

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Umum Khamir (*Yeast*)

Khamir adalah organisme uniseluler yang termasuk golongan “fungi”. Bentuk sel khamir biasanya “spheris”, oval atau silindris dan umumnya perbanyakan sel terjadi melalui proses pertunasan (“budding”). Pada proses pertunasan, sel anak akan terbentuk melalui penonjolan ke arah luar dari sel induk, tunas tersebut kemudian membesar dan terlepas dari induknya. Khamir biasanya tidak membentuk filamen atau miselium, populasi sel khamir merupakan kumpulan dari beberapa 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 mengandung gula cukup banyak seperti pada buah, bunga dan kulit kayu (Brock *et al.*, 1994).

Menurut Kratochvilova (1990) untuk pertumbuhan dan perbanyakannya, sel khamir membutuhkan nutrisi yang cukup dan sesuai, sel akan mengambil nutriennya 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 untuk pembentukan organel-organel sel (oksigen, hidrogen, fosfor dan magnesium), elemen oligobiogenik (“trace elemen” atau mikroelemen) yang dibutuhkan dalam jumlah kecil seperti vitamin, dan substansi pertumbuhan lain. 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, tempat terjadinya reaksi metabolisme dan penyimpanan sementara senyawa antara. Air bebas juga digunakan untuk membuang kelebihan panas.

Khamir adalah organisme kemoheterotropik yang membutuhkan karbon dan nitrogen, terutama dalam bentuk organik. Bentuk karbon yang paling mudah untuk digunakan adalah sakarida, yang digunakan baik untuk reaksi oksidatif maupun anoksidatif. Sebagai sumber C dapat digunakan gula heksosa, misalnya D-glukosa, D-fruktosa dan D-manosa, yang ditambahkan pada medium dengan konsentrasi 1 – 10 %, sebagai sumber nitrogen umumnya disediakan dalam bentuk organik, seperti pepton atau ekstrak yeast. Asam amino dapat digunakan sebagai sumber nitrogen maupun sumber karbon pada saat yang bersamaan dan biasanya ditambahkan dalam medium pertumbuhan dengan proporsi seperti yang terdapat di alam (Kratochvilova, 1990).

Kebanyakan khamir bersifat mesofil. Temperatur optimum untuk multiplikasi khamir secara umum adalah 25°C - 28°C , dengan batas temperatur tertinggi inkubasi adalah 46°C . Temperatur terendah yang masih memungkinkan untuk pertumbuhan khamir berkisar $4-5^{\circ}\text{C}$ (Kratochvilova, 1990).

Kecepatan pertunasan khamir sangat penting untuk mendapatkan biomassa yang maksimal, terutama apabila medium sintetis 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).

2.2. *Phaffia rhodozyma*

Klasifikasi *P. rhodozyma* menurut Kreger-van Rij (1978 dalam Barnett *et al.*, 1990) adalah sebagai berikut :

Kingdom	:	Fungi
Divisi	:	Eumycota
Subdivisi	:	Deuteromycotina
Kelas	:	Blastomycetes
Famili	:	Cryptococcaceae
Genus	:	<i>Phaffia</i>
Spesies	:	<i>Phaffia rhodozyma</i>

Sel *P. rhodozyma* berbentuk ellipsoid; tunggal, sepasang atau dalam rantai pendek; mungkin membentuk pseudomiselium; reproduksi dengan pertunasan; terdapat klamidospora “spheris” yang mengandung granula refraktil; koloni berwarna oranye-merah atau merah muda-salmon karena adanya sintesis pigmen karotenoid, umumnya astaxanthin (3,3'-dihidroksi-4,4'-diketo- β -karoten) dan sedikit β -karoten; dapat memfermentasi glukosa dan gula yang lain (Phaff *et al.*, 1978 ; Singleton and Sainsbury, 1993).

