



SKRIPSI

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI ZAT WARNA β -
KAROTEN PADA RAGI *Rhodotorula graminis*
NBRC 0190**

**DEWI FATIMAH TRI ARY MURTI
NRP. 1411 100 130**

**Dosen Pembimbing
Drs. Refdinal Nawfa, MS**

**Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya
2016**



SCRIPT

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF β -
CAROTENE IN YEAST: *Rhodotorula graminis*
NBRC 0190**

**DEWI FATIMAH TRI ARY MURTI
NRP. 1411 100 130**

**Lecturer Advisor
Drs. Refdinal Nawfa, MS**

**DEPARTMENT OF CHEMISTRY
Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya
2016**

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI ZAT WARNA β -
KAROTEN PADA RAGI *Rhodotorula graminis* NBRC
0190**

SKRIPSI

Disusun untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Sarjana Program Studi S-1
Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya

Disusun oleh :

**DEWI FATIMAH TRI ARY MURTI
NRP 1411 100 130**

Dosen Pembimbing,
Drs. Refdinal Nawfa, MS

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN
ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2016**

LEMBAR PENGESAHAN

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI ZAT WARNA β -
KAROTEN PADA RAGI *Rhodotorula graminis* NBRC
0190**

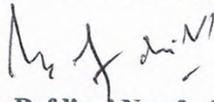
SKRIPSI

Disusun Oleh:

**DEWI FATIMAH TRI ARY MURTI
NRP 1411 100 130**

Surabaya, 3 Agustus 2016

Menyetujui,
Dosen Pembimbing,

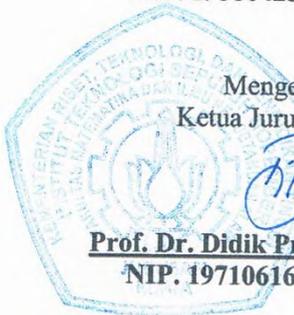


Drs. Refdinal Nawfa, MS
NIP. 19580425 198701 1 001

Mengetahui:
Ketua Jurusan Kimia



Prof. Dr. Didik Prasetyoko, M. Sc.
NIP. 19710616 199703 1 002



ISOLASI DAN IDENTIFIKASI ZAT WARNA β -KAROTEN PADA RAGI *Rhodotorula graminis* NBRC 0190

Nama : Dewi Fatimah Tri Ary Murti
NRP : 1411 100 130
Jurusan : Kimia FMIPA - ITS
Dosen Pembimbing : Drs. Refdinal Nawfa, MS

Abstrak

Pada penelitian ini telah dilakukan isolasi dan identifikasi zat warna β -karoten pada ragi *R. graminis* NBRC 0190. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kandungan zat warna β -karoten pada strain tersebut. Senyawa ini diperoleh dengan cara ekstraksi pada sel kering ragi *R. graminis* menggunakan pelarut metanol:kloroform (1:2) pada suhu 60 °C. Lipid total yang diperoleh sebanyak 0,475 g kemudian diekstraksi cair-cair menggunakan pelarut *n*-heksana:metanol (2:1) dan didapatkan lipid nonpolar atau ekstrak β -karoten sebanyak 0,1302 g. Ekstrak β -karoten ini kemudian diidentifikasi menggunakan kromatografi lapis tipis dengan pelarut kloroform 100% dan didapatkan nilai Rf sebesar 0,90. Hasil analisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan serapan pada λ_{maks} 425, 450, dan 477 nm. Hasil analisis menggunakan spektrometer FTIR menunjukkan pita serapan pada bilangan gelombang 2920, 2850, 1462, 1377, 1035 dan 960 cm^{-1} . Analisis lebih lanjut dilakukan pada ekstrak β -karoten dan β -karoten standar dengan APCI LCMS pada m/z 443,50 - 444,50. Dari kurva kalibrasi standar β -karoten, didapatkan konsentrasi β -karoten pada ekstrak adalah 0,74 $\mu\text{g/mL}$.

Kata kunci: *R. graminis*, β -karoten, ekstraksi, FTIR, APCI LCMS.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF β -CAROTENE IN YEAST: *Rhodotorula graminis* NBRC 0190

Name : Dewi Fatimah Tri Ary Murti
NRP : 1411 100 130
Department : Kimia FMIPA - ITS
Lecturer Advisor : Drs. Refdinal Nawfa, MS

Abstract

Research had been done to isolate and identify β -carotene biopigment from *Rhodotorula graminis* NBRC 0190 yeast. This study aimed to determine β -carotene content in *R. graminis* NBRC 0190 strain. This compound was isolated by extraction the lyophilized cell using methanol:chloroform (1:2) solvents at 60 °C. After that, 0,4795 g total lipids were separated by liquid-liquid extraction using *n*-hexane:methanol (2:1) solvents and obtained 0,1302 g of nonpolar lipids (β -carotene). The β -carotene extract then being identified by TLC procedure using cloroform 100% solvent and yield Rf value at 0,90. The UV-Vis absorbtion of sample were recorded at λ_{\max} 425, 450, and 477 nm. The FTIR absorbance spectrum of sample exhibited peaks at 2920, 2850, 1462, 1377, 1035 dan 960 cm^{-1} . For further analysis, sample and standart of β -carotene were analyzed with APCI LCMS at 443.50-444.50 m/z. From the calibration curve of β -carotene standart, we obtained that β -carotene concentration on sample was 0,74 $\mu\text{g/L}$.

Keywords: Extraction, *R. graminis*, β -carotene, FTIR, APCI LCMS.

DAFTAR ISI

Abstrak	v
Abstract	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Permasalahan	2
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Tinjauan <i>Rhodotorula graminis</i>	5
2.2 Tinjauan Karotenoid	9
2.3 Tinjauan β -karoten.....	13
2.4 Kultur Mikroorganisme	15
2.5 Nutrisi Pertumbuhan Mikroorganisme	18
2.6 Kurva Pertumbuhan Mikroorganisme.....	20
2.7 Ekstraksi Karotenoid.....	24
2.8 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	25
2.9 Kromatografi Cair Spektrometri Massa (KCSM/ LCMS)	28
2.10 Spektrofotometri UV-Vis.....	30
2.11 Spektroskopi Infra Red (IR).....	35
BAB III METODOLOGI PERCOBAAN	39
3.1 Alat dan Bahan.....	39
3.1.1 Alat.....	39

3.1.2	Bahan.....	39
3.2	Prosedur penelitian.....	39
3.2.1	Pembuatan Media.....	39
3.2.2	Rehidrasi Ragi <i>R. graminis</i>	40
3.2.3	Regenerasi Ragi <i>R. graminis</i>	40
3.2.4	Kurva Pertumbuhan <i>R. graminis</i>	40
3.2.5	Produksi Biomassa <i>R. graminis</i>	41
3.2.6	Pemisahan lipid total <i>R. graminis</i>	41
3.2.7	Pemisahan Lipid non polar pada <i>R. graminis</i>	41
3.2.8	Identifikasi β -karoten menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	42
3.2.9	Identifikasi Gugus Fungsi dengan Spektrofotometer FTIR	42
3.2.10	Analisis Spektrofotometer UV-Vis	42
3.2.11	Kromatografi Cair-Spektroskopi Massa (KCSM/LCMS).....	43
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	45
4.1	Rehidrasi Sel Kering <i>R. graminis</i>	45
4.2	Regenerasi <i>R. graminis</i>	46
4.3	Kurva Pertumbuhan <i>R. graminis</i>	48
4.4	Produksi Biomassa.....	50
4.5	Pemisahan Lipid Total dan β -karoten dari <i>R. graminis</i>	53
4.6	Identifikasi β -karoten menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	55
4.7	Identifikasi β -karoten menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.....	57
4.8	Karakterisasi β -karoten menggunakan FTIR	60
4.9	Identifikasi β -karoten menggunakan KCSM/LCMS ...	61
BAB V	Kesimpulan dan Saran.....	65
5.1	Kesimpulan	65
5.2	Saran	65

DAFTAR PUSTAKA.....	67
Lampiran 1 Skema Kerja.....	75
Lampiran 2 Data dan Perhitungan.....	78
Lampiran 3 Data Pengukuran Kurva Pertumbuhan <i>R. graminis</i>	84
Lampiran 4 Hasil Karakterisasi β -Karoten Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	85
Lampiran 5 Hasil Karakterisasi β -Karoten Standar Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.....	87
Lampiran 6 Hasil Karakterisasi Ekstrak Sampel Menggunakan FTIR.....	89
Biodata Penulis	93

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Morfologi dari <i>R. graminis</i> TISTR 5124 pada media agar YM.....	6
Gambar 2.2 Jalur metabolisme mevalonat pada sintesis karotenoid genus <i>Rhodotorula</i>	8
Gambar 2.3 Struktur isoprenoid	9
Gambar 2.4 Struktur likopen	9
Gambar 2.5 Struktur α -karoten.....	10
Gambar 2.6 Struktur β -karoten.....	10
Gambar 2.7 Struktur Zeaxanthin	11
Gambar 2.8 Struktur spiriloxantin.....	11
Gambar 2.9 Struktur mixoxantofil	11
Gambar 2.10 Struktur torularhodin	11
Gambar 2.11 Struktur echinenon.....	12
Gambar 2.12 Struktur torularhodin aldehida.....	12
Gambar 2.13 Struktur antheraxantin	12
Gambar 2.14 Sumber makanan yang mengandung β -karoten.....	14
Gambar 2.15 Kurva pertumbuhan mikroba pada sistem tertutup	21
Gambar 2.16 Ilustrasi perhitungan nilai Rf	27
Gambar 2.17 Ilustrasi jangkauan LCMS	29
Gambar 2.18 Skema alat APCI LCMS.....	30
Gambar 2.19 Transisi elektronik	31
Gambar 2.20 Instrumen pada spektrofotometer UV-Vis	32
Gambar 2.21 Spektra UV-Vis beberapa karotenoid.....	35
Gambar 2.22 Rangkaian alat FTIR.....	36
Gambar 4.1 Morfologi <i>R. graminis</i> NBRC 0190 pada media agar YPG	47
Gambar 4.2 Kurva pertumbuhan <i>R. graminis</i> NBRC 0190	49
Gambar 4.3 Biomassa <i>R. graminis</i> a) sebelum sentrifugasi, b) setelah sentrifugasi	52

Gambar 4.4 Sel kering <i>R. graminis</i>	53
Gambar 4.5 Ekstrak cair dari sel <i>R. graminis</i>	54
Gambar 4.6 Lipid total sel <i>R. graminis</i>	54
Gambar 4.7 Ekstrak yang mengandung β -karoten	55
Gambar 4.8 Analisis KLT menggunakan kloroform 100% a) β - karoten standar dan b) ekstrak sampel.....	57
Gambar 4.9 Spektra UV-Vis sampel	58
Gambar 4.10 Spektra UV-Vis β -karoten standar.....	59
Gambar 4.11 Kromatogram sampel pada m/z 443,50-444,50	62
Gambar 4.12 Kromatogram β -karoten standar pada konsentrasi 0,250 $\mu\text{g/L}$	62

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan β -karoten dari beberapa sumber makanan dan mikroorganisme	15
Tabel 2.2 Nilai konstanta dielektrik beberapa senyawa organik .	28
Tabel 2.3 Data absorpsi UV-Vis pada β -karoten standar pada beberapa pelarut organik	34
Tabel 2.4 Serapan khas gugus fungsi pada FTIR	37
Tabel 4.1 Perbandingan nilai bilangan gelombang ekstrak dan β -karoten standar Ammawath (2010)	61

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Skema Kerja.....	75
Lampiran 2 Data dan Perhitungan.....	78
Lampiran 3 Data Pengukuran Kurva Pertumbuhan <i>R. graminis</i> .	84
Lampiran 4 Hasil Karakterisasi β -Karoten Menggunakan Spektro- fotometer UV-Vis	85
Lampiran 5 Hasil Karakterisasi β -Karoten Standar Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.....	87
Lampiran 6 Hasil Karakterisasi Ekstrak Sampel Menggunakan FTIR.....	89

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Karotenoid merupakan pewarna alami yang mencakup warna kuning hingga warna merah. Karotenoid terdapat di berbagai jenis makhluk hidup dan dapat disintesis pada tanaman, fungi, alga, ragi, dan bakteri. Karotenoid pada umumnya disintesis oleh organisme fotosintetik dan mempunyai bentuk struktur yang berbeda-beda sesuai fungsinya masing-masing (Ye dkk; 2008). Karotenoid banyak diteliti karena keragaman pigmennya dan mempunyai potensi menguntungkan dalam bidang kesehatan. Karotenoid berperan penting dalam bidang kesehatan sebagai anti kanker, mencegah penyakit pada organ hati, dan berbagai penyakit seperti katarak dan degeneratif pada makula (Carilho dkk; 2014).

