

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1. Pertumbuhan *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-18

Pertumbuhan *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-18 pada medium dapat dilihat pada perubahan kultur cairnya. Kultur *R. mucilaginosa* UICC Y-18 terlihat berwarna merah orange mulai dari inkubasi 12 jam. Pertumbuhan pada khamir ini dapat diketahui dengan mengukur biomassa selnya secara populatif menggunakan metode gravimetri.

Biomassa sel tertinggi *R. mucilaginosa* UICC Y-18 yang ditumbuhkan dalam sistem fermentasi *batch* diperoleh sebesar 4,02 g/L pada waktu inkubasi 132 jam. Untuk kondisi *fed batch*, khamir *R. mucilaginosa* UICC Y-18 terlebih dahulu dikondisikan pada fermentasi *batch*. Hasil biomassa tertinggi pada sistem ini adalah 2,96 g/L. Fermentasi *fed batch* dimulai setelah waktu inkubasi 48 jam, saat gula reduksi dalam medium sebesar 4,84 g/L dan hasil biomassa tertinggi yang diperoleh pada sistem *fed batch* ini sebesar 4,62 g/L.

Secara umum pertumbuhan yang diketahui dari berat kering sel pada perlakuan *fed batch* lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan *batch* setelah inkubasi 48 jam. Akan tetapi dari Uji t, perbedaan yang nyata baru pada waktu inkubasi 84 jam (Lampiran 05. Tabel 10.). Penambahan glukosa pada sistem *fed batch* saat inkubasi 48 jam tidak langsung memberikan hasil yang secara nyata lebih tinggi dari pada sistem *batch*. Saat inkubasi 48 jam pada sistem *batch*, kandungan glukosa masih

cukup untuk kelangsungan metabolisme dalam sel khamir, sehingga pertumbuhan masih tinggi. Biomassa sel *R. mucilaginosa* UICC Y-18 selama 240 jam inkubasi dapat dilihat pada Tabel 01.

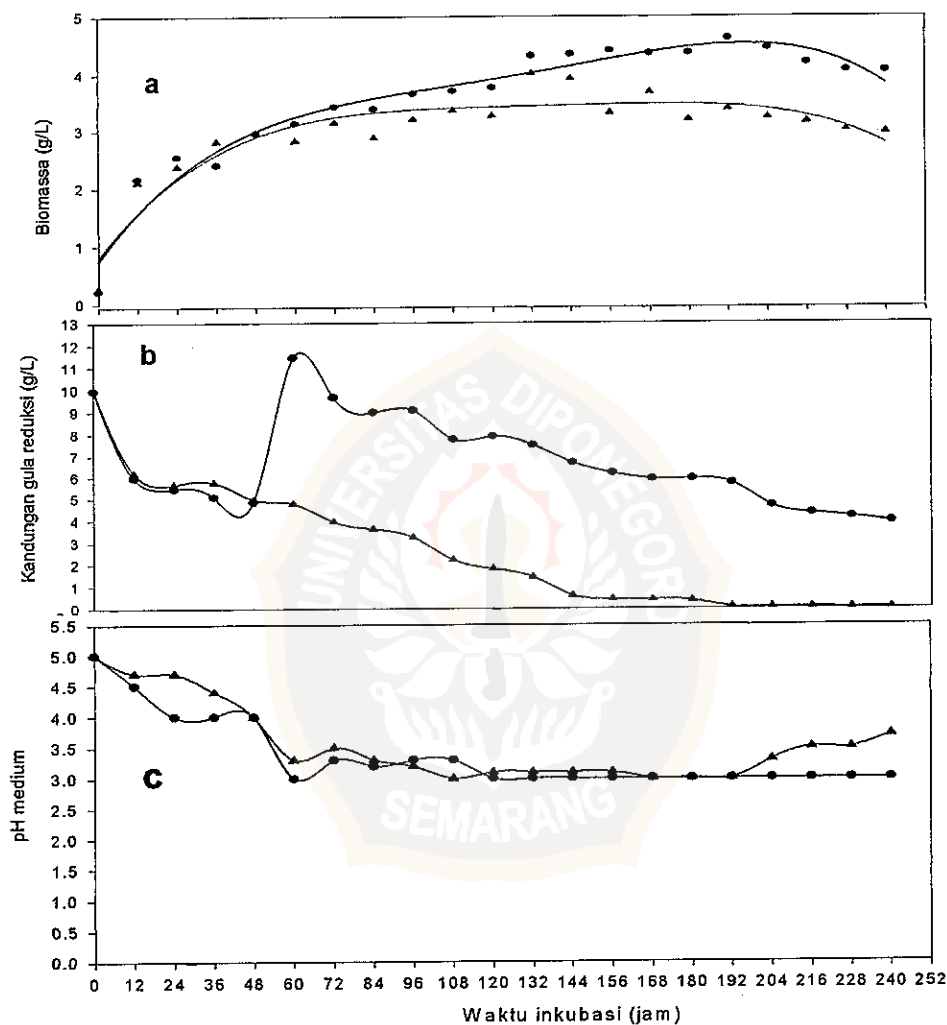
Tabel 01. Biomassa sel *R. mucilaginosa* UICC Y-18 (g/L) pada medium dengan perlakuan sistem fermentasi *batch* dan *fed batch* selama 240 jam inkubasi pada agitasi 180 rpm dan temperatur ruang.

