Produksi Pigmen Karotenoid oleh Khamir *Phaffia rhodozyma* yang Diperlakukan dengan Radiasi Sinar UV

Sri Pujiyanto, Wijanarka, Endang Kusdiyantini, dan T.A. Lestari

Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, UNDIP, Kampus UNDIP Tembalang Semarang 50275
Telp/Fax (024) 7499494 Email: spujiyanto@hotmail.com

Diterima Juli 2005 disetujui untuk diterbitkan Mei 2006

Abstract

Carotenoid pigment is an essential element in aquaculture, since it gives characteristic of color on shrimp and fish. Carotenoid pigments can be produced microbiologically using Paffia rhodozyma*. Genetic improvement of the yeast, one of which can be accomplished by radiation mutation, will increase the production of carotenoid pigments. The aims of this study were to mutate* P. rhodozyma *using UV irradiation and to figure out pigment production by the mutant strains resulting from 30 minute-irradiation. Irradiated culture was incubated in dark condition and plated onto YMA media. Grown mutant colonies were collected in order to test for their pigment production. Pigment production was measured on the basis of extinction coefficient of 1%. The results showed that mutant strain encoded with MUV-1 produced the highest pigment at 179.96 μg/g dry weight cell, higher than the wild type (63.20 μg/g dry weight cell).*

Keyword: *carotenoid,* Paffia rhodozyma *pigment, radiation, mutation*

Pendahuluan

Pigmen karotenoid memegang peranan sangat penting dalam akuakultur untuk mendapatkan warna yang diinginkan pada hewan budidaya seperti udang dan ikan hias. Warna merah oranye pada udang akan memberikan daya tarik bagi konsumen. Penggunaan pigmen karotenoid pada sektor akuakultur telah mengalami kemajuan yang pesat. Salah satu cara untuk memenuhi permintaan pigmen yang makin tinggi tersebut adalah dengan mengembangkan kultur khamir *Paffia rhodozyma* untuk memproduksi karotenoid, terutama astaksantin. Pigmen ini penting bagi beberapa jenis ikan yang tidak mampu menyintesis β karotenoid *de novo.*

Penelitian tentang optimalisasi produksi karotenoid oleh *P. rhodozyma* hingga saat ini masih jarang dilakukan. Berbagai strategi untuk meningkatkan produksi pigmen dari khamir tersebut antara lain dilakukan dengan memperbaiki teknik fermentasi, modifikasi media, atau pun metode perbaikan genetiknya. Kusdiyantini *et al.* (2001) telah mengkaji optimasi produksi karotenoid oleh *P. rhodozyma* dengan menitikberatkan perlakuan pada berbagai tipe fermentasi serta sumber karbon yang digunakan. Dengan optimasi tersebut, hanya diperoleh produksi pigmen tertinggi sebesar 205 μg/g berat kering. Produksi ini masih jauh dari produksi maksimal yang diharapkan dari *P. rhodozyma*, yaitu 3.000 μg/g berat kering. Oleh karena itu, menurut Johnson dan Schroeder (1996), pendekatan genetika perlu dilakukan untuk meningkatkan produksi pigmen karotenoid.

Pendekatan genetika yang dimaksud adalah menciptakan mutan *P. rhodozyma* yang memiliki kemampuan produksi pigmen yang lebih tinggi, misalnya dengan radiasi. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan mutasi terhadap *P. rhodozyma* dengan radiasi sinar UV agar diperoleh mutan dengan produksi pigmen karotenoid yang lebih tinggi.

Materi dan metode

Khamir *P. rhodozyma* diperoleh dari *Belgian Co-ordinated Collections of Microorganism* (BCCM), kemudian ditumbuhkan dan disimpan dalam media *Yeast Malt Agar* (YMA) dengan komposisi (g/l) glukosa 10, peptone 5, *yeast extract* 3, dan agar 20. Temperatur penyimpanan yang digunakan adalah 4°C. Medium prekultur dan kultur berupa medium YM tanpa agar pada pH 6 dengan suhu ruang. Prekultur ditumbuhkan pada erlenmeyer 250 ml di atas *rotary shaker* dengan kecepatan 180 rpm selama 24 jam. Sebanyak 5% (v/v) prekultur digunakan sebagai *starter* (Kusdiyantini *et al*., 2001).

