

5/4.192
Kus
P c 1



LAPORAN PENELITIAN

PRODUKSI ASTAXANTHIN *Phaffia rhodozyma* MELALUI TEKNIK FUSI PROTOPLAS

Oleh :

HERMIN PANCASAKTI KUSUMANINGRUM, S.Si, M.Si.
Dr. ENDANG KUSDIYANTINI, DEA
Drs. WIJANARKA, M.Si.

Biayai oleh Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumber Daya Manusia,
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional,
Tahun Anggaran 2003

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS DIPONEGORO
NOPEMBER 2003

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN DASAR

- A. Judul Penelitian : PRODUKSI ASTAXANTHIN *Phaffia rhodozyma* MELALUI TEKNIK FUSI PROTOPLAS
- B. Ketua Peneliti
- a. Nama lengkap dan gelar : Hermin Pancasakti Kusumaningrum, S.Si, M.Si
 - b. Jenis kelamin : Perempuan
 - c. Pangkat/Golongan/NIP : Penata Muda Tk.I/III b/132 094 951
 - d. Bidang keahlian : Genetika dan Biologi Molekuler
 - e. Fakultas/Jurusan : FMIPA/Biologi
 - f. Perguruan Tinggi : Universitas Diponegoro
- C. Tim Peneliti

NAMA	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS/JUR.	PERGURUAN TINGGI
HERMIN PANCASAKTI KUSUMANINGRUM, S.Si, M.Si	GENETIKA DAN BIOLOGI MOLEKULER	FMIPA/BIOLOGI	UNIVERSITAS DIPONEGORO
Dr. ENDANG KUSDIYANTINI, DEA	BIOKIMIA DAN FERMENTASI	FMIPA/BIOLOGI	UNIVERSITAS DIPONEGORO
Drs. WIJANARKA, M.Si	MIKROBIOLOGI	FMIPA/BIOLOGI	UNIVERSITAS DIPONEGORO

D. Pendanaan dan Jangka waktu Penelitian :

Jangka Waktu Penelitian yang diusulkan : 10 bulan

Biaya total yang diusulkan : Rp. 15.000.000, 00 (lima belas juta rupiah)

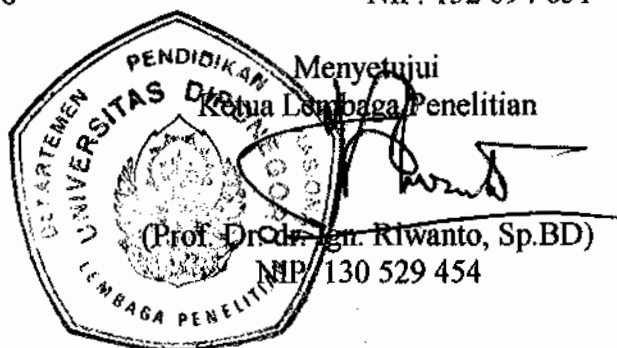
Biaya yang disetujui tahun 2003 : Rp. 15.000.000, 00 (lima belas juta rupiah)

Semarang, 4 Nopember 2003

Ketua Peneliti



(Hermin Pancasakti K, S.Si. M.Si)
NIP. 132 094 851



DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	2
DAFTAR ISI	3
RINGKASAN DAN SUMMARY	4-5
PRAKATA	6
DAFTAR TABEL	7
DAFTAR GAMBAR	8
DAFTAR LAMPIRAN	9
I. PENDAHULUAN	10
II. TINJAUAN PUSTAKA	10
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	13
IV. METODE PENELITIAN	14
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	17
VI. KESIMPULAN DAN SARAN	26
DAFTAR PUSTAKA	27
LAMPIRAN	29

UPT-PUSTAK-UNDIR	
No. Daft:	138/KI/MIPA/C1
Tgl.	10 Maret 2004

RINGKASAN

Dewasa ini kebutuhan pigmen astaxanthin khususnya astaxanthin dalam budidaya perikanan semakin meningkat. Astaxanthin dibutuhkan sebagai makanan tambahan pada budidaya akuakultur dan peternakan karena meningkatkan nilai gizi dan ketahanan terhadap penyakit bagi hewan yang mengkonsumsi. Sintesis astaxanthin secara kimiawi sangat kompleks dan mahal, oleh karena itu dicari sumber astaxanthin alami dari mikroorganisme. *Phaffia rhodozyma* adalah khamir penghasil astaxanthin sebagai pigmen utama namun produksinya $< 500 \mu\text{g}$ total astaxanthin per gram khamir sedangkan kebutuhannya mencapai $3000 \mu\text{g g}^{-1}$ (Johnson & Schroeder, 1996).

