

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA DAN HIPOTESIS

2.1. Biologi Khamir

Khamir adalah organisme uniseluler yang termasuk ‘fungi’ dan umumnya perbanyak 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. 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 dan dapat dibedakan berdasarkan ukuran dan kehadiran struktur selnya yang sangat jelas. Khamir hidup pada habitat yang mengandung gula cukup banyak, seperti pada buah, bunga, dan kulit kayu (Brock *et al.*, 1994).

Beberapa bentuk khamir, di antaranya adalah bulat atau sferoid, elips atau bulat telur, batang atau silindris, seperti buah jeruk (lemon). Khamir tidak memiliki flagela, sehingga tidak dapat melakukan gerakan aktif. Bentuk sel khamir tetap sehingga dapat membantu untuk identifikasi (Rahayu dan Sudarmadji, 1980).

Sel khamir memiliki ukuran yang sangat bervariasi, tergantung dari spesies, nutrisi, umur, dan faktor-faktor lain. Biasanya sel khamir memiliki ukuran lebar 1-9 μm dan panjang 2-20 μm . Banyak spesies khamir bersifat oksidatif kuat, yaitu tidak dapat melakukan fermentasi alkohol. Khamir semacam ini bersifat aerob, misalnya *Rhodotorula* (Fardiaz, 1992).

Pembentukan tunas pada khamir terjadi setelah sel mencapai ukuran tertentu. Fase pembentukan tunas adalah sentrosom membentuk tonjolan yang mendesak sitoplasma sehingga terjadi tonjolan pada sel. Tonjolan tersebut kemudian tumbuh menjadi besar yang diikuti dengan masuknya bagian-bagian inti ke dalam tonjolan, kemudian diikuti dengan pembentukan sekat pada bekas tonjolan. Setelah tonjolan tersebut menjadi sel anakan dan cukup dewasa maka segera melepaskan diri (Rahayu dan Sudarmadji, 1980).

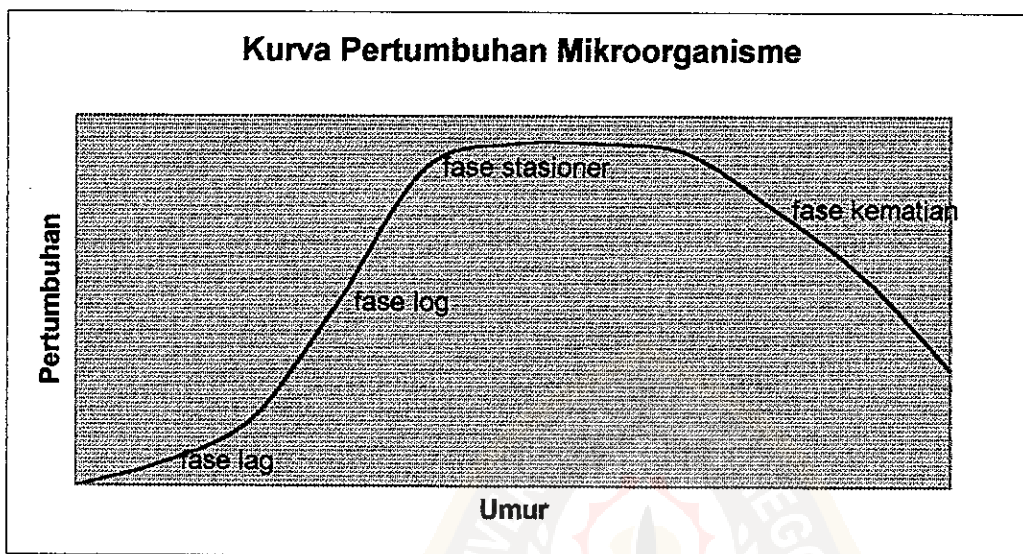
Kenampakan pertumbuhan sel khamir pada semua bagian media penting untuk identifikasi, misalnya terbentuk lapisan tipis (film) menunjukkan adanya khamir jenis oksidatif atau "film yeast", sedangkan khamir yang berwarna adalah genus *Rhodotorula* dengan warna merah oranye yang berupa karotenoid (Rahayu dan Sudarmadji, 1980).

