

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Khamir *Phaffia rhodozyma*

Phaffia rhodozyma merupakan khamir merah orange yang menghasilkan astaksantin sebagai karotenoid utama. Khamir ini pertama kali diisolasi pada awal tahun 1970 dari eksudat (cairan) pada suatu pohon yang sedang berganti daun, di daerah pegunungan Jepang dan Alaska (Phaff *et al.*, 1972). Semula khamir ini dimasukkan ke dalam golongan fungi “imperfecti” atau Deuteromycotina, karena belum ditemukan spora seksualnya. Berdasarkan pengamatan ultrastruktural klasik, khemotaksanomi, serta analisis struktur dan urutan gen aktin, *Phaffia rhodozyma* dimasukkan dalam khamir basidiomycetes (Wery *et al.*, 1995). Sistematika *Phaffia rhodozyma* sebagai berikut:

Kingdom : Fungi
Divisi : Eumycota
Sub divisi : Basidiomycotina
Famili : Cryptococcoceae
Genus : *Phaffia*
Species : *Phaffia rhodozyma*

Sel *Phaffia rhodozyma* berbentuk ellipsoid, tunggal, berpasangan atau membentuk rantai pendek (pseudomiselium). Reproduksi khamir ini biasanya dengan pertunasan atau membentuk klamidospora (Verdoes, 1997). Koloni khamir ini berwarna merah orange yang disebabkan terutama oleh pigmen karotenoid astaksantin dan sedikit β - karoten (Phaff *et al.*, 1978).

2.2 Pertumbuhan dan Produksi Pigmen

Dalam fermentasi secara *batch culture* (fermentasi tanpa penambahan substrat atau medium selama proses fermentasi), pertumbuhan *Phaffia rhodozyma* dimulai setelah 10 jam lag dan pertumbuhan khamir relatif konstan setelah 80 jam masa inkubasi. Pertumbuhan berakhir bertepatan dengan habisnya nutrisi dalam medium fermentasi. Pertumbuhan rata-rata *Phaffia rhodozyma* sangat dipengaruhi oleh pH dan tertinggi pada pH 5.8 (Johnson and Lewis, 1979).

Produksi pigmen karotenoid oleh khamir *Phaffia rhodozyma* tergantung pada kondisi kultur. Astaksantin merupakan pigmen utama yang disintesis oleh *Phaffia rhodozyma* dan terdapat pada semua sampel yang diambil selama fermentasi khamir ini, diproduksi terutama selama fase eksponensial pertumbuhan. Sintesis pigmen terjadi secara aktif selama periode pertumbuhan dipercepat. Produksi ini berjalan lambat setelah pertumbuhan terhenti. Sumber karbon yang paling baik untuk pertumbuhan dan pembentukan pigmen adalah D-selobiosa. Disamping itu oksigen juga merupakan komponen yang penting untuk menghasilkan khamir dan pigmen secara optimum (Johnson and Lewis, 1979).

2.3 Sumber Nutrien

Phaffia rhodozyma merupakan salah satu khamir penghasil karotenoid yang mampu memfermentasi glukosa (Miller *et al.*, 1976). Khamir ini juga dapat memanfaatkan berbagai sumber karbon yang lain seperti fruktosa, maltosa, selobiosa, sukrosa, suksinat, manitol, silosa, arabinosa dan glukonolakton. Selobiosa dan disakarida yang lain seperti maltosa dan sukrosa mendorong tingginya pigmentasi pada *Phaffia rhodozyma*. Sukrosa dan glukosa diketahui mendukung peningkatan

pertumbuhan *Phaffia rhodozyma* dari pada sumber karbon yang lain (Johnson and Lewis, 1979).

Air kelapa merupakan endosperm dalam bentuk cair yang mengandung unsur hara dan zat pengatur tumbuh. Gula yang terdapat di dalam air kelapa adalah glukosa, fruktosa dan sukrosa. Pada buah kelapa yang sudah tua, airnya sudah berkurang dan mengandung mineral 4%, gula rata-rata 2% dan abu. Kandungan gula ini terbanyak dicapai pada saat buah muda (degan) (Soedijanto dan Sianipar, 1984). Komposisi zat gizi air kelapa dalam 100 ml terlihat pada Tabel 01.