P. rhodozyma merupakan bentuk aseksual dari khamir *Xanthophyllomyces dendrorhous*, dapat mati karena panas dan kekeringan. Komponen utama dalam sel *P. rhodozyma* adalah protein, karbohidrat dan lipid (Orstan, 2000). *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 didalam sel (intraselular) (De Boer *et al.*, 2001). Xantofil aktif disintesis selama periode peningkatan pertumbuhan dan setelah terjadi kekurangan glukosa dalam medium pertumbuhannya. Astaxanthin adalah xantofil yang paling banyak ditemukan dan diproduksi terutama selama fase eksponensial (Johnson and Lewis, 1979).

Penelitian Johnson and Lewis (1979) menunjukkan bahwa pada kultur fermentasi "batch", pertumbuhan *P. rhodozyma* dimulai setelah fase lag berlangsung selama 10 jam dan mencapai berat kering yang konstan setelah diinkubasi selama kurang lebih 80 jam. Pertumbuhan akan berhenti bersamaan dengan habisnya glukosa dari medium.

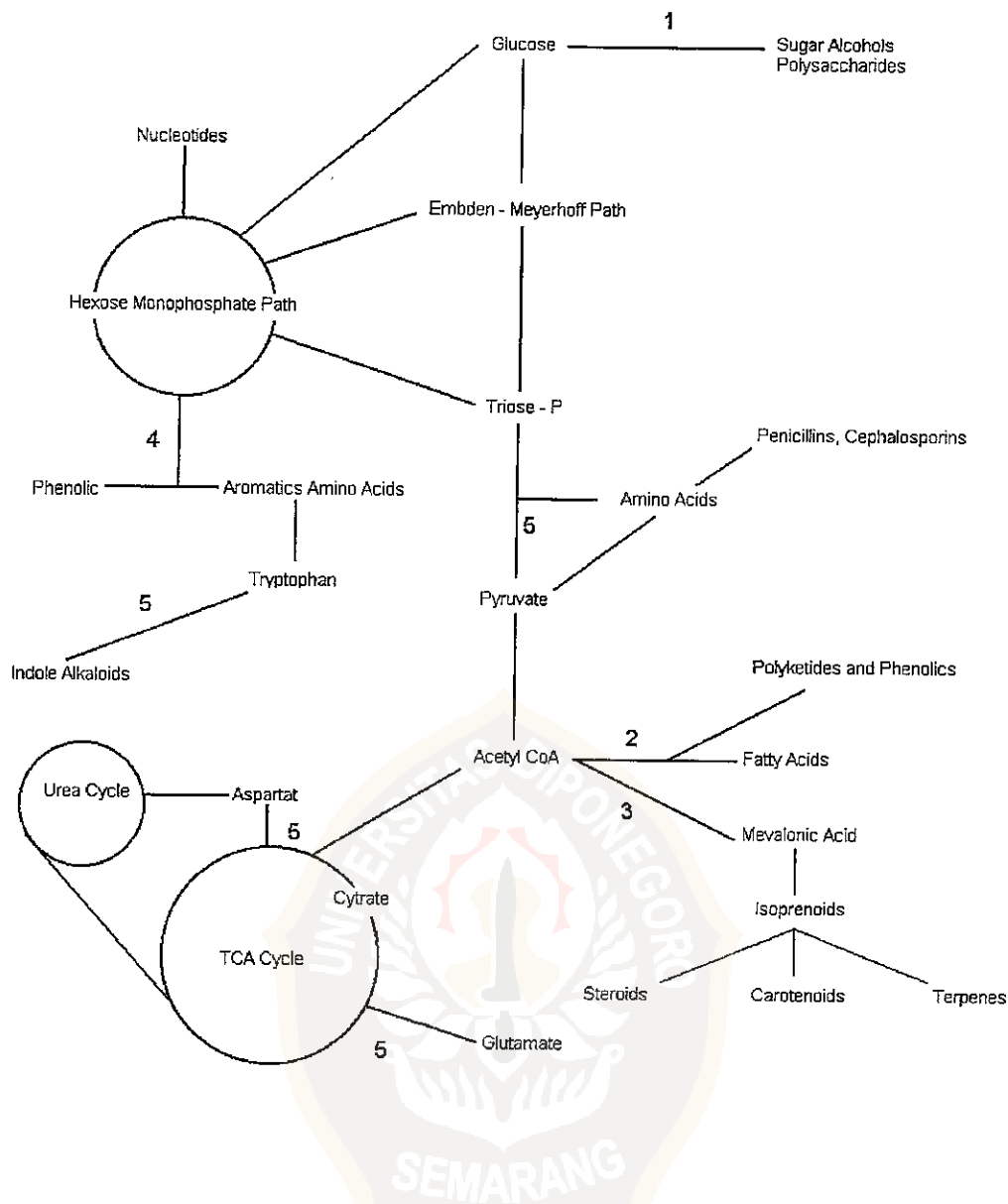
P. rhodozyma memiliki kemampuan untuk menghidrolisis urea dan memproduksi zat tepung. Khamir ini juga dapat memfermentasi gula, meskipun lemah (Kirsop and Kurtzman, 1988; Barnett *et al.*, 1990). *P. rhodozyma* merupakan satu-satunya khamir penghasil karotenoid yang mampu memfermentasi glukosa (Miller *et al.*, 1976 dalam Johnson and Lewis, 1979).