2.2. Pertumbuhan Khamir

Semua bentuk kehidupan, dari mikroorganisme sampai kepada manusia, mempunyai persamaan dalam hal persyaratan nutrisi tertentu dalam bentuk zat-zat kimiawi yang diperlukan untuk pertumbuhan dan fungsinya yang normal (Pelczar dan Chan, 1986).

Menurut Kratochvilova (1990), 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 pertumbuhannya terdiri atas fase lag, fase logaritma (eksponensial), fase stasioner, dan fase kematian.



Gambar 01. Kurva pertumbuhan mikrobial (Fardiaz, 1992)

Mikrobia dapat tumbuh dan berkembang dengan baik bila media yang digunakan memenuhi syarat, antara lain mengandung semua unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan, pH yang sesuai untuk pertumbuhan, serta steril untuk menghindari kontaminasi (Suriawiria, 1986).

Menurut Kratochvilova (1990), untuk pertumbuhan dan perbanyakannya, sel khamir membutuhkan nutrisi yang cukup dan sesuai. Sel akan mengambil nutriennya dari lingkungan atau medium. Nutrisi dasar yang dibutuhkan oleh khamir adalah air, karbon, dan nitrogen. Khamir juga membutuhkan elemen-elemen penting lain, yaitu elemen biogenik untuk

pembentukan organel-organel sel (oksigen, hidrogen, fosfor, dan magnesium), elemen oligobiogenik ('trace element' atau mikroelemen) yang dibutuhkan dalam jumlah kecil, seperti vitamin dan substansi pertumbuhan lain. Medium khamir harus memiliki kandungan air yang cukup, sedikitnya 30% untuk bentuk khamir dan 20% untuk bentuk hifa. Air menyusun lebih dari 85% massa sel dan berada dalam bentuk terikat maupun tidak terikat. Air yang terikat dibutuhkan sebagai bahan penyusun struktur sel, sedangkan air bebas digunakan sebagai sarana transportasi selama metabolisme dan sebagai tempat terjadinya reaksi metabolisme dan penyimpanan sementara senyawa antara. Air bebas juga digunakan untuk membuang kelebihan panas.

Sifat-sifat fisiologis khamir adalah secara umum kebutuhan akan air lebih sedikit dibandingkan dengan bakteri pada umumnya, beberapa jenis khamir membutuhkan air lebih banyak dibandingkan dengan jamur. Jenis khamir tertentu mempunyai persyaratan A_w yang rendah, yaitu yang tergolong dalam osmofilik. Interval A_w untuk pertumbuhan secara normal adalah 0.88-0.94, sedangkan untuk khamir osmofilik adalah 0.62-0.65. Temperatur pertumbuhan khamir yang optimal antara 25-30.5 °C, maksimal temperatur pertumbuhan adalah 35-47.5 °C. pH optimal antara 4.0-4.5, dan tidak dapat tumbuh baik pada media yang bersifat alkalis (Sudarmadji dan Rahayu, 1980).

Menurut Kratochvilova (1990), khamir adalah organisme kemoheterotrof yang membutuhkan karbon dan nitrogen dalam bentuk komponen organik. Sumber karbon yang umumnya siap digunakan adalah dalam bentuk monosakarida, antara lain glukosa, fruktosa, dan manosa. Beberapa khamir juga dapat menggunakan disakarida seperti sukrosa dan maltosa.

Khamir tumbuh baik pada suasana aerob, tetapi untuk jenis fermentatif dapat tumbuh secara anaerob, walaupun secara lambat. Secara umum gula merupakan sumber energi yang paling baik, hanya untuk jenis khamir oksidatif dapat menggunakan asam organik dan alkohol. Penggunaan sumber nitrogen untuk pertumbuhan dengan penambahan ammonia, urea, atau polipeptida (Rahayu dan Sudarmadji, 1980).

