

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Biologi Khamir

Khamir adalah organisme uniseluler yang termasuk golongan 'fungi', bentuk selnya spheris, oval atau silindris dan pada umumnya perbanyakan sel terjadi melalui proses pertunasan ('budding'). Pada proses pertunasan, sel anak akan terbentuk melalui penonjolan ke arah luar dari sel induk, tunas tersebut kemudian membesar dan terlepas dari induknya (Brock *et al.*, 1994).

Khamir biasanya tidak membentuk filamen atau miselium, populasi sel khamir merupakan kumpulan dari beberapa sel tunggal. Sel khamir mempunyai ukuran yang lebih besar dari sel bakteri yaitu lebar 1-9 mikron dan panjang 2-20 mikron. Ukuran sel khamir sangat bervariasi, tergantung dari spesies, nutrisi, umur, dan faktor-faktor lain. Khamir hidup pada habitat yang mengandung gula cukup banyak, seperti pada buah, bunga, dan kulit kayu. Banyak spesies khamir bersifat oksidatif kuat, yaitu tidak dapat melakukan fermentasi alkohol. Khamir semacam ini bersifat aerob, misalnya *Rhodotorula* (Fardiaz, 1992).

Dibanding dengan mikroorganisme lain, khamir banyak digunakan pada industri makanan seperti *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, dan *Pichia*. Khamir dapat digunakan untuk menghasilkan vitamin, enzim, dan protein kualitas tinggi. Sejak khamir dipersiapkan untuk tujuan yang selektif, pertumbuhannya dioptimalkan dengan memperkaya nutrisi alami, seperti produksi protein sel tunggal (PST) (Banwart, 1989).

2.2. Pertumbuhan Khamir

Pertumbuhan sel khamir berarti bertambahnya volume atau ukuran sel, jumlah sel ataupun biomasanya. Pertumbuhan ini dapat digambarkan sebagai sebuah kurva logaritma. Jumlah sel pada waktu inkubasi tertentu dapat diamati dengan mengukur densitas optikal kultur tersebut. Jumlah sel atau biomassa sel diplotkan pada sumbu ordinat, sedangkan waktu (jam) diplotkan dalam sumbu absis. Kurva pertumbuhan ini menunjukkan adanya perubahan kultur khamir selama fase-fase yang berbeda dalam siklus pertumbuhannya. Siklus pertumbuhan khamir tidak jauh berbeda dengan mikroorganisme lainnya. Fase-fase dalam siklus pertumbuhan secara umum terdiri atas fase lag, fase logaritma (eksponensial), fase stasioner, dan fase kematian (Kratochvilova, 1990).

Faktor-faktor yang harus dikontrol selama pertumbuhan meliputi nutrisi, air, pH, suhu, dan aerasi (Jawetz *et al.*, 2001).

2.2.1. Nutrisi Pertumbuhan Khamir

Menurut Kratochvilova (1990), khamir membutuhkan nutrisi yang tepat untuk pertumbuhan dan penggandaan sel. Khamir memperoleh nutrisi dari lingkungan yang tersedia dalam media pertumbuhannya.

Khamir yang sedang tumbuh membuat replika dirinya, membutuhkan elemen-elemen dalam komposisi kimia mereka. Nutrisi harus menyediakan elemen ini dalam bentuk yang mudah dimetabolisme. Di samping itu, khamir membutuhkan energi metabolisme untuk mensintesa makromolekul (Jawetz *et al.*, 2001).

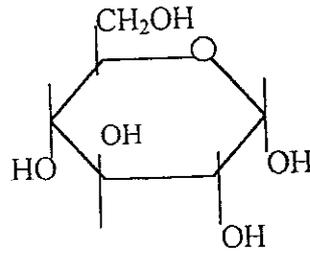
2.2.1.1. Sumber karbon

Khamir adalah organisme kemoheterotrof yang membutuhkan karbon organik untuk pertumbuhan, dan karbon organik tersebut harus dalam bentuk yang dapat diasimilasi. Glukosa dapat membantu pertumbuhan dari banyak mikroorganisme. Sumber karbon yang hendak digunakan harus sesuai dengan galur mikroorganisme yang akan ditumbuhkan. Banyak mikroorganisme respiratif menghasilkan lebih dari cukup CO_2 yang dibutuhkan pada sejumlah reaksi biosintesis, tetapi yang lain membutuhkan sumber CO_2 pada medium pertumbuhan. (Jawetz *et al.*, 2001).

