

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pertumbuhan *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-18

Pertumbuhan *R. mucilaginosa* UICC Y-18 yang ditentukan dengan rata-rata berat kering sel dapat dilihat pada Tabel 01.

Tabel 01. Rata-rata berat kering sel *R. mucilaginosa* UICC Y-18 pada medium standar dengan sumber karbon yang berbeda

Masa inkubasi (jam)	Rata-rata berat kering sel <i>R. Mucilaginosa</i> UICC Y-18 (g/L)				
	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅
0	0.009 ^b	0.007 ^c	0.007 ^c	0.009 ^b	0.010 ^a
12	1.84 ^{ab}	0.70 ^c	0.66 ^c	1.48 ^b	2.34 ^a
24	2.74 ^a	1.14 ^c	2.00 ^b	2.86 ^a	2.86 ^a
36	3.48 ^a	1.72 ^d	2.98 ^{bc}	2.98 ^{bc}	3.08 ^b
48	4.18 ^{ab}	1.94 ^d	4.12 ^{ab}	4.26 ^a	3.60 ^c
60	4.22 ^a	2.10 ^c	3.38 ^b	4.12 ^a	4.08 ^a
72	5.16 ^a	2.10 ^c	5.26 ^a	4.16 ^b	4.20 ^b
84	4.50 ^{bc}	1.76 ^d	5.00 ^a	4.62 ^{bc}	3.92 ^c
96	3.86 ^a	1.80 ^b	4.02 ^a	3.76 ^a	4.04 ^a
108	4.20 ^b	2.20 ^d	4.28 ^b	4.70 ^a	3.86 ^c
120	4.60 ^a	2.20 ^c	4.56 ^a	4.46 ^a	3.56 ^b

Keterangan : Angka-angka pada baris yang sama yang diikuti oleh huruf superskrip yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda sangat nyata

P₁ = Glukosa

P₄ = Xilosa

P₂ = Maltosa

P₅ = Galaktosa

P₃ = Sukrosa

Rata-rata berat kering sel *R. mucilaginosa* UICC Y-18 untuk semua perlakuan selama masa inkubasi 120 jam menunjukkan kisaran antara 0,007-5,26 g/L, dengan rata-rata berat kering sel tertinggi pada sumber karbon sukrosa (5,26 g/L) yang dicapai pada masa inkubasi 72 jam dan sumber karbon maltosa dengan rata-rata berat kering sel terendah (2,20 g/L) pada masa inkubasi 120 jam.

Hasil analisis sidik ragam (Anova) terhadap rata-rata berat kering sel

R. mucilaginosa UICC Y-18 menunjukkan perbedaan yang sangat nyata terhadap

sumber karbon yang dipakai. Pengaruh sumber karbon tampak berbeda sangat nyata sejak dimulai masa inkubasi 12 jam sampai 120 jam. Hasil analisis sidik ragam (Anova) rata-rata berat kering sel *R. mucilaginosa* UICC Y-18 ditunjukkan pada Tabel 02. di bawah ini.

Tabel 02. Hasil analisis sidik ragam (Anova) rata-rata berat kering sel *R. mucilaginosa* UICC Y-18 pada medium standar dengan sumber karbon yang berbeda.

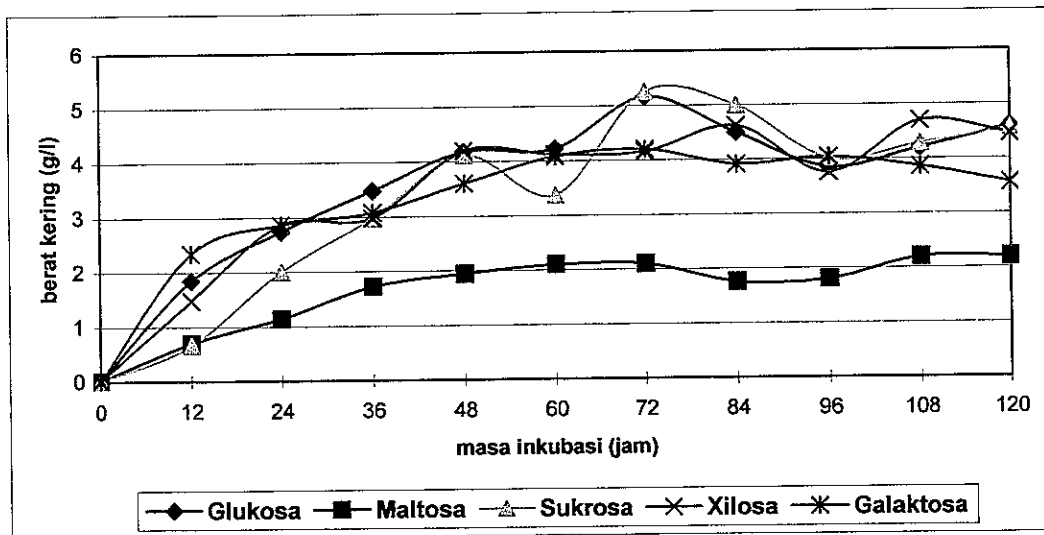
Parameter	Masa Inkubasi (jam)										
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Berat Kering (g/L)	1.25	13.81**	15.25**	25.00**	34.14**	23.36**	35.38**	156.51**	42.06**	61.19**	40.77**

