

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. TINJAUAN UMUM KHAMIR

Khamir merupakan organisme seluler yang termasuk golongan fungi. Bentuk sel khamir biasanya spheris, oval, atau silindris dan memiliki reproduksi aseksual melalui “budding” atau pertunasan. Sel anakan hasil dari proses “budding” menonjol ke arah luar dari badan sel induk lalu terlepas. Khamir tidak memiliki bentuk miselium dan ukuran sel khamir (0,4 μm) lebih besar dari sel bakteri dan strukturnya jelas. Khamir hidup di habitat yang mengandung cukup gula seperti pada buah, bunga, dan kulit kayu (Brock *et al.*, 1994).

2.1.1. Pertumbuhan Khamir

Pertumbuhan sel khamir berarti bertambahnya volume atau ukuran sel, jumlah sel ataupun biomasnya. Pertumbuhan dapat ditentukan dengan pengukuran berat kering sel khamir dan jumlah sel/ berat kering sel diplotkan pada sumbu ordinat, sedangkan waktu (jam) diplotkan pada sumbu absisi, pertumbuhan dapat digambarkan sebagai kurva logaritmik. Kurva pertumbuhan menunjukkan adanya perubahan kultur khamir selama fase yang berbeda dalam siklus pertumbuhannya. Fase-fase dalam siklus pertumbuhan terdiri atas fase lag, fase logaritmik (eksponensial), fase stasioner, dan fase kematian (Brooks *et al.*, 1995).

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

2.1.2. Nutrisi Khamir

Sel khamir mengambil nutrien yang cukup dan sesuai dari medium/lingkungannya. Menurut Kratochvilova (1990) nutrisi khamir yang diperlukan adalah:

a. Air

Medium khamir harus mengandung air yang cukup berkisar 30%, sedang untuk membentuk hifa paling sedikit 20%. Air terikat mendukung fungsi struktural sel, air bebas berperan sebagai sarana transport dalam proses metabolisme.

b. Sumber Karbon

Khamir adalah organisme kemoheterotropik yang membutuhkan karbon dan nitrogen, terutama dalam bentuk senyawa organik. Bentuk karbon yang paling mudah digunakan adalah sakarida, yang baik digunakan untuk reaksi oksidatif. Sumber C yang digunakan adalah gula heksosa, misal: D-glukosa, D-fruktosa, dan D-mannosa yang ditambahkan pada medium dengan konsentrasi 1-10%.

c. Sumber Nitrogen

Sumber nitrogen organik yang digunakan adalah pepton atau ekstrak khamir, yang mengandung asam amino. Asam amino dapat digunakan sebagai sumber

nitrogen sekaligus sebagai sumber karbon pada saat bersamaan dan biasanya ditambahkan dalam media pertumbuhan dengan proporsi seperti yang ada di alam.

d. Fosfor

Fosfor adalah elemen penting untuk media pertumbuhan khamir. Abu khamir mengandung sejumlah besar fosfor dalam bentuk P_2O_5 (mencapai 35-65%). Fosfor dibutuhkan untuk mensintesis komponen penting seperti: fosfoprotein, fosfolipid, nukleoprotein, asam nukleat dan lain-lain.

e. Magnesium, Kalsium dan Potassium

Mineral sangat dibutuhkan untuk berfungsinya enzim. Ion magnesium dan ion ferro ditemukan pada turunan porfirin, besi sebagai bagian dari koenzim sitokrom dan peroksidase. Magnesium dan kalium merupakan mineral esensial untuk fungsi dan integritas ribosom. Formula untuk medium pemeliharaan organisme perlu mengandung sumber kalsium, kalium, magnesium, dan besi biasanya dalam bentuk ion-(Brooks, 1995).

Abu khamir mengandung magnesium sebesar 6%. Nilai ini akan bertambah dengan adanya penambahan magnesium sulfat dalam media pertumbuhan. Ion magnesium merupakan kofaktor dari beberapa enzim yang mengkatalisis proses metabolisme (Kratochilova, 1990).

Potassium dibutuhkan oleh seluruh organisme. Beberapa jenis enzim termasuk diantaranya yang terlibat dalam sintesis protein, khususnya diaktifkan oleh potassium. Magnesium berfungsi untuk menstabilkan ribosom, membran sel, asam nukleat dan juga dibutuhkan untuk mengaktifkan beberapa enzim khususnya yang terlibat dalam transfer fosfat (Brock *et al.*, 1991)

Kebanyakan peranan magnesium adalah untuk pertumbuhan yang berkaitan dengan proses metabolisme. Magnesium biasanya ditambahkan dalam bentuk magnesium sulfat, sekaligus digunakan sebagai sumber sulfur. Pemberian mikroelemen magnesium dalam medium berkisar antara 0,1-1 g/l (Hawker dan Lilian, 1950).

e. Elemen-elemen Oligobiogenik

Abu khamir mengandung elemen-elemen oligobiogenik seperti K_2O , CaO , MgO , SiO_2 , SO_3 , Fe_2O_3 , dan Cl . "Trace element" yang juga penting adalah Cu , Mo , Co , dan Zn . Penambahan elemen-elemen ini juga digunakan untuk meningkatkan proliferasi sel khamir, tetapi sebaliknya penambahan dalam jumlah yang banyak dapat menyebabkan keracunan.