Sumber karbon yang umum digunakan adalah dalam bentuk monosakarida, antara lain glukosa, fruktosa dan manosa, yang ditambahkan pada media pertumbuhan dengan konsentrasi 1-10%. Beberapa khamir juga dapat menggunakan disakarida seperti sukrosa dan maltosa (Kratochvilova, 1990).

A. Glukosa

Glukosa merupakan monosakarida yang paling penting, memiliki gugus aldehid (aldosa) dan 6 atom karbon (heksosa). Banyak ditemukan dalam sari buah, hidrolisis pati, gula tebu, maltosa, sukrosa dan laktosa. Pada tumbuhan glukosa disintesa dari karbondioksida serta air melalui fotosintesis dan disimpan dalam bentuk pati atau diubah menjadi selulosa yang merupakan kerangka tumbuhan (Muray *et al.*, 1997). Struktur molekul glukosa dapat terlihat pada Gambar 01.

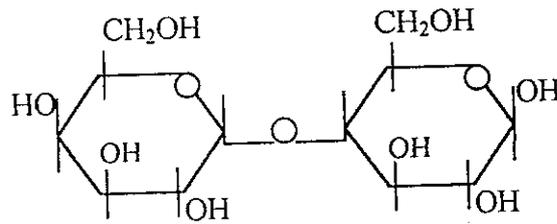


Gambar 01. α -D-glukosa (The Merck Index, 1989)

Pada pertumbuhan khamir, glukosa digunakan sebagai salah satu komponen medium sintetik disamping ekstrak khamir, nitrogen, dan garam. Nutrien yang dapat memberikan pertumbuhan dan produksi pigmen yang baik yaitu glukosa (5%) dan ekstrak khamir (0,5%) (Simpson *et al.*, 1971). Contoh khamir yang menggunakan glukosa sebagai sumber karbonnya yaitu *Phaffia rhodozyma* dimana didalam pertumbuhannya menghasilkan biomassa sebesar 2,57 mg/mL dan total karotenoid 290 μ g/g berat kering sel (An *et al.*, 1989). Pada khamir *Rhodotorula glutinis* dihasilkan biomassa 5,46 g/L berat kering sel dan karotenoid selular yang didapatkan sebesar 265,96 μ g/g berat kering sel (Park and Kim, 2002).

B. Maltosa

Merupakan senyawa yang apabila dihidrolisis akan menghasilkan dua molekul monosakarida yang sama yaitu glukosa dan glukosa. Diantara 2 molekul glukosa tersebut dihubungkan oleh ikatan glikosida 1,4 α . Glukosa yang memberikan atom C nomor 1 untuk mengikat gugus yang lain, ditetapkan sebagai glukosa pokok. Oleh karena atom C nomor 1 pada glukosa pokok mengikat gugus maka daya mereduksi menjadi hilang (Martoharsono, 1993). Struktur molekul maltosa dapat terlihat pada Gambar 02.

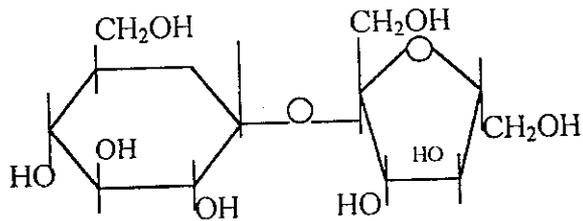


Gambar 02. Maltosa (The Merck Index, 1989)

Maltosa tidak umum digunakan sebagai salah satu sumber karbon untuk pertumbuhan khamir. Dalam metabolismenya sumber karbon maltosa pertama kali dihidrolisis menjadi glukosa dengan bantuan enzim maltase yang selanjutnya mengikuti jalur Embden-Meyerhof-Parnas (glikolisis) (Weusthuis, 1993). Contoh khamir yang dapat menggunakan maltosa sebagai sumber karbonnya adalah *Saccharomyces cerevisiae* yang menghasilkan biomassa sebesar 0,077 g/L (Weusthuis, 1993), dan khamir *Rhodotorula glutinis* yang dapat memproduksi karotenoid sebesar 440,18 µg/g berat kering sel dengan biomassa 4,05 g/L (Park and Kim, 2002).

