

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA DAN HIPOTESIS

2.1. Khamir

Khamir merupakan jamur uniseluler yang bereproduksi dengan pertunasan atau pembelahan sel. Khamir terdapat sebagai sel bebas yang sederhana. Berbeda dengan bakteri, khamir merupakan sel eukariotik yang mempunyai ukuran lebih besar serta berkembang biak dengan mekanisme yang berbeda. Ukuran sel khamir sangat bervariasi dengan panjang 1-30 μm dan lebar 1-5 μm . Setiap sel khamir memiliki bentuk yang khas, namun dalam biakan terdapat variasi yang sangat luas dalam hal bentuk dan ukuran, tergantung pada umur dan lingkungannya. Bentuk khamir bermacam-macam, yaitu bulat (spheroid), bulat telur (elip), silindris, seperti sosis, seperti buah jeruk, dan sebagainya (Pelczar *et al.*, 1986). Struktur sel khamir lebih sederhana dari jamur namun lebih kompleks dari bakteri. Mikrostruktur sel khamir terdiri dari dinding sel, membran sitoplasma, nukleus, membran nukleus, satu atau lebih vakuola, mitokondria, dan sitoplasma (Brock *et al.*, 1994).

Pertumbuhan dan perbanyakan sel khamir membutuhkan nutrisi yang sesuai. Nutrisi tersebut diambil 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 (oksigen, hidrogen, fosfor, dan magnesium) untuk pembentukan organel-organel sel, dan "trace elemen" atau mikroelemen yang dibutuhkan dalam jumlah kecil seperti vitamin, dan mineral (Kratochvilova, 1990).

2.2 Reproduksi Khamir

Reproduksi khamir ada dua, yaitu aseksual dan reproduksi seksual. Reproduksi aseksual dapat melalui beberapa cara, yaitu pertunasan, pembelahan, pembelahan tunas, dan pembentukan spora aseksual. Reproduksi seksual terjadi melalui pembentukan spora seksual. Pertunasan merupakan cara yang sangat umum terjadi pada reproduksi aseksual khamir. Dalam proses pertunasan, suatu saluran terbentuk dari vakuola di dekat nukleus menuju dinding sel yang terdekat dengan vakuola. Dinding sel akan mengalami penipisan yang memberikan ruang bagi protoplas untuk menonjol keluar. Tonjolan ini kemudian membesar dan diisi dengan komponen-komponen nukleus dan sitoplasma dari induknya melalui saluran yang terbentuk. Tunas terus tumbuh dan membentuk dinding sel baru. Jika ukuran tunas sudah hampir sama besar dengan induknya, komponen-komponen nukleus terpisah menjadi dua dan terbentuk dinding penyekat. Selanjutnya anak sel melepaskan diri dari induknya dan membentuk tunas baru (Fardiaz, 1992).

Pada umumnya pembentukan spora seksual pada khamir adalah dengan fusi atau menyatunya dua sel khamir menjadi sel tunggal berbentuk kantung yang disebut askus. Satu sampai delapan spora terbentuk di dalam askus. Askus tersebut kemudian pecah dan terbuka untuk melepaskan spora yang disebut sebagai askospora. Pada kondisi yang cocok untuk pertumbuhan, masing-masing askospora akan bersemi dan tumbuh menjadi sel khamir baru (Griffin, 1981).