Karotenoid tersintesis secara alami sebagai hidrokarbon (karoten, seperti: likopen, α -karoten, dan β -karoten) atau karoten teroksidasi (xantofil, contohnya lutein, zeaxantin, dan astaxantin) yang berasal dari tanaman dan mikroorganisme (Armstrong, 1997). Lebih dari 600 jenis karotenoid telah diidentifikasi, namun hanya 30-50 saja yang teridentifikasi menjadi pro vitamin A. Senyawa provitamin A yang paling banyak dikenal adalah β -karoten dan α -karoten, dan penelitian lebih banyak ditekankan pada senyawa β -karoten karena memiliki potensi sebagai antioksidan yang tinggi (Vachali dkk; 2012).

Karoten banyak ditemukan dalam sumber makanan manusia, seperti buah-buahan dan sayuran yang berwarna. Sayur dan buah yang berwarna kuning oranye paling banyak kandungan β -karoten dan α -karoten. Wortel, umbi-umbian, mangga, labu, belawah, dan apricot merupakan sumber yang kaya akan β -karoten (Sizer dan Whitney, 2006). Namun akhir - akhir ini, karotenoid yang diproduksi dari fermentasi mikroba banyak diminati oleh berbagai pihak. Karotenoid yang diproduksi dari mikroba bersifat ramah lingkungan dibandingkan dengan karotenoid yang diproduksi menggunakan proses kimia (Das dkk; 2007). Selain itu,

pewarna alami yang berasal dari mikroorganisme memiliki potensi sebagai pewarna alternatif menggantikan pewarna sintesis. Pewarna sintetis yang sering digunakan, terutama pewarna makanan, cenderung memiliki efek toksisitas (Kaur dkk; 2008).

Salah satu mikroorganisme yang menarik perhatian peneliti sebagai penghasil β -karoten adalah ragi dari genus *Rhodotorula* karena spesies ini memiliki penampakan sel berwarna jingga hingga kemerahan. Beberapa dari spesies ini menghasilkan pigmen warna seperti torularhodin, torulena, γ -karoten, dan β -karoten. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa spesies *R. mucilaginosa* menghasilkan torularhodin sebagai pigmen major sebesar 60-80% dari total karotenoid, β -karoten sebesar 10-20%, dan torulena sebagai pigmen dengan proporsi yang kecil (Moline dkk; 2012).

Laboratorium mikroorganisme jurusan Kimia ITS memiliki koleksi baru yaitu strain *R. graminis* NBRC 0190. Strain ini merupakan bagian dari Genus *Rhodotorula* yang merupakan mikroorganisme karotenogenesis. Penelitian kandungan β -karoten pada strain ini belum dilaporkan, sehingga pada penelitian ini dilakukan isolasi dan identifikasi kandungan β -karoten pada strain *R. graminis* NBRC 0190.

1.2 Permasalahan

Penelitian tentang biopigmen telah banyak dilaporkan berasal dari mikroorganisme karotenogenesis maupun non karotenogenesis. Penelitian lebih ditekankan pada senyawa β -karoten karena memiliki potensi sebagai antioksidan yang tinggi. Data perdagangan internasional menyebutkan, pada tahun 2004 penjualan β -karoten mencapai 242 juta dolar dan pada 2009 mencapai 253 juta dolar. Namun, lebih dari 90% β -karoten yang dijual merupakan hasil produksi melalui sintesis kimia (Vachali dkk; 2012). Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa pada spesies *Rhodotorula sp.* dapat menghasilkan pigmen warna karotenoid, seperti: β -karoten, γ -karoten, torularhodin, astaxanthin dan lainnya (Moline dkk; 2012). Pada penelitian ini digunakan

strain *R. graminis* NBRC 0190 untuk memperoleh zat warna β -karoten karena strain ini memiliki penampakan berwarna oranye kemerahan yang mengindikasikan adanya pigmen karotenoid.

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini, yaitu ragi yang digunakan sebagai sumber karotenoid adalah *R. graminis* NBRC 0190 yang berasal dari Jepang. Biomassa yang digunakan dikultur pada suhu 24 °C dan digoyang dengan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Sampel yang digunakan untuk ekstraksi adalah sel kering dari biomassa ragi pada fasa stasioner. Proses mendapatkan karotenoid pada ragi ini dilakukan dengan ekstraksi pada sel kering menggunakan pelarut metanol:kloroform 1:2 pada suhu 60 °C. β -karoten yang diperoleh dianalisis lebih lanjut menggunakan KLT, spektrofotometer UV-Vis, APCI LCMS, dan FTIR.

1.4 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi zat warna (biopigmen) β -karoten yang berasal dari sumber baru, yaitu strain *R. graminis* NBRC 0190.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah dapat memberikan informasi kepada pembaca mengenai kandungan zat warna β -karoten pada ragi *R. graminis* NBRC 0190, sehingga dapat dimanfaatkan lebih lanjut. Selain itu, dapat memberikan perkembangan pada penelitian zat warna dari mikroorganisme yang banyak diminati saat ini.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan *Rhodotorula graminis*

Ragi dari genus *Rhodotorula* mengacu pada kelompok besar dari ragi asporogenus berpigmen bagian dari filum Basidiomycota. Genus ini terdapat banyak di alam dan telah diisolasi dari segala lingkungan, bunga, air tawar, air laut, gletser, tanah, dan lainnya. Beberapa spesies dari genus ini dideskripsikan sebagai agen penyebab dari mikosis oportunistik (Moline dkk; 2012). *Rhodotula* merupakan jenis fungi yang merupakan kontaminan di udara. Spesies ini dipertimbangkan sebagai organisme non-patogenik, dan selama dua dekade terakhir beberapa spesies *Rhodotorula* telah dikaitkan pada serangan mikosis pada pasien dengan imunitas yang lemah (Selfi dkk; 2013).

R. graminis memiliki nama lain *Pichia rosa* dan *R. rosa*. *R. graminis* memiliki 67 strain yang berasal dari New Zealand, Indonesia, Amerika Utara, Jepang, Indian dan Samudra Atlantik. Sumber dari *R. graminis* adalah tanaman, air laut, tanah dan salah satunya tidak diketahui asalnya. (Kurtzman dan Fell, 1998).

Seorang ilmuwan bernama Di Menna melakukan isolasi pada *R. graminis* selama musim panas di North Island, New Zealand pada 1958. Isolat ini berasal dari permukaan daun rerumputan yang terdiri dari spesies *Lolium perenne*, *Anthoxanthum odoratum* dan *Agrostis tenuis* yang ada di padang rumput di daerah tersebut. Kemudian strain ini dinamai CBS 2826 atau strain Di Menna 2K53 (Kurtzman dan Fell, 1998).

R. graminis memiliki penampakan yang meyerupai *R. glutinis*. Salah satu strain *R. graminis* memiliki morfologi seperti pada Gambar 2.1. Kurtzman dan Fell (1991) melaporkan bahwa 30% nDNA dari kedua spesies memiliki keterkaitan. Fell et al. (1992), mengemukakan penyelidikannya pada barisan urutan nukleotida pada potongan bagian dari LSU rRNA, yang menemukan bahwa kedua spesies tersebut dibedakan dengan suatu posisi dasar.



Gambar 2.1 Morfologi dari *R. graminis* TISTR 5124 pada media agar YM

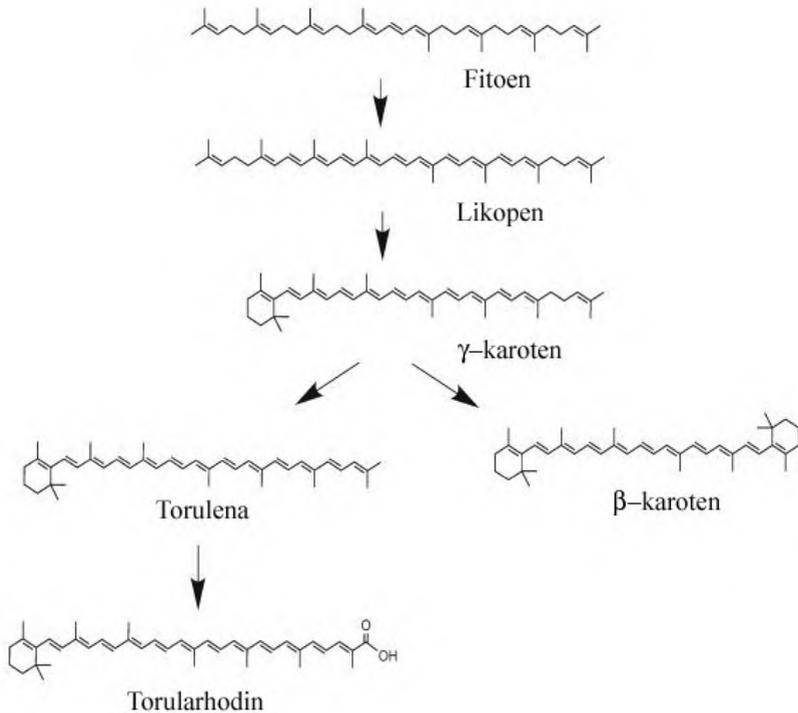
R. graminis dapat tumbuh pada suhu 30 °C dan tidak dapat tumbuh pada suhu 37 °C. *R. graminis* dapat tumbuh pada *malt extract* 5% setelah 3 hari pada suhu 25 °C. Bentuk sel *R. graminis* yang tumbuh adalah globosa (bulat) hingga ovoidal (seperti telur) atau memanjang, dengan ukuran (2,5-7) x (4-15) μm . Sel yang tumbuh biasanya mempunyai titik minyak dan bisa muncul secara satu demi satu, berpasangan atau pada rantai yang pendek atau berkelompok. Biasanya, pada sel muncul lingkaran tipis dan terdapat endapan terang. Setelah satu bulan, kemungkinan akan muncul lingkaran yang tebal, biasanya juga muncul endapan tebal, dan ada kalanya terdapat pulau kecil/islet yang lembab. Ragi ini juga dapat tumbuh pada *malt agar* 5%. Sel yang tumbuh pada media ini memiliki morfologi yang mirip dengan sel yang tumbuh pada media *malt extract* 5%. Sel akan tumbuh setelah satu bulan pada suhu 25 °C. Goresan yang tumbuh berwarna merah *coral*, permukaannya licin atau rugosa (kasar) hingga berombak dan mengkilap. Tekstur sel yang terbentuk adalah lembut, dan terkadang mucoid (berlendir), penampang lintangnya berbentuk rata hingga agak cembung dan batasnya tidak biasa dibandingkan dengan beberapa *pseudomycelium* yang belum sempurna (Menna, 1958).

Kedudukan taksonomi *R. graminis* adalah sebagai berikut:

Kerajaan	: Fungi
Subkerajaan	: Dikarya
Divisi	: Basidiomycota
Subdivisi	: Pucciniomycotina
Kelas	: Microbotryomycetes
Ordo	: Sporidiobolales
Famili	: Sporidiobolaceae
Genus	: Rhodotorula
Jenis	: <i>R. graminis</i> (ITIS, 2004).

Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa spesies *R. graminis* memiliki komponen asam lemak utama yaitu asam palmitat dan asam tak jenuh C₁₈ (Hartman dkk; 1959). Spesies ini memiliki gliserol sebanyak 97,9 % pada lemak intraselular dan lebih sedikit asam oleat pada strain 6 CB (Tulloch dan Spencer, 1964). Spesies ini telah menunjukkan genangan lemak pada permukaan koloninya pada kultur cawan petri (Hartman dkk; 1959). Spesies *R. graminis* juga dapat mendisimilasi komponen aromatik melalui jalur betaketoasidat dan protokatekoat (Durham dkk; 1984).