C. Sukrosa

Sukrosa termasuk disakarida yang tersusun dari 2 satuan monosakarida yang saling berhubungan dengan ikatan glikosida antara atom C nomor 1 dengan atom C nomor 2 dari monosakarida lain (Fessenden and Fessenden, 1984). Pada molekul sukrosa terdapat ikatan antara molekul glukosa dan fruktosa yaitu antara atom C nomor 1 pada glukosa dengan atom C nomor 2 pada fruktosa melalui atom oksigen (Martoharsono, 1993). Struktur molekul sukrosa dapat terlihat pada Gambar 03.

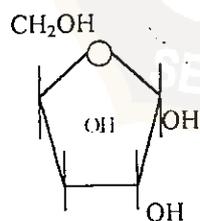


Gambar 03. Sukrosa (Lehninger, 1990)

Khamir akan menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa, dimana fruktosa akan segera dibentuk menjadi fruktosa-6-fosfat dengan enzim fruktokinase dan masuk ke jalur Embden-Meyerhof-Parnas (glikolisis) (Thompson *et al.*, 1992). Contoh khamir yang menggunakan sukrosa sebagai sumber karbon adalah *Rhodotorula glutinis* yang menghasilkan biomassa sebesar 5,77 g/L dengan karotenoid 260,15 $\mu\text{g/g}$ berat kering sel (Park and Kim, 2002).

D. Xilosa

Xilosa merupakan monosakarida yang mempunyai 5 atom karbon (pentosa). Mempunyai daya mereduksi karena mengandung atom C reduktif yang merupakan gugus aldehyd pada atom C nomor 1 (Martoharsono, 1993). Struktur molekul xilosa dapat terlihat pada Gambar 04.



Gambar 04. α -D-xilosa (Poedjiadi, 1994)

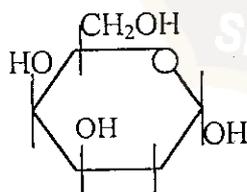
Xilosa umumnya diasimilasi oleh khamir melalui dua reaksi enzimatik. Reaksi pertama yaitu reduksi xilosa menjadi xylitol dengan enzim xylitol reduktase dan reaksi kedua yaitu oksidasi xylitol menjadi xylulose dengan enzim xylitol dehidrogenase. Xylulose kemudian difosforilasi dan dimetabolisme

melalui 2 jalur. Kebanyakan mikroorganisme mengubah xylulosa masuk jalur Embden-Meyerhof-Parnas menjadi fruktosa-6-fosfat namun untuk mikroorganisme heterolaktat masuk jalur fosfoketolase yang melalui gliseraldehid-3-fosfat (Tantirungkij, 1992).

Khamir dapat menggunakan xilosa sebagai sumber karbon, seperti pada *Pichia stiptis* dalam 100 ml substrat menghasilkan pertumbuhan sel 44,7 g/L dan produksi total etanol sebesar 12 g/L (Conoza, 1990). Khamir *Rhodotorula glutinis* menghasilkan biomassa sebesar 1,439 g/L dengan kandungan karotenoid 59,81 µg/g berat kering sel (Park and Kim, 2002).

E. Galaktosa

Monosakarida ini jarang terdapat bebas di alam. Umumnya berikatan dengan glukosa dalam bentuk laktosa, yaitu gula yang terdapat dalam susu. Galaktosa mempunyai rasa kurang manis dibanding glukosa dan kurang larut dalam air (Poedjiadi, 1994). Struktur molekul galaktosa dapat terlihat pada Gambar 05.



Gambar 05. α -D-Galaktosa (The Merck Index, 1989)

Galaktosa merupakan gula yang tidak biasa digunakan sebagai sumber untuk pertumbuhan khamir, namun dapat digunakan apabila di dalam medium tidak terdapat glukosa (Walker, 1997). Salah satu contoh khamir yang dapat mengasimilasi galaktosa adalah *Rhodotorula glutinis* memproduksi

karotenoid sebesar 448,29 $\mu\text{g/g}$ berat kering sel dengan biomassa 4,53 g/L (Park and Kim, 2002).

