

PRODUKSI ASTAXANTHIN OLEH KAMIR MERAH (*Phaffia Rhodozyma*) DITUMBUHKAN DALAM AIR KELAPA YANG DITAMBAH EKSTRAK KAMIR

[Astaxanthin Production by the Red Yeast (*Phaffia rhodozyma*),
Grown on Yeast Extract Added Coconut Water]

K. H. Timotius ¹⁾, Ana W. Purnomo ¹⁾, dan V. I. Meitiniarti ¹⁾

¹⁾ Universitas Kristen Satya Wacana Jl. Diponegoro 52-60 Salatiga 50711

Diterima 30 Januari 2003/Disetujui 28 Mei 2003

ABSTRACT

This experiment was conducted to evaluate the effect of yeast extract addition in fresh green coconut water medium during the batch growth and astaxanthin production of Phaffia rhodozyma MUCL 31142. The addition of yeast extract (0,025% and 0,075%) could increase the cell growth (37,12 g/l and 49,18 g/l), growth rate (0,061/hour and 0,074/hour), total production of astaxanthin (4,871 mg/l and 9,442 mg/l), specific concentration of astaxanthin (118,99 µg/g biomassa and 176,56 µg/g biomass), production rate of astaxanthin (0,042/hour and 0,088/hour), astaxanthin yield (0,236 mg/g glucose dan 0,342 mg/g glucose), and glucose consumption (19,84 g/l and 26,95 g/l).

Key words : Astaxanthin, *Phaffia rhodozyma*, coconut water

PENDAHULUAN

Phaffia rhodozyma merupakan kamir merah yang pada tahun 1976 ditemukan pertama kali oleh Miller et al., (1976 dalam Haard 1988). Menurut Andrew et al., (1976 dalam Haard 1988), *P. rhodozyma* dapat menghasilkan karotenoid astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β,β' -carotene-4,4'-dione). *P. rhodozyma* dapat digunakan sebagai sumber pewarna tambahan (*colour additive*) untuk daging ikan salmon (Jensen,2000) dan kuning telur hewan unggas (Akiba et al., 2000). Selain itu astaxanthin juga bermanfaat sebagai antioksidan (VisionWorks, 2001).

Untuk kepentingan ekonomi, produksi biomassa *P. rhodozyma* dibutuhkan dalam jumlah yang besar. Salah satu faktor penting dalam produksi biomassa adalah penggunaan medium pertumbuhan yang mudah didapat, murah, dan dapat mendukung produksi biomassa *P. rhodozyma*. Oleh sebab itu perlu adanya penemuan sumber media baru untuk *P. rhodozyma* supaya membentuk pigmen yang lebih banyak (Martin et al., 1993). Komponen-komponen dasar yang dibutuhkan sebagai bahan nutrisi bagi kamir adalah air, sumber karbon dan nitrogen, elemen-elemen yang dibutuhkan dalam jumlah kecil (*trace element*), vitamin dan bahan-bahan untuk pertumbuhan, dan elemen-elemen penting untuk membentuk sel (Kockova-Kratochvilova,1990). Komponen-komponen tersebut bisa didapatkan dalam medium air kelapa.

Kelapa hijau (*Cocos nucifera* Linn) merupakan salah satu jenis tanaman yang mudah didapat. Air kelapa

hijau yang masih muda dapat digunakan sebagai medium pertumbuhan *P. rhodozyma*. Kandungan gulanya tinggi dan akan menurun setelah buah kelapa masak. Air kelapa merupakan substrat yang baik untuk pertumbuhan kapang dan organisme lain. Van Overbeek et al., (1941 dalam Child,1964) menunjukkan bahwa air kelapa mengandung faktor esensial untuk pertumbuhan dan pembentukan organisme.