Waktu inkubasi (jam)	Perlakuan	
	P1	P2
0	0,26 <sup>a</sup>	0,22 <sup>a</sup>
12	2,10 <sup>a</sup>	2,16 <sup>a</sup>
24	2,38 <sup>a</sup>	2,55 <sup>a</sup>
36	2,82 <sup>a</sup>	2,41 <sup>a</sup>
48	2,96 <sup>a</sup>	2,96 <sup>a</sup>
60	2,83 <sup>a</sup>	3,14 <sup>a</sup>
72	3,15 <sup>a</sup>	3,43 <sup>a</sup>
84	2,88 <sup>b</sup>	3,39 <sup>a</sup>
96	3,21 <sup>b</sup>	3,66 <sup>a</sup>
108	3,36 <sup>b</sup>	3,71 <sup>a</sup>
120	3,27 <sup>b</sup>	3,77 <sup>a</sup>
132	4,02 <sup>b</sup>	4,32 <sup>a</sup>
144	3,93 <sup>b</sup>	4,35 <sup>a</sup>
156	3,32 <sup>b</sup>	4,41 <sup>a</sup>
168	3,69 <sup>b</sup>	4,36 <sup>a</sup>
180	3,20 <sup>b</sup>	4,37 <sup>a</sup>
192	3,39 <sup>b</sup>	4,62 <sup>a</sup>
204	3,24 <sup>b</sup>	4,45 <sup>a</sup>
216	3,16 <sup>b</sup>	4,20 <sup>a</sup>
228	3,02 <sup>b</sup>	4,07 <sup>a</sup>
240	2,97 <sup>b</sup>	4,06 <sup>a</sup>

Keterangan : Angka yang diikuti dengan superskrip huruf yang sama pada baris yang sama dalam lajur perlakuan berbeda, menunjukkan berbeda tidak nyata menggunakan Uji t dengan taraf uji 5 %.

P1= *batch*, P2= *fed batch*

Pertumbuhan *R. mucilaginosa* UICC Y-18 (dalam bentuk kurva logaritmik) dan penurunan konsentrasi gula pereduksi dalam medium selama fermentasi berlangsung dapat dilihat pada Gambar 02.



Gambar 02. Kurva pertumbuhan (a) dan kandungan gula pereduksi (b) serta derajat keasaman medium (c) *R. mucilaginosa* UICC Y-18 dengan sumber karbon glukosa selama 240 jam inkubasi pada agitasi 180 rpm dan temperatur ruang. Simbol :  
 ▲ sistem fermentasi *batch*, ● sistem fermentasi *fed batch*.

Kurva pertumbuhan *R. mucilaginosa* UICC Y-18 pada Gambar 02. menunjukkan bahwa pertumbuhan sel mengalami fase pertumbuhan stasioner pada waktu yang berbeda. Perlakuan sistem fermentasi *batch* telah mengalami fase stasioner saat inkubasi 72 jam. Fase stasioner ditandai juga dengan semakin menipisnya sumber glukosa yang terdapat dalam medium (Gambar 02.b.). Gula pereduksi yang terkandung di dalam medium mulai menipis pada inkubasi 72 jam dan habis pada inkubasi 192 jam. Pada *fed batch*, khamir mengalami fase stasioner saat inkubasi 132 jam. Gula pereduksi dalam medium masih tersisa sekitar 4 g/L saat fermentasi dihentikan pada inkubasi 240 jam. Ketersediaan sumber karbon ini memungkinkan pertumbuhan terus berlangsung sampai gula pereduksi benar-benar habis.