2.2.1.2. Sumber Nitrogen

Nitrogen merupakan komponen utama protein dan asam nukleat, yaitu sebesar lebih kurang 10% dari berat sel bakteri. Mikroorganisme mempunyai kemampuan yang berbeda dalam mengasimilasi nitrogen. Hasil akhir dari seluruh jalur asimilasi nitrogen adalah dalam bentuk paling tereduksi yaitu ion amonium (NH_4^+) (Jawetz *et al.*, 2001).

Sumber nitrogen untuk khamir biasanya tersedia dalam bentuk komponen organik, seperti pepton, ekstrak yeast, dan lain-lain. Penggunaan sumber nitrogen dan sumber karbon dapat dilakukan dalam waktu yang bersamaan sebagai medium pertumbuhan dengan perbandingan yang tepat (Kratochvilova, 1990).

2.2.2. Air

Air dalam media pertumbuhan terdapat dalam dua bentuk yaitu air terikat dan air bebas. Air terikat mendukung fungsi struktural sel, sedangkan air bebas berperan sebagai sarana transportasi dalam metabolisme (Kratochvilova, 1990).

2.2.3. Aerasi

Khamir menggunakan oksigen dalam bentuk oksigen terlarut. Oksigen tidak dapat disimpan dalam bentuk nutrien, tetapi harus diberikan secara kontinyu. Oksigen terlarut pada medium cair dapat ditingkatkan dengan menyediakan ruangan besar antara gas dan medium. Salah satu cara untuk mencapai hal tersebut

adalah dengan agitasi dari medium cair dengan pengocokkan (“shaking”) baik secara resiprok (bolak-balik) maupun sirkular (Schlegel, 1993).

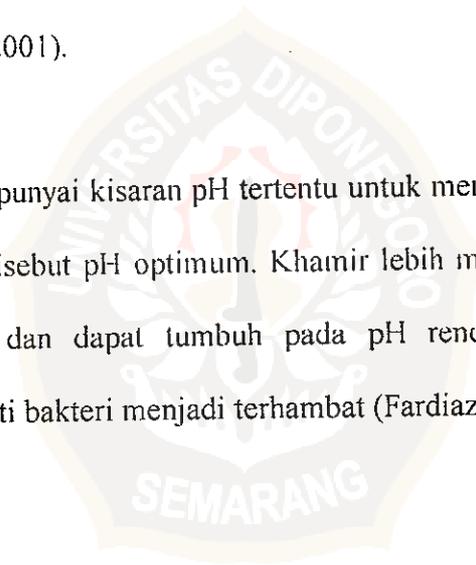
2.2.4. Suhu

Suhu adalah faktor penting yang berpengaruh terhadap pertumbuhan mikrobia dan ketahanan hidupnya. Setiap terjadi kenaikan suhu, reaksi kimia dan reaksi enzimatik di dalam sel dan pertumbuhannya akan menjadi lebih cepat. Setiap terjadi kenaikan suhu pada kisaran tertentu, pertumbuhan dan fungsi metabolisme meningkat sampai batas reaksi inaktivasi (Brock *et al.*, 1994).

Batas atas kisaran suhu yang dapat ditoleransi oleh setiap spesies berhubungan erat dengan stabilitas panas keseluruhan protein spesies yang diukur dalam ekstrak sel (Jawetz *et al.*, 2001).

2.2.5. pH

Setiap mikrobia mempunyai kisaran pH tertentu untuk memungkinkan pertumbuhannya dan biasanya disebut pH optimum. Khamir lebih menyukai pH yang sedikit asam yaitu 4-5, dan dapat tumbuh pada pH rendah dimana pertumbuhan mikrobia lain seperti bakteri menjadi terhambat (Fardiaz, 1992).



2.3. Biologi *Rhodotorula mucilaginosa*

Menurut Carlile and Watkinson (1994), klasifikasi *R. mucilaginosa* sebagai berikut:

- Kingdom : Mycota
- Phylum : Eumycota
- Class : Deuteromycetes
- Order : Cryptococcales
- Family : Cryptococcaceae
- Genus : *Rhodotorula*
- Species : *Rhodotorula mucilaginosa*

Rhodotorula merupakan khamir asporogenous yang terkadang menghasilkan pseudomiselium yang primitif. Selnya berbentuk spheris yang dihasilkan melalui multipolar budding. Khamir jenis ini menghasilkan pigmen karotenoid merah sampai kuning pada medium kulturnya ataupun pada beberapa jenis makanan (Banwart, 1989).

