

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Umum Khamir

Khamir merupakan organisme uniseluler yang termasuk dalam fungi dan umumnya perbanyakannya dilakukan melalui proses pertunasan. Pada proses pertunasan, sel anak akan terbentuk melalui penonjolan ke arah luar dari sel induk, tunas tersebut akan membesar dan melepaskan diri dari induknya. Khamir biasanya tidak membentuk filamen atau miselium. Populasi sel khamir biasanya merupakan kumpulan dari sel tunggal. Sel khamir mempunyai ukuran yang lebih besar daripada sel bakteri dan dapat dibedakan berdasarkan ukuran dan kehadiran struktur selnya yang sangat jelas. Khamir hidup pada habitat yang cukup banyak mengandung gula, seperti pada bunga, buah dan kulit kayu (Brock *et al.*, 1994).

Bentuk khamir berbeda-beda diantaranya : bulat atau sferoid, elips atau bulat telur, batang atau silindris. Khamir tidak memiliki flagela, sehingga tidak dapat melakukan gerakan aktif. Bentuk sel khamir tetap sehingga sangat membantu dalam identifikasi (Rahayu dan Sudarmadji, 1980).

Sel khamir memiliki ukuran yang bervariasi tergantung dari spesies, nutrisi, umur dan faktor-faktor lain. Biasanya spesies khamir bersifat oksidatif kuat, yaitu tidak dapat melakukan fermentasi alkohol (Fardiaz, 1980).

Kenampakan semua bagian pertumbuhan sel khamir penting untuk identifikasi, misalnya terbentuk lapisan tipis menunjukkan adanya khamir jenis oksidatif atau "film yeast", sedangkan khamir yang berwarna adalah genus

Phaffia dan *Rhodotorula*, dengan warna merah orange karena mengandung karotenoid (Rahayu dan Sudarmaji, 1980).

2.2. Pertumbuhan Khamir

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

Pertumbuhan khamir berarti penambahan volume dan ukuran sel, jumlah sel ataupun berat kering selnya. Pertumbuhan ini dapat digambarkan sebagai kurva logaritmik. Jumlah sel pada waktu inkubasi tertentu dapat diamati dengan mengukur densitas optikal kultur tersebut. Jumlah sel atau berat kering 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 berbeda dengan mikroorganisme lainnya, yaitu terdiri atas fase lag, fase logaritmik, fase stasioner dan fase kematian (Kratochvilova, 1990).

Sel khamir membutuhkan nutrisi yang cukup dan sesuai. Sel akan mengambil nutrien dari lingkungan atau medium. Nutrisi dasar yang dibutuhkan oleh khamir adalah air, karbon dan nitrogen. Khamir juga membutuhkan elemen-elemen penting, yaitu elemen biogenik untuk pembentukan organel-organel sel (oksigen, hidrogen, fosfat dan magnesium), elemen oligobiogenik ("trace element" atau mikroelemen) yang dibutuhkan dalam jumlah kecil, seperti vitamin

dan substansi pertumbuhan lainnya. 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 berbagai reaksi (Rahayu dan Sudarmadji, 1980).

Sifat fisiologi khamir secara umum adalah kebutuhan akan air lebih sedikit dibandingkan dengan bakteri pada umumnya. 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 optimum adalah 25-30,5°C, sedang maksimum temperatur pertumbuhan adalah 35-47,5°C. Derajat keasaman (pH) optimum berkisar antara 4,0-4,5, dan tidak dapat tumbuh baik pada media yang bersifat alkalis (Rahayu dan Sudarmadji, 1980).

Khamir adalah organisme heterotrof yang membutuhkan karbon dan nitrogen dalam bentuk molekul organik. Sumber karbon umumnya dalam bentuk monosakarida, antara lain glukosa, fruktosa dan manosa. Beberapa khamir juga menggunakan disakarida antara lain sukrosa dan maltosa (Kratochvilova, 1990).