Radiasi dengan sinar UV terhadap sel yang telah ditumbuhkan pada media YM dilakukan setelah kultur mencapai kerapatan optik 0,4 pada panjang gelombang 660 nm. Secara aseptik sel-sel khamir dipindahkan ke cawan petri dan dilakukan penyinaran dengan lampu UV (220-280 nm) dan dibiarkan selama 30 menit hingga lebih dari 95% koloni terbunuh. Sel-sel khamir kemudian ditumbuhkan selama 18 jam dalam kondisi gelap kemudian dicawankan pada media YMA (An *et al*., 1989).

Seleksi mutan hasil radiasi dilakukan secara kualitatif dengan melihat penampakan warna koloni setelah pencawanan selama 18 jam. Dua koloni yang dipilih menunjukkan warna merah paling kuat. Koloni-koloni ini selanjutnya diremajakan pada media YM untuk dipelajari lebih lanjut.

Produksi pigmen dilakukan pada media YM pH 6 yang telah disterilkan dengan autoklaf pada 115°C dan 1 atm selama 20 menit. Sebanyak 100 ml medium diinokulasi dengan 5% v/v *starter* pada kepadatan 10^7 - 10^8 sel/ml. Setiap biakan diinkubasi pada *rotary shaker* dengan kecepatan 180 rpm (Kusdiyantini *et al*., 2001) selama 120 jam. Pengukuran pertumbuhan dan produksi pigmen dilakukan setiap 12 jam inkubasi.

Pengukuran pertumbuhan khamir *P. rhodozyma* dilakukan secara gravimetri. Sebanyak 1,0 ml kultur dimasukkan ke dalam tabung eppendorf yang telah diketahui berat keringnya. Kultur kemudian disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 4.500 rpm (Vasquez *et al*., 1998). Pelet yang diperoleh dikeringkan dengan oven pada suhu 80°C hingga beratnya konstan. Berat akhir dikurangi dengan berat tabung merupakan berat kering sel khamir.

Produksi total pigmen diekstraksi dengan metode Sedmak *et al*. (1990). Sebanyak 2,0 ml kultur disentrifugasi dalam tabung eppendorf selama 10 menit pada kecepatan 4.500 rpm dan dicuci sekali dengan akuades. Pelet yang diperoleh ditambah dengan 1,0 ml 0,1 M sodium fosfat pH 7 dan 1,0 ml *dimethyl sulphoxide* (DMSO) yang telah dipanaskan pada suhu 55°C. Campuran dikocok selama 15 menit, kemudian ditambah dengan 2,0 ml pelarut organik *(diethyl ether)*, dikocok kembali lalu disentrifugasi. Dua fase yang diperoleh dipisahkan; pigmen terdapat pada bagian atas larutan. Pigmen dipisahkan dari pelarut organik dengan cara evaporasi. Setelah kering, pelarut organik (metanol) ditambah dengan volume yang diketahui, bergantung kepada jumlah pigmen yang dihasilkan. Pigmen total ditentukan dengan koefisien ekstinsi (*extinction coefficient*) 1% ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ =1600) menurut An *et al*.(1989) dengan formulasi sebagai berikut:

$$X = \frac{(V).(A - 480)}{(E_{1\text{cm}}^{1\%})(100)(P)} \times 10^6$$

Keterangan:

X : pigmen total yang dihasilkan (μg/ml)
V : volume larutan pigmen (ml)
A-480 : kerapatan optik pada λ 480 nm
$E_{1\text{cm}}^{1\%}$: koefisien ekstinsi 1% =1600
P : berat kering sel (g/ml)

Hasil dan pembahasan

Hasil radiasi terhadap kultur *P. rhodozyma* dapat diamati setelah kultur ditumbuhkan pada media YMA. Pengamatan secara visual terhadap koloni-koloni yang tumbuh sebagai hasil radiasi menunjukkan adanya variasi koloni. Variasi koloni mutan ini meliputi variasi bentuk, warna, dan ukuran. Variasi koloni ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Variasi koloni *Phaffia rhodozyma* hasil radiasi UV
Table 1. Colony variation of *Phaffa rhodozyma* irradiated by UV