Menurut Fardiaz (1992), *Rhodotorula* memiliki ukuran sel dengan lebar 2,5-5,5 mikron dan panjang 5-10 mikron. Khamir bersifat oksidatif kuat, yaitu tidak dapat melakukan fermentasi alkohol, bersifat aerob, dan tumbuh melebar pada medium pertumbuhannya, dapat ditemukan dalam air ataupun pada tanah.

Khamir *Rhodotorula* dapat digunakan sebagai sumber lipid, protein (sistein dan metionin), dan β -carotene. Aw (Water Activity) minimum untuk pertumbuhannya adalah 0,89-0,92, memiliki temperatur minimum 0,5-5⁰C, dan maksimum 35⁰C, tumbuh optimum pada suhu 29-30⁰C. Khamir pada

umumnya memiliki pH minimum sekitar 4-5, namun pada *R. mucilaginosa* adalah 2,2 dengan penambahan HCl atau asam organik (Frengova *et al.*, 1997).

2.4. Karotenoid

Karotenoid merupakan kelompok senyawa terpenoid dengan jumlah karbon sebanyak lima unit. Warna yang ditimbulkan oleh senyawa ini sangat bervariasi tergantung dari panjang kromofor dan jenis ikatan oksigen yang terkandung didalamnya (Frengova *et al.*, 1997).

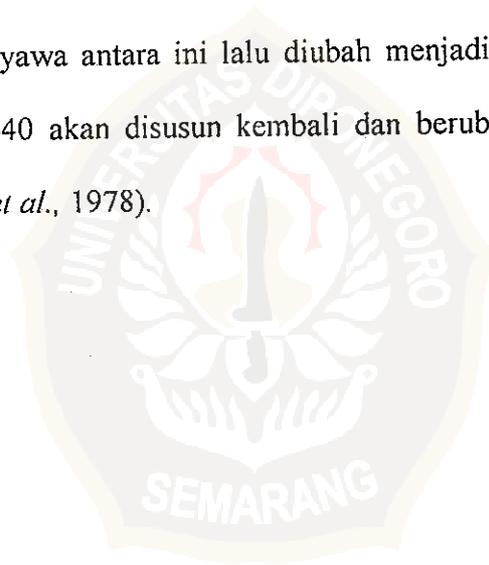
Pada tahun 1928, karoten sebagai salah satu pigmen berwarna kuning tumbuhan diidentifikasi sebagai prekursor vitamin A. Diantara ratusan karotenoid yang terdapat di alam hanya bentuk alfa, beta, dan gama serta kriptosantin yang berperan sebagai provitamin A. Karotenoid terdapat di dalam kloroplas tanaman dan berperan sebagai katalisator dalam fotosintesis yang dilakukan oleh klorofil (Almatsier, 2002).