Perlakuan sistem fermentasi *fed batch* mengalami fase logaritmik yang lebih panjang karena kebutuhan sumber karbon (dalam percobaan ini berupa glukosa) masih dapat terpenuhi. Adanya penambahan glukosa secara eksogen yang dilakukan setelah inkubasi 48 jam akan menunjang metabolisme sel, karena sumber karbon merupakan elemen paling penting dalam kontinuitas kehidupan khamir (Phaff *et al.*, 1978). Karbon dalam sel digunakan sebagai sumber energi dan penyusun rangka dari substansi seluler untuk pertumbuhan sel. Sumber karbon yang terbatas atau habis akan menurunkan pertumbuhan, bahkan sel akan mati (Muljono, 1989). Sumber karbon dalam konsentrasi yang tinggi pada medium juga akan menghambat pertumbuhan sel karena akan terjadi plasmolisis yang disebabkan oleh perbedaan tekanan osmosis di dalam dan di luar sel karena medium mengalami hipertonis.

Rehm and Reed (1981) menyatakan bahwa konsentrasi maksimum glukosa dalam medium untuk pertumbuhan mikroorganisme adalah sebesar 50 g/L. Pada penelitian yang dilakukan, saat inkubasi 48 jam, gula pereduksi dalam medium sisa 4,84 g/L. Penambahan glukosa adalah sebesar 6,61 g/L sehingga total gula pereduksi selama fermentasi *fed batch* adalah 11,45 g/L. Konsentrasi ini masih jauh di bawah batas maksimum konsentrasi gula dalam medium untuk pertumbuhan khamir yang artinya medium belum mengalami saturasi (kejenuhan) oleh sumber karbon.

Voet and Voet (1995) menyatakan bahwa glukosa akan diserap secara difusi terfasilitasi ke dalam sel melalui membran. Dalam sitosol, glukosa akan dikatabolisme menjadi triosa fosfat melalui serangkaian reaksi glikolisis, yang menghasilkan energi dalam bentuk ATP sebanyak 8 molekul. Satu molekul glukosa akan diubah menjadi 2 molekul asam piruvat. Asam piruvat berupa triosa fosfat ini akan masuk mitokondria setelah dikonversi menjadi Asetil KoA dalam jalur Siklus Krebs, kemudian mengalami fosforilasi oksidatif dan transfer elektron. Katabolisme setiap molekul glukosa akan menghasilkan energi berupa ATP sebanyak 38 ATP. ATP yang merupakan senyawa berenergi tinggi ini dapat digunakan dalam berbagai proses seluler dan biomolekuler yang kompleks, di antaranya proses biosintesis yang berupa kerja kimia, transport aktif yang berupa kerja osmotik, dan juga pemindahan informasi genetik saat pembelahan sel.

Perlakuan sistem fermentasi *batch* menunjukkan bahwa derajat keasaman medium cenderung mengalami penurunan mulai dari pH awal inkubasi (pH 5) menjadi 3. Menurut Fang dan Chiou (1996), penurunan pH pada awal inkubasi

disebabkan karena konsumsi gula dan amonium. Gula yang dikonsumsi akan dikatabolisme dan hasil katabolisme gula ini dapat berupa asam-asam organik yang akan dilepaskan ke lingkungan (dalam hal ini medium). Akumulasi asam organik ini menyebabkan pH medium menjadi lebih asam dibanding dengan pH awal. Pengamatan menunjukkan bahwa setelah 192 jam inkubasi, pH medium mengalami kenaikan (Gambar 02.c.). Kenaikan pH ini disebabkan karena pelepasan ion amonium pada proses metabolisme protein dan asam amino. Penimbunan ion amonium yang terus menerus akan menyebabkan medium bertambah alkalis. Metabolisme protein dan asam amino ini biasanya terjadi pada akhir fase logaritmik atau saat fase stasioner.

Perlakuan sistem fermentasi *fed batch* belum menunjukkan adanya peningkatan pH setelah terjadi penurunan sampai pada waktu inkubasi 120 jam. Menurut Muljono (1989), metabolisme akan terkonsentrasi pada metabolisme protein jika sumber karbon dalam medium habis atau berada dalam jumlah yang kecil. Sumber karbon pada penelitian sistem fermentasi *fed batch* yang diamati masih cukup tinggi pada medium (Gambar 02.b.). Karena sumber karbon masih tinggi, maka sel-sel pada kultur *fed batch* masih melakukan metabolisme gula sebagai sumber karbon dan komponen-komponen substrat lainnya. Metabolisme protein dan asam amino tidak banyak terjadi, sehingga tidak terdapat akumulasi ion ammonium yang dapat meningkatkan pH medium. Hal ini terlihat pada waktu inkubasi 120 jam sampai dengan fermentasi ini diberhentikan pH tidak mengalami perubahan.