2.3 Pertumbuhan Sel Khamir

Pertumbuhan pada khamir berarti penambahan volume dan ukuran sel, jumlah atau biomassa sel selama interval waktu tertentu yang dapat digambarkan sebagai kurva logaritmik. Jumlah atau biomassa sel diplotkan pada sumbu ordinat sedangkan waktu inkubasi diplotkan pada sumbu absis. Kurva pertumbuhan menunjukkan adanya fase-fase yang berbeda dalam siklus pertumbuhannya. Fase-fase pertumbuhan khamir tidak berbeda dengan mikroorganisme lainnya, yaitu fase lag, logaritmik/eksponensial, stasioner, dan fase kematian. Fase lag merupakan fase adaptasi bagi mikroorganisme terhadap keadaan lingkungan. Kondisi medium yang sesuai bagi pertumbuhan khamir dapat mempercepat tercapainya fase ini. Setelah fase lag terlampaui maka fase berikutnya adalah fase logaritmik/eksponensial. Kecepatan pembelahan pada fase ini mencapai maksimal dan waktu generasinya paling pendek. Fase selanjutnya adalah fase stasioner yang dicirikan dengan kecepatan pertumbuhan yang melambat dengan jumlah sel yang tetap karena jumlah sel yang hidup dan yang mati kira-kira sama, kemudian berlanjut pada fase kematian yang dicirikan dengan menurunnya kecepatan pertumbuhan dan akhirnya berhenti (Kratochvilova, 1990).

Kecepatan pertunasan khamir sangat penting untuk mendapatkan biomassa yang maksimal, terutama apabila medium sintesis digunakan sebagai substrat. Kecepatan pertunasan dapat diketahui dari jumlah sel atau biomassa yang diproduksi pada keadaan dan interval waktu tertentu. Pertambahan biomassa khamir juga dapat ditentukan dengan cara tidak langsung, misalnya dengan menghitung viskositas atau kenaikan absorbansi cahaya (Kratochvilova, 1990).

2.4. Faktor- faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan

2.4.1. Sumber Karbon

Khamir adalah organisme khemoheterotrof yang membutuhkan karbon organik untuk pertumbuhan, dan karbon organik tersebut harus dalam bentuk yang dapat diasimilasi. Sumber karbon yang hendak digunakan harus sesuai dengan galur mikroorganisme yang akan ditumbuhkan. Banyak mikroorganisme respiratif menghasilkan lebih dari cukup CO₂ yang dibutuhkan pada sejumlah reaksi biosintesis, tetapi yang lain membutuhkan sumber CO₂ pada medium pertumbuhan (Jawetz *et al.*, 2001).

Sumber karbon yang umum digunakan adalah dalam bentuk monosakarida, antara lain glukosa, fruktosa dan manosa, yang ditambahkan pada medium pertumbuhan dengan konsentrasi 1-10%. Beberapa khamir juga dapat menggunakan disakarida seperti sukrosa dan maltosa (Kratochvilova, 1990).

2.4.2. Sumber Nitrogen

Nitrogen merupakan komponen utama protein dan asam nukleat, yaitu sebesar lebih kurang 10% dari berat sel khamir. Mikroorganisme mempunyai kemampuan yang berbeda dalam mengasimilasi nitrogen. Hasil akhir dari seluruh jalur asimilasi nitrogen adalah dalam bentuk paling tereduksi, yaitu ion amonium (NH₄⁺) (Garraway & Evans, 1984).

Sumber nitrogen untuk khamir biasanya tersedia dalam bentuk komponen organik, seperti pepton, “ekstrak yeast”, dan lain-lain. Penggunaan sumber nitrogen dan sumber karbon dapat dilakukan dalam waktu yang bersamaan

sebagai medium pertumbuhan dengan perbandingan yang tepat (Kratochvilova, 1990).

2.4.3. Suhu

Suhu adalah faktor penting yang berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroorganisme dan ketahanan hidupnya. Setiap terjadi kenaikan suhu, reaksi kimia dan reaksi enzimatik di dalam sel dan pertumbuhannya akan menjadi lebih cepat. Setiap terjadi kenaikan suhu pada kisaran tertentu, pertumbuhan dan fungsi metabolisme meningkat sampai batas reaksi inaktivasi (Brock *et al.*, 1994). Kisaran suhu untuk pertumbuhan khamir pada umumnya sama dengan kapang, yaitu dengan suhu optimum 25-30°C, dan suhu maksimum 35-47°C (Fardiaz, 1992).