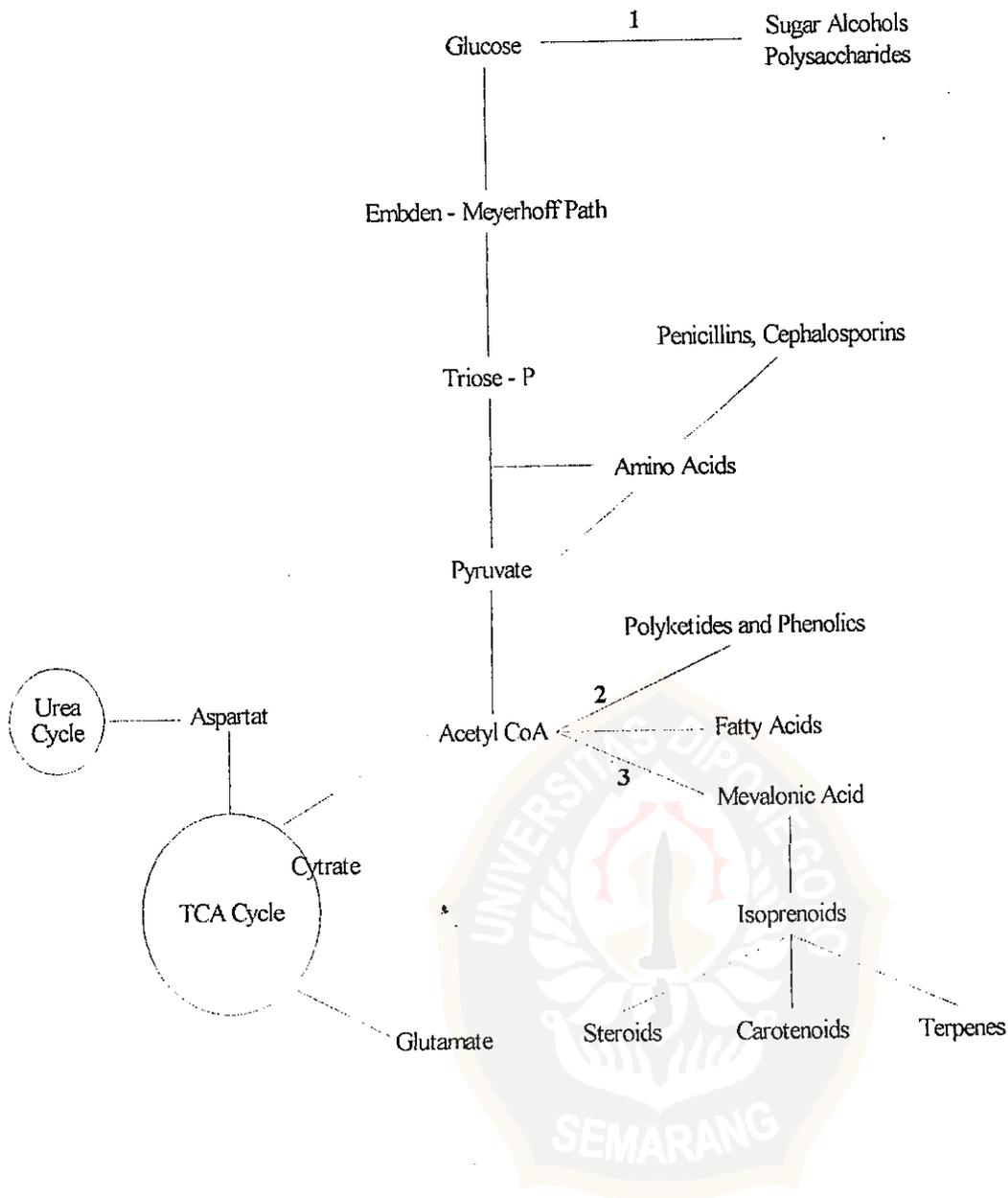
Senyawa karotenoid terbagi dalam tiga kelompok besar, yaitu senyawa-senyawa karoten, yang merupakan hidrokarbon; senyawa-senyawa xantofil, yang merupakan turunan karbon teroksidasi; dan asam karotenat yang diperoleh dari oksidasi degradatif dari karotena C₄₀ sehingga jumlah atom karbonnya tereduksi beberapa untai, dan terbentuk satu atau dua gugus karboksilat (Manitto, 1981).

β -karoten adalah bentuk provitamin A paling aktif, yang terdiri atas dua molekul retinol yang saling berkaitan. Jenis karotenoid ini mempunyai warna sangat kuning dan telah dapat digunakan dalam pemberian warna makanan, antara lain untuk memberi warna kuning pada gelatin, margarin, minuman ringan, dan produk sereal (Almatsier, 2002). Menurut Costa (1987), β -karoten merupakan