Hasil uji DBB (Diazonium Blue B) yang positif menunjukkan bahwa khamir ini termasuk ke dalam kelas Basidiomycetes (Kirsop and Kurtzman, 1988). Karakteristik *P. rhodozyma* yang lain antara lain : dinding sel terdiri atas banyak lapisan; lisis oleh endo-1,3- β -glukanase dan ekso-1,4- α -D-glukosidase; sel tersusun atas komponen glukosa, manosa, glukosamin dan xilosa; memiliki 48,3 % pasangan basa G-C pada DNA nukleusnya (Barnett *et al.*, 1990).

2.3. Karotenoid dan Astaxanthin

Karotenoid memiliki suatu kerangka yang terdiri dari 40 atom karbon (tetraterpena) tersusun dari rantai poliisoprena simetris terhadap pusat. Karotenoid memiliki sifat mengabsorpsi pada daerah tampak, karena itu senyawa ini berwarna kuning-merah. Ada tiga jenis karotenoid, yaitu : karotena yang merupakan suatu hidrokarbon; xantofil yang merupakan turunan karotena teroksigenasi, dan asam karotenat (Manitto, 1981). Pigmen karotenoid berwarna merah muda hingga kuning diproduksi oleh spesies-spesies dari genus *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Rhodospirium*, *Rhodotorula*, *Phaffia* dan beberapa spesies dari *Cryptococcus* (Phaff *et al.*, 1978).