2.4.4. Aerasi

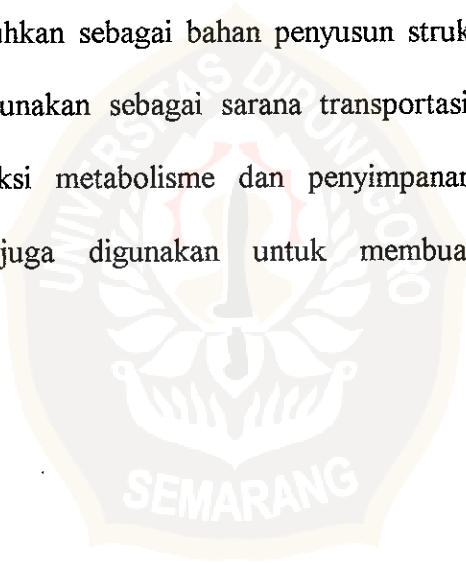
Khamir menggunakan oksigen dalam bentuk oksigen terlarut. Oksigen tidak dapat disimpan dalam bentuk nutrisi, tetapi harus diberikan secara kontinyu. Oksigen terlarut pada medium cair dapat ditingkatkan dengan menyediakan ruangan besar antara gas dan medium. Salah satu cara untuk mencapai hal tersebut adalah dengan agitasi dari medium cair dengan pengocokan ("shaking") baik secara resiprok (bolak-balik) maupun sirkular (Schlegel, 1993).

2.4.5. pH

Setiap mikroorganisme mempunyai kisaran pH tertentu untuk pertumbuhannya dan biasa disebut pH optimum. Khamir lebih menyukai pH yang sedikit asam yaitu 4-5, dan dapat tumbuh pada pH rendah yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain seperti bakteri. Khamir tidak dapat tumbuh pada kondisi alkali, kecuali jika telah beradaptasi (Fardiaz, 1992).

2.4.6. Air

Medium khamir harus memiliki kandungan air yang cukup. 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 yang tidak terikat digunakan sebagai sarana transportasi selama metabolisme, tempat terjadinya reaksi metabolisme dan penyimpanan sementara senyawa antara. Air bebas juga digunakan untuk membuang kelebihan panas (Kratochvilova, 1990).



2.5. Karakteristik *Rhodotorula mucilaginosa*

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

Kingdom	: Mycota
Divisi	: Eumycota
Kelas	: Deuteromycetes (fungi imperfecti)
Ordo	: Cryptococcales
Famili	: Cryptococcaceae
Genus	: <i>Rhodotorula</i>
Spesies	: <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>

Rhodotorula mucilaginosa memiliki bentuk sel bulat sampai panjang dengan ukuran sel lebar 2,5- 6,5 μm dan panjang 6,5-14 μm . Koloni sel di dalam medium agar berwarna merah muda seperti koral, koloninya halus, retikulat, rugose, corrugated dan basah atau berlendir (Rij, 1984). Menurut Carlile & Watkinson (1994), *Rhodotorula* merupakan khamir yang tidak membentuk ballitospora atau askospora, sehingga dikelompokkan dalam famili Cryptococcaceae yang disebut juga "asporogenous yeast". Sel berbentuk oval, 'spherical'(bulat) dan bulat memanjang, kadang-kadang memperlihatkan bentuk pseudomiselium primitif dan berkembang biak dengan pertunasan multipolar.

Rhodotorula merupakan khamir fermentatif, habitat utamanya adalah pada tanaman terutama di bagian daun, bunga dan buah serta ditemukan juga pada lingkungan perairan (Phaff, 1978). Menurut Fardiaz (1992), semua spesies *Rhodotorula* merupakan kelompok khamir yang bersifat oksidatif kuat atau

aerobik yang membutuhkan oksigen untuk pertumbuhannya. Khamir *Rhodotorula* dapat menghasilkan pigmen karotenoid, dengan jumlah dan jenis pigmen yang dihasilkan tergantung dari jenis dan kondisi medium pertumbuhannya. Pigmen karotenoid yang dihasilkan terutama adalah β -karoten, torulen, dan torularhodin (Simpson *et al.*, 1971).

