *et al.*, 2013
- Ho VTT, Zhao J, Fleet G. 2014. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology.* 174:72-87
- Jay J, Loessner MJ, Golden DA. 2005. *Modern Food Microbiology*, 7th ed Springer USA hal 101-118.
- Kristanto WH. 2017. Pengaruh penambahan *S.cerevisiae* dan jumlah lubang kotak pada fermentasi buah kakao *Theobroma cacao* terhadap mutu biji kakao kering. Skripsi. Universitas Lampung, BandarLampung.
- Kustyawati ME. & Setyani S. 2012. *Effects of Mixed Starter Addition to the Chemicals and Microbiological Changes during Cocoa Bean Fermentation* (Text in Indonesian), *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*, 13(2), pp. 73-84, 2008.
- Kyi TM, Daud WRW, Mohammad AB, Wahid Samsudin M, Kadhum AAH. Talib MZM. 2005. The kinetics of polyphenol degradation during the drying of Malaysian cocoa beans. *Int. J. Food Sci. Technol.* 40, 323–331.
- Leal, G.A., Gomes, L.H., Efraim, P., Tavares, F.C.A., Figueira, A., 2008. Fermentation_of cacao Lima LJR, Almeida MH, Rob Nout, MJ, Zwieterin MH. 2011. *Theobroma cacao L., The Food of the Gods: Quality Determinants of Commercial Cocoa Beans, With Particular Reference to the Impact of Fermentation.* *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51: 731-761.
- Novita, D. 2009. Pengaruh penambahan *S.cerevisiae* terhadap mikrobiologi kakao nib, Skripsi, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Univeristas Lampung.
- Papalexandratou Z, Camu N, Falony G, De Vuyst, L, 2011. Comparison of the bacterial species diversity of spontaneous cocoa bean

- fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil. *Food Microbiology* 28, 964–973.
- Payne MJ, Hurst WJ, Miller KB, Rank C, Stuart DA. 2010. Impact of fermentation, drying, roasting, and dutch processing on epicatechin and catechin content of cacao beans and cocoa ingredients. *Journal Agric. Food Chem.* 58, 10518–10527.
- Rohaman, M.Maman (2001) Komposisi lemak biji coklat. *Warta IHP. Bogor : BBIHP, Vol. 7 (2) 1990 : p. 35 - 40 ; 0, 0, 0, Ref. ISSN : 0215-1243*
- Schwan, R.F. 1998. Cocoa fermentation conducted with a defined microbial inoculum. *Appl. and Environmental Microbiol.* 64(4):1477-1483.
- Sipayung, TG. 2009. Pengaruh penembahan *Saccharomyces cerevisiae* pada fermentasi kakao, Skripsi, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Lampung.
- Thompson, S., Miller, K. & Lopez, A., Cocoa and Coffee, in *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, M.P. Doyle, L.R. Beuchat & Montville, T.J., eds., Washington DC: ASM Press, pp. 721-736, 2001.

-oo0oo-



SACCHAROMYCES CEREVISIAE DALAM PANGAN TERFERMENTASI

Pangan terfermentasi yang diulas pada Bab ini meliputi tempe, kopi, madu dan markisa. Keikutsertaan *Saccharomyces cerevisiae* dalam fermentasi produk-produk tersebut bermanfaat dalam memperbaiki aroma dari produk hasil fermentasinya. Tempe adalah makanan hasil fermentasi yang dibuat dari kedelai diinokulasi dengan jamur *Rhizopus oligosporus* dalam fermentasi padat. Tempe mempunyai aroma khas tempe (*mushroomi dan beany*) yang walaupun disukai oleh konsumen tempe, namun tidak sedikit pula yang kurang menyukai aroma tersebut. Modifikasi tempe dengan aroma yang baru dapat dihasilkan dari fermentasi dengan penambahan *S. cerevisiae*. Kopi merupakan produk yang diunggulkan karena aroma yang dihasilkan pada saat kopi diseduh dengan air mendidih. Fermentasi kopi menggunakan starter sangat mungkin akan menghasilkan aroma yang mungkin berbeda. Markisa (*Passiflora edulis*) adalah buah tropis yang banyak tumbuh di beberapa daerah di Indonesia. Markisa ungu mempunyai rasa manis sedangkan markisa kuning mempunyai rasa asam yang kurang disukai. Fermentasi jus markisa dengan starter *Saccharomyces cerevisiae* memperbaiki sensory dan fungsionalnya. Fermentasi madu belum banyak dilakukan di Indonesia, namun bila terjadi kemelimpahan produksi madu proses fermentasi dapat menghasilkan produk baru dan mencegah kerusakan dan kerugian secara ekonomi. Setelah membaca Bab ini diharapkan pembaca mampu (1) memahami tentang fermentasi berbagai produk oleh aktivitas *S. cerevisiae*, (2) menjelaskan peranan *S. cerevisiae* dalam

memodifikasi sifat produk hasil fermentasi, (3) menganalisa keuntungan dan kerugian produk hasil fermentasi.

Fermentasi Pembuatan Tempe

Fermentasi tempe merupakan fermentasi dua tahap yaitu fermentasi oleh aktivitas bakteri yang berlangsung selama proses perendaman kedelai, dan fermentasi oleh kapang yang berlangsung setelah diinokulasi dengan kapang. Komposisi dan pertumbuhan mikroflora tempe selama fermentasi sangat menarik untuk dicermati karena ternyata tidak hanya *R. oligosporus* yang berperan. Walaupun *R. oligosporus* berperan utama dalam pembuatan tempe, khamir kemungkinan juga dapat tumbuh selama fermentasi tempe. Sehingga analisis mikrobiologis sangat perlu diungkapkan lebih mendetil agar keterlibatan setiap jenis mikroorganisme dalam pembuatan tempe dapat diketahui dengan jelas. Khamir (ragi) sudah lama diduga ikut serta dalam fermentasi tempe (Nout dan Kiers, 2005), tetapi peranan khamir dalam pembuatan tempe belum mendapatkan perhatian yang serius. Beberapa jenis khamir telah ditemukan dalam tempe yang dipasarkan dan selama perendaman kedelai untuk pembuatan tempe, tetapi khamir yang dalam perendaman kedelai tidak ditemukan dalam produk tempennya. Bab ini mengulas fungsi beberapa spesies khamir dalam pembuatan tempe baru, kopi, madu, markisa, dan nasi. Setelah membaca dan menganalisis isi bab ini diharapkan pembaca mampu memahami peran khamir dalam memperbaiki karakteristik produk pangan.