Warna dan tekstur	Ukuran
Merah tua, kasar	Besar dan kecil
Merah tua, halus	Besar dan kecil
Merah, kasar	Besar dan kecil
Merah, halus	Besar dan kecil
Oranye, kasar	Besar dan kecil
Oranye, halus	Besar dan kecil
Kuning, halus	Kecil
Putih halus	Kecil

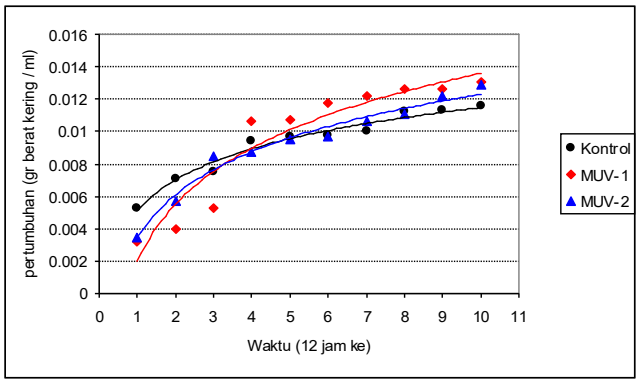
Variasi fenotipe yang diperlihatkan oleh mutan hasil radiasi menunjukkan adanya variasi genetik pada mutan-mutan tersebut. Radiasi sinar UV yang secara langsung mengenai sel *P. rhodozyma* dapat menyebabkan perubahan pada DNA. Perubahan ini dapat mempengaruhi sintesis protein, terutama enzim yang digunakan pada metabolisme. Dengan demikian, perubahan pada DNA akibat radiasi akan berpengaruh terhadap metabolisme sel-sel tersebut sehingga dihasilkan berbagai fenotipe mutan.

Hal tersebut sesuai dengan pendapat Crueger dan Crueger (1984) yang menyatakan bahwa sinar UV yang terserap oleh DNA dapat menyebabkan terbentuknya dimer dan menginduksi berbagai macam mutasi. Antara mutan yang satu dan mutan lainnya dapat terjadi jenis mutasi yang berbeda-beda. Mutasi yang tidak terjadi secara seragam pada sel-sel tersebut menyebabkan adanya variasi genetik di antara mutan-mutan yang tumbuh.

Variasi genetik juga dapat disebabkan oleh perbedaan sistem perbaikan yang dikembangkan oleh tiap sel yang telah diradiasi. Sel memiliki berbagai mekanisme untuk memperbaiki DNA yang rusak akibat radiasi. Untuk mencegah fotoreaktivasi, maka setelah diradiasi, kultur sel diinkubasi di dalam kondisi gelap sebelum ditanam pada media agar. Pada kondisi gelap, sel masih memiliki mekanisme penyembuhan melalui eksisi, rekombinasi, atau respon SOS. Sel yang telah diperbaiki sifat genetiknya tersebut dapat melakukan metabolismenya kembali sehingga dapat bertahan hidup dan membentuk koloni yang dapat diamati. Sistem perbaikan yang tidak sama pada setiap sel meyebabkan adanya variasi genetik sehingga terbentuk keanekaragaman koloni.

Pada penelitian ini dipilih dua koloni mutan yang berukuran besar dan berwarna merah dengan asumsi bahwa koloni tersebut memiliki pertumbuhan yang cepat dengan produksi pigmen karotenoid yang relatif tinggi bila dibandingkan dengan koloni yang kecil dan warnanya kurang merah.

Pertumbuhan khamir pada penelitian ini ditentukan dengan menghitung berat kering sel setiap 12 jam sekali. Pertumbuhan mutan terpilih *P. rhodozyma* hasil radiasi dapat dilihat pada Gambar 1.