Rhodotorula sp. tumbuh cepat pada temperatur rendah. Adanya sifat khamir ini dapat menyebabkan kerusakan pada produk-produk susu, seperti yoghurt, mentega, krim, dan keju. *Rhodotorula* sp. juga dapat menyebabkan kerusakan pada ikan dan kerang, yaitu dengan adanya noda berwarna merah muda pada produk tersebut (Pitt & Hocking, 1999).

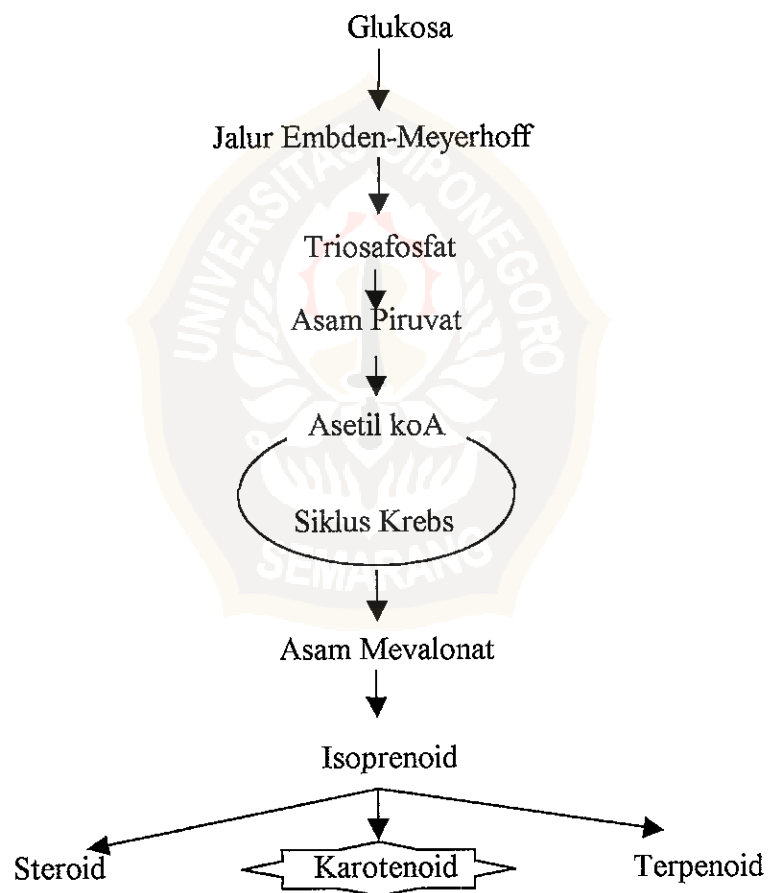
2.6. Pigmen Karotenoid

Karotenoid merupakan kelompok pigmen yang berwarna kuning sampai merah yang terdapat baik pada kingdom tanaman maupun hewan. Karotenoid termasuk dalam senyawa terpenoid yang merupakan kelompok dari substansi-substansi lipid. Karotenoid menimbulkan warna yang sangat bervariasi tergantung dari panjang kromofor dan jenis ikatan oksigen yang terkandung di dalamnya. Pigmen ini merupakan warna khas spesies dari genus *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, dan *Sporobolomyces* (Simpson *et al.*, 1971).

Karotenoid memiliki suatu kerangka yang terdiri dari 40 atom karbon (tetrapena) tersusun dari rantai poliisoprena simetris terhadap pusat. Karotenoid memiliki sifat mengabsorpsi pada daerah tampak, karena itu senyawa ini berwarna kuning-merah. 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 C_{40} sehingga jumlah atom karbonnya tereduksi beberapa untai, dan terbentuk satu atau dua gugus karboksilat (Manitto, 1981)

Sintesis karotenoid tidak terlepas dari metabolisme primer, sekalipun karotenoid merupakan metabolit sekunder (Griffin, 1981). Jalur metabolisme primer dan sekunder dalam pembentukan pigmen karotenoid pada khamir disajikan dalam Gambar 01.



Gambar 01. Sintesis karotenoid. (*) jalur asam mevalonat (Griffin, 1981).

Sintesis karotenoid dimulai dengan adanya asam mevalonat, suatu senyawa dengan enam karbon yang memiliki rantai cabang konfigurasi isoprenoid, yang berasal dari tiga molekul asetil koA. 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).