Khamir dalam pembuatan tempe

Empat spesies khamir terpilih berdasarkan kemampuannya memproduksi enzim lipase dan protease yaitu *Saccharomyces boulardii*, *Yarrowia lipolytica*, *Aerobasidium pullulans* dan khamir yang menyerupai kapang *Geotrichum candidum*, masing-masing diinokulasikan bersama dengan *Rhizopus oligosporus* dalam kedelai untuk fermentasi temped an interaksi pertumbuhannya dengan bakteri dan kapang diamati (Kustyawati, 2009). Ke empat khamir tersebut merupakan penghasil enzim ekstraseluler lipolitik dan proteolitik yang sangat tinggi (Buzzini dan Martini, 2002). Bila khamir mampu tumbuh dan berinteraksi dengan mikroflora lain selama fermentasi

maka kemungkinan khamir mempunyai peran dalam meningkatkan kualitas nutrisi dan flavor tempe.

Selama ini tempe dibuat menggunakan starter ragi tempe yang sudah banyak digunakan yaitu ragi Raprima. Ragi Raprima adalah produk yang sudah dipasarkan. Namun Kustyawati (2009) berhasil membuat tempe menggunakan campuran kultur starter *R. oligosporus* dan *Saccharomyces boulardii*, dan menghasilkan tempe dengan aroma harum seperti aroma minuman fermentasi buah anggur atau juga seperti aroma tape. Mikroorganisme di dalam pembuatan tempe sangat menentukan produk tempe yang dihasilkan baik nilai nutrisinya maupun gizi dan fungsionalnya. Komposisi mikroorganisme yang terdiri dari kapang *R. oligosporus*, khamir *S. boulardii* dan bakteri tempe harus dalam jumlah yang seimbang untuk menghasilkan tempe. Tempe segar atau tempe yang telah terfermentasi selama 30-36 jam mengandung populasi kapang *R. oligosporus* berkisar antara $1-5 \cdot 10^7$ sel/g, khamir *S. boulardii* berkisar antara 10^5-10^7 cfu/g, dan bakteri yang didominasi oleh *Bacillus sp* berkisar antara 10^5-10^9 cfu/g.

Pembuatan tempe menggunakan penambahan biakan khamir disamping kapang *R. oligosporus* khamir ternayata dapat tumbuh bersama dengan *R. oligosporus*, dan pertumbuhannya dapat mendorong pertumbuhan kapang pada tempe dan mengubah penampakan dan flavor tempe. Pertumbuhan bakteri tidak dipengaruhi oleh yeast. Khamir merupakan bagian dari mikroflora fermentasi pangan yang peranannya bervariasi tergantung jenisnya. Umumnya khamir berkontribusi pada interaksi antara mikroorganisme, perubahan tekstur dan bioseintesa komponen flavor. Bakteri tumbuh pada populasi 10^5-10^9 cfu/g. Pertumbuhan sigmoidal *R. oligosporus* sampai 36 jam fermentasi dan selanjutnya menurun di akhir fermentasi. *S. boulardii* dapat tumbuh bersama *R. oligosporus* sampai pada populasi 10^7 cfu/g dan pertumbuhan *R. oligosporus* sampai dengan populasi 10^3 cfu/g sampai akhir fermentasi yaitu 48jam. *S. boulardii* mempunyai pertumbuhan mengikuti kapang *R. oligosporus* yang kemungkinan terdapat simbiosis yang saling menguntungkan dalam hal ketersediaan nutrisi antar keduanya. Pada fermentasi kedelai dengan *R. oligosporus* dan *S. boulardii*, menghasilkan tempe dengan aroma harummanis yang menutupi aroma kedelai pada umumnya karena khamir mempunyai aktivitas proteolitik dan lipolitik yang sangat tinggi sehingga mampu menghidrolisa protein

maupun lemak menghasilkan asam amino, ester, asam lemak, etanol, acetaldehid, ethil acetate dan ethyl butyrate yang merupakan komponen flavor dan aroma. Khamir juga mampu menstimuli pertumbuhan mikroba lain dengan menghasilkan faktor tumbuh. *Saccharomyces boulardii* adalah jenis *S.cerevisiae* yang mempunyai sifat probiotik. Kandungan alkohol dalam tempe tidak diamati karena tempe yang dihasilkan tidak menunjukkan aroma yang beralkohol. Potensi *S. boulardii* dalam tempe sebagai agensia probiotik sangat menarik untuk dikaji lebih lanjut.

Pembuatan tempe juga telah dilakukan menggunakan ragi tempe atau biakan murni *R.oligosporus* dengan menambahkan kultur khamir. Berbagai jenis khamir yang sudah digunakan untuk ditambahkan ke dalam fermentasi pembuatan tempe disamping menggunakan kultur *R.oligosporus* yaitu *Yarrowia lipolytica*, *Geothricum candidum*, *Aerobasidium pullulans* dan *Saccharomyces cerevisiae*. Tempe hasil fermentasi menggunakan *R.oligosporus* dengan menambahkan *Y.lipolytica* mempunyai aroma buah (fruity), karena *Y. lipolytica* dapat memproduksi γ Decalactone yang mengeluarkan aroma buah seperti strawberi, apricot dan peach. Tetapi penggunaan *Y. ipolytica* dalam fermentasi tempe memerlukan pemikiran lebih mendalam, karena aktivitas enzim lipase dan protease yeast ini sangat bervariasi sehingga seleksi spesies sangat penting dilakukan. Tempe yang dibuat dengan menambahkan *G.candidum* mempunyai warna yang lebih putih dengan lapisan miselium seperti beludru yang dihasilkan oleh miselium *G.candidum*. *G. candidum* adalah jenis khamir yang menyerupai kapang, mempunyai miselium yang tidak berseptata sehingga sering disebut *yeast-like fungi*. Enzim yang diproduksi oleh khamir ini mampu menghidrolisa lemak dan protein dan menghasilkan komponen precursor aroma, misalnya komponen volatile sulfur (VSCs, volatile sulfur compounds), dan menghidrolisa α dan β -kasein yang dapat meningkatkan kadar asam amino (Boutrou dkk., 2005). Sehingga kemungkinan *G. candidum* sebagai penyumbang aroma dalam tempe dapat dikaji lebih mendalam. Fermentasi kedelai yang diinokulasi dengan *A. pullulans* tidak menghasilkan tempe. Khamir *Aerobasidium pullulans* berada pada fase lag sampai 24 jam dan selanjutnya mati. Demikian pula pola pertumbuhan *R. oligosporus*, kapang pada fase lag dan mati. Tetapi bakteri dapat bertahan sampai 24 jam dan mengalami pertumbuhan sampai akhir fermentasi. Kedelai busuk dan lengket kemungkinan oleh senyawa yang

dihasilkan oleh *A. pullulans*. Senyawa tersebut juga diduga menghambat pertumbuhan kapang dengan tidak tersedianya oksigen yang cukup. *Aerobasidium pullulans* dikenal sebagai yeast hitam ("Black yeast") karena memproduksi melanin, tergolong mikroorganisme terapan penting karena produksinya berbagai enzim sehingga memungkinkan untuk dapat tumbuh dalam berbagai medium, dan dapat juga tumbuh dalam medium yang mengandung fenol, cresol, dan lignin. Kedelai berwarna kehitaman, agak lengket dan berbau tanah. Ada beberapa kemungkinan penyebabnya antara lain konsentrasi *A. pullulans* yang tinggi 10^5 cfu/g, sel lisis yang mungkin menghambat *R. oligosporus*, atau pertumbuhan bakteri alami yang sangat tinggi.