Keterangan : ** = berbeda sangat nyata dengan $F_{tabel(0.05)} = 3.01$ dan $F_{tabel(0.01)} = 4.77$

Rata-rata berat kering sel *R. mucilaginosa* UICC Y-18 yang hasil analisis sidik ragamnya menunjukkan perbedaan sangat nyata, yaitu mulai masa inkubasi 12 jam sampai 120 jam dilakukan uji lanjut. Uji lanjut yang digunakan adalah uji Duncan untuk koefisien keragaman lebih dari 10% dan uji BNT untuk koefisien keragaman kurang dari 10%. Hasil uji Duncan dan BNT menunjukkan bahwa sumber karbon yang maksimal untuk media pertumbuhan *R. mucilaginosa* UICC Y-18 adalah sukrosa dengan produksi berat kering sel sebesar 5,26 g/L dan glukosa sebesar 5,16 g/L dengan perbedaan yang tidak nyata (Tabel 01).

R. mucilaginosa UICC Y-18 yang ditumbuhkan pada sumber karbon xilosa memasuki fase eksponensial pada masa inkubasi 12 jam sampai 48 jam, sedangkan pada sumber karbon lainnya (glukosa, maltosa, sukrosa, dan galaktosa) pada masa inkubasi 12 jam sampai 60 jam. Setelah fase eksponensial dilanjutkan dengan fase stasioner sampai akhir masa inkubasi, namun pada sumber karbon galaktosa mengalami penurunan pada inkubasi 96 jam. Grafik pertumbuhan

R. mucilaginosa UICC Y-18 pada medium standar dengan sumber karbon berbeda dapat dilihat pada Gambar 08.



Gambar 08. Kurva pertumbuhan *R. mucilaginosa* UICC Y-18 pada medium standar dengan sumber karbon berbeda selama inkubasi 120 jam dengan agitasi 220 rpm pada temperatur ruangan.

Pertumbuhan *R. mucilaginosa* UICC Y-18 maksimal pada sumber karbon sukrosa dengan adanya enzim invertase yang dikandungnya. Fase eksponensial dari pertumbuhan *R. mucilaginosa* UICC Y-18 menghasilkan berat kering yang tidak maksimal disebabkan karena adanya perombakan sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Menurut Garraway and Evans (1984), menyatakan bahwa perbedaan nutrisi yang terdapat dalam medium dapat menghasilkan profil pertumbuhan yang berbeda oleh karena kecepatan konsumsi dan metabolisme yang berbeda. Glukosa hasil hidrolisis akan segera masuk jalur glikolisis dan fruktosa masuk jalur glikolisis melalui senyawa fruktosa-6-fosfat dengan bantuan enzim fruktokinase. Adanya penambahan energi melalui senyawa fruktosa-6-fosfat masuk jalur glikolisis menyebabkan pertumbuhan *R. mucilaginosa* UICC Y-18 dapat lebih maksimal.

Sebagai kontrol perlakuan, sumber karbon glukosa merupakan monosakarida yang banyak dijumpai pada lingkungan khamir dan semua khamir memiliki sistem transport serta sistem enzim penerima glukosa, sehingga apabila sel khamir ditumbuhkan pada medium sintetik yang mengandung glukosa sebagai sumber karbon utamanya memiliki periode lag fase yang cepat dan memiliki pertumbuhan yang tinggi sejalan dengan fase pertumbuhannya (Griffin, 1994). Glukosa yang diberikan sebagai sumber karbon utama untuk pertumbuhan khamir segera masuk jalur glikolisis yang akan menghasilkan energi untuk pertumbuhan.