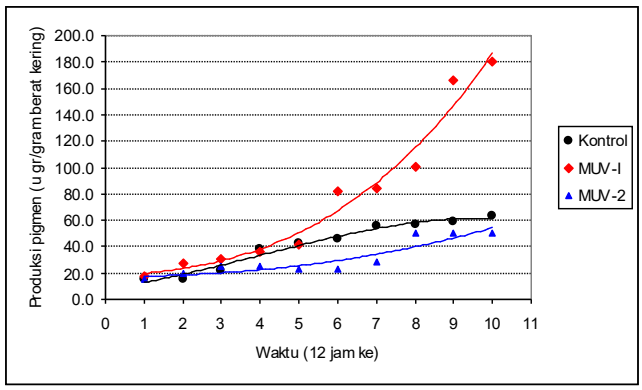


Gambar 1. Pertumbuhan mutan *Phaffia rhodozyma* hasil radiasi UV
Figure 1. Growth of *Phaffa rhodozyma* mutants resulting from UV irradiation

Dari kurva pertumbuhan pada Gambar 1 dapat dilihat bahwa semua mutan terpilih hasil radiasi memiliki pertumbuhan yang cepat. Mutan MUV-1 dan MUV-2 pada waktu 4 x 12 jam pertama masih memiliki pertumbuhan yang lebih lambat daripada kontrol (tipe asli atau *wild type*). Namun, setelah itu pertumbuhannya justru lebih cepat daripada tipe asli. Secara umum fase-fase pertumbuhan kedua mutan tersebut serta tipe asli hampir sama meskipun kecepatan pertumbuhannya berbeda-beda. Pada gambar di atas tidak dijumpai adanya fase *lag* atau adaptasi, tetapi semua mutan langsung mengalami fase logaritmik. Hal ini karena sebelum dilakukan fermentasi, inokulum telah dibuat *starter* terlebih dahulu. Kecepatan pertumbuhan akan menurun begitu sumber nutrisi di dalam medium mulai berkurang.

Mutan-mutan yang diuji tersebut dipilih dari koloni-koloni mutan yang berukuran besar yang disebarkan pada medium agar. Koloni yang terbentuk merupakan hasil pertumbuhan dari satu sel. Ukuran koloni hasil radiasi memperlihatkan variasi ukuran dari kecil hingga besar. Variasi ukuran koloni menunjukkan variasi kecepatan pertumbuhan mutan-mutan tersebut. Koloni mutan yang besar memiliki pertumbuhan yang lebih cepat daripada pertumbuhan koloni mutan yang kecil. Dari koloni yang besar tersebut diharapkan akan diperoleh mutan yang memiliki pertumbuhan cepat. Untuk membuktikannya, kultur ditumbuhkan pada medium cair.

Produksi pigmen karotenoid dari mutan terpilih hasil radiasi dengan sinar UV disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Produksi pigmen *Phaffia rhodozyma* hasil radiasi UV
Figure 2. Pigment production of *Phaffa rhodozyma* irradiated by UV

Dari kurva produksi pigmen karotenoid di atas dapat dilihat adanya perbedaan produksi pigmen karotenoid antara mutan hasil radiasi dan tipe asli (kontrol). Mutan-mutan yang diuji produksinya tersebut dipilih dari koloni berwarna paling merah yang diasumsikan memiliki produksi pigmen lebih tinggi daripada tipe aslinya. Namun, dari semua mutan yang diuji hanya mutan dengan kode MUV-1 yang memiliki produksi pigmen lebih tinggi daripada tipe asli. Mutan MUV-2 memiliki kemampuan produksi karotenoid lebih rendah daripada tipe asli.

Perbedaan kemampuan produksi pigmen tersebut bergantung kepada sifat genetik yang dimiliki oleh masing-masing sel mutan. Adanya variasi genetik akan mempengaruhi kemampuan sel dalam metabolisme. Biosintesis karotenoid terjadi melalui jalur yang panjang dengan bantuan berbagai macam enzim. Perubahan genetik akibat radiasi dapat mempengaruhi enzim yang dibentuk. Apabila gen untuk sintesis salah satu enzim hilang atau rusak, maka dapat terjadi akumulasi senyawa antara sehingga tidak terbentuk karotenoid (Verdoes, 1997).