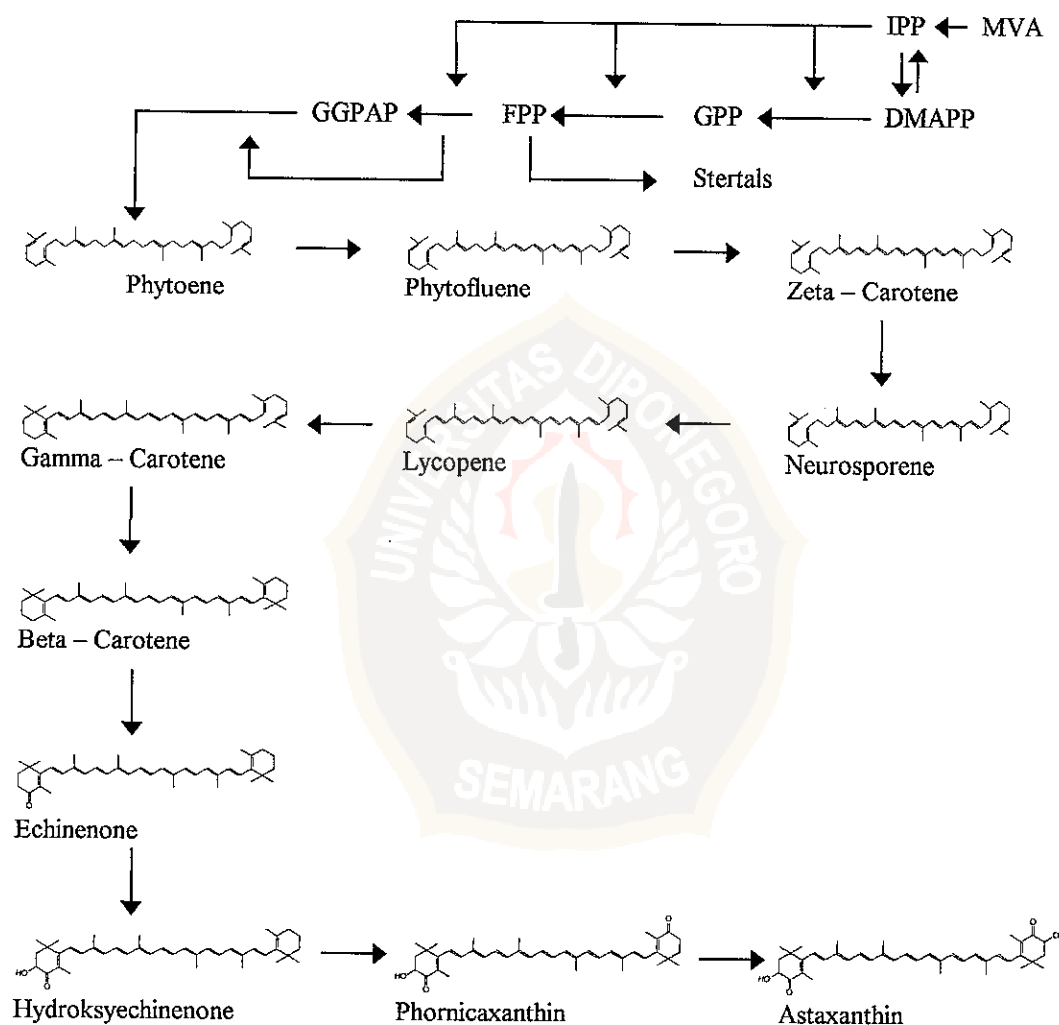
Sintesis karotenoid dimulai dari asetil ko-A, yang diubah menjadi rantai C₅ terpenoid (isopentenil pirofosfat) melalui serangkaian reaksi. Senyawa antara ini kemudian diubah menjadi komponen C₄₀. Reaksi terakhir rantai C₄₀ akan disusun kembali dan berubah menjadi karotenoid yang spesifik (Phaff *et al.*, 1978). Karotenoid disintesis melalui jalur asam mevalonat. Sintesis karotenoid tidak terlepas dari metabolisme primer, sekalipun karotenoid merupakan metabolit sekunder (Griffin, 1981). Hubungan antara metabolisme primer dengan metabolisme sekunder (sintesis karotenoid) disajikan pada gambar 01.



Gambar 01. Hubungan antara metabolisme primer dan sekunder. (1) jalur metabolit derivat glukosa; (2) jalur asetat malonat; (3) jalur asam mevalonat; (4) jalur asam shikimat; (5) jalur derivat asam amino (Griffin, 1981).

Astaxanthin adalah pigmen utama *P. rhodozyma* dan merupakan oxykarotenoid dengan rumus molekul $C_{40}H_{52}O_4$ (Kusdiyantini dkk, 2001). Pigmen ini memiliki kesamaan dengan pigmen “lobster” dan “trout” yang tidak dimiliki oleh khamir merah (“red yeast”) lain (Phaff *et al.*, 1978). *P. rhodozyma*

memproduksi astaxanthin melalui beberapa tahap. Tahap - tahap tersebut adalah : pembentukan fitoena dari geranil-geranil pirophosphat, dehidrogenasi fitoena menjadi likopen, siklisasi likopen menjadi β -karoten dan oksidasi β -karoten menjadi astaxanthin (Girard *et al.*, 1994). Tahap pembentukan astaxanthin pada *P. rhodozyma* dapat dilihat pada Gambar 02.