Khamir tumbuh baik dalam suasana aerob, tapi untuk jenis fermentatif dapat tumbuh secara anaerob walaupun lambat. Gula umumnya merupakan sumber energi yang paling baik, hanya untuk jenis khamir oksidatif yang dapat menggunakan asam organik dan alkohol (Rahayu dan Sudarmadji, 1980).

Khamir menggunakan oksigen dalam bentuk oksigen terlarut. Oksigen tidak dapat disimpan dalam bentuk nutrien, tapi harus diberikan secara kontinyu. Oksigen terlarut dalam medium cair dapat ditingkatkan dengan menyediakan ruangan besar antara gas dan medium. Salah satu cara untuk mencapai hal tersebut adalah dengan agitasi pada medium cair melalui pengocokan (“shaking”), baik secara resiprok (bolak-balik) maupun secara sirkuler (Rahayu dan Sudarmadji, 1980).

2.3. Biologi *Phaffia rhodozyma*

Phaffia rhodozyma merupakan khamir yang diisolasi dari daerah pegunungan di Jepang (Hokkaido dan Honshu) dan Alaska antara tahun 1967-1968 (Phaff *et al.*, 1978). Kenampakan morfologi pada koloni yang berwarna merah pada media menunjukkan bahwa spesies ini mengandung pigmen karotenoid dan telah mengalami maturasi koloni.

Klasifikasi khamir *Phaffia rhodozyma* menurut Barnett *et al.* (1990) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Fungi
Divisio : Eumycota
Kelas : Deuteromycetes
Ordo : Cryptococcales
Famili : Cryptococcoceae
Genus : *Phaffia*
Species : *Phaffia rhodozyma*

Sel *Phaffia rhodozyma* berbentuk ellipsoidal, tunggal, sepasang atau dalam rantai pendek; mungkin berbentuk pseudomiselium; reproduksi dengan pertunasan. Koloni khamir ini berwarna merah oranye atau merah muda salmon karena adanya sintesis pigmen karotenoid. Astaxanthin umumnya mencapai 85%, sedangkan 15% terdiri dari : β -karoten, γ -karoten, neurosporen, likopen, ekinenon, phoenikosantin dan 3-hidroksi-3',4'-dihidrokaroten (Andrewes *et al.*, 1976). *Phaffia rhodozyma* merupakan salah satu deuteromycetes yang mampu memfermentasi glukosa dan gula yang lain (Phaff *et al.*, 1978).

Akhir-akhir ini *Phaffia rhodozyma* dipertimbangkan sebagai sumber potensial untuk produksi astaxanthin melalui jalur bioteknologi. Selain itu juga, spesies ini kaya akan lemak dan protein. Sehubungan dengan kandungan protein yang tinggi, khamir ini dapat dipertimbangkan sebagai alternatif untuk makanan tambahan (Johnson and Lewis, 1979).

Tabel 01. Kandungan nutrisi utama dalam sel *Phaffia rhodozyma*

| Komponen | Kandungan per berat kering sel (%) |
|---------------|------------------------------------|
| Protein kasar | 25- 30 |
| Lemak | 15-25 |
| Karbohidrat | 40 |
| Abu | 6 |

Sumber : Meyer *et al.* (1993)

2.4. Karotenoid

Karotenoid mempunyai kerangka yang terdiri dari 40 atom karbon (tetraterpena) tersusun dari rantai poliisoprena yang simetris terhadap pusat. Mempunyai sifat mengadsorpsi cahaya pada daerah tampak. Ada 3 jenis karotenoid yaitu, karoten yang merupakan suatu hidrokarbon, xanthofil yang merupakan turunan karoten teroksidasi dan asam karotenat (Manitto, 1981).

Pigmen karoten berwarna merah muda sampai kuning, yang diproduksi oleh beberapa spesies dari genus *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Rhodospirium*, *Rhodotorula*, *Phaffia* dan beberapa spesies dari *Cryptococcus* (Phaff *et al.*, 1978).