Pembuatan tempe menggunakan kultur yang terdiri dari kultur murni *R. oligosporus* dan *Saccharomyces boulardii* menghasilkan tempe dengan sifat fungsional yang lebih baik dari tempe biasa yaitu tanpa penambahan *S. boulardii* (Tabel 6.1). Namun demikian pertumbuhan khamir, kapang dan bakteri selama fermentasi tidak mempengaruhi kandungan isoflavan, kandungan vitamin B₁₂ tak dipengaruhi oleh penambahan jenis khamir, khamir mempunyai kontribusi dalam meningkatkan kandungan asam folat kecuali *G. candidum*. Tempe yang dibuat dengan kultur *R. oligosporus* mengandung asam folat 72,76µg/100g berat tempe kering, sedang tempe yang dibuat dengan *R. oligosporus* dan khamir *S. boulardii*, *Y. lipolytica*, dan *A. pullulans* mengandung asam folat berturut-turut 89,28; 19,62; dan 20,207 ug/100g berat tempe kering. Tetapi besarnya kandungan folat yang ditemukan pada penelitian ini lebih kecil dari kandungan asam folat dalam tempe mentah yaitu 416,4 ug/100g berat kering. Tempe (tempe kedelai) merupakan sumber isoflavan yang sangat potensial. Isoflavan dalam tempe merupakan bentuk isoflavan bebas atau aglikon genistein, daidzein, dan glisitein karena telah mengalami hidrolisis selama fermentasi. Mikroba seperti bakteri, algae, lumut, dan jamur tidak mampu mensintesis senyawa tersebut tetapi mikroba tertentu mampu melakukan transformasi. Jumlah aglikon dalam setiap jenis tempe tidak dipengaruhi oleh jenis yeast yang ditambahkan. Walaupun mikroba tidak mampu mensintesa isoflavan, biosintesa Faktor-II dapat dihasilkan melalui demetilasi glisitein oleh bakteri *Brevibacterium epidermis* dan *Micrococcus luteus* atau melalui reaksi hidroksilasi daidzein. Sehingga kemungkina yeast mampu melakukan

transformasi selama fermentasi perlu dikaji lebih mendalam. Sebagai sumber vitamin B yang sangat potensial, tempe mengandung beberapa jenis vitamin antara lain vitamin B₁ (tiamin), B₂ (riboflavin), asam pantotenat, asam nikotinat (niasin), vitamin B₆ (piridoksin), dan B₁₂ (sianokobalamin). Vitamin B₁₂ umumnya terdapat pada produk-produk hewani dan tempe menjadi satu-satunya sumber vitamin yang potensial dari bahan pangan nabati. Vitamin ini tidak diproduksi oleh kapang tempe, tetapi oleh bakteri kontaminan seperti *Klebsiella pneumoniae* dan *Citrobacter freundii*. Pada fermentasi kedelai untuk membuat tempe ternyata penambahan khamir juga berperan dalam meningkatkan kandungan asam folat, dan penambahan *S. boulardii* menghasilkan tempe yang mengandung asam folat lebih baik dari pada tempe dengan penambahan khamir yang lain yaitu *G. candidum*, *Y. lipolytica*, dan *A. pullulans*. Sehingga peran *S. boulardii* sebagai penyumbang asam folat dalam fermentasi makanan perlu dikaji lebih lanjut.

Tabel 6.1. Efek khamir terhadap kandungan senyawa fungsional tempe

Jenis inokulum	Genistein	Daidzein	Glycitein	Vit B12 (Mcg/100g)	Asam folat (ug/100g)
Kedelai saja	0,29	0,71	0,23	3,68	68,23
Kedelai+Ro	0,41	0,77	0,32	3,79	72,76
Kedelai+Ro+Sb	0,38	0,78	0,34	3,95	89,28
Kedelai+Ro_Gc	0,38	0,76	0,34	3,76	62,45
Kedelai+Ro+Yl	0,36	0,67	0,27	3,92	19,62
Kedelai+Ro+Ap	0,38	0,66	0,37	3,58	20,21

Sumber Kustyawati (2009)

Bakteri asam laktat dalam pembuatan tempe

Pada pembuatan tempe bakteri asam laktat terdapat dalam jumlah yang tinggi selama proses perendaman kedelai dan berperan dalam mengasamkan kedelai. Bakteri asam laktat berasal dari mikroorganisme indigenus yang terdapat selama proses fermentasi alami. Fermentasi dalam pembuatan tempe berlangsung dalam dua tahap. Tahap pertama fermentasi bakteri yaitu selama proses perendaman kedelai, dan tahap ke dua fermentasi kapang yaitu fermentasi kedelai setelah inokulasi dengan ragi tempe. fermentasi tahap pertama dilakukan oleh mikroorganisme indigenus yang terdapat selama proses perendaman, terutama bakteri

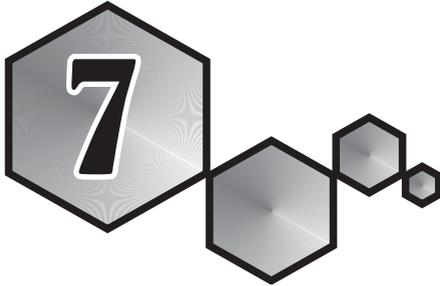
asam laktat. Perendaman berperan dalam mengendalikan mikroorganisme selama fermentasi tempe, mengeliminasi golongan Enterobacteriaceae yang tidak bertahan hidup karena produksi asam organik yang diproduksi bakteri asam laktat. Populasi bakteri asam laktat yang tinggi hingga akhir fermentasi kapang mencapai 10^8 cfu/g (Nurdini *et al.*, 2015) mengindikasikan terdapat peran bakteri asam laktat dalam tempe yang perlu diungkap lebih mendalam.

Latihan

1. Apakah tempe termodifikasi?
2. Sebutkan sifat bahan pangan yang memungkinkan untuk difermentasi oleh *S.cerevisiae*?
3. Mengapa bakteri asam laktat bisa terdapat di dalam tempe selama fermentasi kapang?
4. Apakah kontribusi pH dalam fermentasi pembuatan tempe?