Perubahan pH yang terjadi pada medium bervariasi, tergantung juga pada sumber nitrogen yang digunakan. Jika sumber nitrogen adalah bahan organik, maka pH cenderung tinggi karena bahan tersebut mengalami deaminasi. Penelitian ini menunjukkan bahwa pH medium setelah waktu inkubasi tertentu tidak terlalu tinggi, yaitu sekitar 3,8. Hal ini disebabkan oleh konsentrasi sumber nitrogen organik (“ekstrak yeast”) di dalam medium lebih rendah dari sumber nitrogen yang bukan berasal dari bahan organik, yaitu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

#### 4.2. Produksi Pigmen Karotenoid *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-18

Hasil penelitian rata-rata produksi pigmen karotenoid khamir *R. mucilaginosa* UICC Y-18 yang ditumbuhkan pada sistem fermentasi *batch* dan *fed batch* selama 240 jam inkubasi menunjukkan hasil yang berbeda. Produksi pigmen tertinggi untuk perlakuan fermentasi *fed batch* (P2) dicapai pada waktu inkubasi 168 jam sebesar 167,74  $\mu\text{g/g}$ , sedangkan produksi tertinggi perlakuan *batch* (P1) dicapai pada inkubasi 84 jam sebesar 131,33  $\mu\text{g/g}$ . Produksi pigmen tertinggi ini disebabkan karena pengaruh penambahan sumber karbon, yaitu dalam penelitian ini glukosa. Produksi pigmen tertinggi pada sistem *fed batch* dicapai pada waktu inkubasi yang lebih lama dengan hasil yang juga lebih tinggi karena kandungan glukosa dalam medium masih tinggi untuk mendukung proses karotenogenesis dalam sel. Perlakuan sistem *batch* menunjukkan hasil yang lebih rendah karena konsentrasi glukosa dalam medium lebih rendah, sehingga

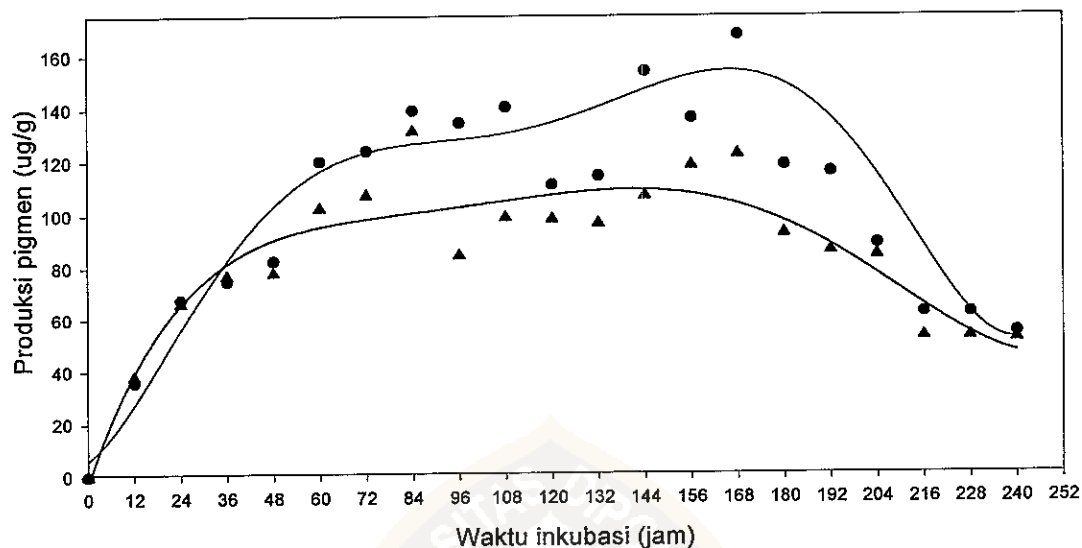
Menurut Johnson & Lewis (1979), karotenogenesis sangat dipengaruhi oleh adanya sumber karbon. Karbon sangat diperlukan dalam pembentukan pigmen karena disamping sebagai senyawa penghasil energi (ATP, NADPH dan FADH), juga merupakan komponen penyusun rangka utama dari pigmen karotenoid. Phaff *et al.*, (1978) menyatakan bahwa atom karbon yang digunakan dalam sintesis karotenoid dimulai dari asetil Ko-A yang diubah menjadi rantai C<sub>5</sub> terpenoid. C<sub>5</sub> terpenoid kemudian diubah menjadi komponen C<sub>40</sub>. Pada reaksi terakhir, rantai C<sub>40</sub> akan disusun kembali dan berubah menjadi karotenoid yang spesifik.