Penelitian ini menerapkan teknik fusi protoplas intrastrain untuk mengembangkan kemampuan *P. rhodozyma* dalam menghasilkan astaxanthin. Teknik fusi protoplas dilakukan dalam tiga tahap yaitu isolasi protoplas, proses fusi protoplas dan regenerasi protoplas. Fusan yang diperoleh, diuji kandungan DNA-nya dan kemampuannya dalam menghasilkan pigmen karotenoid dibandingkan dengan induknya.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aplikasi teknik fusi protoplas dapat meningkatkan produksi pigmen karotenoid sebesar 2.03 kali lebih besar dari induk *P. rhodozyma*. Selain itu telah diperoleh fusan (fusan 5) dengan produksi karotenoid mencapai $252,95 \mu\text{g/g}$ bsk dengan perkiraan produksi astaxanthin mencapai $215 \mu\text{g/g}$ berat kering sel.

SUMMARY

The demand for the natural astaxanthin has substantially increased. Though this can be manufactured synthetically, these will cause complexity and high cost of chemically synthetic astaxanthin. Carotenoids are required as feed supplements in the poultry industry and in aquaculture of fishes and crustaceans. Besides providing nutrition and possibly disease resistance, carotenoids give brilliant pigmentation and esthetic value to crustacea, animals and birds (Chien dan Jeng, 1991). The yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (formerly *Phaffia rhodozyma*) is the known yeast that produce astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β -carotene-4,4'-dione) as its primary pigments and therefore is considered to be the best biological source of this carotenoid. However, as natural isolates of *P. rhodozyma* produce relative low amounts of astaxanthin $< 500 \mu\text{g}$ of total astaxanthin per gram of cell compare with the needs $3000 \mu\text{g g}^{-1}$ (Johnson & Schroeder, 1996).

The needs of highly producing astaxanthin organisms has lead to production of several mutans using fusion protoplast experiment (Nagy, 1995). The work is being carried out in three stages; first, isolation of protoplast. Second, intrastain fusion of protoplasts, and third , the regeneration of protoplasts which produce an increase yieds of carotenoids i.e astaxanthin, compare with wild type.

The result of the study is obtaining the mutan with increased yields of carotenoid pigments up to 2.03 times the levels of wild type. Carotenoids accumulated to a level as high as $252.95 \mu\text{g/g}$ of yeast dry matter.

PRAKATA

Syukur Alhamdulillah Tim peneliti ucapkan atas selesainya penelitian tentang Produksi astaxanthin *Phaffia rhodozyma* melalui teknik fusi protoplas. Penelitian ini merupakan suatu penelitian yang bertujuan untuk mengembangkan kemampuan khamir *P.rhodozyma* sebagai sumber pigmen astaxanthin alami terbaik. Teknik fusi protoplas memberi harapan untuk diperolehnya mutan yang mempunyai kemampuan produksi astaxanthin yang lebih besar dibandingkan induk dalam waktu yang relatif singkat dan biaya yang tidak terlalu mahal.

Dalam kesempatan ini pula, tim peneliti ingin mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, yang telah memberikan kesempatan dan dana untuk membiayai penelitian ini. Terima kasih juga penulis ucapkan kepada sesama rekan peneliti satu tim yang telah menciptakan suatu "team-work" yang baik dan iklim penelitian ilmiah yang sangat kondusif bagi perkembangan penelitian serta keilmuan selanjutnya.

Tim peneliti menyadari bahwa dalam menjalankan suatu penelitian, tidak ada kerja yang benar-benar sempurna. Oleh karena itu segala kritik dan saran sangat penulis harapkan dari pembaca demi kesempurnaan penelitian ini. Tim peneliti berharap, penelitian ini dapat merupakan sumbangan bagi kemajuan ilmu pengetahuan di Indonesia.