Daftar Pustaka

- Boutrou, R., Kerriou, L. dan Gassi, J.Y. (2005). Contribution of *Geotrichum candidum* to the proteolysis of soft cheese. *International Dairy Journal* 24: 2005.
- Buzzini, P. dan Martini, A. (2002). Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology* 93: 10201025.
- Kustyawati ME.2009. Kajian peran yeast dalam pembuatan tempe. *AGRITECH*, 29(2): 64-70.
- Nurdidi AL, Nuraida L, Suwanto A, dan Suliantari. 2015. Microbial growth dynamic during tempe fermentation in two different home industries. *IFRJ* 22(4):1668-1674.
- Nout, M.J.R. dan Kiers, J.L. (2005). Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third milenium. *Journal of Applied Microbiology* 98: 789805.



SACCHAROMYCES CEREVISIAE **DALAM FERMENTASI KOPI**

Kopi merupakan tanaman perkebunan penting yang tumbuh di lebih dari 50 negara dan merupakan salah satu minuman non-alkohol yang paling populer dikonsumsi di seluruh dunia. Pengolahan pasca panen buah kopi dilakukan di negara-negara penghasil menggunakan dua proses, yaitu sebagai pengolahan cara basah dan pengolahan cara kering. Pengolahan basah digunakan terutama untuk kopi arabika, dimulai dengan menghilangkan pulpi (*depulped*) buah matang yang kemudian memindahkan depulpi kopi ke dalam tangki untuk proses fermentasi terendam air (under water fermentation) selama 24-48 jam dan dikeringkan hingga kadar air 10-12%. Dalam pengolahan kopi secara kering, seluruh buah kopi dikeringkan (di bawah sinar matahari) pada lantai beralas maupun tanpa menghilangkan pulpinya terlebih dahulu. Brasil adalah produsen terbesar kopi diperoleh dengan pengolahan kering. Namun, pengolahan basah menjadi semakin sering digunakan sebagai cara untuk meningkatkan kualitas kopi. Selama pengolahan basah, buah kopi matang mengalami fermentasi spontan, oleh mikroorganisme kompleks yang melibatkan khamir, bakteri dan jamur berfilamen. Fermentasi dilakukan untuk menghilangkan lendir yang masih menempel pada biji kopi dan membantu meningkatkan flavor kopi dengan adanya produksi metabolit mikroba, yang merupakan prekursor senyawa volatil yang terbentuk selama penyangraian. Khamir adalah salah satu mikroorganisme yang paling sering diisolasi dari fermentasi biji kopi, walaupun informasi mengenai efeknya pada pengembangan karakteristik

rasa kopi masih terbatas. Spesies yang paling sering teridentifikasi selama pengolahan kopi adalah *Pichiakluyveri*, *Pichia anomala*, *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii* dan *Torulaspota delbrueckii*. Selain itu, bakteri dengan aktivitas pectinolytic meliputi *Erwinia*, *Klebsiella*, *Aerobacter*, *Escherichia* dan *Bacillus*, serta varietas dari jamur berfilamen juga sering. Beberapa karakteristik penting yang harus dimiliki oleh mikroorganisme sebagai starter fermentasi kopi antara lain: (1) kemampuannya untuk tumbuh pada kisaran pH fermentasi kopi (pH 2,0 – 8,0), (2) toleran terhadap tekanan osmotik (terdeteksi pertumbuhan pada 50% glukosa dan fruktosa); (3) toleransi terhadap panas (kemampuannya untuk tumbuh pada suhu 37-43°C); dan (4) toleran terhadap akumulasi metabolit (kemampuannya untuk tumbuh pada kapasitas 12 sampai 15% etanol, 2% asam laktat dan 2% asam asetat).

Suksesi mikroorganisme selama fermentasi kopi

Khamir dengan jumlah 2,7 log (cfu/ml) ada pada awal fermentasi dan tumbuh hingga populasi maksimum 7.15 log (cfu/ml) selama 40 jam berikutnya, diikuti dengan penurunan hingga 5,2 log cfu/ml pada 48 h. Sebanyak 144 ragi diisolasi di seluruh fermentasi basah dari biji kopi dan spesies yang dominan meliputi *P. fermentans* (yang paling sering diisolasi), diikuti oleh *P. kluyveri*, *Candida glabrata* dan *C. quercitrusa*. *Saccharomyces sp.* terdeteksi pada 24 dan 32 jam, sedangkan *P. guilliermondii*, *Pichia caribbica* dan *Hanseniaspora opuntiae* umumnya diisolasi pada awal fermentasi. Spesies khamir ini berasal dari (niche) tanah, buah-buahan dan pohon. Sementara *P. fermentans* adalah khamir pertama yang diisolasi dari fermentasi spontan. Spesies dari genus *Pichia* telah dilaporkan menghambat ochratoxigenic pertumbuhan jamur berfilamen selama fermentasi kopi, dan bertindak sebagai kontrol biologis untuk pencegahan racun ochratoxin-A dalam kopi.

Produksi senyawa volatile aroma pada fermentasi kopi

Inokulasi khamir ke dalam media simulasi pulp kopi dan produksi aroma volatile diukur setelah fermentasi selama 48 jam. Khamir tumbuh hingga 3 siklus log dalam 48 jam. Terdapat 14 macam senyawa volatile aroma

yang diproduksi yaitu meliputi acetaldehid, benzaldehd, asam kaprilat, ethanol, atil asetat, etil laurat, isoamyl asetat, 2,3-butanedione, 1-decanol, 3-metill-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 2-hexanol, 2-octanol and 1-octanol. Senyawa volatile paling penting meliputi acetaldehyde, ethanol, isoamyl acetate and ethyl acetate. *Saccharomyces* spesies menghasilkan senyawa etanol paling tinggi dibandingkan yang bukan *Saccharomyces*. *P. fermentans* menghasilkan isoamil asetat (aroma seperti pisang) dan etil asetat (aroma seperti nanas).

Keberagaman flavor kopi sangat dipengaruhi oleh proses penyangraian terutama waktu dan suhu penyangraian (Madiah et al., 2013). Penambahan starter *Saccharomyces* pada proses pengolahan biji kopi secara basah diketahui menghasilkan senyawa volatile yang memberikan flavor tertentu pada kopi yang timbul saat penyangraian. Tabel 7.1 menyajikan starter dan senyawa volatil yang dihasilkan setelah 48 jam fermentasi. Etanol, asetaldehida, etil asetat, isoamil asetat, 2,3-butanedione dan heksanal adalah senyawa volatil utama yang diproduksi oleh baik fermentasi kopi spontan maupun fermentasi dengan penambahan starter, dan diukur dengan metoda headspace. Senyawa volatile tersebut bisa berasal dari dua sumber utama, yaitu sebagai hasil dari metabolisme khamir seperti etanol, asetaldehida, etil asetat, dan isoamil asetat, dan berasal dari reaksi panas yang timbul selama fermentasi seperti heksanal dan 2,3-butanedione. Sementara itu, beberapa senyawa tersebut berperan dalam pengembangan aroma selama fermentasi kopi, seperti etanol, etil asetat, isoamil asetat dan asetaldehida). Penambahan starter *Saccharomyces* dalam fermentasi kopi diketahui secara signifikan meningkatkan ($p < 0,05$) produksi senyawa yang berperan dalam pengembangan flavor kopi (Pereira et al., 2014). Minuman kopi yang dibuat dari biji kopi terfermentasi dengan inokulasi tunggal *Pichia fermentans* memiliki rasa buah (fruity) yang tajam, dimana berkaitan dengan produksi ester seperti etil asetat dan isoamil asetat, selama fermentasi. inokulasi campuran menghasilkan 2,3-butadienon (buttery flavor), asetaldehid (fruity flavor), heksanal (green beans flavor), etanol (alkoholik flavor) dan ester (fruity flavor).