Kebanyakan dari spesies *Rhodotorula* menghasilkan pigmen karotenoid yang berbeda-beda. Beberapa pigmen yang sering dijumpai dari spesies ini adalah torularhodin, torulena, γ -karoten, dan β -karoten. Pigmen-pigmen ini disintesis melalui jalur mevalonat. Asam mevalonat ditransformasi dalam isopentenil pirofosfat, kemudian terkondensasi membentuk fitoena secara berturut-turut. Transformasi dari fitoena yang terjadi secara berturut-turut mengarah pada pembentukan pigmen-pigmen tersebut. Jalur sintesis metabolit ini dapat dilihat pada Gambar 2.2. Proporsi untuk masing-masing karotenoid yang terbentuk bergantung pada jenis strain dan kondisi kultur (Moline dkk; 2012).



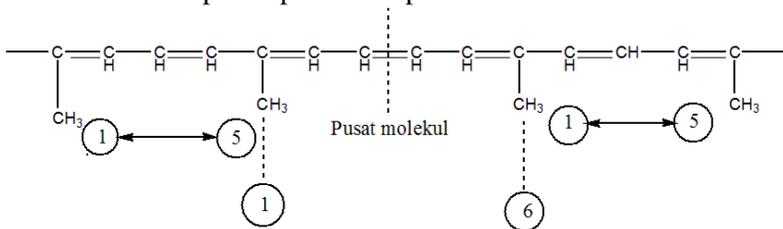
Gambar 2.2 Jalur metabolisme mevalonat pada sintesis karotenoid genus *Rhodotorula*

Produksi karotenoid dari ragi *Rhodotorula* memiliki banyak kelebihan dibandingkan dengan mikroorganisme lainnya, seperti alga dan fungi. Laju pertumbuhan spesifik pada jenis ragi ini terbilang tinggi dan menghasilkan jumlah biomassa sel yang besar, sehingga mudah untuk diperoleh di laboratorium dan penanaman skala besar. Sel dapat dikultur pada bioreaktor konvensional dan biomassa dapat digunakan secara langsung sebagai tambahan pada produk farmasi. Selain itu, ragi dapat beradaptasi pada lingkungan yang kondisinya berbeda dan tumbuh pada sumber karbon dan nitrogen yang bervariasi (Moline dkk; 2012).

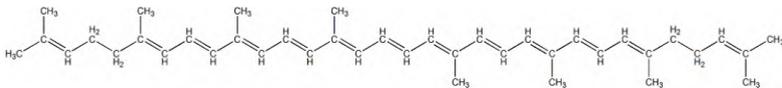
2.2 Tinjauan Karotenoid

Pigmen berwarna karotenoid telah diteliti sejak awal perkembangan kimia organik (Isler, 1971). Penelitian pada pigmen warna ini banyak dilakukan pada tumbuhan maupun berbagai mikroorganisme seperti alga, fungi, bakteri, dan alga. Secara umum, karotenoid disintesis pada organisme fotosintetik (Vachali dkk; 2012).

Karotenoid adalah suatu senyawa yang pada dasarnya tersusun oleh delapan unit isoprenoid (ip) yang bergabung, sehingga susunan pada unit-unitnya terbalik pada tengah molekul. Ilustrasi dari penjelasan ini dapat dilihat pada Gambar 2.3. Pada struktur ini, kedua pusat metil terletak pada posisi 1,6 yang relatif terhadap satu sama lain, sedangkan gugus metil non-terminal berada pada posisi 1,5. Semua karotenoid umumnya diturunkan dari poliena likopen $C_{40}H_{56}$ asiklik melalui reaksi-reaksi yang meliputi hidrogenasi, dehidrogenasi, siklisasi, penambahan oksigen dengan berbagai macam bentuk, migrasi *double bond*, migrasi metil, perpanjangan rantai, dan pemendekan rantai (Goodwin, 1980). Struktur dari likopen dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.3 Struktur isoprenoid

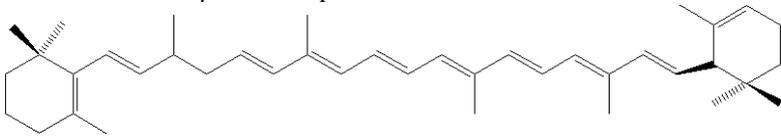


Gambar 2.4 Struktur likopen

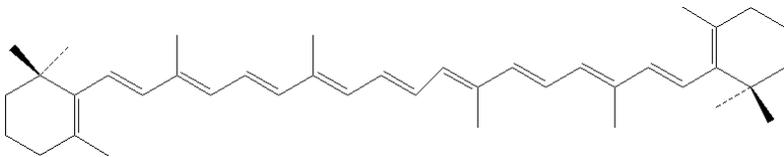
Karotenoid mempunyai lebih dari 600 macam jenis yang diketahui. Dua kelompok besar karotenoid adalah xanthofil dan

karoten. Xanthofil adalah jenis karotenid yang mempunyai molekul oksigen pada strukturnya, sedangkan karoten adalah jenis yang hanya mempunyai molekul karbon dan hidrogen di dalamnya. Xanthofil yang biasa ditemukan pada makanan adalah lutein dan zeaxanthin, sedangkan pada karoten adalah α -karoten, β -karoten, dan likopen. Lutein dan zeaxanthin merupakan pigmen warna kuning yang secara selektif terkonsentrasi 1000 kali lebih baik pada fovea dibandingkan pada jaringan lain. Zeaxanthin menjadi sumber karotenoid yang utama (Kohlstadt, 2013).

Hidrokarbon karotenoid dikenal sebagai karoten. Karoten individu dinamai berdasarkan pada gugus akhir yang spesifik yang ada pada senyawa tersebut. Pada penggunaannya, akan diberikan nama sistematis atau semi sistematis pada tanda kurung sebelum nama trivialnya, setelah itu hanya akan digunakan nama trivial untuk penyebutan selanjutnya. Sebagai contohnya likopen [ψ , ψ karoten], α -karoten [β , ϵ karoten] dan β -karoten [β , β karoten] (Goodwin, 1980). Struktur dari α -karoten dapat dilihat pada Gambar 2.5 dan β -karoten pada Gambar 2.6.



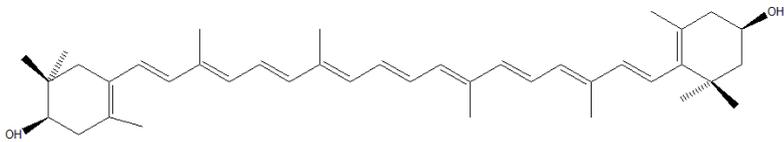
Gambar 2.5 Struktur α -karoten



Gambar 2.6 Struktur β -karoten

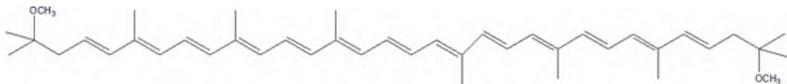
Karotenoid teroksidasi dikenal secara kolektif sebagai xantofil. Jenis-jenis ini dinamai berdasarkan pada aturan umum tata nama zat organik. Gugus yang sering diobservasi adalah:

- 1) hidroksi pada zeaxanthin. Struktur dari senyawa ini dapat dilihat pada Gambar 2.7.



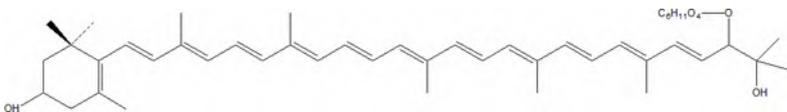
Gambar 2.7 Struktur Zeaxanthin

- 2) metoksi pada spiriloxantin. Struktur dari senyawa ini dapat dilihat pada Gambar 2.8.



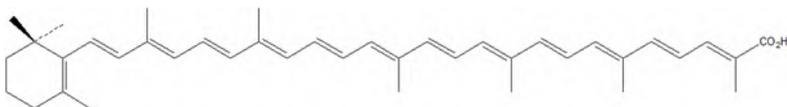
Gambar 2.8 Struktur spiriloxantin

- 3) glikosiloksi pada mixoxantofil. Struktur dari senyawa ini dapat dilihat pada Gambar 2.9.



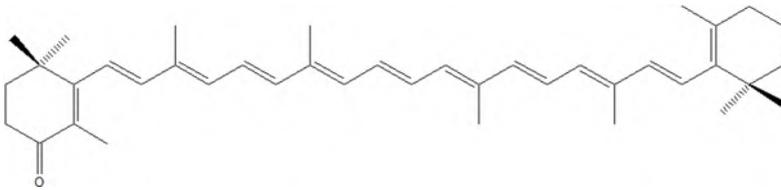
Gambar 2.9 Struktur mixoxantofil

- 4) karboksi pada torularhodin. Struktur dari senyawa ini dapat dilihat pada Gambar 2.10.



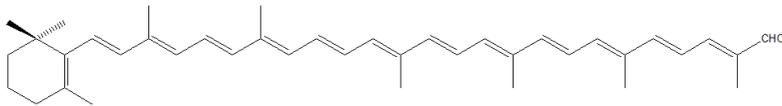
Gambar 2.10 Struktur torularhodin

- 5) okso pada echinenon. Struktur dari senyawa ini dapat dilihat pada Gambar 2.11.



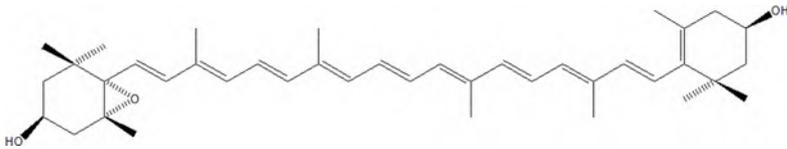
Gambar 2.11 Struktur echinenon

6) aldehida pada torularhodin aldehida. Struktur dari senyawa ini dapat dilihat pada Gambar 2.12.



Gambar 2.12 Struktur torularhodin aldehida

7) epoksi pada antheraxantin (Goodwin, 1980). Struktur dari senyawa ini dapat dilihat pada Gambar 2.13.



Gambar 2. 13 Struktur antheraxantin

Karotenoid adalah molekul yang banyak diteliti pada bidang sains karena memiliki bentuk yang unik, distribusi yang luas serta memiliki fungsi yang berbeda-beda. Pada organisme fotosintesis, karotenoid menyediakan pigmen terang. Pada kebanyakan organisme, peran utama dari karotenoid adalah sebagai antioksidan dengan menetralkan radikal bebas dan mencegah potensi kerusakan oksidatif pada sel. Karotenoid bisa mengurangi penyusupan oksigen singlet dengan menurunkan fluiditas membran sel. (Vachali dkk; 2012).

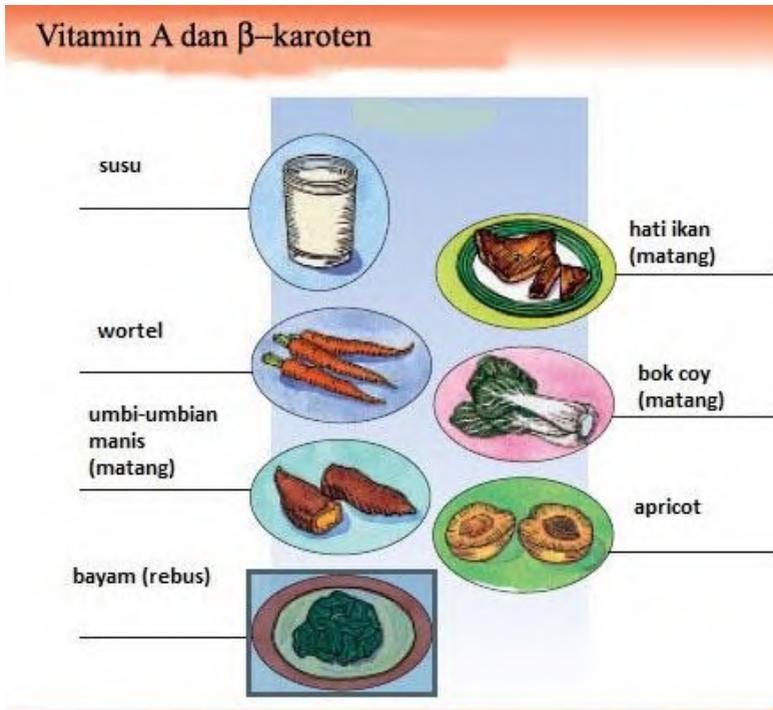
Karotenoid belum mengalami kerusakan oleh pemanasan pada suhu 60°C. Karotenoid lebih tahan tersimpan dalam

lingkungan asam lemak tidak jenuh dibandingkan dengan penyimpanan dalam asam lemak jenuh. Hal ini disebabkan asam lemak lebih mudah menerima radikal bebas apabila dibandingkan dengan karotenoid, sehingga oksidasi yang pertama kali akan terjadi pada asam lemak dan akibatnya karotenoid terlindung dari oksidasi (Choo dan Basiron, 2013).