2.2. *Phaffia rhodozyma*

Klasifikasi khamir *P. rhodozyma* menurut Phaff *et al.*, (1978) adalah sebagai berikut :

| | |
|-----------|----------------------------|
| Kingdom | : Fungi |
| Divisi | : Eumycota |
| Subdivisi | : Deuteromycotina |
| Famili | : Cryptococcoceae |
| Genus | : <i>Phaffia</i> |
| Species | : <i>Phaffia rhodozyma</i> |

P. rhodozyma berbentuk ellipsoidal; tunggal, sepasang atau dalam rantai pendek; dalam kondisi yang tidak sesuai berbentuk pseudomiselium; reproduksi

dengan pertunasan; terdapat klamidospora 'spheria' yang mengandung granula refraktil; koloni berwarna merah oranye atau merah muda salmon karena adanya sintesis pigmen karotenoid, umumnya astaxanthin; dapat memfermentasi glukosa dan gula yang lain (Phaff *et al.*, 1978).

P. rhodozyma ini merupakan bentuk aseksual dari khamir *Xanthophyllomyces dendrorhous*, dapat mati karena panas dan kekeringan. Komponen utama dalam sel *P. rhodozyma* adalah protein, karbohidrat, dan lipid. *P. rhodozyma* merupakan khamir yang baru ditemukan pada tahun 1976, dan sangat berbeda dengan khamir penghasil pigmen lainnya dalam hal kemampuan memproduksi pigmen karotenoid yaitu astaxanthin. Produksi pigmen karotenoid oleh *P. rhodozyma* tergantung pada kondisi kultur. Astaxanthin yang merupakan pigmen utama khamir ini, diproduksi pada fase pertumbuhan eksponensial (Johnson and Lewis, 1979) dan disimpan di dalam sel (intraseluler).

Johnson dan Lewis (1979) telah meneliti pada kultur fermentasi 'batch', dimana pertumbuhan *P. rhodozyma* dimulai setelah fase log berlangsung selama 10 jam dan mencapai berat kering konstan setelah diinkubasi selama ± 80 jam. Pertumbuhan akan berhenti bersamaan dengan habisnya glukosa dari medium.

Menurut Johnson dan An (1991), produksi karotenoid pada *P. rhodozyma* dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti : nutrien yang cukup, aerasi, suhu, pH, media, dan cahaya. *P. rhodozyma* dapat tumbuh dengan optimal pada kisaran pH 4-5 (termasuk kelompok asidofil). Suhu untuk pertumbuhannya dapat mencapai 27⁰C, sedang suhu optimal pertumbuhan dan produksi pigmen adalah 22⁰C. Beberapa penelitian tentang pertumbuhan dan produksi pigmen oleh *P. rhodozyma* yang

menggunakan galur mutan tidak berhasil pada suhu 30⁰C. Selain suhu dan pH, oksigen juga sangat penting peranannya dalam proses sintesis karotenoid oleh berbagai mikroorganisme. Oksigen (O₂) merupakan suatu inducer yang baik pada proses karotenogenesis pada beberapa jamur.

2.3. KAROTENOID

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) dan dari sinilah nama karotenoid berasal (Hawker dan Lilian, 1950).

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 karoten C₄₀ sehingga jumlah atom karbonnya tereduksi beberapa unit dan terbentuk satu atau dua gugus karboksilat (Manitto, 1981).

Karoten 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). Karoten dibentuk dari 10 pasangan ganda dan membentuk warna yang lebih gelap, seperti warna merah pada tomat yang matang atau semangka, yang dibentuk dari lycopene yang mengandung 11 pasangan ganda (Luhur, 2001). Kombinasi protein dan lipid pada karoten juga memberikan variasi warna biru, hijau, ungu dan coklat pada kehidupan laut. Gabungan karoten dan

protein dikenal sebagai karotenoprotein dan karotenolipoprotein (Luhur, 2001). Sintesis karotenoid tidak terlepas dari metabolisme primer, sekalipun karotenoid merupakan metabolisme sekunder (Griffin, 1981).