Khamir memerlukan senyawa atau unsur karbon sebagai bahan utama pembentukan sel dan sumber energi, sedangkan senyawa nitrogen diperlukan untuk sintesis protoplasma dan dinding sel. Nitrogen akan dimanfaatkan sebagai penyusun protein membran yang bersama dengan lipid akan membentuk lipoprotein membran. Protein membran menentukan elastisitas membran sel, sehingga meningkatkan proses penyerapan nutrisi dan menjadikan sel tahan terhadap perubahan-perubahan yang terjadi selama metabolisme, seperti perubahan pH dan temperatur (Kimball, 1992).

Menurut Schlegel dan Schmidt (1994), belerang dan nitrogen terdapat dalam sel dalam bentuk tereduksi sebagai gugus sulfhidril dan amino. Sebagian besar mikroorganisme mampu menampung unsur-unsur ini dalam bentuk oksida dan mereduksi sulfat dan juga nitrat. Sumber nitrogen yang paling umum untuk mikroorganisme adalah garam-garam amonium. Beberapa prokariot mampu mereduksi nitrogen dalam bentuk molekul (N_2 atau dinitrogen). Mikroorganisme lain memerlukan asam-asam amino sebagai sumber nitrogen organik. Tidak semua mikroorganisme mampu mereduksi sulfat, beberapa di antaranya memerlukan H_2S atau sistein sebagai sumber S.

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 cara tersebut adalah dengan agitasi dari medium cair dengan pengocokan ("shaking") baik secara resiprok (bolak-balik) maupun sirkular (Schlegel dan Schmidt, 1994).

2.3. Sumber Nitrogen

Khamir memiliki kemampuan untuk menggunakan bermacam sumber nitrogen inorganik dan organik yang berbeda, seperti asam amino, peptida, protein, asam nukleat, dan vitamin. Pada media pertumbuhannya sering ditambahkan sejumlah tertentu campuran beberapa asam amino kompleks. Khamir juga dapat tumbuh dengan menggunakan ion ammonium sebagai sumber nitrogen utamanya, karena khamir memiliki seluruh rangkaian gen pengkode enzim yang dibutuhkan untuk biosintesis semua asam amino (Walker, 1997).

Menurut Schlegel dan Schmidt (1994), sumber nitrogen dapat digunakan oleh khamir untuk pertumbuhannya, namun jenisnya tergantung pada spesies atau strain. Misalnya nitrogen dalam bentuk ammonia cair, garam ammonium, urea, nitrat, serta derivat protein terlarut, seperti peptida, pepton, dan asam amino seperti monosodium glutamat. Hanya beberapa spesies yang dapat mengasimilasi nitrogen dalam bentuk nitrat, misalnya spesies dari genus *Rhodotorula* yang dapat menggunakan nitrat sebagai sumber nitrogennya. Ammonia dan garam ammonium, umumnya dalam bentuk ammonium sulfat dan diammonium hidrogen fosfat, merupakan sumber nitrogen yang paling banyak

digunakan dalam pertumbuhan khamir. Corn-steep liquor dapat digunakan sebagai sumber nitrogen organik.

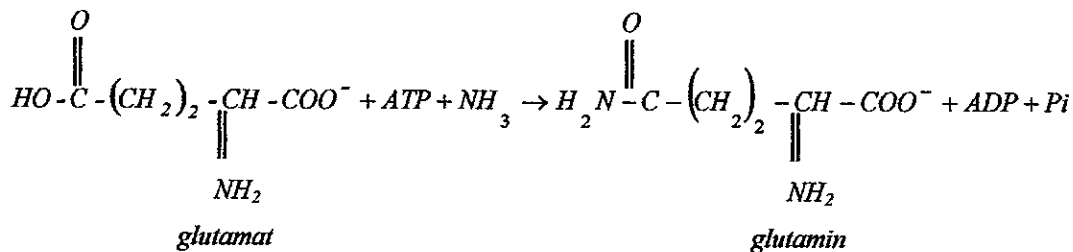
Menurut Kratochvilova (1990), sumber nitrogen untuk khamir biasanya tersedia dalam bentuk komponen organik, seperti pepton, ekstrak yeast, dan lain-lain. Garam ammonium (sulfat, fosfat, nitrat) juga dibutuhkan oleh sel khamir. Garam ammonium dari asam organik lebih baik daripada garam ammonium dari asam anorganik. Asam amino dapat menjadi sumber karbon dan sumber nitrogen dalam waktu yang bersamaan dan sering digunakan dalam media pertumbuhan dengan perbandingan yang tepat.