Tabel 01. Komposisi Zat Gizi Air Kelapa.

Zat Gizi	Kandungan (per 100 ml)
Kalori	17 kal
Protein	0.2 g
Lemak	0.2 g
Karbohidrat	3.8 g
Kalsium	15 mg
Fosfor	8 mg
Besi	0.2 mg
Vitamin C	1.0 mg
Air	95.5 g

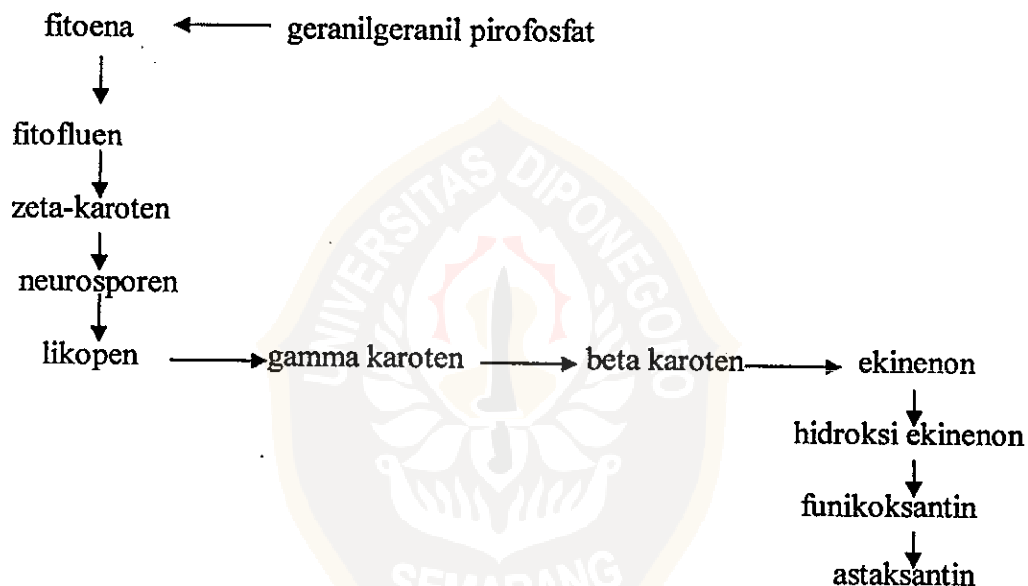
Sumber : Direktorat Gizi Depkes (1998)

2.4 Pembentukan Pigmen Karotenoid

Pola pembentukan pigmen pada *Phaffia rhodozyma* berasosiasi dengan pola pertumbuhan (*growth associated*), meskipun produksinya tidak bertepatan secara pasti dengan pertambahan biomasa. Pada pola ini sintesis karotenoid dimulai sejak awal pertumbuhan. Produksi astaksantin yang *growth associated* ini berbeda dengan yang dihasilkan oleh *Sporobolomyces roseus* dan *Rhodotorulla glutinis*. Produksi

karotenoid pada *Sporobolomyces roseus* dan *Rhodotorulla glutinis* meningkat setelah pertumbuhan khamir berhenti (fase stasioner). Pada *Phycomycetes* periode awal sintesis karotenoid juga terjadi pada akhir pertumbuhan (Johnson and Lewis, 1979).

Menurut Girard *et al* (1994), sintesis karotenoid pada *Phaffia rhodozyma* diperkirakan melalui langkah: pembentukan fitoena dari geranylgeranyl pirofosfat, dehidrogenasi fitoena menjadi likopen, siklisasi likopen menjadi β -karoten dan oksidasi akhir menjadi astaksantin. Skema pembentukan astaksantin terdapat pada Gambar 01.



Gambar 01. Skema Pembentukan Pigmen Astaksantin (Girard *et al.*, 1994).

2.5 Genetik *Phaffia rhodozyma*

Gen aktin pada *Phaffia rhodozyma* mengandung 4 sekuen. Diperkirakan 1808 pasang basa pada gen aktin *Phaffia rhodozyma* mengkode 375 asam amino. Aktin merupakan gen yang memiliki peran dasar yang penting pada proses selular eukariotik seperti motilitas, regulasi pertumbuhan sel, diferensiasi sel dan stabilitas struktural.

Pada gen tersebut terdapat 4 intron dengan panjang berkisar 71-338 pasang basa (Wery *et al.*, 1995).