2.7. Glukosa

Glukosa merupakan senyawa gula yang umum digunakan untuk menumbuhkan khamir sebagai sumber karbon dan energi dari senyawa organik di laboratorium (Walker, 1999). Sebagai sumber karbon utama, glukosa sering digunakan karena sifatnya yang mudah difermentasi. Glukosa merupakan monosakarida yang memiliki gugus aldehid (aldosa) dan 6 atom karbon (heksosa). Monosakarida ini banyak ditemukan dalam sari buah, hidrolisis pati, gula tebu, maltosa, sukrosa, dan laktosa. Glukosa pada tumbuhan disintesis dari karbondioksida serta air melalui fotosintesis dan disimpan dalam bentuk pati atau diubah menjadi selulosa yang merupakan kerangka tumbuhan (Muray *et al.*, 1997).

Khamir merupakan organisme anaerob fakultatif. Glukosa pada kondisi anaerob diubah menjadi alkohol dan karbondioksida oleh enzim khamir melalui

jalur Embden-Meyerhoff. Pada kondisi aerob glukosa dioksidasi sempurna menjadi karbondioksida dan air melalui daur asam sitrat (Fardiaz, 1992).

2.8. Fermentasi

2.8.1. Fermentasi *Batch*

Fermentasi *batch* dapat dianggap sebagai fermentasi tertutup. Pada saat $t=0$, medium yang telah diinokulasi dengan mikroorganisme diinkubasi dalam kondisi fisiologis. Selama proses fermentasi berlangsung tidak ada penambahan kecuali oksigen (dalam bentuk gas di udara) dan asam atau basa untuk mengontrol pH. Komposisi medium, konsentrasi biomassa, dan konsentrasi hasil metabolit secara umum akan berubah sebagai hasil metabolisme sel. Setelah mikroorganisme diinokulasikan pada medium dan diinkubasi pada kondisi fisiologisnya, maka akan terjadi empat fase pertumbuhan, yaitu fase lag, fase log, fase stasioner, dan fase kematian (Crueger & Crueger, 1984).

2.8.2 Fermentasi *Fed Batch*

Pada fermentasi *batch* semua substrat diberikan di awal fermentasi. Pada fermentasi *fed batch*, substrat (sumber karbon, protein, mineral, dan lain-lain) ditambahkan selama fermentasi berlangsung. Dengan demikian, sebagian besar metabolit sekunder dapat terbentuk dari katabolisme glukosa atau sumber karbohidrat lain, serta senyawa nitrogen dalam konsentrasi yang tinggi. Elemen penting dari larutan nutrisi pada fermentasi *fed batch*, diberikan dalam konsentrasi kecil di awal fermentasi, kemudian ditambahkan kembali dalam konsentrasi kecil (tertentu) selama proses fermentasi berlangsung (Crueger & Crueger, 1984).

Menurut Yamane *et al.* (1997), produksi karotenoid meningkat di dalam kultur *fed batch* dengan penambahan sumber karbon glukosa walaupun pertumbuhan menjadi terhambat karena konsentrasi glukosa yang tinggi. Pada penelitian Yamane yang lain menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi glukosa pada fermentasi *fed batch* harus diimbangi dengan suplai oksigen yang cukup.

Buzzini (2001) menyatakan bahwa konsentrasi total pigmen karotenoid pada sistem fermentasi *fed batch* sangat tinggi dibanding pada sistem fermentasi *batch*. Peningkatan produksi karotenoid dalam sistem *fed batch* meningkat hingga 150% dari sistem *batch*

2.9. Hipotesis

Sistem fermentasi dilakukan dengan maksud untuk memaksimalkan pertumbuhan dan produksi pigmen karotenoid *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-18. Penambahan substrat glukosa sebagai sumber karbon dengan konsentrasi tertentu selama proses fermentasi berlangsung (fermentasi *fed batch*) dapat meningkatkan pertumbuhan dan produksi pigmen karotenoid *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-18.