Untuk meningkatkan produksi astaxanthin, digunakan ekstrak kamir yang ditambahkan ke dalam medium air kelapa. Menurut An et al., (1996b), ekstrak kamir dapat digunakan untuk pemeliharaan *P. rhodozyma*. Dalam penelitiannya digunakan 0-1% ekstrak kamir ditambah 1-3% glukosa sehingga dapat dicapai pertumbuhan dan produksi astaxanthin yang optimal. Ekstrak kamir sering digunakan sebagai salah satu komponen dalam medium pertumbuhan mikroorganisme karena kaya akan asam amino (Singleton dan Sainsbury,1989). Asam amino yang terdapat dalam ekstrak kamir dapat digunakan sebagai sumber C dan N yang baik untuk pertumbuhan dan produksi astaxanthin *P. rhodozyma* (Kockova-Kratochvilova,1990).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan ekstrak kamir terhadap pertumbuhan dan produksi astaxanthin *Phaffia rhodozyma* MUCL 31142 dalam medium air kelapa hijau dari buah yang masih muda.

METODOLOGI

Bahan

Mikroba yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Phaffia rhodozyma* MUCL 31142, diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi, Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga. Medium yang digunakan untuk pemeliharaan *P. rhodozyma* adalah *Potato Dextrose Agar* (PDA). Sedangkan medium yang dipergunakan untuk pertumbuhan adalah air kelapa hijau dari buah yang masih muda dengan penambahan ekstrak kamir (*yeast extract*).

Pembuatan inokulum

Inokulum dibuat dengan menginokulasikan satu ose biak *P. rhodozyma* ke 100 ml air kelapa hijau muda segar yang telah ditambah ekstrak kamir 0,0250 dan 0,075% atau tanpa ekstrak (kontrol) serta disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit. Pertumbuhan dilakukan pada pH 4,5, dan telah diaerasi dengan menggunakan aerator dan diinkubasi pada suhu ruang selama 48-72 jam.

Pertumbuhan curah

Inokulum sebanyak 100 ml yang sudah berwarna merah diinokulasikan ke 900 ml medium air kelapa hijau muda segar steril yang mengandung ekstrak kamir 0,025%, 0,075% atau tanpa ekstrak (kontrol). Medium yang digunakan dikondisikan pada pH awal 4,5. Pertumbuhan dilakukan pada suhu ruang, diaerasi dengan aerator, dan dihomogenisasi dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Pengambilan sampel dilakukan tiap selang waktu 8 jam sampai terjadi fase stasioner, dan dimulai saat inokulum (100 ml) dimasukkan ke dalam medium pertumbuhan (900 ml) sebagai t_0 .

Analisis sampel

Parameter yang diukur pada setiap pengambilan sampel adalah pengukuran jumlah sel, konsentrasi gula pereduksi dan konsentrasi astaxanthin.

Pengukuran jumlah sel (Ingraham et al., 1993)

Pengukuran jumlah sel dilakukan dengan mengukur kerapatan optis sampel dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 474 nm. Nilai absorbansi sampel yang dibaca pada panjang gelombang 474 nm selama pertumbuhan, dikonversikan ke persamaan linearitas kurva standar berat kering sel OD.

Pengukuran konsentrasi gula pereduksi (James, 1995)

Dari hasil pengenceran sampel sebesar 60x diambil 0,5 ml kemudian ditambah 0,5 ml reagen 3,5 Dinitrosalisilat Acid (DNSA) dan ditambah 1 ml akuades kemudian

dihomogenisasi. Selanjutnya dipanaskan dalam pemanas air selama 5 menit pada suhu 100°C, setelah itu didinginkan dan ditambah 8 ml akuades. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Konsentrasi glukosa (gula pereduksi) dalam sampel ditentukan dengan mengkonversikan OD sampel pada kurva standar glukosa.

Pengukuran konsentrasi astaxanthin (Schroeder and Johnson, 1993).