Bentuk intron *Phaffia rhodozyma* mirip dengan basidiomycetes, misalnya *Filoblasidiella neoformans* (ditunjukkan dengan sempurna pada *Cryptococcus rheoformans*). Bentuk tersebut kurang menyerupai khamir ascomycetes. Berdasarkan penjajaran gen aktin *Phaffia rhodozyma* dengan *F. neoformans*, terdapat homologi yang tinggi pada tingkat DNA dan pada tingkat protein, dan kedua organisme tersebut cocok ditempatkan dalam kelompok yang sama. Perbandingan gen aktin tersebut mendukung dekatnya hubungan kekerabatan *Phaffia rhodozyma* dengan khamir basidiomycetes (Wery *et al.*, 1995).

2.6 Mutasi pada *Phaffia rhodozyma*

Patokan utama dalam memilih teknik mutasi adalah kemampuan teknik tersebut untuk menghasilkan sebanyak mungkin mutan yang nantinya akan diseleksi. Kebanyakan mutasi yang diinduksi tidak merupakan hasil akibat kerusakan langsung dari DNA, tetapi lebih merupakan hasil proses perbaikan DNA seluler yang terjadi pada DNA yang rusak sehingga menghasilkan suatu perubahan yang tetap pada urutan dasar DNA. Mutagen yang menyebabkan terjadinya fenomena ini mencakup UV, radiasi pengion dan beberapa mutagen kimia (Crueger and Crueger, 1984).

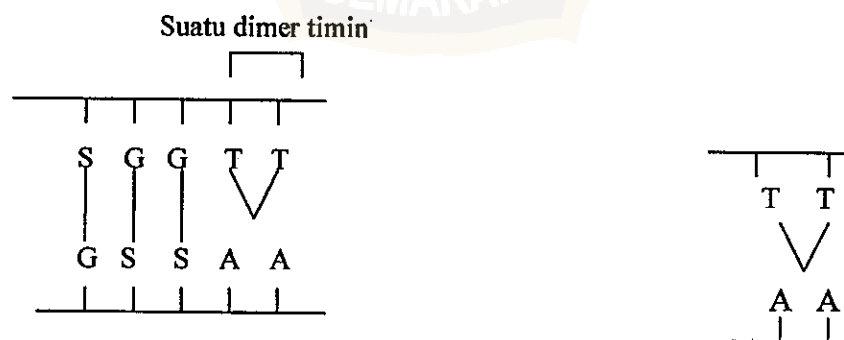
Perlakuan UV dan etil metansulfonat (EMS) sering kali menghasilkan koloni *Phaffia rhodozyma* dengan pola bermacam-macam. Seleksi melalui pengamatan secara visual pada koloni yang diisolasi setelah mutagenesis UV maupun EMS, memperlihatkan variasi warna berkisar dari putih hingga sangat merah, semuanya menunjukkan warna yang cukup stabil pada subkultur. Variasi warna tersebut tidak

pernah dihasilkan secara langsung oleh galur alami (Girard *et al.*,1994). Peningkatan aliran metabolik pada karotenogenesis menyebabkan tingginya produksi pigmen yang diperoleh pada *Phaffia rhodozyma* melalui mutagenesis (An *et al.*, 1989).

2.7 Radiasi Sinar Ultraviolet

Batasan spektrum sinar ultraviolet (UV) yaitu 8×10^{14} - 3.4×10^{16} Hz, dengan energi foton berkisar 3.2 -100 eV. Pada panjang gelombang yang kurang dari 290 nm, UV bersifat *germicidal* (membunuh mikroorganisme) (Hecht, 1987).

Salah satu agen mutagenik yang cukup efektif yaitu radiasi sinar UV dengan panjang gelombang pendek. Panjang gelombang pendek untuk mutagenesis adalah antara 200-300 nm, dengan optimumnya pada 254 nm. Pada panjang gelombang 254 nm tersebut DNA mengabsorpsi UV dengan maksimum. Produk paling penting pada aksi UV adalah dimer (Timin-Timin, Timin-Sitosin dan Sitosin-Sitosin). Bentuk ini terjadi antara pirimidin yang berdekatan atau antara pirimidin pada untai komplementer. Radiasi UV juga menginduksi transisi, transversi, mutasi frame shift dan delesi (Crueger and Crueger, 1984).