Menurut Crueger dan Crueger (1984), model aksi molekuler beberapa mutagen telah diketahui dengan baik. Namun, efek mutagen pada gen spesifik yang dikehendaki atau efek mutasi pada proses kompleks seperti biosintesis metabolit sekunder tidak pernah dapat diprediksi. Hal yang dapat dilakukan untuk mendapatkan mutan yang diinginkan adalah dengan melakukan seleksi sel mutan dari seluruh populasi yang dihasilkan. Pigmen karotenoid, terutama astaksantin, berwarna merah sehingga koloni yang berwarna merah dianggap dapat mewakili kemampuan produksi pigmen yang lebih tinggi daripada mutan yang berwarna oranye, kuning, atau putih.

Dari Gambar 1 dan 2 di atas dapat dilihat bahwa produksi pigmen mengikuti pola *non growth associated*. Pada saat kecepatan pertumbuhan tinggi kecepatan pembentukan pigmennya rendah. Sebaliknya, saat kecepatan pertumbuhannya mulai menurun, kecepatan pembentukan pigmennya naik. Menurut Johnson dan Lewis (1979), pigmen karotenoid dari *P. rhodozyma*, terutama astaksantin, diproduksi pada fase eksponensial dan saat kekurangan nutrisi. Pada awal fermentasi, pigmen sudah mulai diproduksi. Di samping membentuk biomassa, sel khamir juga membentuk pigmen. Pada masa akhir inkubasi (saat kekurangan nutrisi), produksi pigmennya meningkat karena sel melakukan perubahan aktivitas dari metabolisme primer ke metabolisme sekunder. Di dalam sel terjadi perombakan metabolit primer untuk membentuk metabolit sekunder, khususnya pigmen karotenoid, sehingga pada akhir fermentasi produksi pigmennya meningkat (Johnson dan An, 1979). Dari semua mutan terpilih yang diuji, produksi pigmen karotenoid tertinggi dicapai oleh mutan MUV-1, yaitu sebesar 179,96 μg/g berat kering sel, lebih tinggi daripada produksi karotenoid oleh tipe asli, yaitu hanya 63,20 μg/g berat kering sel pada medium yang sama.

Kesimpulan

Berdasarkan atas hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa radiasi sinar UV dapat digunakan untuk menciptakan mutan *P. rhodozyma*. Pada penelitian ini diperoleh satu mutan *P. rhodozyma* hasil radiasi sinar UV yang dapat menghasilkan pigmen karotenoid lebih tinggi daripada produksi karotenoid oleh tipe aslinya.

Saran

Pengujian mutan hasil radiasi lebih banyak perlu dilakukan untuk mendapatkan strain mutan yang memiliki produksi karotenoid lebih tinggi lagi. Di samping itu, perlu dipelajari kestabilan MUV-1 dalam memproduksi pigmen karotenoid.

Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, yang telah memberikan dukungan dana bagi terlaksananya penelitian ini.

Daftar Pustaka

An G.H., D.B. Schuman, and E.A. Johnson. 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutans with increased astaxanthin content. Appl. Envinron. Microbiol. 55: 116-124.

Crueger, W. and A. Crueger. 1984. Biotechnology: a Text Book of Industrial Microbiology. Science Tech. USA.

Johnson, E.A. and M.J. Lewis. 1979. Astaxanthin formation by yeast *Phaffia rhodozyma*. Gen. Microbiol. 115: 173-183.

_____ and W.A. Schroeder, 1996. Microbial Carotenoids. Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology. Fiechter (ed). 141-145.

_____ and G.H. An. 1979. Astaxanthin formation by the yeast *Paffia rhodozyma*. J. General Microbiol. 115: 173-183.

Kusdiyantini, E., Wijanarka, dan M. Zainuri. 2001. Paket teknologi biosintesis karotenoid pada *Paffia rhodozyma* dalam upaya diversifikasi pakan buatan pada sektor akuakultur. Lap. Pen. DCRG-URGE.

Sedmak, J.J., D.K. Weerasingle, and S.O. Jolly. 1990. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. J. Biotechnol. 2: 107-112.

Vasquez, M., V. Santos, and J.C. Parajo, 1998. Fed batch cultures of *P. rhodozyma* in xilose-containing media from wood hydrolisates. Food Biotechnol. 12: 43-55.

Verdoes J. 1997. Molecular genetics of carotenoid biosynthesis in yeast: improved production of natural pigments. Gene 184: 89-97.