Karotenoid merupakan sumber pigmen alami yang diproduksi oleh phytoplankton, algae dan tumbuhan. Pigmen-pigmen inilah yang bertanggung jawab atas bermacam-macamnya warna alami, yang paling sering terlihat adalah warna kuning, oranye dan merah dari buah, daun dan binatang air. Karotenoid adalah pigmen yang paling umum dari semua kelas pigmen alami. Tumbuhan, algae dan beberapa jenis jamur serta bakteri dapat memproduksi karotenoid, sedangkan binatang tidak dapat memproduksinya, hanya memperoleh dari makanan. Variasi warna karoten tergantung dari jumlah rantai polyene berganda dari molekul yang dikenal sebagai khromofor. Wortel mempunyai 9 pasangan ganda dari rantai polyene-nya dan berwarna kuning ke-oranye-an. Karoten dibentuk dari 10 pasangan ganda polyene dan membentuk warna yang lebih gelap, seperti warna merah pada tomat yang matang atau semangka. Susunan polyene dari astaxanthin adalah 9 pasangan ganda (Luhur, 2001).

Karotenoid juga dapat berikatan dengan protein dan lipid yang dapat memberikan variasi warna biru, hijau, ungu dan coklat. Karotenoid dan protein yang kompleks dikenal sebagai *carotenoproteins* dan *carotenolipoprotein*. Astaxanthin sendiri berwujud pigmen merah, ketika menyatu dengan bermacam protein dari penyerapan sinar pigmen ini dapat menghasilkan warna hijau, kuning, biru dan coklat. Ini terjadi pada udang pada saat dimasak dimana ikatan antara

astaxanthin dan protein terlepas sehingga udang berwarna merah oranye (Luhur, 2001).

Phytoplankton adalah produsen utama dari karoten di kehidupan bawah laut. Phytoplankton di laut dikenal sebagai pabrik biokimia yang diperkirakan dapat menghasilkan sekitar 40 juta ton berat kering sel pertahun dan dari jumlah ini diperkirakan 0,01% mengandung karoten (Gerard, 2002).

Karotenoid adalah makanan yang sangat penting bagi kehidupan laut, misalnya digunakan untuk menimbulkan warna pada ikan konsumsi, udang, kepiting dan juga berbagai macam ikan hias. Selain itu, produk karotenoid terutama astaxanthin juga diperuntukkan bagi manusia karena dari beberapa produk yang diketahui, produsen menyediakan 2 macam produk untuk manusia dan usaha akuakultur (Gerard, 2002).

Sintesis karotenoid dimulai dari asetil Ko-A yang diubah menjadi rantai C-5 terpenoid (isopentenil pirophospat) melalui serangkaian reaksi. Senyawa antara ini lalu diubah menjadi komponen C-40. Reaksi terakhir adalah rantai C-40 akan disusun kembali dan berubah menjadi karotenoid yang spesifik (Phaff *et al.*, 1978).

Karotenoid disintesis melalui jalur asam mevalonat dan tidak terlepas dari metabolisme primer, meskipun karoten merupakan hasil dari metabolisme sekunder (Griffin, 1994).

Menurut Johnson and Lewis (1979), produksi karotenoid pada *Phaffia rhodozyma* dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti : nutrien yang cukup, aerasi, suhu, pH, media dan cahaya. *Phaffia rhodozyma* dapat tumbuh dengan optimal

pada kisaran pH 4-5 (termasuk kelompok asidofil). Suhu untuk pertumbuhannya dapat mencapai 27°C. Suhu optimal untuk pertumbuhan dan untuk produksi pigmen adalah 22°C. Beberapa penelitian tentang pertumbuhan dan produksi pigmen oleh *Phaffia rhodozyma* menggunakan galur mutan tidak berhasil pada suhu 30°C. Cahaya juga sangat penting peranannya dalam proses sintesis karotenoid oleh berbagai mikroorganisme.