2.3.1. Ammonia

Sebagai sumber nitrogen inorganik, ion ammonium dapat ditambahkan pada medium pertumbuhan sebagai suplai nutrisi atau berupa hasil katabolisme dari senyawa nitrogen lain. Ion ammonium dapat langsung diubah menjadi asam amino, yaitu glutamat dan glutamin, yang lalu dapat berperan sebagai donor amino dalam banyak reaksi lain, khususnya dalam pembentukan cincin purin (Brock *et al.*, 1994; Walker, 1997).

Menurut Brock *et al.* (1994), walaupun ammonia memiliki tahap oksidasi yang sama dengan kelompok amino, asimilasi ammonia menjadi asam amino tetap membutuhkan energi. Kebanyakan mikroorganisme memiliki dua jalur untuk asimilasi ammonia, dan salah satu tahapannya tergantung pada konsentrasi ammonia eksternal. Pada saat konsentrasi ammonia tinggi, jalur glutamat dehidrogenase berperan, dalam pembentukan asam glutamat dari ammonia dan α -ketoglutarat. Reaksi sintesis glutamat ini membutuhkan energi yang tereduksi dalam bentuk NADH. Pada saat konsentrasi ammonia rendah,

suatu reaksi kompleks akan berjalan dan melibatkan glutamin (bentuk amida dari asam glutamat) yang disintesis dari glutamat dan ammonia dalam suatu reaksi yang membutuhkan ATP dan dikatalisis oleh enzim glutamin sintetase:



Pada reaksi kedua, enzim glutamat sintetase mengkatalisis perpindahan sekuens amida dari glutamin ke α -ketoglutarat membentuk dua molekul glutamat:



Dari kedua reaksi ini didapatkan hasil:



Setelah atom N bergabung membentuk glutamat, maka dapat dengan mudah diubah menjadi rangkaian karbon lain melalui reaksi transaminase.

2.3.2. Urea

Menurut Walker (1997) dan Valladares *et al.* (2002), urea telah banyak digunakan secara luas sebagai sumber nitrogen bagi pertumbuhan khamir. Telah banyak penelitian mengenai produksi enzim urease pada bermacam khamir dan alga. Penggunaan urea sebagai sumber nutrisi dapat menemui bermacam hambatan, misalnya bahwa urea harus diambil dari lingkungan pertumbuhan dan mungkin berada dalam konsentrasi yang sangat kecil. Walaupun beberapa jenis khamir mampu mendegradasi urea dengan bantuan ATP dan enzim urea amidolase (dengan kofaktor biotin), tetapi kebanyakan mikroorganisme menggunakan urea amidohidrolase (dengan kofaktor Ni^{2+}) atau yang lebih dikenal

sebagai urease, suatu enzim intraseluler yang mengkatalisis hidrolisis urea menghasilkan CO₂ dan dua molekul ammonia.

2.3.3. Pepton

Penggunaan pepton sebagai sumber nitrogen bagi pertumbuhan khamir telah secara luas dilakukan. Pepton adalah sumber nitrogen organik yang merupakan derivat protein terlarut dan sifatnya sangat larut dalam air. Pepton sebagai sumber nitrogen memberikan hasil pertumbuhan dan konsentrasi pigmen yang tinggi (Chen dan Johns, 1993; Kratochvilova, 1990; Schlegel dan Schmidt, 1994).

Pepton adalah hasil hidrolisis enzimatik dari jaringan hewan. Kandungannya berupa campuran antara peptida dan asam amino. Kadar nitrogen total yang dimilikinya berkisar antara 11-16% dengan kadar nitrogen amino sebesar 1.5-6.0% (The Merck Index, 1990).