2.3.1. Astaxanthin

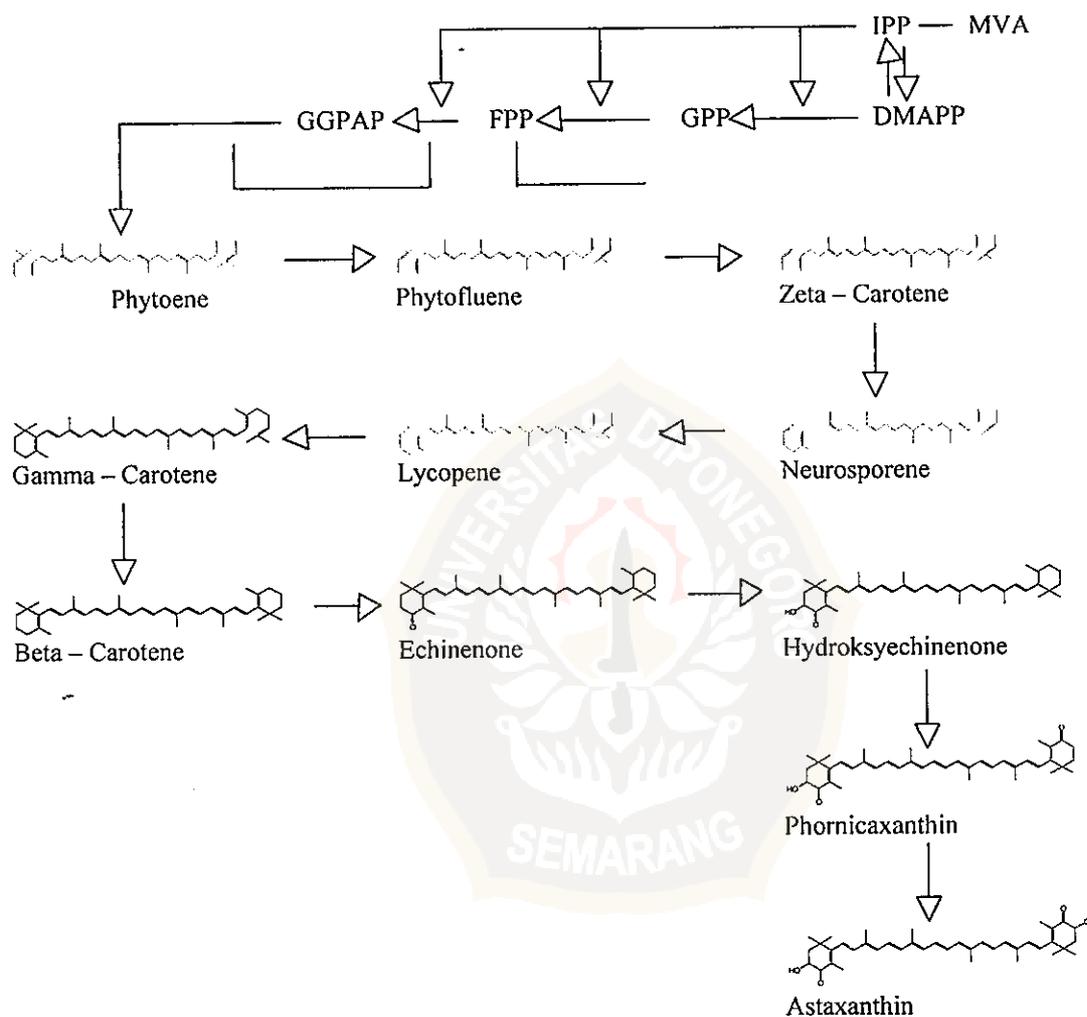
Astaxanthin adalah pigmen utama pada *P. rhodozyma* yang merupakan oxikarotenoid dengan Rumus Molekul $C_{40}H_{52}O_4$ (Kusdiyantini *et al.*, 2001). Pigmen ini memiliki kesamaan dengan pigmen “lobster” dan “trout” yang tidak dimiliki oleh khamir merah (“red yeast”) lain (Phaff *et al.*, 1978). Astaxanthin merupakan pigmen utama yang menyusun kurang lebih 85 % dari pigmen total (Andrewes *et al.*, 1976; Fontana *et al.*, 1996)

Astaxanthin sendiri berwujud pigmen merah, ketika ia menyatu dengan berbagai macam protein dengan adanya penyerapan sinar, ia dapat menghasilkan warna hijau, kuning, biru dan coklat. Ini terlihat pada warna merah pada saat udang direbus, yang merupakan hasil denaturasi dari protein dan melepaskan astaxanthin chromophore (Luhur, 2001).