2.3 Tinjauan β -karoten

β -karoten adalah *phytonutrient* yang larut dalam lemak yang merupakan prekursor langsung dari asam retinoat, juga dikenal sebagai vitamin A. β -karoten merupakan salah satu antioksidan, selain vitamin C dan vitamin E (Kohlstadt, 2013). Pada tanaman, vitamin A hanya tersedia dalam bentuk prekursorinya. β -karoten merupakan prekursor karotenoid yang paling berlimpah dan mempunyai aktivitas yang paling tinggi untuk membentuk vitamin A. β -karoten akan dikonversikan menjadi retinol dalam tubuh (Sizer dan Whitney, 2006).

β -karoten merupakan salah satu antioksidan yang dapat mencegah penyakit. Senyawa antioksidan ini mampu menetralkan zat-zat radikal bebas dalam tubuh yang merupakan sumber pemicu timbulnya berbagai penyakit terutama penyakit degeneratif (Serlahwaty dkk; 2009). Secara alamiah, β -karoten banyak terdapat pada buah-buahan dan sayuran, sebagai prekursor vitamin A. Pada makanan yang berasal dari hewan, seperti hati, minyak ikan, *butter* dan telur, hanya tersedia vitamin A yang telah aktif. Warna oranye terang pada buah-buahan dan sayuran berasal dari zat warna β -karoten. Sayuran berwarna lainnya, seperti kubis merah, buah bit, dan jagung kuning memperoleh warnanya dari jenis pigmen lain dan mengandung β -karoten yang rendah. Tanaman lainnya yang berwarna putih seperti kentang dan biji-bijian padi tidak mengandung β -karoten (Sizer dan Whitney, 2006). Beberapa bahan makanan yang mengandung β -karoten bisa dilihat pada Gambar 2.14.



Gambar 2.14 Sumber makanan yang mengandung β -karoten

Selain pada sayuran dan buah, β -karoten juga disintesis pada beberapa mikroorganisme. Kandungan β -karoten beberapa sayur dan mikroorganisme disajikan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Kandungan β -karoten dari beberapa sumber makanan dan mikroorganisme

Sumber	Kandungan
Wortel	183 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Mangga	131 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Ubi manis	95 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Labu	69 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Aprikot	26 $\mu\text{g}/\text{kg}$
<i>Blakeslea trispora</i>	420 $\mu\text{g}/\text{g}$
<i>Dunaliella salina</i>	10,35 mg/L
<i>Rhodotorula glutinis mutant 32</i>	250 mg/L

(Vachali dkk; 2012)

β -karoten mempunyai dua struktur cincin yang sama pada kedua sisi rantai karbon alifatik, yaitu berupa cincin β -ionon. Struktur dari β -karoten dapat dilihat pada Gambar 2.6. Oleh karena itu, β -karoten disebut pula β - β -karoten. Adanya struktur ikatan rangkap pada molekul β -karoten (11 ikatan rangkap pada 1 molekul β -karoten) menyebabkan bahan ini mudah teroksidasi ketika terkena udara. Oksidasi karotenoid akan lebih cepat dengan adanya sinar dan katalis logam, khususnya tembaga, besi, dan mangan. Oksidasi dapat terjadi secara acak pada rantai karbon yang mengandung ikatan ganda (Wallford, 2013).

2.4 Kultur Mikroorganisme

Mikroorganisme merupakan makhluk hidup renik yang dapat berkembang biak dengan cepat. Mikroorganisme dapat tumbuh dan berkembang biak pada lingkungan alami maupun buatan. Mikroorganisme dibiakkan pada media buatan untuk keperluan penelitian. Hal ini dilakukan untuk mengisolasi mikroorganisme tertentu dari lingkungannya.

Penelitian pada mikrobiologi sangat bergantung pada kemampuan untuk menumbuhkan dan mempertahankan mikroorganisme pada laboratorium. Pertumbuhan yang baik pada mikroorganisme akan terjadi jika media kultur yang digunakan tersedia dan sesuai dengan kebutuhan nutrisi mikroorganisme.

Media kultur yang digunakan bisa berwujud padatan atau cairan. Media berfungsi untuk pertumbuhan, transportasi nutrisi, dan proses penyimpanan mikroorganisme. Medium yang digunakan harus mengandung semua nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhannya. Media khusus terkadang dibutuhkan mikroorganisme untuk melakukan isolasi dan identifikasi mikroorganisme, tes sensitivitas antibiotik, analisis air dan makanan, industri mikrobiologi, dan berbagai kegiatan lainnya (Willey; 2009).

Secara umum, mikroorganisme membutuhkan sumber energi, karbon, nitrogen, fosfor, sulfur dan macam-macam mineral yang lainnya. Komposisi yang tepat dari medium yang baik bergantung pada spesies yang akan dikembangkan, karena kebutuhan nutrisi pada mikroorganisme sangat bervariasi satu sama lain. Pengetahuan mengenai habitat normal dari mikroorganisme tersebut dibutuhkan untuk memilih medium kultur yang sesuai. Kebutuhan nutrisi dari mikroorganisme mencerminkan lingkungan alamiahnya. Medium juga dapat didesain secara khusus untuk menyuburkan mikroba dalam sampel dari alam. Kultur yang dihasilkan dari proses penyuburan ini disebut sebagai kultur penyuburan (*enrichment culture*) dan dapat digunakan untuk mengisolasi suatu spesies yang diinginkan pada studi laboratorium (Willey dkk; 2009).

Pada ragi, kebutuhan nutrisi yang diperlukan adalah nutrisi yang sederhana, sehingga sangat mudah untuk menumbuhkan sel ragi. Proses pembiakan ragi di laboratorium pada umumnya menggunakan berbagai macam media sintetik dan media kompleks yang tersedia secara komersial, serta formulasi standar media tersebut telah disediakan oleh Campbell (1998). Untuk menumbuhkan ragi yang giat dan berkembang biak dengan baik, digunakan ekstrak daging kaldu (atau *beer wort*). Ekstrak daging ini dapat digunakan dalam keadaan cair atau padatan. Ekstrak daging dalam bentuk solid dapat dibuat dengan menambahkan 1-2% agar (b/v). Media ini merupakan medium kompleks yang digunakan secara tradisional. Ekstrak ragi, atau lebih dikenal *yeast*

extract, merupakan sebuah campuran kompleks dari produk yang telah rusak dari struktur ragi dan menyimpan makromolekul. Ekstrak ragi diperoleh melalui proses autolisis atau hidrolisis sel ragi. Ekstrak ragi dapat dilengkapi dengan penambahan pepton dan glukosa (seperti pada media YEPG) untuk pemeliharaan jangka pendek pada strain laboratorium (Walker, 2000).

Pertumbuhan mikroorganisme dipengaruhi oleh keadaan fisik dan kimia lingkungan alaminya. Beberapa mikroorganisme meakukan adaptasi terhadap lingkungan yang ekstrim dan keras. Mikroorganisme memiliki lingkungan hidup yang berbeda-beda. Ada beberapa habitat mikroorganisme yang sangat baik untuk pertumbuhan mikroorganisme tertentu, tetapi akan membunuh sebagian besar organisme lain (Willey dkk; 2009). Pertumbuhan pada ragi dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungan maupun faktor media. Faktor-faktor tersebut adalah temperatur, pH, dan air yang digunakan sebagai media (Walker, 2000).

Temperatur merupakan salah satu faktor utama yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme. Mikroorganisme sangat rentan terhadap suhu eksternal karena mikroorganisme tidak bisa mengatur suhu internal mereka. Salah satu pengaruh suhu pada pertumbuhan mikroorganisme adalah sensitivitas reaksi pada enzim terkatalisis (Willey dkk; 2009). Pada ragi, setiap spesies menunjukkan temperatur minimum, optimum, dan maksimum tersendiri pada setiap spesiesnya. Suhu maksimum pertumbuhan suatu spesies relatif konstan (Van Uden, 1984). Kebanyakan ragi yang digunakan untuk penelitian di laboratorium serta untuk industri akan tumbuh dengan baik pada kisaran suhu 20-30° C (Walker, 2000).

Air merupakan salah satu media yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroorganisme. Konsentrasi media pertumbuhan mikroorganisme berkaitan erat dengan konsentrasi osmotik lingkungan mikroorganisme. Mikroorganisme memiliki membran plasma permeabel yang memisahkannya dari lingkungan. Pada larutan hipotonik (larutan yang memiliki konsentrasi osmotik lebih rendah dari sistem sel), air akan memasuki sel dan mengakibatkan

ledakan sel karena membran plasma tidak bisa menghambat atau mencegah masuknya air. Sedangkan saat sel diletakkan pada larutan hipotonik (larutan dengan konsentrasi osmotik yang lebih tinggi), sel akan mengalami plasmolisis, yaitu cairan dalam sel akan mengalir keluar dari sel (Willey dkk; 2009). Pada ragi, air diperlukan dengan konsentrasi yang tinggi. Air tersebut akan mempengaruhi proses pertumbuhan dan metabolisme pada ragi. Aktivitas enzim tidak akan berjalan tanpa adanya air, sebab substrat maupun enzim pada umumnya berbentuk larutan aquos maupun suspensi koloid. Sehingga kebutuhan air pada proses metabolisme ragi adalah mutlak. (Walker, 2000).

pH merupakan salah satu faktor fisik yang mempengaruhi pertumbuhan pada ragi. Kebanyakan ragi tumbuh sangat baik pada pH antara 4,5 dan 6,5. Walaupun demikian, hampir semua spesies dapat tumbuh pada rentang pH tersebut, meskipun pada media yang lebih asam atau basa (sekitar pH 3 atau pH 8). Ragi tumbuh lebih baik pada media yang diasamkan dengan asam mineral (misalnya klorida dan asam fosfat) daripada pada media yang diasamkan dengan asam organik (misalnya asetat, asam laktat). Media yang diasamkan dengan asam organik akan menjadi inhibitor pertumbuhan ragi. Asam organik terurai dapat menurunkan pH intraselular yang kemudian akan menyebabkan adanya translokasi melalui membran plasma lagi (Walker, 2000).

2.5 Nutrisi Pertumbuhan Mikroorganisme

Pertumbuhan mikroorganisme bergantung pada nutrisi yang diserap dari media pertumbuhan maupun lingkungan hidupnya. Pada ragi, nutrisi sangat diperlukan sebagai sumber makanannya. Proses penyerapan nutrisi pada ragi dimulai dari memindahkan air, nutrisi esensial organik, dan anorganik dari media pertumbuhan. Nutrisi tersebut akan melewati dinding sel dan naik pada membran sel menuju ke lingkungan intraselular. Membran transpor merupakan kunci untuk selektivitas penyerapan nutrisi dan menggambarkan keadaan mendasar pada ragi dalam berinteraksi dengan lingkungan pertumbuhannya. Nutrisi untuk

ragi juga mengacu pada pemanfaatan berkelanjutan sumber makanan yang esensial baik itu untuk reaksi katabolik maupun reaksi anabolik yang menjamin pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel (Walker, 2000).