Tabel 7.1. Senyawa aroma yang diproduksi selama fermentasi kopi.

Senyawa aroma ($\mu\text{mol/L}$)	Fermentasi		
	Kultur tunggal	Kultur campuran	Kontrol (tanpa inokulasi starter)
Etanol	43,08 ^a \pm 23,81	88,50 ^b \pm 61,72	1,29 ^c \pm 0,19
Asetaldehid	0,48 ^a \pm 0,01	12,85 ^b \pm 0,57	0,49 ^a \pm 0,07
Etil asetat	42,42 ^a \pm 8,38	5,37 ^b \pm 2,16	ND
Isoamil alkohol	10,18 ^a \pm 1,59	0,32 ^b \pm 0,11	ND
Heksanal	21,59 ^a \pm 9,30	24,91 ^a \pm 6,17	12,59 ^b \pm 2,38
2,3-Butanedion	17,86 ^a \pm 0,74	17,30 ^a \pm 3,01	8,15 ^b \pm 1,45
2,3-Butanedion (buttery flavor)	6,25 ^a \pm 0,25	6,30 ^a \pm 0,14	5,40 ^b \pm 0,53
Asetaldehid, ester (fruity flavor)	7,83 ^a \pm 0,14	6,16 ^b \pm 0,28	5,83 ^b \pm 0,30
Caramel aroma	6,66 ^a \pm 0,14	6,58 ^a \pm 0,14	6,75 ^a \pm 0,25
Coklat aroma	5,83 ^a \pm 0,14	5,91 ^a \pm 0,14	5,75 ^a \pm 0,25
Fermented aroma	6,40 ^a \pm 0,38	6,87 ^a \pm 0,17	5,16 ^b \pm 0,14
Aroma asam	5,83 ^a \pm 0,14	5,91 ^a \pm 0,28	5,8 ^a \pm 0,14

Sumber data: Pereira et al. (2014).

Keterangan: Angka tertulis di dalam Tabel yang merupakan rata-rata dari tiga kali ulangan, dengan huruf sama adalah tidak berbeda secara signifikan ($p > 0,05$) satu dengan yang lainnya menggunakan uji Duncan. (Nilai rata-rata \pm standard deviasi) kultur tunggal adalah *Pichia fermentans*. Kultur campuran adalah *Pichia fermentans* dan *Saccharomyces cerevisiae*.

Pada MEAD (fermentasi madu)

Mead adalah minuman tradisional, mengandung 8% -18% (v/v) etanol yang dihasilkan dari fermentasi alkohol madu encer (37% v/v dengan air) oleh khamir (O'Connor-Cox dan Ingledew, 1991). Pengembangan produk berbasis madu harus dikembangkan untuk mempertahankan pemeliharaan lebah sebagai industri yang layak. Namun, *Mead* merupakan produk home industry (buatan sendiri), sehingga masalah seperti kurangnya keseragaman produk akan muncul. Variabilitas komposisi madu, fermentation ulang oleh khamir atau bakteri asam-asetat dan bakteri asam laktat dapat meningkatkan senyawa volatile asam dan produksi ester yang tidak normal dengan demikian mempengaruhi kualitas organoleptik dari produk akhir.

Fermentasi *Mead* memerlukan waktu beberapa bulan tergantung dari jenis madu, jenis khamir, dan komposisi must madu. Tujuan utama pembuat *Mead* adalah waktu fermentasi secepat mungkin dengan hasil yang optimal. Suplementasi substrat fermentasi (must madu) dengan potassium tartrat, asam malat dan diamonium fosfat dapat mempercepat fermentasi menjadi 11 hari. Namun demikian ketersediaan gula di dalam substrat masih tinggi demikian juga komponen nitrogen di dalam prohk akhir *Mead*. Kerapatan populasi khamir (CFU) selama fermentasi tidak pernah mencapai diatas 10^7 cfu/mL mengindikasikan adanya komponen penghambat pertumbuhan khamir di dalam madu. Penggunaan khamir *Saccharomyces cerevisiae* dalam jumlah tinggi dapat memperpendek fermentasi madu untuk pembuatan mead. *S.cerevisiae* sangat sesuai untuk starter fermentasi madu karena kebutuhan akan oksigennya rendah dan juga kebutuhan akan nitrogen. Madu encer (37%) dengan pH 3,7 (diatur dengan menambahkan asam malat), kandungan nitrogen 267mg/L (diatur dengan menambahkan amnium fosfat) sebagai must madu untuk substrat fermentasi dengan menambahkan starter *S.cerevisiae* sebanyak 10^8 cfu/mL (melalui rehidrasi 10 g khamir kering dalam 100 mL must madu pada suhu 38°C). Fermentasi alkohol skala laboratorium menggunakan substrat must madu sebanyak 2/3 volume Erlenmeyer 250mL secara anaerobic pada suhu 22°C. Pengukuran kehilangan berat (weight loss) untuk mengetahui produksi CO₂ selama fermentasi, jumlah total khamir menggunakan media peptone dextrose agar (20 g/L glukosa, 10g/L pepton, 5g/L ekstrak khamir dan 20g/L agar) dengan suhu inkubasi 25°C selama 48 jam, dan pengukuran kadar gula reduksi menggunakan metode 3,5-dinitrosalicylic (DNS) dengan glukosa sebagai standard. Senyawa aroma yang diproduksi selama fermentasi disajikan pada Tabel 7.2. Hasil analisis senyawa aroma volatile menggunakan GC-FID ditemukan 7 senyawa volatile utama meliputi etil asetat, methanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, and 3-metil-1-butanol, sedangkan senyawa minor hasil analisis dengan GC-MS meliputi etil butirrat, isoamil asetat, etil heksanoat, etil laktat, 3-etoksi-1-propanol, etil oktanoat, asam isobutirat, asam butanoat, etil dekanat, 3-(metilthio)-1-propanol, etil fenilasetat, 2-feniletil asetat, etil dedokanoat, asam heksanoat, 2-feniletanol, asam oktanoat, 4-vinilguaikol, asam dekanat, 4-vinilfenol dan asam dodekanoat.

Tabel 7.2. Nilai aktivitas aroma (OAV) komponen volatile yang mempengaruhi aroma Mead setelah fermentasi dengan *S.cerevisiae* QA23 pada pitching rate $1,5 \times 10^5$ sel/mL.