Pada sumber karbon xilosa, pertumbuhan sel tidak terlalu maksimal bila dibandingkan dengan sukrosa dan glukosa. Xilosa dimetabolisme oleh *R. mucilaginosa* UICC Y-18 melalui 2 reaksi enzimatik, yaitu reduksi xilosa menjadi xylitol oleh enzim xylitol reduktase dan oksidasi xylitol menjadi xylulose oleh xylitol dehidrogenase. Xylulose masuk jalur glikolisis melalui reaksi fosforilasi menjadi fruktosa-6-fosfat (Tantirungki, 1992).

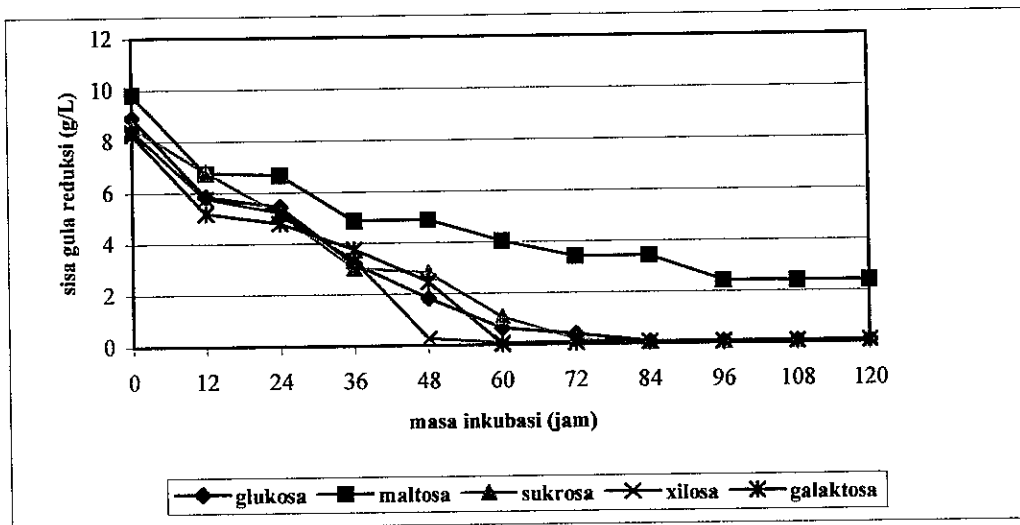
Hasil penelitian terhadap sumber karbon galaktosa menunjukkan bahwa pertumbuhan sel *R. mucilaginosa* UICC Y-18 kurang maksimal. Dalam metabolisme, galaktosa akan segera difosforilasi menjadi galaktosa-1-fosfat selanjutnya terikat dengan uridin difosfat menjadi UDP-galaktosa yang akan mengalami epimerasi sehingga terbentuk UDP-glukosa. Senyawa ini masuk jalur glikolisis melalui senyawa glukosa-1-fosfat yang akan segera diubah menjadi glukosa-6-fosfat (Schumm, 1992).

Menurut Verduyn (1991), menyatakan bahwa untuk pembentukan protein didalam sel ataupun pembentukan biomassa sangat ditentukan oleh jumlah ATP yang dihasilkan. Pada proses perombakan xilosa dan galaktosa lebih banyak

membutuhkan ATP sehingga ATP yang dihasilkan lebih sedikit. Pada sumber karbon xilosa, perombakan menjadi xylulose-5-fosfat diperlukan 1 ATP, proses fosforilasi pada sumber karbon galaktosa menjadi galaktosa-1-fosfat diperlukan 1 ATP. Meskipun adanya persamaan dalam menghasilkan ATP namun profil pertumbuhan *R. mucilaginosa* UICC Y-18 pada sumber karbon xilosa dan galaktosa berbeda. Perbedaan sumber karbon pada medium pertumbuhan dapat menentukan biomassa yang dihasilkan meskipun dalam 1 strain (Verduyn, 1991). Menurut Gaudy and Gaudy (1981), kesanggupan suatu spesies dalam menggunakan sumber karbon tergantung dengan informasi genetik yang dikandungnya.