Karotenoid tersusun atas 40 rangka karbon dan atom hidrogen (C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>) (Phaff *et al.*, 1978), oleh karena itu jika sumber karbon terbatas atau habis, maka pigmen tak akan disintesis. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa produksi karotenoid semakin menurun seiring dengan habisnya sumber glukosa dalam medium (Tabel 02. dan Gambar 02.b.).

Secara umum produksi pigmen karotenoid pada perlakuan *fed batch* lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan *batch* setelah inkubasi 48 jam. Akan tetapi dari Uji *t*, perbedaan yang nyata hanya pada waktu inkubasi 96 jam sampai dengan 192 jam (Lampiran.06. Tabel 15.). Penambahan glukosa pada sistem *fed batch* saat inkubasi 48 jam tidak langsung memberikan hasil yang secara nyata lebih tinggi dari pada sistem *batch*. Saat inkubasi 48 jam sampai dengan 96 jam pada sistem *batch*, kandungan glukosa masih cukup untuk kelangsungan metabolisme dalam sel khamir, sehingga karotenogenesis masih dapat berlangsung.



Produksi pigmen karotenoid khamir *R. mucilaginosa* UICC Y-18 ditunjukkan dalam bentuk kurva seperti pada Gambar 03.



Gambar 03. Kurva produksi pigmen karotenoid khamir *R. mucilaginosa* UICC Y-18 dengan perlakuan sistem fermentasi *batch* dan *fed batch* pada agitasi 180 rpm dan temperatur ruang selama 240 jam inkubasi. Simbol :  
 ▲ Sistem fermentasi *batch*, ● sistem fermentasi *fed batch*.

Kurva produksi pigmen pada Gambar 03. menunjukkan profil yang tidak berbeda antara perlakuan sistem fermentasi *batch* dan *fed batch*. Produksi pigmen pada fermentasi *batch* sudah konstan sejak inkubasi 60 jam sampai inkubasi 168 jam, kemudian mengalami penurunan. Pada kondisi *fed batch*, produksi karotenoid masih cenderung mengalami peningkatan saat inkubasi 60 jam sampai dengan 168 jam, setelah itu baru mengalami penurunan. Hal ini sesuai dengan kandungan glukosa dalam medium. Pada kondisi *batch*, glukosa berada dalam jumlah yang terbatas, sedangkan untuk kondisi *fed batch*, ada penambahan glukosa sebagai sumber karbon

yang menyebabkan perbedaan dalam optimalitas karotenogenesis kedua sistem fermentasi ini. Fermentasi *fed batch* dapat dikatakan lebih optimum dalam memproduksi karotenoid.

Pigmen karotenoid sangat terkait dengan pertumbuhan sel, meskipun tidak tepat sama. Hal ini dapat dilihat bahwa profil produksi pigmen (Gambar 03.) hampir sama dengan profil pertumbuhannya (Gambar 02.a.). Pigmen pada khamir disintesis saat awal fase logaritmik dan terus meningkat sampai pada fase akhir logaritmik dan stasioner pertumbuhannya (Johnson & Lewis, 1979). Pigmen ini difungsikan sebagai antioksidan bersama-sama dengan enzim katalase yang terdapat dalam sel khamir. Pigmen karotenoid pada umumnya optimum disintesis pada fase transisi (antara fase log dan fase stasioner). Tada & Tsubouchi (1990), menyatakan bahwa pada fase ini akumulasi radikal bebas dalam sel yang bersifat destruktif cukup tinggi, sehingga pigmen akan banyak disintesis untuk menetralkan radikal bebas tersebut.

Glukosa sangat penting perannya dalam pembentukan pigmen karotenoid pada khamir *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-18. Glukosa yang merupakan sumber karbon dalam medium akan diserap oleh sel khamir tersebut dan mengalami serangkaian reaksi metabolisme. Glukosa akan dikatabolisme menjadi Asetil Ko-A melalui reaksi glikolisis. Asetil Ko-A yang merupakan senyawa antara ini akan membentuk asam mevalonat. Menurut Voet & Voet (1995) dan Simpson *et al.* (1971), mevalonat akan dikonversi membentuk fitoen. Fitoen berturut-turut mengalami perubahan menjadi fitofluen, neurosporen,  $\beta$ -zeakaroten,  $\nu$ -karoten dan

akhirnya membentuk  $\beta$ -karoten. Pigmen  $\beta$ -karoten ini merupakan pigmen utama yang menyusun karotenoid dari *Rhodotorula*. Karotenoid lain yang terdapat pada khamir *Rhodotorula* adalah torulen dan torularhodin yang merupakan kelompok asam karotenat turunan dari  $\beta$ -karoten.