Senyawa	Deskripsi aroma	Ambang batas aroma (g/L)	Pitching rate ($1,5 \times 10^5$ sel/mL)
3-Metil-1-butanol	Cheese, nail polish	30 000	5,60
2-Metil-1-propanol	Alkohol, bitter	40 000	-
Etil asetat	Solven like, nail polish	12 300	2,21
Isoamil asetat	Banana	30	34,43
2-Feniletal asetat	Flowery, roses	250	2,40
Etil oktanoat	Fruty, sweet	5	95,44
Etil keksanoat	Fruity, aniseed	14	24,64
Etil dekanat	Pleasant, soap	200	1,52
Etil butirat	Fruity, pineapple	20	6,22
4-Vinilfenol	Almond shell	180	1,08
Asam oktanoat	Fatty, rancid	500	4,32
Asam dekanat	Fatty, soapy	1000	1,03
Asam heksanoat	Cheese, sweaty	420	1,43
Asetaldehid	Fresh, green leaves	500	14,24

Sumber Pereira et al., (2013).

Alkohol merupakan senyawa volatile yang paling besar diproduksi dan mengindikasikan bahwa khamir *S.cerevisiae* mempunyai peran penting di dalam fermentasi madu. Senyawa alkohol utama yang diproduksi adalah 3-metil-1-. Sementara itu, senyawa volatile fenol yang diproduksi oleh khamir selama fermentasi berkontribusi pada off-flavor.

Tabel 7.3. Konsentrasi senyawa volatile Mead setelah fermentasi oleh *S.cerevisiae* pada pitching rate $1,5 \times 10^5$ sel/mL, dan 4×10^7 sel/mL

Senyawa	Pitching rate $1,5 \times 10^5$ sel/mL	Pitching rate 4×10^7 sel/mL
Alkohol (mg/L)		
3-metil-1-butanol	167,92 ± 5,53 ^b	117,57 ± 11,71 ^a
2-metil-1-propanol	22,52 ± 2,33 ^a	41,24 ± 8,14 ^{a b}
2-metil-1-butanol	21,48 ± 1,02 ^a	28,33 ± 2,62 ^{b c}
1-Propanol	17,95 ± 1,69 ^a	30,53 ± 5,29 ^b
2-feniletanol	12,84 ± 1,38 ^c	6,97 ± 1,20 ^{a b}
Methanol	5,36 ± 4,65	4,87 ± 0,73
3-Etoksi-1-propanol	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,03
3-(metilthio)-1-propanol	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Total	248,21 ± 7,96	229,68 ± 15,49

Senyawa	Pitching rate 1,5x10 ⁵ sel/ mL	Pitching rate 4x10 ⁷ sel/ mL
Ester (mg/L)		
Etil asetat	27,15± 0,8 ^a	27,21± 3,17 ^a
Isoamil asetat	1,03 ±0,09 ^b	0,21± 0,01 ^a
2-feniletil asetat	0,60± 0,06 ^b	0,06± 0,01 ^a
Etil oktanoat	0,48 ±0,09 ^{ab}	0,14± 0,03 ^{ab}
Etil heksanoat	0,34± 0,07 ^{ab}	0,07± 0,02 ^{ab}
Etil dekanooat	0,30± 0,10 ^{ab}	0,04± 0,01 ^a
Etil butirrat	0,12± 0,03	0,08 0,05
Etil dudekanooat	0,07 ±0,02	Tr
Etil laktat	0,023 ±0,003	0,017± 0,008
Etil fenilasetat	0,004± 0,001	0,004± 0,002
Total	30,13± 0,83	27,83 ±3,17
Volatile Fenol (µg/L)		
4-Vinilfenol	195,17 ±29,68 ^{ab}	96,49± 17,0 ^{ab}
4-Vinilguaikol	100,67 ±9,17 ^c	50,92± 15,19 ^a
Total	295,84±31,07	147,41± 22,80
Volatile asam lemak (µg/L)		
Asam oktanoat	2158,77± 124,05	516,75± 174,10 ^{ab}
Asam dekanooat	1028,31 ±339,35 ^{ab}	82,29± 42,77 ^{ab}
Asam heksanoat	600,66± 78,68 ^c	155,67± 37,14 ^{ab}
Asam isobutirat	24,99 ±11,44 ^{ab}	102,77± 31,71 ^{ab}
Asam dodekanooat	55,39 ±28,47	17,60 ±1,26
Asam butanoat	16,90± 4,40 ^{ab}	15,50± 3,82 ^{ab}
Total	3885,02± 371,08	890,58 ±185,85
Senyawa karbonil (mg/L)		
Asetaldehid	7,12 ±2,38	7,91± 2,83

Sumber Pereira et al. (2013)

Keterangan:

tr = trace. Nilai rata-rata di dalam baris yang sama dengan huruf yang sama menunjukkan berbeda pada $\rho < 0,05$. Nilai di dalam Tabel yang tidak diikuti huruf menunjukkan berbeda secara signifikan pada $\rho > 0,05$.

Nilai-P adalah nilai nilai untuk efek dari pitching rate terhadap profil senyawa volatile pada Mead, dari one-way analisis ANOVA. Jika ada efek yang signifikan dari pitching rate terhadap data profil volatile, selanjutnya data dibandingkan dengan uji Tukey karena varian yang sama dapat diasumsikan ($\rho > 0,05$ dengan cara uji Levene).

** Nilai-P adalah nilai nilai untuk efek dari pitching rate terhadap senyawa volatile pada Mead, hasil dari one-way analisis Welch ANOVA. Jika ada efek yang signifikan dari pitching rate terhadap data senyawa volatile, selanjutnya nilai rata rata dibandingkan dengan uji Dunnett T3 karena varians yang sama tidak dapat diasumsikan ($\rho < 0,05$ dengan cara uji Levene).