Pertumbuhan *R. mucilaginosa* UICC Y-18 paling rendah pada sumber karbon maltosa. Maltosa dirombak oleh enzim maltase yang terdapat dalam sel menjadi 2 molekul glukosa. Pada saat maltosa terus dikonsumsi oleh sel terjadi peningkatan enzim maltase yang dapat menghambat proses glikolisis di dalam sel (Weusthuis *et al.*, 1993).

Semua sumber karbon yang dimetabolisme oleh sel akan dibentuk menjadi CO₂ dan H₂O beserta sejumlah ATP yang dihasilkannya, perombakan ini berguna untuk pembentukan material sel (Oura, 1983). Menurut Bauchop and Elsdon (1983), sel yang sedang tumbuh sebagian besar disusun oleh monomer asam amino, basa purin dan pirimidin, heksosa dan asam asetat. ATP yang dihasilkan dalam metabolisme dibutuhkan untuk reaksi polimerisasi monomer-monomer tersebut.



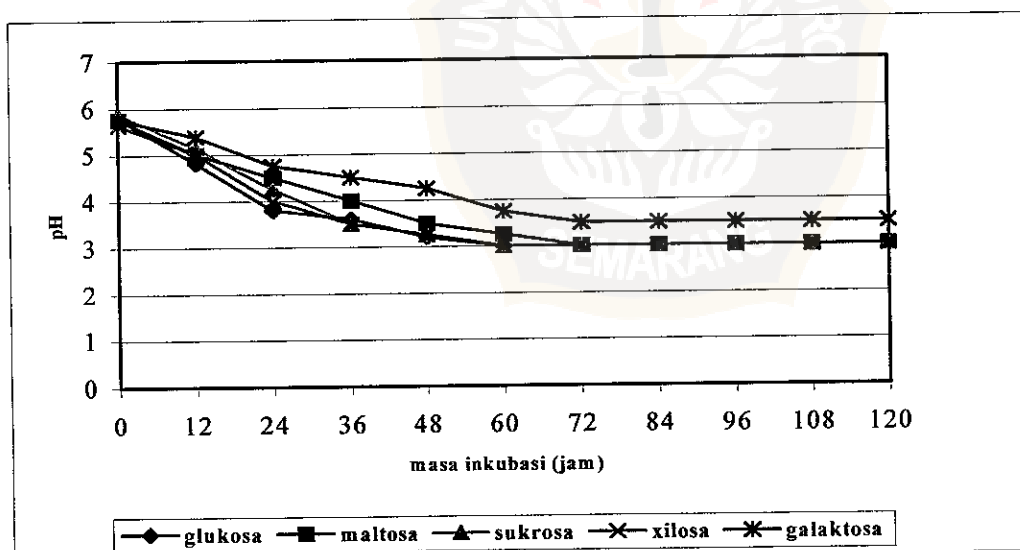
Gambar 09. Kurva sisa gula reduksi (g/L) *R. mucilaginosa* UICC Y-18 pada medium standar dengan sumber karbon berbeda selama inkubasi 120 jam dengan agitasi 220 rpm pada temperatur ruangan.

Gambar 09. merupakan kurva sisa gula reduksi dari sumber karbon yang berbeda, dimana terlihat perbedaan konsumsi gula reduksi oleh *R. mucilaginosa* UICC Y-18. Sisa gula reduksi di akhir inkubasi untuk keempat sumber karbon (glukosa, sukrosa, xilosa, dan galaktosa) adalah sama yaitu 0,085g/L sedangkan untuk sumber karbon maltosa yaitu 2,415 g/L. Konsumsi gula reduksi untuk masing-masing perlakuan berturut-turut adalah 8,834 g/L (glukosa), 8,461 g/L (sukrosa), 8,313 g/L (xilosa), 8,179 g/L (galaktosa), dan 7,386 g/L (maltosa). Pada sumber karbon glukosa dan sukrosa habis dikonsumsi oleh *R. mucilaginosa* UICC Y-18 pada masa inkubasi 84 jam, sedangkan sumber karbon xilosa dan galaktosa pada masa inkubasi 60 jam.