2.3.4. Nitrat

Menurut Brock *et al.* (1994), tidak semua jenis khamir dapat menggunakan nitrat sebagai sumber nitrogen. Apabila nitrat yang digunakan sebagai sumber nitrogen, senyawa ini akan direduksi menjadi ammonia. Tahap pertama proses ini adalah reduksi nitrat menjadi nitrit oleh enzim nitrat reduktase, yaitu suatu flavoprotein yang mengandung molibdenum. Selanjutnya enzim nitrit reduktase akan mereduksi nitrit menjadi ammonia. Tahap reduksi nitrit menjadi ammonia masih menjadi penelitian, diduga prosesnya melalui hidroksilalanin, NH₂OH. Ammonia yang terbentuk akan dikonversi menjadi bentuk organik melalui langkah di atas. Adanya logam molibdenum dalam nitrat reduktase

menjelaskan bahwa logam ini dibutuhkan dalam medium pertumbuhan fungi apabila menggunakan nitrat sebagai sumber nitrogen, tetapi tidak dibutuhkan apabila menggunakan ammonia sebagai sumber nitrogen.

2.4. Biologi *Rhodotorula mucilaginosa*

Carlile dan Watkinson (1994) mengklasifikasikan *Rhodotorula mucilaginosa* sebagai berikut:

- Kingdom : Fungi
Phylum : Eumycota
Classis : Deuteromycetes (Fungi Imperfecti)
Order : Cryptococcales
Familia : Cryptococcaceae
Genus : *Rhodotorula*
Species : *Rhodotorula mucilaginosa*

Menurut Fardiaz (1992), *R. mucilaginosa* memiliki ukuran sel dengan lebar 0.5-6.5 μm dan panjang 6.5-14.0 μm dan merupakan jenis khamir yang bersifat oksidatif kuat, yaitu tidak dapat melakukan fermentasi alkohol. Khamir ini bersifat aerob dan memproduksi enzim urease. Menurut Rahayu dan Sudarmadji (1980), genus *Rhodotorula* mempunyai warna merah, kuning, oranye, serta menyebabkan perubahan warna bahan pangan.

Menurut Jay (2000), *R. mucilaginosa* berkembang biak dengan pembentukan tunas melalui pembelahan multilateral. Habitat utamanya adalah daun dan batang tumbuhan, dan jenis ini banyak ditemukan pada sereal, tepung, gandum, kacang kedelai, produk sitrus, dan konsentrat sari buah. Khamir ini juga

banyak ditemukan di tanah, udara, air tawar, bunga, dan kulit buah anggur. *R. mucilaginosa* merupakan khamir tipe asporogenous yang kadang-kadang dapat menghasilkan tipe pseudomiselium yang primitif. Menurut Fardiaz (1992), khamir ini tumbuh melebar pada media dengan sel berbentuk ovoid, dan pseudomiselium berbentuk teliospora. Jenis khamir ini dapat menghasilkan pigmen karotenoid.

Khamir jenis ini 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 0.5-5 °C, dan maksimum 35 °C. pH minimum untuk pertumbuhannya adalah 2.2 dengan penambahan HCl atau asam organik (Frengova *et al.*, 1997).