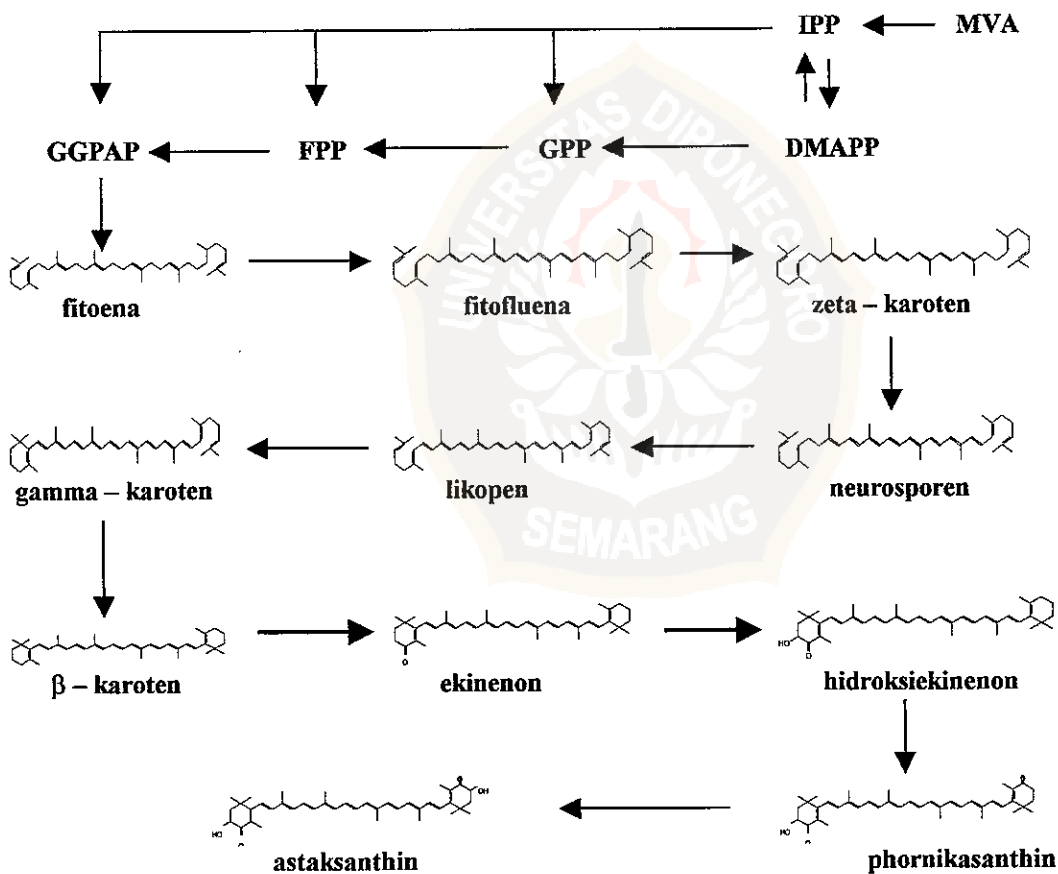
2.5. Astaxanthin

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β,β -karotena-4,4-dione) merupakan pigmen merah orange pada alga, mikroorganisme dan crustaceae. Pigmen ini merupakan oksikarotenoid dengan rumus molekul kimia $C_{40}H_{52}O_4$ yang memiliki berat molekul 598,86 g/mol, dan digunakan sebagai makanan tambahan pada hewan-hewan, seperti ikan salmon, udang dan hewan-hewan yang tidak bisa mensintesis astaxanthin sendiri (Johnson and Lewis, 1979). Pigmen ini ditemukan bebas dalam daging ikan dan bentuk ester pada kulit dan ovarium ikan.

Umumnya astaxanthin diperoleh secara sintesis berupa bahan kimia dan pemasarannya dapat diperkirakan antara 60-100 juta USD per tahun (Johnson and An, 1991). Konsumen lebih memilih pigmen yang dihasilkan dari sumber natural misalnya mikroorganisme, walaupun astaxanthin sintesis telah mendapat otorisasi dari FDA (Food and Drug Administration) (Fontana *et al.*, 1996). Hanya ada beberapa mikroorganisme penghasil astaxanthin, diantaranya : *Agrobacterium auranticum*, *Haematococcus pluvialis* dan *Phaffia rhodozyma*. Pigmen ini telah

dikomersilkan oleh F. Hoffman La Roche dari Swiss dengan nama *Caropyll Pink* (Johnson and An, 1991).