Astaxanthin alami ini mempunyai banyak antioksidan berguna dari vitamin C, vitamin E, beta-karoten, dan karoten lainnya. Studi pada manusia, binatang dan akuakultur memperlihatkan bahwa astaxanthin alami ini dapat melindungi kulit dari efek merusak radiasi sinar ultraviolet, mengurangi keriput dan proses penuaan, melindungi terhadap kanker akibat penggunaan bahan kimia, meningkatkan produksi high-density lipoprotein (HDL), kolesterol yang baik, meningkatkan sistem kekebalan, meningkatkan sistem metabolisme. Penelitian menunjukkan bahwa

astaxanthin alami mempunyai 550 kali aktivitas antioksidan dibanding vitamin E dan 10 kali aktivitas antioksidan dibanding beta-karoten (Luhur, 2001).

Tahap pembentukan astaxanthin pada *P. rhodozyma* dapat dilihat pada Gambar 01 (Girard *et al.*, 1994; Johnson and An, 1991).



Gambar 01. Tahap-tahap biosintesis astaxanthin pada *P. Rhodozyma*: MVA, asam mevalonat; IPP, isopentenil pirophosphat ;DMAPP, dimetilalil pirophosphat; GPP, geranyl pirophosphat; FPP, farnesil pirofosfat; GGPP, geranylgeranyl pirophosphat (Girard *et al.*, 1994; Johnson and And, 1991).

Sintesis karotenoid pada *P. rhodozyma* diawali dengan adanya senyawa asam mevalonat, senyawa ini membentuk senyawa farnesil-pp. Proses ini terjadi melalui bantuan enzim Hidroksimetil Glutarat-KoA Sintetase (HMGS) dan

Hidroksimetil Glutarat KoA Reduktase (HMG). Setelah mengalami proses siklisasi, dekarboksilasi dan fosforilasi oksidatif, senyawa farnesil-pp akan membentuk beberapa karotenoid yang akhirnya akan terbentuk senyawa astaxanthin (Johnson and An, 1991).

2.4. AIR KELAPA

Air kelapa mulai diproduksi oleh kelapa berumur 5 bulan, dengan volume sekitar 2 gelas, merupakan cairan yang mempunyai rasa manis karena mengandung gula. Air kelapa juga mengandung substansi pertumbuhan, mineral, dan vitamin (Duke, 1983). Kandungan gula tertinggi terjadi pada waktu buah kelapa masih muda, sehingga air terasa manis, dan semakin tua rasa tersebut akan semakin berkurang. Air kelapa selain mengandung kalori, protein dan mineral diperkirakan juga mengandung zat yang disebut sitokinin yang bersifat hormon sehingga dapat mengaktifkan kegiatan jaringan atau sel-sel hidup. Jumlah air kelapa semakin berkurang dengan pertambahan umur buahnya, yaitu 18 g/buah sebelum buah berdaging, 30 g per buah muda dan 8-10 g setiap buah tua. Demikian pula warna airnya, semakin tua buah, semakin keruh warna air kelapa (Suhardiman, 1994).

Tabel 01. Komposisi kimia air kelapa

| Komponen | Duke (1983) | Anonim (1989) |
|-------------|---------------|-----------------|
| Air | 95% | 95.5% |
| Karbohidrat | 4.0% | 3.7 g/100mL |
| Protein | 0.1% | 0.1 g/100mL |
| Lemak | 0.1% | 0.1 g/100mL |
| Abu | 0.1% | |
| Energi | | 17 kal/100mL |
| Potassium | 312 mg/100g | |
| Sodium | 105 mg/100g | |
| Magnesium | 30 mg/100g | |
| Kalsium | 29 mg/100g | 15 mg/100mL |
| Besi | 0.1 mg/100g | 0.2 mg/100mL |
| Tembaga | 0.04 mg/100g | |
| Fosfor | 37 mg/100g | 8 mg/100mL |
| Sulfur | 24 mg/100g | |
| Kolin | 183 mg/100g | |
| Vitamin C | | 1 mg/100mL |

(Duke (1983), Anonim (1989) Anonim (1998))

Menurut Grimwood (1979) karbohidrat yang terkandung dalam air kelapa tua, terdiri dari glukosa, fruktosa, dan sukrosa. Komposisi karbohidrat dalam air kelapa selengkapnya ada pada tabel 02.

Tabel 02. Komposisi karbohidrat dalam air kelapa tua

| Komponen | Kadar (%) |
|----------|-----------|
| Glukosa | 0.75 |
| Fruktosa | 0 |
| Sukrosa | 1.89 |

(Grimwood, 1979)

2.5. HIPOTESIS

Pertumbuhan dan produksi pigmen karotenoid *P. rhodozyma* sangat dipengaruhi oleh adanya mikroelemen seperti magnesium sulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) dalam medium pertumbuhannya. Penambahan konsentrasi magnesium sulfat yang tepat dapat menghasilkan pertumbuhan dan produksi pigmen karotenoid *P. rhodozyma* optimum, karena adanya konsentrasi ion magnesium yang tinggi pada cairan intraseluler *P. rhodozyma* dapat mengaktifkan ATP dan meningkatkan metabolisme sel *P. rhodozyma*.