Sampel sebanyak 5 ml disentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, dan pelet dicuci dengan 5 ml akuades sebanyak 2 kali. Kemudian pelet dicuci dengan 5 ml aseton dan divortex agar homogen, setelah itu disentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Pelet dikeringanginkan, kemudian ditambah dengan *glass beads* berdiameter $\pm 0,5$ mm ($\pm 0,25$ g) dan 2,5 ml DMSO (dimethyl sulfoxide) yang telah dipanaskan pada suhu 55°C. Selanjutnya ditambah 2,5 ml aseton, 2,5 ml petroleum eter dan 2,5 ml NaCl 20%. Disentrifus selama 2 menit dan didapatkan 3 fase, fase paling atas (fase petroleum eter) diambil dengan pipet tetes dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 474 nm. Konsentrasi astaxanthin dihitung berdasar hukum Lambert-Beer : $A_{474} = \epsilon \cdot d \cdot c$ (Sedmak et al., 1990).

Analisis data

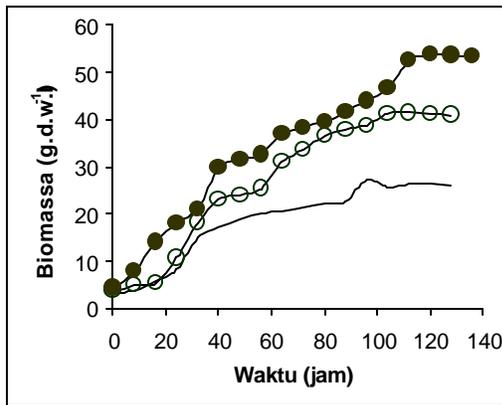
Analisis data dilakukan untuk mengetahui : pertambahan biomassa, yang dihitung dengan mengurangi biomassa akhir dengan biomassa awal. Kecepatan pertumbuhan, dihitung dari data peningkatan biomassa selama fase logaritmik. Kecepatan produksi astaxanthin, dihitung dari data produksi total astaxanthin selama fase logaritmik. Produksi total astaxanthin, dihitung dari konsentrasi akhir astaxanthin dikurangi dengan konsentrasi awal. Konsentrasi spesifik astaxanthin, dihitung dari jumlah total astaxanthin per satuan berat (g biomassa). Konsumsi glukosa, dihitung dengan cara mengurangi konsentrasi glukosa awal dengan konsentrasi glukosa akhir. Bati (*yield*) biomassa, dihitung dengan cara membagi pertambahan biomassa dengan banyaknya glukosa yang dikonsumsi. Bati *yield* astaxanthin, dihitung dengan cara membagi besarnya produksi total astaxanthin dengan banyaknya glukosa yang dikonsumsi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh penambahan ekstrak kamir terhadap pertumbuhan *P. rhodozyma*.

Pertumbuhan *P. rhodozyma* pada medium air kelapa hijau muda dipengaruhi oleh penambahan ekstrak kamir. Ekstrak khamir dapat meningkatkan produksi

biomassa *P. rhodozyma* (Gambar 1). Makin banyak ekstrak kamir ditambahkan, makin banyak pembentukan biomasanya. Pembentukan biomassa paling banyak terdapat pada penambahan ekstrak kamir 0,075% (pertambahan biomassa 49,18 g/l) setelah itu pertumbuhan pada penambahan ekstrak kamir 0,025% (pertambahan biomassa 37,12 g/l) dibandingkan perlakuan tanpa penambahan ekstrak kamir (pertambahan biomassa 23,23 g/l). Penambahan ekstrak kamir, juga meningkatkan laju pertumbuhan spesifik (μ) *P. rhodozyma* (Tabel 1).