Penggunaan sumber karbon untuk pertumbuhan paling maksimal pada fase eksponensial dan mulai berkurang pada saat memasuki fase stasioner. Menurut Blanch dan Einsele (1973), pada fase eksponensial kultur 'batch', kecepatan pertumbuhan mikroorganisme menjadi maksimum diikuti dengan pengurangan jumlah sumber karbon yang tinggi. Pada fase ini kecepatan

pembelahan sel paling tinggi, waktu generasi paling pendek dan konstan, metabolisme paling cepat sehingga sintesis bahan sel sangat cepat dan konstan (Kratochvilova, 1992). Keadaan ini berlangsung terus sampai nutrisi habis dan terjadi penimbunan hasil-hasil metabolisme yang bersifat racun sehingga menyebabkan terhambatnya pertumbuhan sampai menuju fase kematian. Pada sumber karbon maltosa, sel paling sedikit dalam mengkonsumsi gula terlihat pada pertumbuhan selnya yang paling rendah diantara sumber karbon yang diamati.

Aktivitas metabolisme *R. mucilaginosa* UICC Y-18 menyebabkan perubahan pH seperti yang ditunjukkan pada gambar 10. Pengukuran pH medium dilakukan bersamaan pada saat pengambilan sampel untuk pertumbuhan dan produksi pigmen. pH medium mengalami penurunan sampai pada masa inkubasi 72 jam yang selanjutnya mencapai keadaan yang konstan seiring dengan dimulainya fase stasioner.



Gambar 10. Grafik perubahan pH medium pertumbuhan *R. mucilaginosa* UICC Y-18 selama inkubasi 120 jam dengan pH awal 6,5, agitasi 220 rpm pada temperatur ruangan.

pH sangat menentukan dalam pertumbuhan ataupun produksi pigmen. Adsorpsi dan disosiasi molekul melalui membran sel dapat berjalan

dengan kondisi pH yang sesuai (Hawker and Linton, 1979). pH yang optimal bagi sel, menyebabkan aktivitas enzim dalam merombak sumber karbon menjadi maksimal. Pada pertumbuhan sel, pH makin menurun seiring dengan pemakaian sumber karbon untuk pertumbuhannya. Sumber karbon yang dikonsumsi untuk pertumbuhan akan diubah menjadi asam organik sehingga dapat menurunkan pH (Schlegel, 1992). Dalam pembentukan pigmen karotenoid membutuhkan kondisi pH yang optimal sehingga 3 proses utama yaitu dehidrogenasi, siklisasi, dan oksidasi dapat berjalan optimal.

4.3. Pigmen Karotenoid *R. mucilaginosa* UICC Y-18

Hasil pengamatan terhadap rata-rata pigmen karotenoid yang dihasilkan *R. mucilaginosa* UICC Y-18 selama inkubasi 120 jam dengan sumber karbon berbeda dapat dilihat pada Tabel 03.

Tabel 03. Rata-rata pigmen karotenoid *R. mucilaginosa* UICC Y-18 pada medium standar dengan sumber karbon berbeda

Masa inkubasi (jam)	Rata-rata pigmen karotenoid <i>R. mucilaginosa</i> UICC Y-18 ($\mu\text{g/g}$ berat kering sel)				
	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅
0	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
12	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
24	10.06 ^b	0.00 ^c	11.13 ^a	0.00 ^c	0.00 ^c
36	14.14 ^a	8.92 ^{bc}	8.39 ^{bc}	13.00 ^b	0.00 ^d
48	11.89 ^{abc}	15.03 ^a	12.81 ^{ab}	10.30 ^{abc}	0.00 ^d
60	37.13 ^a	27.49 ^{ab}	11.76 ^c	17.99 ^b	0.00 ^{cd}
72	45.89 ^a	28.45 ^b	8.49 ^c	38.07 ^{ab}	0.00 ^d
84	62.64 ^a	54.03 ^{ab}	8.68 ^d	48.25 ^c	1.20 ^c
96	68.87 ^a	58.09 ^{ab}	14.26 ^c	50.85 ^{ab}	5.91 ^c
108	65.04 ^a	49.59 ^{ab}	19.40 ^c	50.20 ^{ab}	7.76 ^d
120	67.23 ^a	58.04 ^{bc}	27.20 ^{bcd}	46.17 ^b	8.34 ^d

Keterangan : Angka-angka pada baris yang sama yang diikuti oleh huruf superskrip yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda sangat nyata

P₁ = Glukosa

P₄ = Xilosa

P₂ = Maltosa

P₃ = Galaktosa

P₃ = Sukrosa

Hasil penelitian rata-rata kandungan pigmen karotenoid *R. mucilaginosa* UICC Y-18 untuk semua perlakuan selama masa inkubasi 120 jam menunjukkan kisaran antara 0,00–68,87 $\mu\text{g/g}$ berat kering sel, dengan rata-rata kandungan pigmen karotenoid tertinggi pada sumber karbon glukosa (68,87 $\mu\text{g/g}$ berat kering sel) yang dicapai pada masa inkubasi 96 jam.