Mikroorganisme membutuhkan berbagai macam nutrisi sebagai sumber makanan. Nutrisi yang dibutuhkan tersebut dibagi menjadi 2, yaitu makronutrien dan mikronutrien. Mikroorganisme membutuhkan nutrisi yang seimbang untuk pertumbuhan yang baik (Willey dkk; 2009). Ragi memperoleh elemen esensial dari lingkungan pertumbuhannya yang merupakan sumber makanan sederhananya. Sumber makronutrien yang dibutuhkan pada ragi adalah C, H, O, N, P, K, Mg, dan S (sekitar 10^{-3} M). Sedangkan mikronutrien yang dibutuhkan adalah Zn^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , dan berbagai ion lainnya serta macam-macam garam (sekitar 10^{-6} M) (Walker, 2000).

Makronutrien atau *macro element* adalah nutrisi yang dibutuhkan suatu mikroorganisme dalam jumlah yang relatif besar. Enam elemen makro pertama yang dibutuhkan oleh mikroorganisme adalah karbon (C), oksigen (O), hidrogen (H), nitrogen (N), sulfur (S), dan fosfor (P). Enam unsur tersebut adalah komponen dari karbohidrat, lipid, protein, dan asam nukleat. Kemudian ada empat makroelemen yang dibutuhkan sel yang berperan sebagai kation dan macam-macam peranan penting dalam sel. Misalnya potasium (K^+), dibutuhkan untuk aktivitas pada beberapa enzim, termasuk peranannya dalam sintesis protein. Kalsium (Ca^+), salah satu peranannya adalah menyumbang ketahanan panas pada endospora bakteri (Willey dkk; 2009).

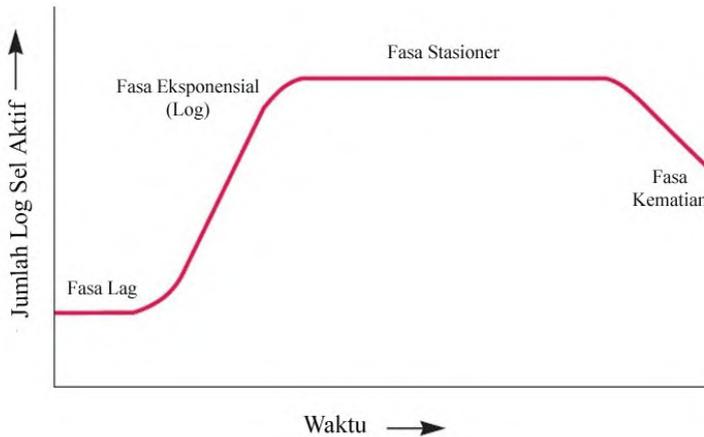
Mikronutrien atau *trace element* adalah nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroorganisme dalam jumlah yang sedikit. Mikronutrien yang paling dibutuhkan sel adalah mangan, zink, kobalt, molibdat, nikel, dan tembaga. Mikronutrien pada umumnya merupakan bagian dari enzim dan kofaktor, serta berperan sebagai katalis reaksi dan memelihara struktur protein. Misalnya, zink (Zn^{2+}) biasanya ada pada sisi aktif pada beberapa enzim, juga terlibat dalam asosiasi dari subunit yang berbeda pada suatu protein

monomerik. Mikronutrien di alam tersedia dalam jumlah yang cukup untuk mendukung pertumbuhan mikroba (Willey dkk; 2009).

Selain itu, ada beberapa mikroorganisme tertentu yang membutuhkan nutrisi khusus yang mencerminkan pada morfologi khusus atau kemampuan metaboliknya. Contohnya adalah pada diatoms, golongan dari takson eukariotik *Stramenopiles*, memerlukan asam silikat (H_4SiO_4) untuk membangun dinding sel yang terbuat dari silika yang indah $[(SiO_2)_n]$ (Willey dkk; 2009).

2.6 Kurva Pertumbuhan Mikroorganisme

Pembelahan biner serta proses pembelahan sel lainnya mengakibatkan perubahan dan peningkatan jumlah sel pada populasi mikroorganisme. Pertumbuhan populasi mikroorganisme dipelajari dengan meneliti kurva pertumbuhan dari kultur mikroba. Hasil panen mikroorganisme pada media cair biasanya ditumbuhkan pada kultur *batch*. Kultur batch dilakukan dengan cara menginkubasi mikroorganisme pada bejana kultur yang tertutup dengan sekumpulan media. Selama proses inkubasi, konsentrasi nutrien mengalami penurunan dan konsentrasi limbah mengalami peningkatan. Pertumbuhan pada mikroorganisme yang berkembangbiak dengan pembelahan biner dapat diplotkan sebagai logaritma dari banyaknya sel yang aktif membelah versus waktu inkubasi. Kurva yang dihasilkan dari proses ini menghasilkan empat fasa yang berbeda (Willey dkk; 2009). Pembagian fasa pertumbuhan pada mikroorganisme dapat dilihat pada Gambar 2.15.



Gambar 2.15 Kurva pertumbuhan mikroba pada sistem tertutup

Fasa lag terjadi saat mikroorganisme pertama kali dipindahkan ke media kultur yang baru dan biasanya tidak terjadi peningkatan jumlah sel secara tiba-tiba. Pada fasa ini, sel mikroorganisme mulai tumbuh membentuk bagian yang baru. Fasa ini bisa dianggap penting untuk beberapa alasan. Kemungkinan sel sudah tua dan kekurangan ATP, kofaktor utama, dan ribosom; sehingga harus dilakukan pembentukan komponen-komponen baru sebelum pertumbuhan sel dimulai. Media pertumbuhan yang baru mungkin berbeda dari medium pertumbuhan mikroorganisme sebelumnya. Sehingga pada fasa ini, enzim baru mungkin diperlukan untuk penyerapan nutrisi yang berbeda. Mungkin juga mikroorganisme dalam keadaan terluka, sehingga diperlukan waktu untuk memulihkan diri. Apapun kemungkinan yang terjadi, pada fasa ini mikroorganisme akan mulai melakukan replikasi DNA, meningkatkan massanya dan akhirnya membelah diri (Willey dkk; 2009).

Fasa (log) eksponensial merupakan fasa mikroorganisme akan tumbuh dan membelah diri pada kecepatan maksimal yang mungkin disebabkan oleh kemampuan genetiknya, sifat dasar mediumnya, dan juga kondisi lingkungannya. Pada fasa ini,

kecepatan pertumbuhan mikroorganisme adalah konstan, yaitu mikroorganisme melengkapi daur sel dan melakukan penggandaan diri pada interval waktu yang tetap. Populasi mikroorganisme mempunyai sifat kimia dan bentuk fisiologis yang seragam selama fasa ini. Oleh karena itu kultur pada fasa eksponensial biasanya digunakan pada studi biokimia dan fisiologis (Willey dkk; 2009).

Pertumbuhan secara eksponensial (logaritmik) merupakan pertumbuhan yang seimbang. Pada fasa ini, semua komponen utama seluler terbentuk pada kecepatan yang relatif konstan. Jika tingkat nutrisi atau kondisi lingkungan yang lainnya diubah, akan menyebabkan pertumbuhan yang tidak seimbang akan terbentuk. Selama pertumbuhan yang tidak seimbang terjadi, kecepatan pembentukan komponen-komponen sel bermacam-macam satu sama lain hingga keadaan seimbang yang baru tercapai. Pertumbuhan tidak seimbang dapat diamati dengan 2 jenis eksperimen, 1) *shift-up*, yaitu kultur yang dipindahkan dari medium yang kurang nutrisi ke medium yang lebih kaya nutrisi; dan 2) *shift-down*, yaitu kultur yang dipindahkan dari media yang kaya nutrisi ke medium yang rendah kandungan nutrisinya. Pada eksperimen *shift-up*, terdapat keterlambatan saat sel pertama kali membentuk ribosom yang baru untuk meningkatkan kapasitas sel untuk sintesis protein. Pada eksperimen *shift-down*, terjadi keterlambatan pada pertumbuhan sel karena sel memerlukan waktu untuk membuat enzim yang digunakan untuk biosintesis nutrisi yang belum tersedia. Ketika sel telah mampu untuk tumbuh kembali, terjadi pertumbuhan yang seimbang kembali dan kultur memasuki fasa eksponensial. Eksperimen *shift-up* dan *shift-down* menunjukkan bahwa pertumbuhan mikroorganisme kurang tepat, kontrol terkoordinasi dan dapat berubah dengan cepat terhadap kondisi lingkungan (Willey dkk; 2009).

Fasa stasioner pada sistem tertutup seperti kultur *batch*, pertumbuhan populasi mikroorganisme segera berhenti dan kurva menjadi horizontal. Fasa stasioner pada bakteri biasanya tercapai saat tingkat populasi berjumlah sekitar 10^9 sel per ml. Normalnya, mikroorganisme lainnya tidak akan mencapai densitas populasi

tersebut. Contohnya adalah pada kultur protista yang seringkali memiliki konsentrasi maksimum pada kisaran 10^6 sel per mL. Ukuran akhir populasi bergantung pada kemampuan nutrien dan faktor lainnya, maupun jenis mikroorganisme yang dibiakkan. Pada fasa stasioner, jumlah total mikroorganisme yang bisa aktif hidup adalah konstan. Konstanitas jumlah sel mungkin dihasilkan dari keseimbangan antara pembelahan sel dan sel yang mati, atau atau karena populasi sel mungkin berhenti untuk membelah tetapi tetap aktif secara metabolisme.

Populasi mikroba memasuki fasa stationer karena beberapa sebab. Salah satu faktor yang paling jelas adalah batasan nutrisi; jika nutrisi yang penting habis secara keseluruhan, pertumbuhan populasi akan terjadi secara lambat. Organisme aerobik biasanya dibatasi dengan ketersediaan oksigen. Oksigen tidak mudah terlarut dan mungkin dapat habis dengan cepat sehingga hanya permukaan biakan saja yang akan memiliki konsentrasasi oksigen yang memadai untuk proses pertumbuhan. Sel yang ada di bawah permukaan tidak akan bisa tumbuh kecuali jika kultur digoyangkan atau diaerasi. Pertumbuhan populasi juga bisa menyebabkan akumulasi produk limbah beracun. Faktor ini (adanya kekurangan oksigen pada kultur) justru menjadi batas pertumbuhan pada kultur anaerobik. Contohnya, *streptococci* dapat memproduksi banyak asam laktat dan beberapa asam organik lainnya dari fermentasi gula yang mediumnya menjadi asam dan pertumbuhannya menjadi terhambat. Proses tersebut menjadi salah satu bukti yang menunjukkan bahwa pertumbuhan bisa berhenti ketika tingkat kritis populasi tercapai. Pencapaian pada fasa stasioner bisa diakibatkan oleh beberapa faktor yang terjadi pada pertumbuhan (Willey dkk; 2009).

Seperti yang telah diketahui, bakteri pada kultur *batch* bisa memasuki fasa stasioner sebagai akibat dari adanya kekurangan nutrisi atau dapat dikatakan mikroba mengalami kelaparan. Hal ini mungkin sering terjadi di alam karena banyak lingkungan yang memiliki tingkat nutrisi yang rendah. Prokariot telah menyusun beberapa strategi untuk bertahan hidup ketika kelaparan. Beberapa

bakteri menanggapi dengan perubahan morfologi yang jelas dengan formasi endospor, tetapi kebanyakan hanya mengalami penurunan pada ukuran secara keseluruhan. Hal ini biasanya dibarengi dengan penyusutan protoplasma dan kondensasi nukleotida. Perubahan yang lebih penting selama proses kelaparan adalah pada ekspresi gen dan fisiologi. Bakteri yang kelaparan sering menghasilkan macam-macam kekurangan protein, seperti menyebabkan sel lebih resisten terhadap kerusakan.

Fasa Penuaan dan kematian secara singkat dijelaskan sebagai fasa penurunan pada sel yang bertahan hidup setelah fasa stasioner. Hal ini diasumsikan dengan perubahan lingkungan yang rusak seperti kehilangan nutrisi dan perkembangan pada limbah beracun menyebabkan kerusakan yang tidak dapat dipulihkan dan kehilangan daya bertahan hidup. Pada keadaan ini, walaupun sel bakteri telah digantikan dengan medium yang masih baru, tidak ada pertumbuhan selular yang akan teramati. Proses kekurangan daya hidup tidak selalu dibarengi dengan hilangnya jumlah sel total, sehingga dapat diasumsikan bahwa sel mengalami kematian tetapi tidak terjadi lisis (Willey dkk; 2009).