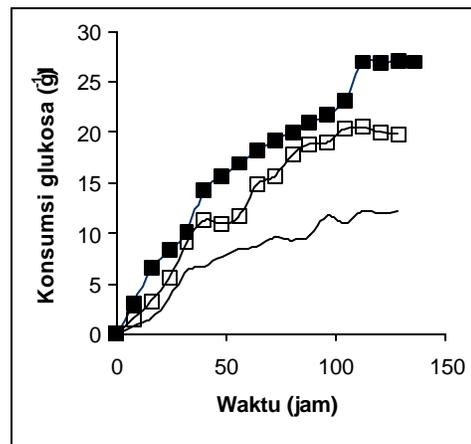


Gambar 1. Pertambahan biomassa *P. rhodozyma* dalam medium air kelapa hijau muda dengan penambahan ekstrak kamir (—○— 0%, —□— 0,025%, —●— 0,075%)
* Catatan : g.d.w : gram " dry weight "

Tabel 1. Laju pertumbuhan *P. rhodozyma* pada medium air kelapa

Sumber karbon dan nitrogen	Laju pertumbuhan (h ⁻¹)	Suhu (°C)
Air kelapa muda	0,056	Ruang
Air kelapa muda + YE 0,025%	0,061	Ruang
Air kelapa muda + YE 0,075%	0,074	Ruang

Konsumsi total glukosa oleh *P. rhodozyma* juga meningkat karena penambahan ekstrak kamir 0,025% atau 0,075% (Gambar 2). Peningkatan konsumsi glukosa tersebut selaras dengan peningkatan jumlah biomassa. Penambahan ekstrak kamir tidak mengubah efisiensi penggunaan per gram glukosa. Dilihat dari hasil bati biomassa (Tabel 2) dengan hasil 1,91 g/g glukosa pada medium tanpa penambahan ekstrak kamir, 1,88 g/g glukosa dengan penambahan ekstrak kamir 0,025% dan 1,83 g/g glukosa pada penambahan ekstrak kamir 0,075%, menunjukkan bahwa per gram glukosa yang dikonsumsi akan dihasilkan biomassa dalam jumlah yang sama.



Gambar 2. Konsumsi total glukosa oleh *P. rhodozyma* pada medium air kelapa hijau muda dengan penambahan ekstrak kamir (—○— 0%, —□— 0,025%, —■— 0,075%)

Tabel 2. Perbandingan pertambahan biomassa dan bati biomassa *P. rhodozyma* MUCL 31142, *Phaffia* strain NCHU-FS501 dan NCHU-FS301

Sumber karbon dan nitrogen	<i>Phaffia</i> strain	Pertambahan Biomassa (g/l)	Bati biomassa (x/s) g/g glukosa	Suhu (°C)	Pustaka
Air kelapa muda	MUCL 31142	23,23	1,91	Ruang	Penelitian ini
Air kelapa muda + YE 0,025%	MUCL 31142	37,12	1,88	Ruang	
Air kelapa muda + YE 0,075%	MUCL 31142	49,18	1,83	Ruang	
Air kelapa muda	MUCL 31142	16,65	2,57	30	Wulansari,2001
Air kelapa muda	MUCL 31142	12,57	2,03	20	
Glukosa (10g/l)	NCHU-FS501	6,43	0,68	22,5	Fang and Chiou,1996
Mollase (10g/l)	NCHU-FS301	3,82	0,34	15	Fang and Cheng,1993