Gambar 02. Dimer Timin (Pai, 1987).

Radiasi UV dengan panjang gelombang 300-400 nm kurang bersifat letal dan kurang berakibat mutagenik dari pada UV panjang gelombang pendek. Tetapi jika sel atau bakteriofage dihadapkan dengan UV panjang gelombang panjang, dapat menghadirkan kematian sel juga, karena UV berinteraksi dengan DNA. Lesi / kerusakan ini dapat diperbaiki dengan perbaikan eksisi nukleotida, rekombinasi maupun sistem perbaikan SOS (Crueger and Crueger, 1984).

2.8 Perbaikan Kerusakan DNA

Menurut Pai (1987), kerusakan DNA yang disebabkan karena dimer dapat diperbaiki melalui beberapa cara, antara lain :

1. Perbaikan fotoreaktivasi

Foton-foton cahaya mengaktifasi enzim fotoreaktivasi (EFR). Enzim tersebut akan memutuskan ikatan pada dimer, dan mengembalikan DNA pada strukturnya yang semula.

2. Perbaikan eksisi

Perbaikan ini berbeda dengan fotoreaktivasi, karena tidak membutuhkan adanya cahaya tampak. Pada perbaikan ini sekuen-sekuen kecil dari DNA yang mengandung dimer dihilangkan dari untaiannya oleh enzim-enzim, dan kekosongan yang disebabkan oleh penyingkiran ini diisi kembali oleh enzim DNA polimerase I dan hubungan / ikatannya disempurnakan.

3. Perbaikan pasca replikasi / rekombinasi

Bentuk perbaikan ini terjadi menyusul replikasi DNA dalam bakteri yang disinari UV. Dimer yang terbentuk disingkirkan dan diperbaiki setelah DNA direplikasi. Dalam untai-untai DNA baru (hasil replikasi) dihasilkan kekosongan yang harus diisi, dan hal ini melibatkan proses yang cukup

rumit. Umumnya beberapa enzim dilibatkan bagi perbaikan eksisi untuk merekombinasi untaian-untaian DNA. Bentuk perbaikan ini disebut “perbaikan rekombinasi pasca-replikasi”, atau “perbaikan pasca replikasi”.

4. Respon SOS

Radiasi UV dapat menyebabkan terjadinya “sintesis DNA tak-terencana” pada tempat terjadinya kerusakan. Sintesis ini dapat terjadi akibat kesalahan perbaikan (*misrepair*) pada DNA yang rusak. Sintesis DNA tak-terencana tersebut diketahui sebagai hasil suatu kombinasi perbaikan eksisi dan perbaikan pasca replikasi serta reaksi-reaksi fisiologis lain yang dikenal dengan respon SOS. Aspek- aspek dari respon SOS meliputi pemanjangan sel, peningkatan kadar berbagai protein (enzim), mempercepat perbaikan DNA dan fenomena lain.

Selama perbaikan lesi UV, hingga 1000 pirimidin dimer dapat diperbaiki dengan semua sistem perbaikan yang dikembangkan sel. Untuk menambah frekuensi mutasi, dapat dilakukan manipulasi untuk mencegah mekanisme fotoreaktivasi yang terjadi dibawah panjang gelombang cahaya tampak, perbaikan eksisi, atau pemakaian senyawa kimia penghambat perbaikan tersebut (Crueger and Crueger, 1984).

2.9 Hipotesis

Salah satu agen mutagenik yang cukup efektif yaitu radiasi sinar ultraviolet panjang gelombang 254 nm. Pada panjang gelombang ini DNA mengabsorpsi UV secara maksimum (Crueger and Crueger, 1984). Dua efek utama dari radiasi UV yaitu letal dan mutagenik. Semakin lama radiasi diberikan, semakin banyak energi yang terserap oleh DNA, sehingga semakin banyak kerusakannya. Perbaikan DNA secara sintesis memungkinkan terjadinya kesalahan perbaikan (*mis repair*) dan menyebabkan

terjadinya mutasi. Mutasi yang menyebabkan rusaknya gen regulator pengatur produksi pigmen karotenoid ini akan menyebabkan sintesis enzim secara terus menerus sehingga pigmen yang dihasilkan tinggi.