Phaffia rhodozyma memproduksi astaxanthin melalui beberapa tahap. Tahap-tahap tersebut adalah pembentukan fitoena dari geranil-geranil pirofosfat, dehidrogenasi fitoena membentuk likopen, siklisasi likopen menghasilkan β -karoten dan oksidasi β -karoten menjadi astaxanthin (Gu and An, 1997). Jalur sintesis karotenoid khamir *Phaffia rhodozyma* ditunjukkan pada Gambar 01.



Gambar 01. Jalur metabolik pembentukan karotenoid pada khamir *Phaffia rhodozyma* (MVA : asam mevalonat; IPP : isopentenil firofosfat; DMAPP : dimetilalil firofosfat; GPP : geranil firofosfat; FPP : farnesil firofosfat; GGPAP : geranil-geranil firofosfat) (Johnson and Lewis, 1979).

Astaxanthin selain digunakan sebagai pigmen pada akuakultur juga merupakan antioksidan potensial yang mampu menunda penuaan dan penyakit degeneratif pada manusia dan hewan (Gu and An, 1997)

Penelitian menyatakan bahwa astaxanthin alami sebagai antioksidan berguna seperti yang terdapat pada vitamin C, vitamin E, β -karoten dan karotenoid lainnya. Studi pada manusia, binatang dan akuakultur memperlihatkan bahwa astaxanthin alami ini dapat melindungi kulit dari efek kerusakan oleh radiasi sinar ultraviolet, mengurangi keriput dan proses penuaan, melindungi terserangnya penyakit kanker akibat penggunaan bahan kimia, meningkatkan produksi High-density Lipoprotein (HDL), meningkatkan sistem kekebalan dan meningkatkan sistem metabolisme. Penelitian juga menunjukkan bahwa astaxanthin alami mempunyai 550 kali aktivitas antioksidan dari vitamin E dan 10 kali aktivitas antioksidan dari β -karoten (Luhur, 2001).

2.6. Pengaruh Pencahayaan Terhadap Karotenogenesis

Cahaya sangat penting peranannya dalam karotenogenesis oleh berbagai mikroorganisme. Pencahayaan bersama-sama dengan O_2 merupakan suatu induser yang baik pada proses karotenogenesis beberapa khamir. Pertumbuhan dan produksi pigmen dapat dihambat oleh cahaya kuat tetapi sebaliknya dapat diinduksi oleh cahaya lemah, yaitu spektrum cahaya tampak seperti cahaya biru (Johnson and Lewis, 1979).

Cahaya berperan cukup besar terhadap karotenogenesis. Hal ini dibuktikan pada *Phaffia rhodozyma* UCD-FST-67-385 (galur liar), dimana cahaya

menstimulus pembentukan karotenoid dalam sel khamir ini. Cahaya merupakan penginduksi yang baik pada berbagai enzim yang berperan dalam jalur biosintesis astaxanthin. Sampai saat ini belum diketahui dengan jelas mekanismenya, tetapi dimungkinkan oleh aktifitas enzim peroksidase, oksidase, sitokrom P-450a, sitokrom P-450b, sitokrom P-450c, phitoena dehidrogenase, neurosporen dehidrogenase dan flavoprotein dehidrogenase (Fontana *et al.*, 1996).

Kemampuan *Phaffia rhodozyma* dalam memanfaatkan energi cahaya berbeda-beda. *Phaffia rhodozyma* strain mutan ada yang lebih sensitif terhadap cahaya, bahkan cahaya lemahpun dapat menghambat produksi karotenoidnya. *Phaffia rhodozyma* strain *Ant-1-4* justru memproduksi karotenoid lebih tinggi (520 µg/g) pada kondisi gelap dan memproduksi pigmen karotenoid sebesar 440 µg/g oleh adanya pemaparan cahaya. Energi cahaya secara spesifik diserap oleh sistem polyene karoten pada panjang gelombang antara 400-700 nm dan diubah menjadi energi getar dan panas (Hwan and Johnson, 1990).