* Catatan : x : biomassa (g) ; s : glukosa (g)
YE : Yeast Extract

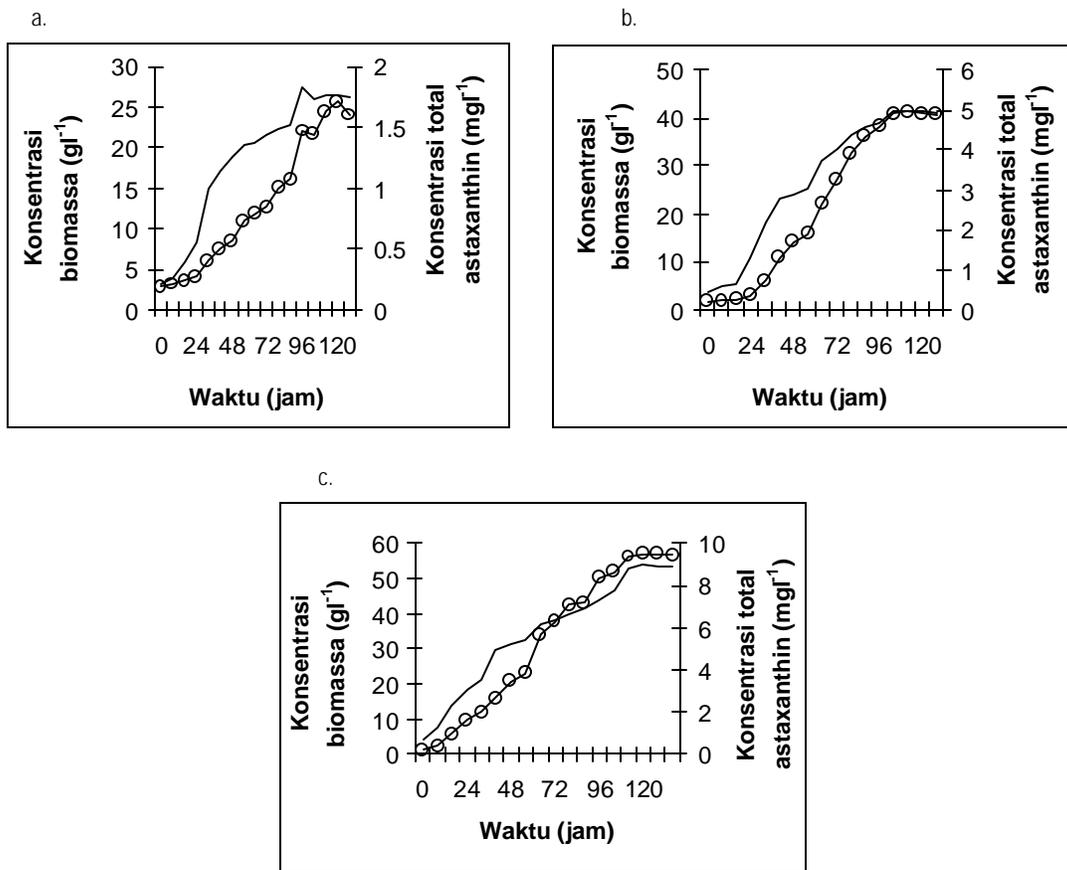
Pengaruh penambahan ekstrak kamir terhadap produksi astaxanthin oleh *P. rhodozyma*

Produksi astaxanthin dianalisis berdasarkan konsentrasi total astaxanthin (mg/l) atau konsentrasi spesifik astaxanthin (μg astaxanthin/ gram berat kering *Phaffia*). Data konsentrasi total astaxanthin selama pertumbuhan dapat dilihat pada Gambar 3a, b dan c. Konsentrasi total astaxanthin terbesar terdapat pada medium dengan penambahan ekstrak kamir 0,075% yaitu sebesar 9,442 mg/l, kemudian diikuti pada penambahan ekstrak kamir 0,025% sebesar 4,871 mg/l, setelah itu pada medium tanpa penambahan ekstrak kamir yaitu sebesar 1,600 mg/l. Peningkatan konsentrasi total astaxanthin selaras dengan peningkatan jumlah biomassa. Ekstrak kamir yang ditambahkan dapat dipakai untuk meningkatkan jumlah biomassa. Jumlah biomassa yang meningkat akan menyebabkan konsentrasi total astaxanthin juga meningkat. Penambahan ekstrak kamir ke dalam medium air kelapa juga dapat meningkatkan laju produksi astaxanthin sebesar 0,025 /jam pada kontrol, 0,042 /jam

pada penambahan ekstrak kamir 0,025% dan 0,088 /jam pada penambahan ekstrak kamir 0,075%.