***S.cerevisiae* dan fermentasi buah markisa**

Buah markisa, *Passiflora*, adalah genus yang paling penting dalam keluarga Passifloriaceae dan tersebar di sebagian besar daerah tropis dan sub-tropis di dunia. Ada dua varietas komersial dari markisa, *Passiflora edulis Sims*, yaitu buah berwarna ungu (*Passiflora edulis*) dan markisa kuning atau maracuja (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degner*). Markisa ungu mempunyai rasa lebih disukai dan lebih manis untuk dikonsumsi sebagai jus segar. Markisa kuning memiliki buah yang lebih besar, rendemen jus lebih tinggi dan lebih asam, oleh karena itu dianggap lebih cocok untuk pengolahan dan merupakan salah satu buah tropis yang paling populer dan paling terkenal. Yellow markisa (markisa kuning/YPF) memiliki bentuk bulat hingga oval, kulit kuning pada saat matang dan menghasilkan sejumlah banyak jus atau bubur. Markisa kuning dikenal mempunyai pewarnai alami yang menarik, sifat rasa yang unik dan berfungsi sebagai pengobatan. Hal ini tidak hanya karena vitamin A, vitamin C, niasin, riboflavin, kalium, serat makanan, karotenoid dan senyawa polifenol dalam jumlah tinggi, tetapi juga sebagai buah tropis dengan bunga dan buah yang menarik, dan memiliki Estery aroma dengan cirri khas rasa seperti sulfur tropis yang eksotis. Markisa kuning mengandung phytochemical non-Nutrisi yang menambah flavor dan bermanfaat untuk asupan makanan sehat. Namun, keasaman tinggi, terutama pada markisa kuning, membatasi penggunaannya sebagai bahan minuman, es krim, selai dan koktail. Markisa dapat direkomendasikan sebagai bahan baku untuk produksi makanan penutup dan anggur Srisamatthakarn *et al.*, (2010). Selain itu, telah secara luas digunakan untuk mengobati kecemasan, insomnia, asma, bronkitis dan infeksi saluran kemih. Jus buah markisa merupakan makanan berasam tinggi, dengan pH 2,8-4 dan keasaman total 43-51,1 gL⁻¹, yang didominasi oleh dua asam organik yaitu asam sitrat (46,3-55 gL⁻¹) dan asam malat (6,5-10,5 gL⁻¹), memiliki total padatan terlarut 13-14,4oBrix dan mengandung sekitar 145-152 gL⁻¹ gula, meliputi glukosa, fruktosa dan sukrosa. Jus markisa menyediakan sumber yang baik dari berbagai nutrisi (Tabel 7.4 dibawah) seperti vitamin C (182 mg kg⁻¹ dari bagian yang dapat dimakan), vitamin A (7.000-24.100 IU kg⁻¹ dari bagian yang dapat dimakan) dan kalium (2780 mg kg⁻¹ dari bagian yang dapat dimakan) (De Neira, 2003). Tiga belas karotenoid yang berbeda dalam markisa telah diidentifikasi, misalnya phytoene, phytofluene, δ -karoten

(karotenoid utama), neurosporene, β -karoten, likopen, prolycopene, monoepoxy- β -karoten, β -cryptoxanthin, β -citaurin, antheraxanthin, violaxanthin, dan neoxanthin. Fitokimia non-Nutrisi lain yang ditemukan di buah markisa adalah senyawa polifenol yang memiliki aktivitas antioksidan serta sifat antikanker, namun, kandungan flavonoid belum dilaporkan. Konsentrasi karotenoid total markisa adalah 932 mgL⁻¹, yang terdiri dari α -karoten, β -karoten serta β -cryptoxanthin (masing-masing 350, 5250 dan 460 g kg⁻¹ dari bagian yang dapat dimakan) (De Neira, 2003). Phytochemical lainnya teridentifikasi termasuk senyawa aroma seperti tiol volatile, terpen, ester asam lemak, alkohol, dan berbagai aromatik lainnya.

Tabel 7.4. Komposisi kimia Markisa kuning per 100 g bagian yang dapat dimakan.

Senyawa kimia	Kisaran konsentrasi (mg)	Senyawa kimia	Kisaran konsentrasi (mg)
Protein	670	Total carotenoids (mg /L)	932
Lemak total	180	Carotene (g)	25
Karbohidrat	14450	Carotene (g)	525
Gula (g/L)	145 - 152	Vitamin E	n.d
Serat total	0.02	Vitamin K (g)	n.d
Kalsim (Ca)	4	Saturated fat	10
Besi	0,36	Monounsaturated fat	20
Magnesium	17	Polyunsaturated fat	110
Phosphor	25	Cholesterol	n.d
Potassium	278	Citric acid (g /L)	46.3 - 55.0
Sodium	6	Malic acid (g/ L)	6.5 - 10.5
Iron	0,06	Food - Folate (g)	8
Tembaga	0,05	Vitamin B6	0,06
Selenium	0,10	Vitamin B12 (g)	n.d
		Vitamin A (IU)	700 - 2410
		Vit C	18.20
		Thiamine	n.d
		Riboflavin	0,10
		Niacin	2,24

Sumber: DeNeira (2003)

S.cerevisiae pada rice ovada

Perubahan sifat kimia dan sensori rice ovada oleh fermentasi menggunakan mixed cultures *Lactobacillus amylophilus*, *Leconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces ovarum*, dan *Saccharomyces cerevisiae* (Silva et al.

2013). Fermentasi adalah proses metabolisme dimana senyawa karbohidrat dan senyawa yang berkaitan dengan karbohidrat teroksidasi dengan membebaskan energi di dalam ketiadaan elektron aseptor eksternal, dan bakteri, khamir dan kapang berperan dalam proses fermentasi ini. Dalam fermentasi makanan tradisional Afrika, misalnya "ogi", bakteri asam laktat dan khamir mempunyai fungsi yang sangat penting antara lain produksi senyawa flavor, aroma, menstabilkan mikroorganisme dan menjaga keamanan produk pangan. bakteri asam laktat dan khamir sering digunakan sebagai starter fermentasi berbahan dasar substrat yang mengandung karbohidrat karena pengaruh biokimianya yang diperlukan di dalam industri fermentasi pangan.

Sebuah kultur starter adalah biakan/kultur yang mengandung mikroorganisme khusus yang dipilih dan telah diketahui, yang digunakan untuk menginisiasi dan sebagai pengendali fermentasi. Penggunaan starter bertujuan untuk meningkatkan konsistensi dan kecepatan serta meningkatkan kualitas gizi, atribut sensori, menurunkan faktor-faktor antinutrisi seperti fitat dan senyawa amina biogenik. Penggunaan kultur starter seperti *Saccharomyces sp*, *Lactobacillus sp*, dan *Pediococcus spp*. juga telah digunakan dalam susu, bir, baking dan industri anggur sejak lama sekali. Dari segi nutrisinya, beras termasuk miskin nutrisi dan subsisten konsumsi beras menyebabkan beri-beri pada anak-anak. Tetapi hal ini telah dikurangi dengan parboiling atau pengayaan beras. Beras juga direkayasa secara genetik dengan β - karoten untuk memerangi kekurangan vitamin A dan kebutaan pada anak-anak.