2.5. Karotenoid

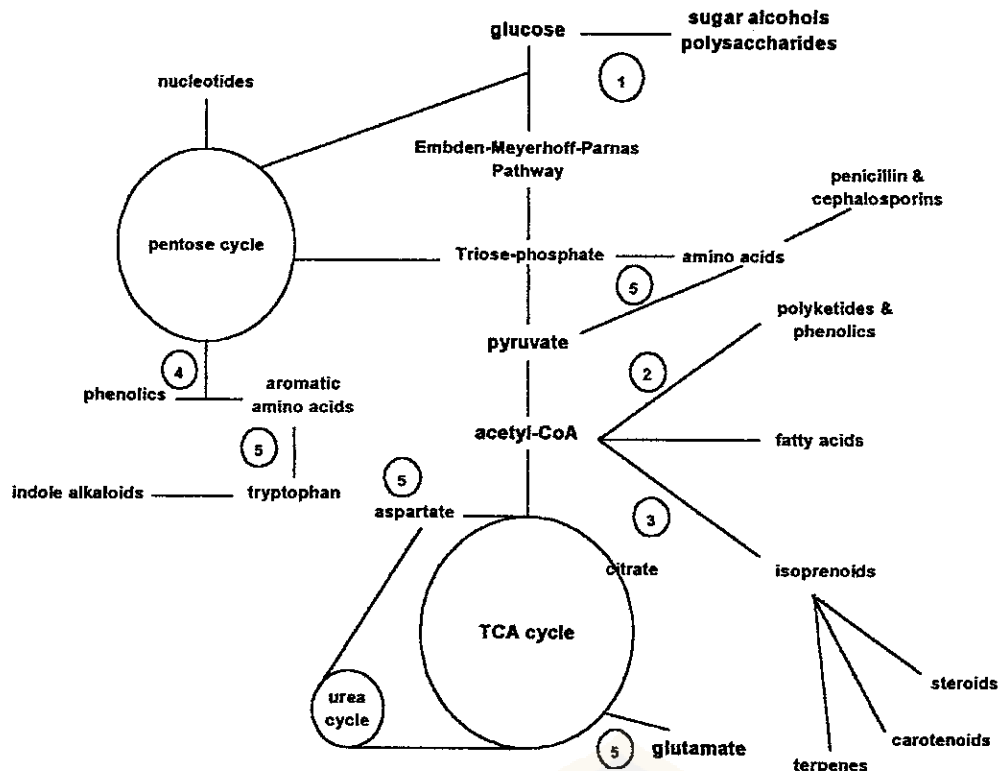
Pigmen karotenoid merupakan pigmen terpenting dan terbanyak yang ada di alam. Hanya tanaman dan mikroorganisme saja yang dapat mensintesis pigmen ini. Senyawa ini, karena kemampuannya memberikan warna dan sifatnya yang relatif stabil, telah secara luas digunakan sebagai antioksidan dalam skala industri, khususnya industri pengolahan bahan makanan. Karotenoid adalah prekursor vitamin A dalam tubuh manusia (Frengova *et al.*, 1997).

Karotenoid adalah suatu kelompok dari substansi-substansi lipid yang memiliki sebuah karakteristik warna merah oranye atau oranye. Substansi tersebut bertanggung jawab terhadap pigmentasi pada wortel (*carrot*) disinilah nama karotenoid berasal (Hawker, 1979).

Karotenoid termasuk kelompok senyawa terpenoid dengan jumlah karbon sebanyak lima unit. Warna yang ditimbulkan oleh senyawa ini sangat bervariasi tergantung dari panjangnya kromofor dan jenis ikatan oksigennya yang terkandung di dalamnya (Frengova *et al.*, 1997).