Penambahan ekstrak kamir dapat meningkatkan konsentrasi spesifik astaxanthin (Tabel 3). Pada medium tanpa penambahan ekstrak kamir memiliki hasil sebesar 60,88 $\mu\text{g/g}$ berat kering biomassa, dan dengan penambahan ekstrak kamir 0,025 dan 0,075% masing-masing dihasilkan 118,99 dan 176,56 $\mu\text{g/g}$ berat kering biomassa.

Penambahan ekstrak kamir dapat meningkatkan dan mempercepat pembentukan biomassa *P. rhodozyma* yang ditumbuhkan pada medium air kelapa muda. Peningkatan yang disebabkan oleh penambahan ekstrak kamir dapat dipahami karena selain fungsinya sebagai sumber faktor tumbuh juga dapat berfungsi sebagai sumber nitrogen. Menurut Fang and Cheng (1993), ekstrak kamir merupakan sumber nitrogen terbaik yang dapat mendukung pembentukan total astaxanthin dengan hasil yang tinggi.



Gambar 3. (a). Pertambahan biomassa (g/l) (—) dan konsentrasi total astaxanthin (mg/l) (—○—) *P. rhodozyma* pada medium air kelapa hijau muda tanpa penambahan ekstrak kamir, (b) dengan penambahan ekstrak kamir 0,025% dan (c) 0,075%

Tabel 3. Perbandingan konsentrasi total astaxanthin, konsentrasi spesifik astaxanthin dan bati astaxanthin pada *P.rhodozyma*MUCL 31142, *Phaffia* strain NCHU-FS501 dan NCHU-FS301

Sumber karbon dan nitrogen	<i>Phaffia</i> strain	Konsentrasi total astaxanthin (mg/l)	Konsentrasi Spesifik Astaxanthin (µg/g)	Bati astaxanthin (p/s) mg/g glukosa	Pustaka
Air kelapa muda (ruang)	MUCL 31142	1,600	60,88	0,166	Penelitian ini
Air kelapa muda+YE 0,025% (ruang)	MUCL 31142	4,871	118,99	0,236	
Air kelapa muda+YE 0,075% (ruang)	MUCL 31142	9,442	176,56	0,342	
Air kelapa muda (20°C)	MUCL 31142	3,516	255,0	-	Wulansari,2001
Air kelapa muda (30°C)	MUCL 31142	5,473	310,0	-	
Glukosa 10g/l (22,5°C)	NCHU-FS501	6,720	1045	0,713	Fang and Chiou,1996
Mollase 10g/l (15°C)	NCHU-FS301	3,965	1039	0,353	Fang and Cheng,1993

* Catatan : YE : Yeast Extract
 p : astaxanthin (mg)
 s : glukosa (g)

Jumlah glukosa yang dapat dikonsumsi juga meningkat. Hal ini juga menunjukkan bahwa jumlah glukosa yang dapat dikonsumsi tergantung pada ketersediaan sumber nitrogen. Efisiensi penggunaan per gram glukosa tidak mengalami perubahan karena penambahan ekstrak kamir. Hal ini juga dapat dipahami karena pembentukan astaxanthin terutama ditentukan oleh sumber karbon. Dilihat dari struktur kimianya, astaxanthin tidak mengandung unsur nitrogen.

Kandungan spesifik astaxanthin juga dipengaruhi oleh ekstrak kamir. Kandungan astaxanthin per gram biomassa kamir meningkat sesuai dengan jumlah ekstrak kamir yang ditambahkan. Hal ini berarti bahwa peningkatan kandungan astaxanthin dalam suatu sel tergantung pada kondisi pertumbuhannya. Jika pertumbuhannya lebih cepat atau lebih baik, maka kandungan astaxanthinnya meningkat. Sistem enzim yang diperlukan untuk pembentukan astaxanthin berfungsi lebih baik jika ditambahkan ekstrak kamir, karena adanya peningkatan sumber nitrogen yang tersedia untuk pembentukan enzim tersebut. Walaupun demikian, jika dibandingkan dengan hasil dari beberapa penelitian yang menggunakan medium pertumbuhan yang beda, pertumbuhan dan pembentukan astaxanthin pada medium air kelapa masih perlu ditingkatkan lagi.