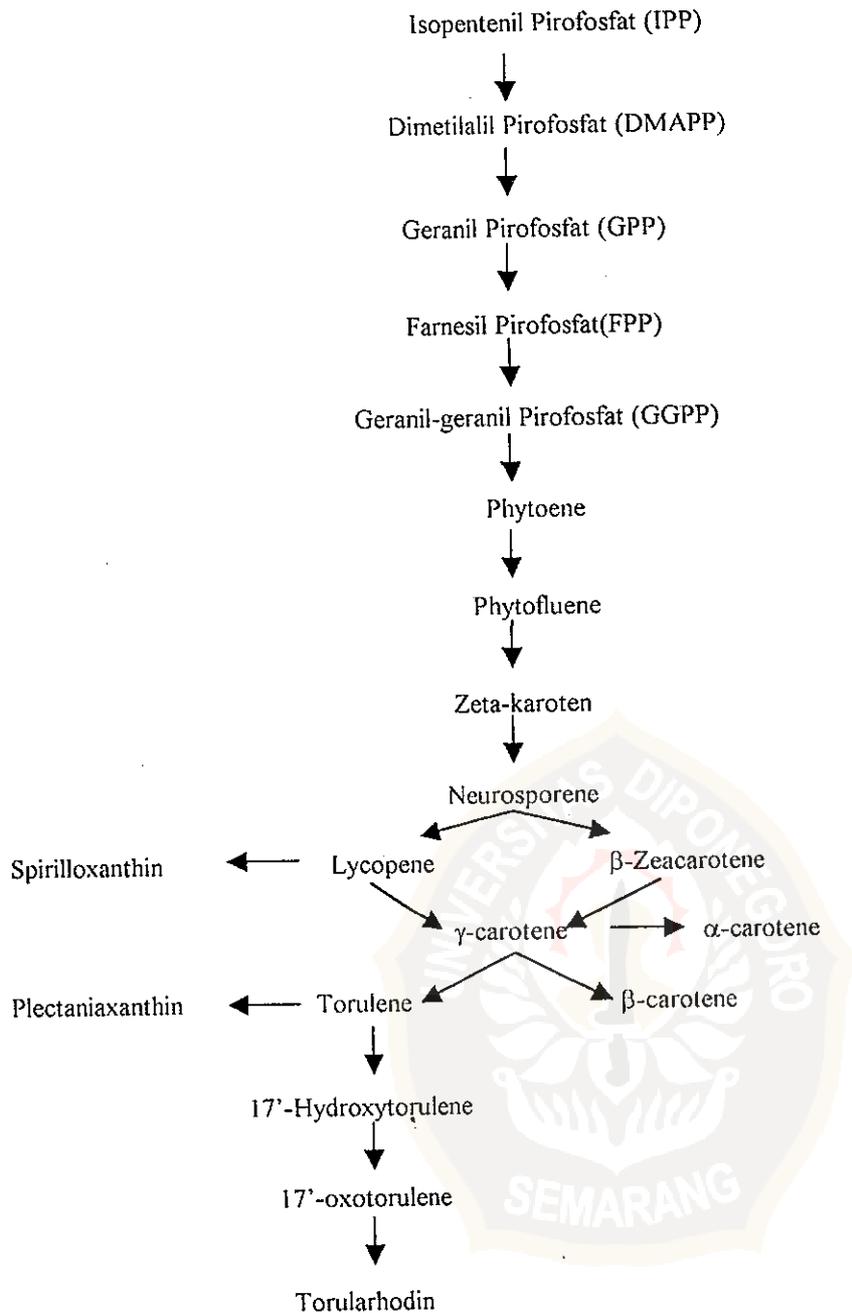
salah satu pigmen karotenoid yang penting untuk pewarna makanan, pertumbuhan dan perbaikan jaringan tubuh, meningkatkan kesehatan kulit serta berperan dalam pembentukan tulang dan gigi.

Khamir *R. mucilaginosa* menghasilkan pigmen karotenoid utama dalam bentuk β -karoten, Torulene, dan Torularhodin yang menyusun sekitar 70% dari pigmen karotenoid total yang dihasilkannya (Frengova *et al.*, 1997). Pigmen karotenoid disintesis melalui jalur asam mevalonat. Sintesis karotenoid tidak terlepas dari metabolisme primer, sekalipun karotenoid merupakan metabolit sekunder (Griffin, 1981). Sintesis karotenoid dimulai dengan adanya senyawa asetil C_0A yang diubah menjadi rantai C-5 terpenoid (isopentenilpirophospat) melalui serangkaian reaksi. Senyawa antara ini lalu diubah menjadi komponen C-40. Reaksi terakhir rantai C-40 akan disusun kembali dan berubah menjadi karotenoid yang spesifik (Phaff *et al.*, 1978).





Gambar 06. Hubungan antara metabolisme primer dan sekunder. (1). Jalur metabolit derivat glukosa; (2). Jalur asetat malonat; (3). Jalur asam mevalonat (Griffin, 1994).



Gambar 07. Jalur karotenoid pada khamir (Simpson *et al.*, 1971)

2.5. HIPOTESIS

Sumber karbon sangat penting digunakan sebagai sumber energi oleh mikroorganisme. Sumber karbon yang berbeda akan berpengaruh terhadap pertumbuhan dan produksi pigmen karotenoid *R. mucilaginosa* UICC Y-18.