Cahaya tampak memiliki kisaran panjang gelombang 400 nm sampai dengan 700 nm, sebagai contoh cahaya biru memiliki panjang gelombang 450-500 nm. sinar ultra violet mempunyai panjang gelombang 400 nm dan cahaya merah memiliki panjang gelombang 700 nm (Johnson and Lewis, 1979).

2.7. Wortel

Tanaman wortel (*Daucus carota*) termasuk famili *Apiaceae* yang merupakan tumbuhan sayur yang ditanam sepanjang tahun, terutama di daerah pegunungan dengan ketinggian sekitar 1200 meter yang memiliki suhu udara yang

dingin dan lembab. Memiliki batang daun basah yang berupa sekumpulan pelepah yang muncul dari pangkal daun bagian atas. Wortel dapat dibedakan beberapa jenis, yaitu :

- *Imperator*, memiliki umbi akar yang panjang dengan ujung meruncing. Rasanya kurang manis.
- *Chantenang*, memiliki umbi bulat panjang dengan rasa yang manis.
- *Mantes*, merupakan kombinasi dari *Imperator* dan *Chantenang*.

Umbi akar wortel berwarna khas yaitu oranye (Thomas, 1992).

Wortel sarat dengan β -karoten. Kadar β -karoten yang terkandung dalam wortel sebanyak 754 $\mu\text{g}/100$ g, hampir dua kali lebih dari kandungan β -karoten dalam kangkung (380 μg) dan tiga kali lebih banyak dari kandungan β -karoten dalam daun caisin (286 μg). β -karoten yang terdapat pada wortel juga masih lebih tinggi dibandingkan dengan yang ditemukan pada bayam (409 μg). Makin jingga warna wortel, makin tinggi kadar β -karotennya. Penelitian lain menunjukkan bahwa antioksidan pada wortel yang dipanaskan, terutama bersama sejumlah kecil lemak/minyak lebih mudah diserap oleh sel. Proses pemanasan ternyata meningkatkan kadar antioksidan wortel kira-kira sepertiga. Kadar antioksidan wortel pun meningkat dalam penyimpanan pada temperatur tinggi selama sampai seminggu (Dowham and Collins, 2000).

Komponen lain seperti karbohidrat, protein, lipid, vitamin dan mineral juga terdapat dalam wortel (Tabel 02).

Tabel 02. Komposisi kimia atau kandungan nutrisi dalam wortel tiap 100 g.

| Kandungan | Thomas (1992) | Kam Nio (1992) |
|---|---------------|----------------|
| Vitamin A | 12.000 SI | - |
| Kalori | 42 kal | 46 kal |
| Protein | 1,2 g | 1,2 g |
| Lemak | 0,3 g | 0,3 g |
| Karbohidrat | 9,3 g | 9,5 g |
| Air | 88 mL | 88 mL |
| Kalsium (Ca) | 39 mg | 39 mg |
| Fosfor (P) | 37 mg | 37 mg |
| Besi (Fe) | 0,8 mg | 0,8 mg |
| Vitamin B1 (Thiamine) | 0,06 mg | 0,06 mg |
| Vitamin C (Asam askorbat) | 6 mg | 6 mg |
| Karoten (dalam bentuk Konversi Retinol) | - | 3.600 µg |

Sumber : Thomas (1992) dan Oei (1992)

2.8. Hipotesis

Pertumbuhan dan produksi khamir penghasil pigmen karotenoid sangat dipengaruhi oleh komposisi medium pertumbuhannya dan ada tidaknya perlakuan-perlakuan yang dapat menginduksi karotenogenesisnya.

Wortel merupakan umbi akar yang mengandung komponen-komponen penting bagi pertumbuhan mikroorganisme, sedangkan cahaya biru merupakan spektrum cahaya tampak yang dapat menginduksi karotenogenesis, sehingga penambahan jus wortel dalam medium YMB yang disinari dengan cahaya biru dapat meningkatkan pertumbuhan dan produksi karotenoid khamir *Phaffia rhodozyma*.