Penggunaan starter culture menyebabkan pH substrat menurun dan asam tertitrasi (titratable acidity) meningkat secara signifikan. Asam merupakan hasil produk metabolit bakteri asam laktat, dan produksi asam memberikan kondisi lingkungan yang mendorong pertumbuhan khamir. Demikian halnya dengan perubahan nutrisi substrat. Beras ovada yang terfermentasi dengan starter kultur bakteri asam laktat dan khamir menunjukkan peningkatan yang signifikan ($p < 0,05$) terutama pada protein kasar. Peningkatan ini mungkin disebabkan oleh biosintesis protein oleh starter kultur. Peningkatan protein juga terjadi pada sereal yang terfermentasi dengan bal dan khamir. Kandungan karbohidrat nasi ovada lebih rendah dibanding nasi yang tidak terfermentasi, sebagai

hasil dari pemecahan zat pati dan gula dalam nasi oleh enzim amilolitik dan enzim lain selama fermentasi. Namun demikian, kandungan mineral (sodium, potassium) tidak berbeda pada nasi tidak terfermentasi dengan nasi terfermentasi dengan *S.ovarum*, *S.cerevisiae*, dan *L.amylophilus*. Nasi terfermentasi dengan *Leuconostoc mesenteroides* mengandung mineral lebih tinggi berbeda nyata dengan yang lain. Perubahan thiamin, riboflavin terjadi pada semua fermentasi. Hal ini sebagai akibat migrasi dan redistribusi vitamin larut dalam air (4). Kandungan amilosa berbeda secara nyata (>0,05) pada semua nasi yang diuji dengan kandungan amilosa tertinggi pada nasi tidak terfermentasi (17,61%). Solubilisasi zat pati dan hilangnya amilosa terjadi selama perendaman nasi dan pemasakan.

Tabel 7.5. Kandungan kimia nasi dengan kultur starter yang berbeda.

	Protein kasar	Na	K	Thiamin	Riboflavin	Amylose
Uninoculated	11.37 ^a	0.31 ^b	1.20 ^b	4.34 ^c	1.54 ^b	17.61 ^e
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	16.72 ^e	0.34 ^c	1.20 ^a	4.32 ^c	1.62 ^d	14.06 ^a
<i>Saccharomyces uvarum</i>	17.48 ^d	0.31 ^b	1.20 ^a	4.10 ^b	1.57 ^c	15.32 ^c
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	17.07 ^c	0.35 ^c	1.50 ^b	4.32 ^c	1.62 ^d	14.49 ^b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12.27 ^b	0.28 ^a	1.30 ^{ab}	4.01 ^a	1.42 ^a	16.3 ^d

Silva et al. 2013

Keterangan: Nilai rata-rata dengan huruf superscripts yang berbeda pada kolom yang sama berbeda secara signifikan dengan uji Duncan pada tingkat signifikansi 5%.

Latihan

1. Apakah sumbangan utama khamir *S.cerevisiae* dalam fermentasi biji kakao?
2. Madu mengandung gula yang tinggi, apakah ada hubungannya dengan sifat fisiologis pertumbuhan *S.cerevisiae*?
3. Sebutkan komponen makromolekul utama di dalam buah markisa sehingga dapat terjadi fermentasi oleh khamir terutama *S.cerevisiae*.

Daftar Pustaka

- Mussatto SI, Machado EMS, Martins S and Teixeira JA. 2011. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food and Bioprocess Technology*, 4(5):661-672.
- Evangelista SR, Silava CF, Miguel MGPC, Cordeiro CS, Pinheiro ACM, Duarte WF, Schwan RF. 2014. Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process, 51:183-195.
- Pereira, G.V.M.; Soccol, V.T.; Brar, S.K.; Neto, E.; Soccol, C.R. 2015. Microbial ecology and starter culture technology in coffee processing. *Crit. Rev. Food Sci.*
- Silva, C.F.; Vilela, D.M.; de Souza, C.C.; Duarte, W.F.; Dias, D.R.; Schwan, R.F. 2013. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 235–247.
- Lee L W, Mun Wai Cheong, Philip Curran, Bin Yu, Shao Quan Liu. 2015. Coffee fermentation and flavor-An intricate and delicate relationship. *Food Chemistry*, 185:182-191, www.elsevier.com/locate/foodchem.
- Neto, DPdeC, Pereira GVdeM, Tanobe VOA, Soccol VT, daSilva BJC, Rodrigues C, and Soccol CR. 2017. Yeast diversity and physicochemical characteristics associated with coffee bean fermentation from the Brazillian Cerrado Mineiro Region. *MDPI Fermentation*, 3(11): 2-11, doi:10.3390/fermentation3010011.
- Masoud, W.; Cesar, L.B.; Jespersen, L.; Jakobsen, M. 2004. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast*, 21:549–556.
- Pereira AP, Mendes-Ferreira A, Oliveira JM, Estevinho LM, Mendes-Faia. 2013. High-cell-density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for the optimisation of mead production, *Food Microbiology*, 33:114-123.
- Pereira GVM, Soccol VT, Pandey A, Medeiros ABP, Lara JMRA, Gollo AL, Soccol CR. 2014. Ioslation, selection and evaluation of yeasts for use

in fermentation of coffee beans by wet process, International Journal of Food Microbiology, 188:60-65, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.008>

-oo0oo-

Saccharomyces Cerevisiae

Metabolit dan Agensi Modifikasi Pangan



Saccharomyces cerevisiae sudah sejak lama digunakan sebagai starter fermentasi pembuatan roti dan minuman beralkohol. Dalam buku ini, *Saccharomyces cerevisiae* dimanfaatkan sebagai agensi modifikasi dalam pengolahan pangan, kemampuan *S. cerevisiae* dalam merombak komponen pangan, produk metabolit yang dihasilkan oleh *S. cerevisiae*, modifikasi terhadap perubahan sifat beberapa produk pangan oleh *S. cerevisiae* seperti tapioka, tempe, dan modifikasi fermentasi kakao. Pengertian dasar mengenai khamir perlu dipahami oleh mahasiswa yang khususnya mempelajari mikrobiologi pangan, mikrobiologi industri dan teknologi pangan. *S. cerevisiae* adalah khamir.

Masyarakat dapat menemui *S. cerevisiae* di lingkungan sekitar atau pasar seperti Fermipan karena fermipan mengandung khamir *S. cerevisiae*. Ragi tape juga mengandung khamir *S. cerevisiae*, sedangkan Ragi tempe seperti Rapijaya tidak mengandung *S. cerevisiae*. Ragi adalah sebenarnya starter atau biakan untuk memulai proses fermentasi, sehingga masyarakat tidak lagi rancu mengenai pemahaman Ragi dan *Saccharomyces*.



Dr. Dra. Maria Erna Kustyawati, M.Sc adalah dosen di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Ia menyelesaikan pendidikan S-3 pada tahun 2014 bidang Teknologi Industri Pertanian di Universitas Sriwijaya Palembang dan bidang Food Microbiology di New South Wales University Sydney Australia. Pendidikan S-2 tahun 1991 diperoleh dari Kansas State University Mahattan Kansas Amerika Serikat di bidang Food Microbiology setelah menyelesaikan pendidikan Sarjana S-1 di Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta bidang kajian Endokrinologi-Histologi.

Diterbitkan Atas Kerjasama dengan



LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT, UNIVERSITAS LAMPUNG

ISBN: 978-602-262-847-7



9 786022 628477