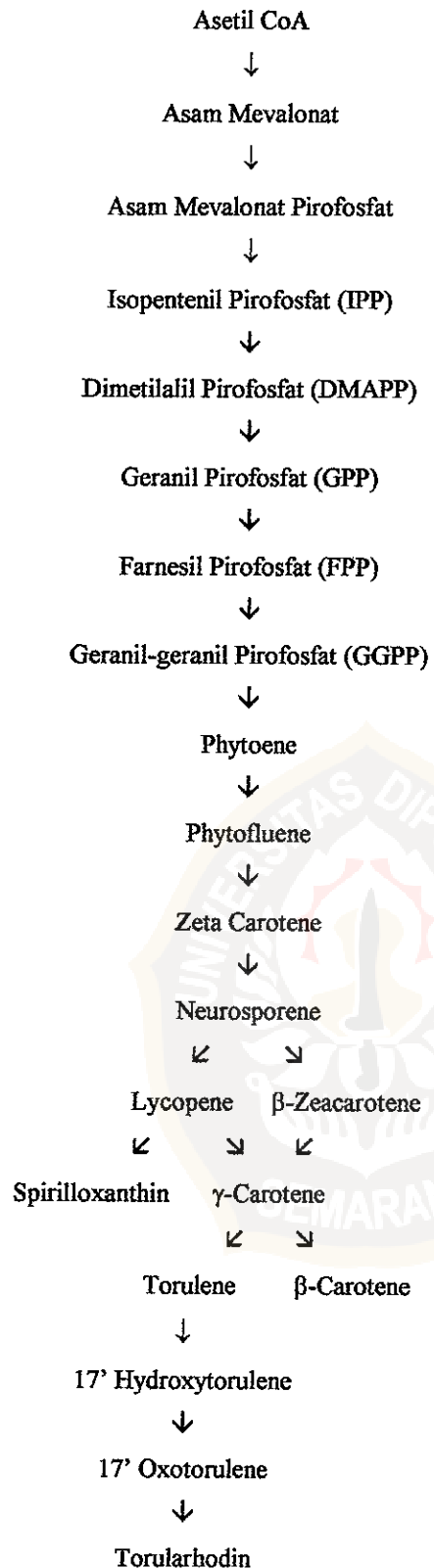
Senyawa karotenoid terbagi dalam tiga kelompok besar, yaitu senyawa-senyawa karoten, yang merupakan hidrokarbon; senyawa-senyawa xantofil, yang merupakan turunan karbon teroksigenasi; dan asam karotenat yang diperoleh dari oksidasi degradatif dari karotena C₄₀ sehingga jumlah atom karbonnya tereduksi beberapa untai, dan terbentuk satu atau dua gugus karboksilat (Manitto, 1981). Menurut Griffin (1994), karotenoid disintesis melalui jalur asam mevalonat. Sintesis karotenoid tidak terlepas dari metabolisme primer, sekalipun karotenoid merupakan metabolit sekunder.

Menurut Umeno dan Arnold (2003), karotenoid merupakan pigmen alami yang memiliki peran penting dalam sistem biologis. Setidaknya telah didapatkan 700 jenis karotenoid dari dua jalur biosintesis karotenoid yang telah diketahui. Umumnya yang paling banyak dimiliki oleh tanaman dan mikororganisme adalah jalur C₄₀. Pada jalur ini dua molekul geranylgeranyl difosfat (GGDP) akan terkondensasi membentuk phytoene. Jalur kedua, yaitu jalur C₃₀ hanya dimiliki oleh beberapa spesies bakteri tertentu. Hampir semua jenis karotenoid alami dihasilkan dari proses desaturasi dengan tipe dan tingkatan yang berbeda serta modifikasi C₄₀.



Gambar 02. Hubungan antara metabolisme primer dan sekunder. (1) jalur metabolit derivat glukosa; (2) jalur asetat malonat; (3) jalur asam mevalonat; (4) jalur asam shikimat; (5) jalur asam amino (Griffin, 1994).

Sintesis karotenoid dimulai dengan adanya asam mevalonat, suatu senyawa dengan enam karbon yang memiliki rantai cabang konfigurasi isoprenoid, yang berasal dari tiga molekul asetil CoA. Asam mevalonat akan diubah menjadi derivat pirofosfat dan dikarboksilasi menghasilkan isopentenil pirofosfat dengan cabang lima karbon, yang memiliki unit dasar isoprenoid. Senyawa antara ini lalu diubah menjadi komponen C₄₀. Reaksi terakhir rantai C₄₀ akan disusun kembali dan berubah menjadi karotenoid yang spesifik (Brock *et al.*, 1994; Phaff *et al.*, 1978).



Gambar 03. Jalur karotenoid pada khamir (Schmidt-Dannert *et al.*, 2000).

2.5. Hipotesis

Terjadi perbedaan pertumbuhan dan produksi pigmen karotenoid *R. mucilaginosa* UICC Y-18 dengan penggunaan sumber nitrogen yang berbeda. Penggunaan sumber nitrogen yang sesuai akan meningkatkan pertumbuhan dan produksi pigmen karotenoid *R. mucilaginosa* UICC Y-18.