Hasil analisis sidik ragam (Anova) terhadap rata-rata kandungan pigmen karotenoid *R. mucilaginosa* UICC Y-18 menunjukkan perbedaan yang sangat nyata terhadap sumber karbon yang dipakai. Pengaruh sumber karbon tampak berbeda sangat nyata sejak dimulai masa inkubasi 24 jam sampai 120 jam. Hasil analisis sidik ragam (Anova) rata-rata kandungan pigmen karotenoid *R. mucilaginosa* UICC Y-18 ditunjukkan pada Tabel 04.

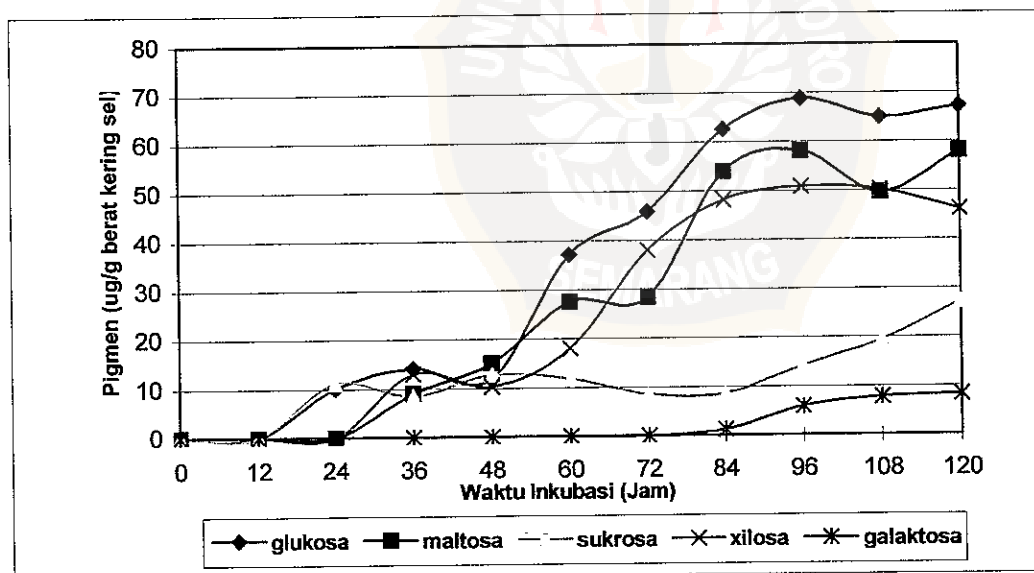
Tabel 04. Hasil analisis sidik ragam (Anova) rata-rata kandungan pigmen karotenoid *R. mucilaginosa* UICC Y-18 pada medium standar dengan sumber karbon yang berbeda.

Parameter	Masa Inkubasi (jam)										
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Pigmen Total ($\mu\text{g/g}$ berat kering sel)	0.00	0.00	18.351**	7.443**	32.898**	183.037**	260.091**	96.538**	10.539**	21.268**	10.838**

Keterangan : ** = berbeda sangat nyata dengan $F_{tabel(0.05)} = 3.01$ dan $F_{tabel(0.01)} = 4.77$

Rata-rata kandungan pigmen karotenoid *R. mucilaginosa* UICC Y-18 yang hasil analisis sidik ragamnya menunjukkan perbedaan sangat nyata, yaitu mulai masa inkubasi 24 jam sampai 120 jam dilakukan uji lanjut. Uji lanjut yang digunakan adalah uji Duncan untuk koefisien keragaman lebih dari 10% dan uji BNT untuk koefisien keragaman kurang dari 10%. Hasil uji Duncan dan BNT menunjukkan bahwa sumber karbon yang maksimal untuk produksi pigmen karotenoid *R. mucilaginosa* UICC Y-18 adalah glukosa dengan produksi pigmen sebesar 68,87 $\mu\text{g/g}$ berat kering sel (Tabel 03).