2.7 Ekstraksi Karotenoid

Ekstraksi adalah proses perpindahan satu atau lebih senyawa dari satu fase ke fase lainnya (Wilson dkk; 2013). Metode maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif akan larut. Perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan larutan yang ada di luar sel membuat larutan pekat di dalam sel di desak keluar. Pemilihan pelarut ekstraksi bergantung pada keadaan sampel dan komposisi karotenoid. Karoten larut pada pelarut nonpolar seperti heksana dan toluen sedangkan xanthofil larut pada pelarut polar seperti etanol dan piridin. Jika kisaran kepolaran karotenoid dalam sampel sangat lebar, maka cara ekstraksinya memerlukan lebih dari satu jenis pelarut, sehingga digunakan pelarut campuran, misalnya aseton-metanol (Britton dkk; 2013).

Ada dua metode ekstraksi yang umum digunakan, yaitu metode ekstraksi kering dan metode ekstraksi basah. Metode kering pada ekstraksi mempunyai prinsip bahwa mengeluarkan karotenoid dan zat yang terlarut dalam lemak (senyawa non polar) tersebut dari sampel yang telah kering benar dengan menggunakan pelarut anhydrous. Keuntungan dari metode kering ini, pengerjaan menjadi amat sederhana, bersifat universal, dan mempunyai ketepatan yang baik (Arifulloh, 2013).

Metode basah yang umum digunakan pada ekstraksi karotenoid yaitu maserasi. Maserasi dilakukan dengan cara merendam sampel basah dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif sehingga zat aktif akan larut (Arifulloh, 2013).

Pada penelitian kali ini, ekstraksi karotenoid dilakukan menggunakan metode kering. Sel ragi yang telah diliofilisasi diekstraksi soklet menggunakan pelarut metanol:kloroform (1:2). Kombinasi pelarut metanol dan pelarut yang kurang polar memberikan hasil yang lebih efektif dibandingkan dengan hanya menggunakan ethanol, *n*-heksana, dan aseton pada ekstraksi karotenoid (Carilho dkk; 2014). Ekstraksi untuk mendapatkan β -karoten dengan hasil yang tinggi dapat dilakukan dengan menggunakan campuran pelarut non polar *n*-heksana-etanol.

2.8 1Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis adalah metode pemisahan campuran senyawa dengan menggunakan fase diam dan fase gerak melalui plat tipis. Fase diamnya (*Stationary Phase*) berbentuk lapisan tipis yang melekat pada gelas/kaca, plastik, aluminium. Sedangkan fase geraknya (*Mobile Phase*) dapat berupa pelarut murni maupun campuran kompleks dari beberapa pelarut. Sifat dan komposisi kimia fasa gerak ditentukan oleh jenis zat yang dipisahkan dan jenis penjerap yang digunakan untuk pemisahan (Touchstone dan Dobbins, 1983). Fase diam yang berupa lapisan tipis ini dapat dibuat dengan melapiskan fase diam (adsorbent atau penjerap atau

sorbent) di atas plat/lempeng kaca plastik ataupun aluminium. Campuran yang dipisahkan berupa larutan, ditotolkan berupa bercak atau pita. Setelah plat diletakkan dalam bejana tertutup rapat berisi larutan eluen yang cocok (fase gerak), pemisahan terjadi selama perambatan kapiler. Selanjutnya, senyawa yang tidak berwarna harus ditampakkan atau dideteksi (Padmawinata, 1985).

Menurut Stahl (1985) eluen atau fase gerak yang digunakan dalam KLT dikelompokkan ke dalam 2 kelompok, yaitu untuk pemisahan senyawa hidrofil dan lipofil. Eluen untuk pemisahan senyawa hidrofil meliputi air, metanol, asam asetat, etanol, isopropanol, aseton, *n*-propanol, tert-butanol, fenol, dan *n*-butanol sedangkan untuk pemisahan senyawa lipofil meliputi etil asetat, eter, kloroform, benzena, toluena, sikloheksana, dan petroleum eter.

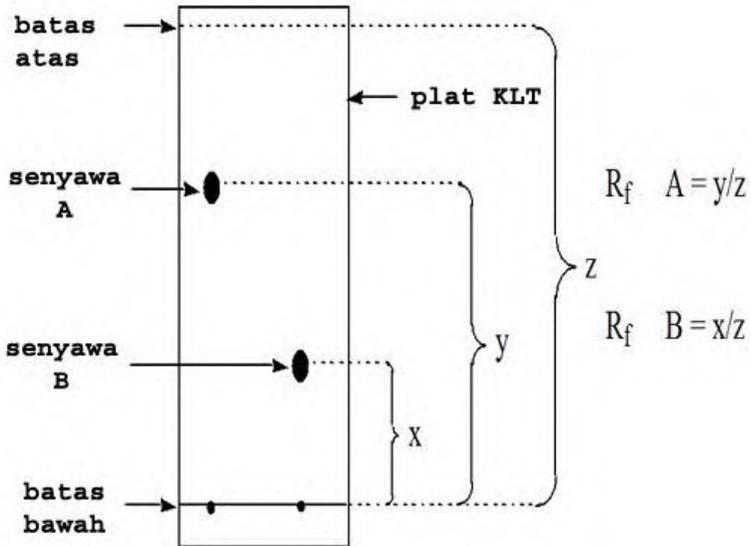
Plat yang telah dielusi dapat diidentifikasi secara fisik dan kimia. Dari kedua jenis cara tersebut, masing-masing dapat dibedakan menjadi metode destruktif dan non destruktif. Metode kimia destruktif salah satunya adalah dengan pengarangan dengan asam sulfat, sedangkan metode non destruktif adalah dengan uap iodin. Metode fisik yang digunakan salah satunya adalah dengan pengamatan di bawah sinar UV dan bersifat non-destruktif terhadap sebagian besar zat, namun pada vitamin dan steroid dapat bersifat destruktif (Touchstone dan Dobbins, 1983).

KLT banyak diaplikasikan untuk menganalisis asam amino dalam makanan, steroid dari urin, alkaloid pada tanaman, dan zat warna (Touchstone dan Dobbins, 1983).

Nilai R_f adalah cara untuk menyatakan posisi senyawa pada kromatogram dan perpindahan senyawa pada plat. Nilai R_f dapat dihitung dengan:

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh komponen (cm)}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut (cm)}}$$

Nilai R_f adalah antara 0 dan 0,999 dan tanpa satuan. Jarak dihitung dari tengah posisi sampel atau dari titik yang ditotolkan (Touchstone dan Dobbins, 1983). Visualisasi dari penghitungan nilai R_f dapat dilihat pada Gambar 2.16.



Gambar 2.16 Ilustrasi perhitungan nilai R_f

Prinsip dari kromatografi adalah polaritas. Senyawa polar adalah senyawa yang tertahan oleh fasa stasioner, di mana senyawa non-polar cenderung bergerak naik pada fasa gerak. Metanol adalah contoh dari senyawa polar yang sangat efektif sebagai fasa gerak untuk zat yang bergerak pada fasa diam (Touchstone dan Dobbins, 1983). Beberapa nilai konstanta dielektrik dari senyawa organik yang sering digunakan sebagai eluen untuk proses elusi KLT dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Nilai konstanta dielektrik beberapa senyawa organik

Senyawa	Nilai konstanta dielektrik ϵ
Alkana	2
Benzena	2,3
Dietileter	4,3
Kloroform	4,7
Etil asetat	6,0
Diklorometan	8,9
Isopropil alkohol	18,3
Aseton	20,7
Etanol	24,3
Metanol	32,6
Asetonitril	37,0
Air	78,5

(Landgrebe, 1972)

2.9 Kromatografi Cair Spektrometri Massa (KCSM/LCMS)

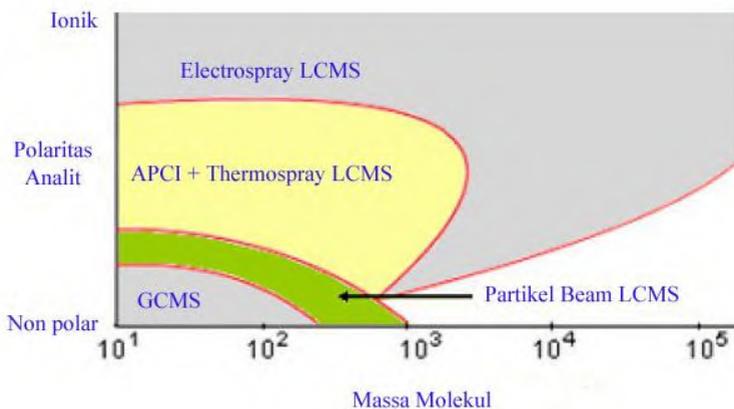
Kromatografi Cair Spektrometer Massa adalah teknik analisis yang menggabungkan kemampuan kromatografi cair dengan deteksi khusus spektroskopi massa. Kromatografi cair (LC) memisahkan senyawa pada sampel dan meneruskan identifikasi senyawa pada spektrotometer massa (MS). MS akan menghasilkan dan mendeteksi muatan ion pada senyawa. Data dari analisis sampel menggunakan KCSM digunakan sebagai informasi tentang berat molekul, struktur, identitas dan kuantitas dari senyawa pada sampel yang lebih spesifik (Horning dan Carroll, 1974).

Identifikasi struktur kimia suatu molekul, merupakan salah satu fungsi spektroskopi massa. Penentuan struktur molekul baik molekul organik maupun anorganik didasarkan pada pola fragmentasi dari ion-ion yang terbentuk ketika suatu molekul diionkan. Pola fragmentasi suatu molekul sangat berbeda dengan

molekul yang lain dan hasil analisisnya dapat berulang (*reproducible*) (Silverstein, 1991).

Penggunaan KCSM memperluas jangkauan analisis spektroskopi massa yang efektif menjadi lebih banyak senyawa organik yang dapat dianalisis. Metode pemisahan ini hanya memerlukan sedikit pemanasan pada sampel analit, sehingga bisa diaplikasikan pada hampir semua senyawa organik. Sampel yang dianalisis dapat berupa senyawa farmasi yang berukuran kecil, hingga senyawa yang berukuran besar, seperti protein (Silverstein, 1991).

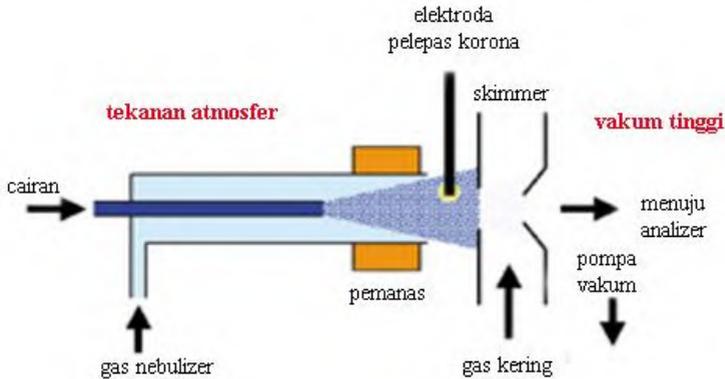
APCI (*atmospheric pressure chemical ionisation*), pada umumnya digunakan untuk analit yang kepolarannya rendah dan mempunyai berat molekul yang lebih kecil. Rentang berat molekul dapat dilihat pada Gambar 2.17.