Gambar 02. Tahap biosintesis astaxanthin pada *P. rhodozyma* : MVA, asam mevalonat ; IPP, isopentenil pirofosfat ; DMAPP, dimetilalil pirofosfat; GPP, geranil pirofosfat; FPP, farnesil pirofosfat; GGPP, geranilgeranil pirofosfat (Girard *et al.*, 1994).

Astaxanthin selain digunakan sebagai sumber pigmen pada akuakultur juga merupakan antioksidan potensial yang mampu menunda penuaan dan penyakit degeneratif pada manusia dan hewan. (Gu *et al.*, 1997).

2.4. Derajat Keasaman (pH)

Penelitian Johnson and Lewis (1979) menunjukkan bahwa pH medium *P. rhodozyma* mempengaruhi hasil biomassa dan produksi karotenoid. Pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh pH, untuk *P. rhodozyma* pertumbuhan tertinggi terjadi pada pH 5,8. Produksi astaxanthin tertinggi dicapai pada pH 5,0, sedangkan buffer yang paling baik untuk pengaturan kisaran pH adalah sodium fosfat 0,1 M, karena menunjang pertumbuhan yang bagus dan produksi pigmen dari *P. rhodozyma*. Penggunaan buffer sitrat untuk pengaturan pH kurang baik, karena dapat menghambat pertumbuhan. Buffer laktat juga kurang sesuai, karena akan terjadi peningkatan pH medium secara lambat selama fase pertumbuhan eksponensial, yang kemungkinan terjadi karena penggunaan laktat oleh *P. rhodozyma* (Johnson and Lewis, 1979).

2.5. Air Kelapa

Air kelapa mulai diproduksi oleh kelapa yang berumur 5 bulan, dengan volume sekitar 2 gelas, merupakan cairan yang mempunyai rasa manis karena mengandung gula. Di dalam air kelapa juga terkandung 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 semakin berkurang. Air kelapa selain mengandung kalori, protein dan mineral

diperkirakan juga mengandung zat yang disebut sitokinin (mungkin bersifat hormon yang dapat mengaktifkan kegiatan jaringan atau sel-sel hidup). Jumlah air kelapa semakin berkurang sesuai dengan pertambahan umur buahnya yaitu 18 g per buah sebelum buah berdagang, 30 g per buah muda dan 8-10 g setiap buah yang sudah tua. Demikian pula warna airnya, semakin tua buahnya airnya pun semakin keruh (Suhardiman, 1994).

Komposisi air kelapa menurut Duke (1983), Anonim (1989) dan Anonim (1998) adalah sebagai berikut :

Tabel 01. Komposisi kimia air kelapa

Komponen	Duke (1983)	Anonim (1989)	Anonim (1998)
Air	95 %	95.5 %	-
Karbohidrat	4.0 %	3.8 g / 100 ml	-
Protein	0.1 %	0.1 g / 100 ml	-
Lemak	0.1 %	0.1 g / 100 ml	-
Abu	0.4 %	-	-
Energi	-	17 kal / 100 ml	-
Gula	-	-	5 mg / 100 ml
Potassium	312 mg / 100 g	-	294 mg / 100 ml
Sodium	105 mg / 100 g	-	25 mg / 100 ml
Klorida	-	-	118 mg / 100 ml
Magnesium	30 mg / 100 g	-	10 mg / 100 ml
Kalsium	29 mg / 100 g	15 mg / 100 ml	-
Besi	0.1 mg / 100 g	0.2 mg / 100 ml	-
Tembaga	0.04 mg / 100 g	-	-
Fosfor	37 mg / 100 g	8 mg / 100 ml	-
Sulfur	24 mg / 100 g	-	-
Kolin	183 mg / 100 g	-	-
Vitamin C	-	1 mg / 100 ml	-

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

Tabel 02. Komposisi karbohidrat dalam air kelapa tua (Grimwood, 1979)

Komponen	Kadar
Glukosa	0.75 %
Fruktosa	0 %
Sukrosa	1.89 %