KESIMPULAN

Penambahan ekstrak kamir (0,025 dan 0,075%) ke medium air kelapa hijau muda dapat meningkatkan pertumbuhan biomassa (37,12 dan 49,18 g/l), kecepatan pertumbuhan biomassa (0,061 dan 0,074/jam), produksi total astaxanthin (4,871 dan 9,442 mg/l), konsentrasi spesifik astaxanthin (118,99 dan 176,56 µg/g biomassa),

kecepatan produksi astaxanthin (0,042 dan 0,088/jam), bati astaxanthin (0,236 dan 0,342 mg/g glukosa) dan konsumsi total glukosa (19,84 dan 26,95 g/l).

DAFTAR PUSTAKA

Akiba, Y., Sato, K., Takahashi, K., Takahashi, Y., Furuki, A., Konashi, S., Nishida, H., Tsunekawa, H., Hayasaka, Y. and Nagao, H. 2000. Pigmentation of egg yolk with yeast *Phaffia rhodozyma* containing high concentration of astaxanthin in laying hens fed on a low-carotenoid diet. *Poultry science*. **37** : 77-87

An, G.-H., Kim, Chul. Medium optimization for cultivation of carotenoid hyperproducing *Phaffia rhodozyma* mutant HT-5F01C. *Ferment and Bioengineer*. **82(5)** : 515-518

Child, R. 1964. Coconut. Longmans. London.

Fang, T. J. and Cheng, Yi-Shin.1993. Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. *Journal of Ferment and Bioengineer*. **75(6)** : 466-469

Fang, T. J. and Chiou, T.-Y. 1996. Batch cultivation and astaxanthin production by a mutan of the red yeast, *Phaffia rhodozyma* NCHU-FS501. *Industrial Microbiol*. **16** : 175-181

Haard, N. F. 1988. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. *Biotech Lett*. **10(9)** : 609-614

- Ingraham, J. L., Maaloe, O. and Nedhart, I. C. 1983. Growth of Bacterial Cell. Sinamer Associates. Inc. Publ. Sunderland. Massacusetts.
- James, C.S. 1995. Analytical Chemistry of Foods. Blackie Academic and Professional. London.
- Jensen, G. L. 2000. FDA approval *Phaffia* yeast as color additive in salmonid fish feed. (<http://library.kcc.hawaii.edu/praise/news/aquacon2.html>).
- Kockova-Kratochvilova, A. 1990. Yeast and Yeast-like Organism. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Martin, A. M., Acheampong, E. and Patel, T. R. 1993. Production of astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* using peat hydrolysates as substrate. Chem Tech Biotech. 58 : 223-230
- Schroeder. W. A. and Johnson, E. A. 1993. Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. Gen Microbiol. 139 : 907-912
- Sedmak, J. J., Weerasinghe, D. K. and Jolly, S. O. 1990. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. Biotech Tech. 4 : 107-112
- Singleton, P. and Sainsbury, D. 1989. Dictionary of Microbiology and Molecular Biology. John Wiley and Sons. New York.
- VisionWorks, Inc. 2001. A new product : astaxanthin. (<http://www.visionworksusa.com/astaxanthin.asp>)
- Wulansari, I. 2001. Pengaruh suhu terhadap pertumbuhan dan pembentukan astaxanthin *Phaffia rhodozyma* MUCL 31142 pada air kelapa sebagai substrat pertumbuhan dengan sistem curah. Skripsi. Fakultas Biologi Universitas Kristen Satya Wacana. Salatiga.