Gambar 2.17 Ilustrasi jangkauan LCMS

APCI bergantung pada pembentukan plasma ion yang ada pada senyawa, terutama dari senyawa yang telah melalui fasa gerak pada HPLC. Molekul eluen yang memiliki ukuran lebih besar dari analit, akan terionisasi oleh awan elektron yang berada di sekeliling jarum korona dan bertindak sebagai gas pereaksi dalam proses ionisasi kimia. Molekul analit terionisasi oleh plasma reagen gas

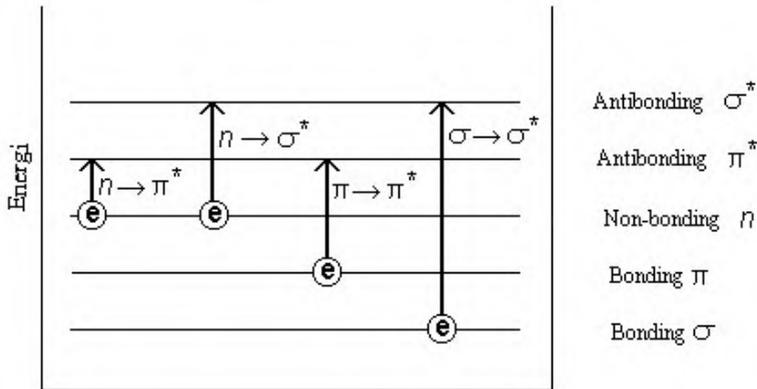
tersebut dan selanjutnya dianalisis ke wilayah *nozzle-skimmer* dari spektrometer massa. APCI adalah teknik yang menggunakan laju alir tinggi (1mL/menit atau lebih) (Horning dan Carroll, 1974). Skema dari alat ini dapat dilihat pada Gambar 2.18.



Gambar 2.18 Skema alat APCI LCMS

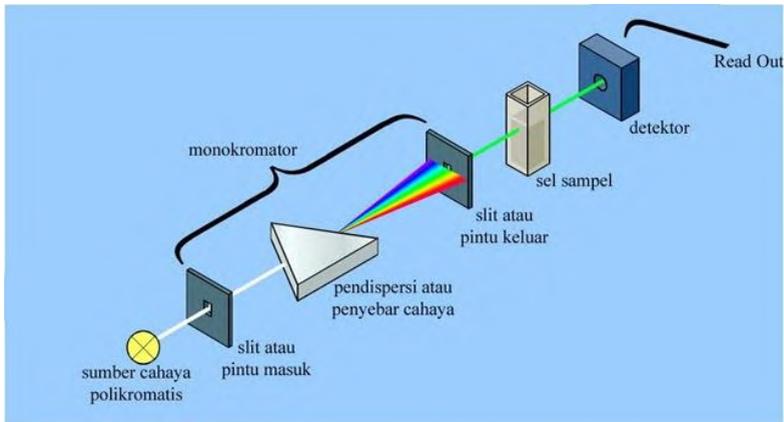
2.10 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis mengukur banyaknya intensitas cahaya yang diabsorb setelah melewati sampel. Spektrofotometri UV-Vis menggunakan spektrum radiasi elektromagnetik pada daerah ultraviolet (185-400 nm) dan sinar tampak (400-700 nm). Metode analisis ini sering digunakan untuk menganalisis senyawa organik dan banyak digunakan pada bidang biokimia dan biologi (Goodwin, 1980). Proses absorpsi cahaya UV-Vis berkaitan dengan promosi elektron dari satu orbital molekul dengan tingkat energi elektronik tertentu ke orbital molekul lain dengan tingkat energi elektronik yang lebih tinggi. Transisi elektronik tersebut biasanya adalah $\sigma \rightarrow \sigma^*$ atau $n \rightarrow \sigma^*$ (bersesuaian dengan energi cahaya UV), dan $\pi \rightarrow \pi^*$ atau $n \rightarrow \pi^*$ (bersesuaian dengan energi cahaya tampak), seperti ditunjukkan pada Gambar 2.19 (Arifulloh, 2013).



Gambar 2.19 Transisi elektronik

Spektrofotometri adalah alat yang terdiri dari spektrometer dan fotometer. Spektrometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diabsorpsi. Jadi spektrofotometer digunakan untuk mengukur energi secara relatif jika energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan atau diemisikan sebagai fungsi dari panjang gelombang. Pada spektrofotometer, panjang gelombang yang benar-benar terseleksi dapat diperoleh dengan bantuan alat pengurain cahaya seperti prisma. Suatu spektrofotometer tersusun dari sumber spektrum tampak yang kontinyu, monokromator, sel pengabsorpsi untuk larutan sampel dan blanko, serta suatu alat untuk mengukur perbedaan absorpsi antara sampel dan blanko ataupun pembanding) (Khopkar, 2003). Prinsip dari pengukuran ini adalah: seberkas sinar dilewatkan pada analat, setelah melewati analat, intensitas cahaya berkurang sebanding dengan banyaknya molekul analat yang menyerap cahaya itu. Intensitas cahaya sebelum dan sesudah melewati bahan diukur sehingga dapat ditentukan jumlah bahan yang bersangkutan (Harjadi, 1993). Skema alat spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada Gambar 2.20.



Gambar 2.20 Instrumen pada spektrofotometer UV-Vis

Sumber cahaya merupakan komponen penting pada pengukuran absorbansi. Sumber cahaya pada spektrofotometer harus memiliki pancaran radiasi yang stabil dan intensitasnya tinggi. Pada spektrofotometer UV-Vis, ada dua macam sumber cahaya, yaitu lampu Tungsten (Wolfram) dan lampu Deuterium. Lampu Tungsten (Wolfram) digunakan untuk mengukur sampel pada daerah tampak. Bentuk lampu ini mirip dengan bola lampu pijar biasa. Memiliki panjang gelombang antara 350-2200 nm. Spektrum radiasinya berupa garis lengkung. Umumnya memiliki waktu 1000 jam pemakaian. Lampu Deuterium dipakai pada panjang gelombang 190-380 nm. Spektrum energi radiasinya lurus dan digunakan untuk mengukur sampel yang terletak pada daerah UV. Lampu ini memiliki waktu 500 jam pemakaian.

Monokromator berfungsi sebagai penyeleksi panjang gelombang yaitu mengubah cahaya yang berasal dari sumber sinar polikromatis menjadi cahaya monokromatis. Monokromator untuk UV-VIS dan IR serupa, yaitu mempunyai celah, lensa, cermin dan prisma atau grating.

Wadah sampel umumnya disebut kuvet. Sel sampel berfungsi sebagai tempat meletakkan sampel dan blanko. Kuvet biasanya terbuat dari kuarsa atau gelas, namun kuvet dari kuarsa

yang terbuat dari silika memiliki kualitas yang lebih baik. Kuvet biasanya berbentuk persegi panjang dengan lebar 1 cm.

Detektor berfungsi menangkap cahaya yang diteruskan dari sampel dan mengubahnya menjadi arus listrik. Radiasi yang melewati sampel akan ditangkap oleh detektor yang akan mengubahnya menjadi besaran terukur.

Recorder merupakan alat yang akan merekam data pada proses absorpsi. Radiasi yang ditangkap detektor kemudian diubah menjadi arus listrik oleh *recorder* dan terbaca dalam bentuk transmitansi maupun absorbansi.

Spektra serapan UV-Vis memberikan informasi untuk identifikasi karotenoid. Karakteristik spektra serapan dari karotenoid adalah dari sistem poliena terkonjugasi pada molekul dan adanya struktur tambahan yang bervariasi (Goodwin, 1980). Panjang gelombang serapan maksimum (λ_{\max}) dan bentuk dari spektrum senyawa yang dianalisis menunjukkan karakteristik kromofor (Rodriguez-Amaya dan Kimura, 2004).

Sistem ikatan rangkap terkonjugasi merupakan serapan cahaya kromofor yang memberi warna yang menarik pada karoten, serta menyediakan spektra serapan tampak yang tersaji sebagai dasar identifikasi dan kualifikasi. Warna pada karotenoid memungkinkan seorang analis untuk memonitor perbedaan tahap analisis pada karotenoid. Perubahan atau hilangnya suatu warna pada saat proses analisis memberikan indikasi adanya degradasi atau modifikasi struktural secara tiba-tiba. Warna pada karotenoid membolehkan proses *visual monitoring* pada pemisahan karotenoid pada kromatografi kolom terbuka, dan menjadi alasan untuk tetap menggunakan metode klasik tersebut untuk proses analisis kuantitatif (Rodriguez-Amaya, 2001).

Kebanyakan karotenoid menyerap panjang gelombang maksimum (λ_{\max}) pada tiga panjang gelombang, dan menghasilkan tiga puncak spektra. Jumlah ikatan rangkap terkonjugasi mempengaruhi serapan panjang gelombang pada sampel yang diukur. Peningkatan jumlah ikatan rangkap yang terkonjugasi akan menambah panjang gelombang maksimal serapan sampel. Panjang

gelombang maksimal dari beberapa senyawa karotenoid dapat dilihat pada Tabel 2.3.

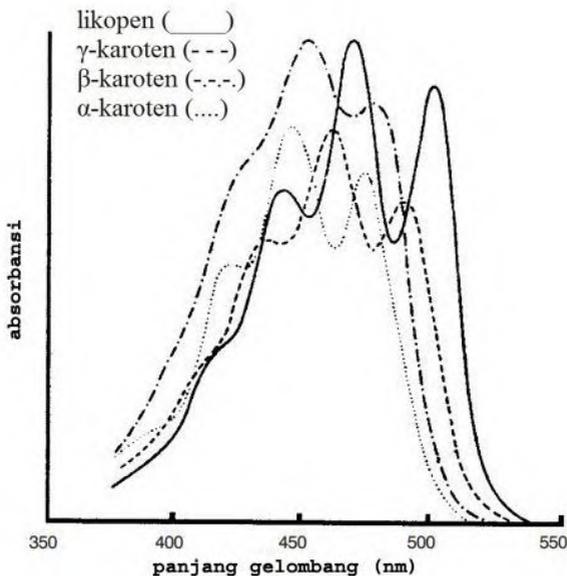
Contohnya pada likopen, senyawa berwarna merah yang merupakan karotenoid asiklik paling tidak jenuh, dengan 11 ikatan konjugasi, memiliki serapan spektra pada panjang gelombang maksimal (λ_{\max}) pada 444, 470, dan 502 nm. Serapan spektra pada likopen merupakan serapan panjang gelombang paling panjang diantara karotenoid lainnya.

Tabel 2.3 Data absorpsi UV-Vis β -karoten standar pada beberapa pelarut organik

Jenis karotenoid	Pelarut	λ_{\max} (nm)		
Antheraxanthin	Kloroform	430	456	484
	Ethanol	422	444	472
	Heksana, petroleum ether	422	445	472
Astaxantin	Aseton		480	
	Benzena, kloroform		485	
	Etanol		478	
	Petroleum eter		468	
γ -karoten	Aseton	439	461	491
	kloroform	446	475	509
	Etanol	440	460	489
	Heksana, Petroleum eter	437	462	494
Lycopene	Aseton	448	474	505
	kloroform	458	484	518
	Etanol	446	472	503
	Petroleum eter	444	470	502
Lutein	kloroform	435	458	485
	Etanol	422	445	474
	Petroleum eter	421	445	474
β -karoten	Aseton	429	452	476
	Kloroform	435	461	485
	Ethanol	425	450	478
	Heksana, Petroleum Eter	425	450	477

(Rodriguez-Amaya, 2001)

β -karoten, senyawa berwarna kuning-oranye dan memiliki struktur bisiklik, memiliki spektra serapan pada panjang gelombang maksimal pada (λ_{\max}) 450 nm dan 477 nm, dan refleksi (bahu) pada 425 nm. Sedangkan ζ -karoten, senyawa berwarna kuning terang dan juga memiliki struktur asiklik, memiliki serapan dengan 3 puncak namun dengan panjang gelombang maksimum (λ_{\max}) pada 378, 400, dan 425 nm (Rodrigues-Amaya dan Kimura, 2004). Spektra dari beberapa senyawa karotenoid dalam pelarut petroleum eter dapat dilihat pada Gambar 2.21.