Semarang, 4 Nopember 2003

Tim peneliti

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Hubungan antara konsentrasi lisosim (mg/ml) dan jumlah koloni	17
Tabel 2. Jumlah koloni fusan perlakuan konsentrasi lisosim yang berbeda	20
Tabel 3. Jumlah koloni fusan pada perlakuan konsentrasi lisosim yang berbeda dan penambahan KCl	20
Tabel 4. Frekuensi regenerasi pada fusi protoplas intrastrain <i>P.rhodozyma</i>	21
Tabel 5. Hubungan antara Kandungan DNA dan konsentrasi lisosim	21
Tabel 6. Produksi pigmen Induk <i>P.rhodozyma</i> dan fusan	23
Tabel 7. Gula reduksi fusan 5	25
Tabel 8. Gula reduksi induk <i>P.rhodozyma</i>	25

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Protoplas <i>P.rhodozyma</i> dengan perlakuan lisosim 2 mg/ml (100 X)	18
Gambar 2. Hubungan antara strain, kandungan DNA dan konsentrasi lisosim	22
Gambar 3. Kurva pertumbuhan induk <i>P.rhodozyma</i> dan fusan	24
Gambar 4. Kurva gula reduksi fusan 5	25
Gambar 5. Kurva gula reduksi induk <i>P.rhodozyma</i>	26

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Gambar 1.	Protoplas <i>P. rhodozyma</i> dengan perlakuan lisosim 2 mg/ml (100 X)	30
Gambar 2.	Fusan <i>P. rhodozyma</i> dengan perlakuan lisosim 4 mg/ml (100 X)	30

1. PENDAHULUAN

Pigmen yang termasuk kelas karotenoid merupakan salah satu makanan tambahan yang penting dalam budidaya ikan-ikan estuaria, seperti udang dan hewan-hewan yang tidak bisa mensintesis pigmen ini. Semakin meningkatnya produk perikanan ini akan menyebabkan peningkatan akan permintaan pigmen ini, seperti pigmen astaxanthin yang merupakan warna karakteristik dari udang (crustacea). Beberapa mikroorganisme dapat menghasilkan pigmen ini antara lain: *Phaffia rhodozyma* (khamir), *Haematococcus pluvialis* (mikroalga) dan *Agrobacterium auranticum* (bakteri). Pada khamir *P. rhodozyma*, astaxanthin merupakan pigmen yang banyak terkandung dari pigmen totalnya, namun kuantitasnya sangat rendah. Mengingat khamir merupakan organisme yang mudah dimanipulasi, maka perlu adanya teknik rekayasa genetik seperti fusi protoplas untuk meningkatkan kemampuannya dalam menghasilkan astaxanthin. Teknik fusi protoplas dipilih secara intensif untuk meningkatkan kemampuan strain khamir karena mereka mempunyai sifat poliploidi sehingga tidak mudah dilakukan hibridisasi seksual, mutagenesis maupun aplikasi teknologi DNA rekombinan. Secara khusus, teknik fusi protoplas antar strain telah terbukti meningkatkan kemampuan produksi astaxanthin sampai 30% (Chun *et al*, 1992) dibanding teknik yang lain, namun mengalami kesulitan dalam pengujian fusan. Sebaliknya fusi protoplas intrastrain belum pernah dilakukan padahal pengujian fusannya lebih mudah.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Fusi protoplas

Salah satu perkembangan penting dalam bidang rekayasa genetik adalah rekombinasi dengan metode fusi protoplas. Terdapat beberapa teknik rekombinasi lain yaitu transformasi, transduksi, konjugasi dan transformasi.. Fusi protoplas menawarkan keunggulan karena prosedurnya relatif lebih mudah dan ekonomis dibandingkan dengan yang lain dan segera menghasilkan rekombinan baru yang dikehendaki untuk perbaikan mutu dan sifat dalam waktu yang singkat. Metode fusi protoplas juga memungkinkan didapatkannya jenis-jenis yang diinginkan melalui persilangan yang tidak dapat terjadi secara alami. Aplikasi fusi protoplas juga telah menghasilkan beberapa macam enzim, hasil metabolit dan antibiotik.

Prinsip dasar proses fusi protoplas adalah pelepasan dinding sel bakteri dengan bantuan enzim dan membentuk suatu bangunan yang disebut protoplas. Protoplas