Gambar 11. menunjukkan kurva produksi pigmen karotenoid *R. mucilaginosa* UICC Y-18, dimana pigmen karotenoid mulai diproduksi pada saat pertumbuhan sel memasuki fase eksponensial yaitu masa inkubasi 12 jam untuk glukosa dan sukrosa dan masa inkubasi 24 jam untuk maltosa dan xilosa. Pigmen karotenoid mengalami peningkatan yang tajam pada saat pertumbuhan sel mencapai fase stasioner (masa inkubasi 48 sampai 120 jam), namun pada sumber karbon galaktosa *R. mucilaginosa* UICC Y-18 mulai memproduksi pigmennya setelah masa inkubasi 72 jam. Produksi pigmen karotenoid pada sumber karbon xilosa mengalami penurunan setelah masa inkubasi 108 jam, namun pada sumber karbon glukosa, maltosa, dan galaktosa belum menunjukkan penurunan produksi pigmennya. Produksi pigmen karotenoid pada sumber karbon sukrosa masih mengalami peningkatan sampai masa inkubasi 120 jam.



Gambar 11. Kurva produksi pigmen karotenoid *R. mucilaginosa* UICC Y-18 pada medium standar dengan sumber karbon berbeda selama inkubasi 120 jam dengan agitasi 220 rpm pada temperatur ruangan.

Produksi pigmen karotenoid sudah dimulai pada fase eksponensial (umur inkubasi 48 jam) dan meningkat tajam pada saat fase stasioner. Pigmen karotenoid disintesis melalui jalur asam mevalonat dengan prekursor asetil ko-A. Akumulasi asetil ko-A pada metabolisme primer dapat menginduksi enzim yang diperlukan pada biosintesa metabolit sekunder (Johnson and Lewis, 1979). Pada saat fase stasioner, dimana pertumbuhan sudah mencapai maksimal bahkan ada beberapa sel yang mati oleh karena autolisis, metabolit sekunder dibentuk lebih maksimal untuk ketahanan hidup sel (Brock *et al.*, 1994).

Pada sumber karbon galaktosa pigmen karotenoid mulai diproduksi pada fase stasioner (umur inkubasi 72 jam) dengan jumlah yang paling rendah. Menurut Sonnichsen *et al.*, (1993) menyatakan bahwa pada saat galaktosa dimetabolisme oleh khamir akan terbentuk protein karier yang membantu penyerapan galaktosa masuk membran sel dan enzim galaktokinase yang berperan dalam pembentukan galaktosa-1-fosfat yang selanjutnya ditransformasikan menjadi glukosa-6-fosfat. Glukosa-6-fosfat masuk jalur glikolisis menghasilkan banyak ATP untuk pertumbuhan hingga sel mencapai ukuran maksimum, sehingga kemungkinan penyebab rendahnya produksi pigmen karotenoid adalah karena energi yang rendah untuk jalur asam mevalonat atau kurang lengkapnya enzim yang berperan dalam pembentukan karotenoid.

Menurut penelitian Gallo and Katz (1972) dalam Bennet and Ciegler (1983) menyatakan bahwa pembentukan metabolit sekunder sangat lambat sekali sampai sumber karbon dalam medium habis. Pada saat sumber karbon dalam medium habis, metabolit sekunder lebih maksimal dibentuk. Hal tersebut

menunjukkan bahwa pembentukan enzim untuk terbentuknya metabolit sekunder terjadi pada saat limitasi nutrien dalam medium.

Pada sumber karbon maltosa menghasilkan pertumbuhan sel yang tidak optimal didukung dengan konsumsi gula reduksi yang rendah (gambar 09.) sedangkan pigmen karotenoid yang dikandungnya lebih besar daripada sukrosa, xilosa dan galaktosa. Pembentukan enzim maltase yang menghambat dalam proses glikolisis menyebabkan gula yang sudah terhidrolisis masuk ke dalam jalur asam mevalonat yang akan merangsang pembentukan pigmen karotenoid.

Pada sumber karbon sukrosa menghasilkan pertumbuhan sel yang baik namun pigmen karotenoidnya rendah. Pembentukan ATP yang maksimal untuk pertumbuhan menyebabkan kondisi medium menjadi asam sehingga tidak optimum untuk terjadinya proses dehidrogenasi, siklisasi, dan oksidasi yang merupakan 3 proses utama dalam pembentukan pigmen karotenoid (Kratochvilova, 1992).