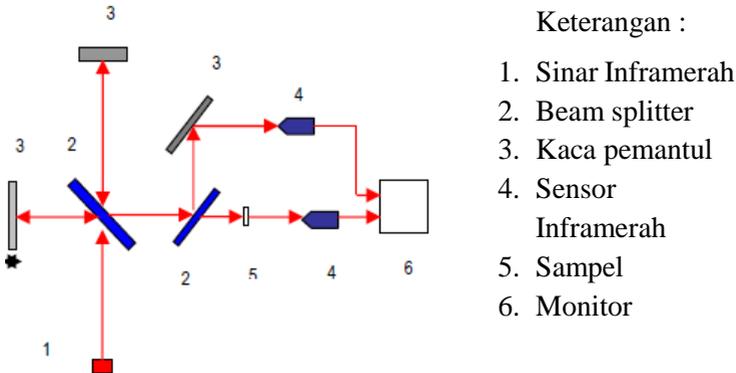


Gambar 2.21 Spektra UV-Vis beberapa karotenoid

2.11 Spektroskopi Infra Red (IR)

FTIR merupakan instrumen spektroskopi infra merah yang dilengkapi dengan transformasi fourier. Transformasi fourier digunakan untuk mendeteksi dan menganalisis hasil spektra suatu sampel (Anam dan Sirojudin, 2007). Metode FTIR digunakan untuk menentukan akumulasi lipid pada mikroalga, *yeast* dan

protista laut. Selain itu spektroskopi infra merah juga digunakan untuk karakterisasi struktur dari isolasi biomolekul seperti protein, lemak asam nukleat, dan karbohidrat (Ami dkk; 2014). Hasil karakterisasi suatu produk dengan menggunakan FTIR bergantung pada penentuan spektra infra merah yang digunakan. Sampel akan mengabsorb radiasi infra merah, hasil serapan tersebut menunjukkan vibrasi yang berbeda seperti *stretching*, *bending*, dan kombinasi vibrasi lainnya. Spektrum yang didapatkan akan ditampilkan pada monitor dalam bentuk *plotting* antara intensitas fungsi energi dan bilangan gelombang (cm^{-1}) (Anam dan Sirojudin, 2007). Skema kerja alat FTIR ditunjukkan pada Gambar 2.22.



Gambar 2.22 Rangkaian alat FTIR

Setiap senyawa memiliki serapan sinar inframerah yang unik yang membedakan satu dengan yang lainnya. Serapan tersebut mengindikasikan vibrasi tiap molekul dalam senyawa tersebut. Vibrasi molekul menunjukkan korelasi dengan struktur sampel. Spektra pada IR dibagi menjadi beberapa daerah. Wilayah spektra elektromagnetik inframerah berada pada 14000 hingga 50 cm^{-1} dan dibagi menjadi 3 area, yaitu: IR daerah jauh (*far-range IR*) dari 400 hingga 50 cm^{-1} , IR daerah jarak menengah (*mid-range IR*) dari 4000 hingga 400 cm^{-1} , dan IR daerah dekat (*near-range IR*)

IR) dari 14000 hingga 4000 cm^{-1} . *IR* daerah menengah merupakan daerah yang digunakan untuk identifikasi senyawa organik, karena pita serapan pada daerah ini merupakan vibrasi dari gugus fungsi tertentu (Guillen dan Cabo, 1997). *IR* daerah menengah juga banyak digunakan untuk analisis secara kuantitatif pada lemak dan minyak (Moh dkk; 1999). Pada biosampel, spektra *IR* pada daerah jarak menengah (*mid-range IR*) dengan bilangan gelombang berkisar pada 4000-600 cm^{-1} lebih optimal daripada spektra *IR* daerah dekat (*near-range IR*) dengan bilangan gelombang 14000-4000 cm^{-1} karena keberadaan *overtone* (Sun dkk; 2007). Serapan khas dari beberapa gugus fungsi pada *IR* daerah menengah dapat dilihat pada Tabel 2.4.

Tabel 2.4 Serapan khas gugus fungsi pada FTIR

Gugus	Senyawa	Daerah Serapan (cm^{-1})
C-H	Alkana	2800-3000
C-H	Alkena	3000-3300
C=C	Alkena	1600-1700
C-C	Aromatik (cincin)	1450-1600
C=O	Aldehida, keton, asam karboksilat, ester	1640-1820
O-H	Alkohol	3000-3700; 900-1300

(Supratman, 2010)

Spektroskopi Inframerah sangat jarang digunakan untuk analisis senyawa karotenoid karena sistem poliena terkonjugasi akan tampak dengan pita yang sangat lemah. Namun, spektroskopi FTIR berguna untuk mendeteksi struktur khusus tertentu seperti asetilenik, alenik, hidroksi, dan kelompok keto yang tidak reaktif. Struktur alenik dan asetilenik pada karotenoid dapat dideteksi dengan spektroskopi FTIR. Puncak yang tidak biasa ini akan terdeteksi pada bilangan gelombang 1928 cm^{-1} pada senyawa fukosantin dapat ditetapkan sebagai gugus alenik. Pita lemah pada

bilangan gelombang 2170 cm^{-1} pada alloxanthin adalah karakteristik dari karotenoid asetilenik (Isler, 1971).

BAB III

METODOLOGI PERCOBAAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: erlenmeyer, tutup aluminium foil, cawan petri, gelas beker, pipet mikro, pipet ukur, propipet, jarum ose, neraca digital, labu ukur, oven, botol duran, botol falcon, mortar alu, spatula, sentrifugasi, *shaker incubator*, *autoclave*, *freezer*, *vakum freeze dryer*, *ultrasonic cleaner*, inkubator suhu 29-30 °C, *hot plate*, corong masir, lampu Ultra Violet (UV) 254 dan 366 nm, pengaduk magnetik, *vortex*, kondensor refluks, spektrofotometer UV-Vis (Genesys tipe 10S), kuvet, *laminary flow*, spektrofotometer *Fourier Transform Infrared* (Shimadzu tipe FTIR-8400S) dan *rotary evaporator*.

3.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: *R. graminis* NBRC 0190, glukosa, *yeast extract*, pepton, aquades, *microbiology agar*, kloram, metanol teknis, metanol 99,9%, *n*-heksana, kloroform, plat aluminium silika gel F₂₅₄, diklorometan PA, β-karoten standar.

3.2 Prosedur penelitian

3.2.1 Pembuatan Media

Media padat yang digunakan untuk regenerasi *R. graminis* terdiri dari: glukosa 10 g, pepton 5 g, *yeast extract* 3 g, dan *microbiology agar* 15 g dilarutkan dalam 1 liter aquades. Media cair untuk kultur *R. graminis* terdiri dari: glukosa 10 g, pepton 5 g, dan *yeast extract* 3 g dilarutkan dalam 1 liter aquades. Media disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit (NBRC, 2004).

3.2.2 Rehidrasi Ragi *R. graminis*

Ragi dari spesies *R. graminis* digunakan pada penelitian ini. Spesies ragi yang digunakan diperoleh dari NITE *Biological Resource Center* (NBRC) Jepang. Sel kering ragi *R. graminis* yang diperoleh diinokulsikan pada media cair 25 mL, diinkubasi pada *shaker inkubator* pada suhu 27 °C dan digoyang pada *shaker* pada kecepatan 120 rpm selama 1x24 jam (NBRC, 2004). Kemudian pre-kultur dipipet sebanyak 100 µL dituangkan di atas media padat steril dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 28-30 °C di dalam lemari inkubator. Sel yang tumbuh pada cawan petri ini digunakan sebagai pre-kultur regenerasi.

3.2.3 Regenerasi Ragi *R. graminis*

Sel pre-kultur diambil 1 ose untuk digoreskan di atas 15 mL media padat pada cawan petri kaca. Ragi diinkubasi selama 24 jam pada suhu 29-30 °C pada inkubator sampai terdapat koloni berwarna merah *coral* atau oranye muncul (Bellanger dkk; 2013).

3.2.4 Kurva Pertumbuhan *R. graminis*

Satu koloni ragi *R. graminis* dari media padat diambil kemudian diinokulasikan pada 10 ml media cair sebagai prekultur. Prekultur diinkubasi sambil digoyangkan pada *shaker inkubator* selama 24 jam pada suhu 24 °C dengan kecepatan 120 rpm. Setelah inkubasi, kultur dipindahkan pada 50 mL media cair dan diinkubasi sambil digoyangkan dengan kondisi sama seperti prekultur. Kemudian kultur tersebut dipipet 2,5 mL dan dimasukkan pada media 25 mL. Dibuat 15 kultur untuk diamati pertumbuhan pada ragi selama 80 jam atau hingga didapatkan fasa kematian ragi. Optical density (OD) diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm (OD_{400}) setiap 6 jam sekali (Spencer dan Tulloch, 1964). Absorbansi diplotkan dengan waktu untuk membuat kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan ragi diperlukan untuk mengetahui fasa stationer bakteri yang kemudian digunakan untuk menentukan masa pemanenan ragi.

3.2.5 Produksi Biomassa *R. graminis*

Satu koloni ragi *R. graminis* dari media padat diambil dan diinokulasikan ke dalam 25 mL media cair sebagai prekulturr. Dibuat 4 prekulturr untuk 1000 mL biomassa. Prekulturr diinkubasi sambil digoyangkan pada *shaker incubator* selama 24 jam pada suhu 24 °C dan kecepatan 120 rpm. Prekulturr masing-masing dipindahkan pada 225 mL media cair dan diinkubasi dengan kondisi yang sama seperti prekulturr selama 36 jam. Kemudian sel dipisahkan dari media dengan sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit dengan suhu 20 °C. Biomassa yang diperoleh kemudian dicuci dengan aquades steril dan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Setelah sentrifugasi, filtrat dibuang. Biomassa ditimbang kemudian disimpan pada *freezer* dengan pengaturan suhu maksimum. *Pellet* sel basah yang diperoleh dipindahkan pada cawan petri steril. Ditimbang massa cawan petri sebelumnya. Sel dibekukan pada *freezer* dengan pengaturan suhu maksimum. Kemudian sel dimasukkan pada *vacuum freeze dryer* dengan pengaturan suhu -87 °C selama 24 jam (Devianti, 2012). Sel kering yang diperoleh ditimbang untuk mengetahui berat kering biomassa.

3.2.6 Pemisahan lipid total *R. graminis*

Sel kering sebanyak 4 g diekstrak 6 kali menggunakan 50 mL kloroform:metanol (2:1 v/v). Ekstraksi sel dilakukan dengan metode refluks selama 2 jam dan temperatur 50-55 °C. Ekstraksi dilakukan hingga warna sel memudar. Hasil ekstraksi disaring secara vakum menggunakan corong masir. Ekstrak yang diperoleh kemudian dikeringkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50 °C (Carilho dkk; 2014). Ekstrak kering yang diperoleh ditimbang untuk mengetahui kandungan lipid totalnya.

3.2.7 Pemisahan Lipid non polar pada *R. graminis*

Pemisahan lipid total dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair. Ekstrak kering sebanyak 0,4786 g dilarutkan dengan 30 mL *n*-heksana dan dimasukkan ke dalam corong pisah. Larutan

ditambahkan metanol 15 ml kemudian dikocok menggunakan *shaker* selama 15 menit. Kemudian campuran didiamkan, dan diambil fasa *n*-heksana. Diulang ekstraksi dengan menambahkan metanol pada fasa *n*-heksana. Perbandingan pelarut untuk ekstraksi cair-cair adalah *n*-heksana:metanol (2:1) (Britton dkk; 2013). Fraksi yang larut dalam *n*-heksana disebut fraksi lipid non polar yang mengandung β -karoten.

3.2.8 Identifikasi β -karoten menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak dan β -karoten standar dimonitoring dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mengidentifikasi β -karoten pada sampel. Plat alumunium silika gel F₂₅₄ digunakan sebagai adsorben dengan ukuran 1 x 6 cm². Lipid dan β -karoten standar masing-masing dilarutkan pada *n*-heksana kemudian ditotolkan pada plat menggunakan pipa kapiler. Plat dielusi dengan eluen kloroform 100%. Plat disinari dengan lampu UV 254 dan 366 nm untuk melihat noda dan ditentukan nilai R_f-nya. Dibandingkan nilai R_f dari ekstrak sampel dan β -karoten standar untuk mengetahui kemurnian senyawa.

3.2.9 Identifikasi Gugus Fungsi dengan Spektrofotometer FTIR

Ekstrak yang diperoleh diambil sedikit lalu ditambahkan KBr, kemudian digerus dengan mortar alu. Sampel dibentuk pelet dan dianalisis dengan spektrofotometer *Fourier Transform Infrared* (Ammawath dan Che Man, 2010).

3.2.10 Analisis Spektrofotometer UV-Vis

Ekstrak dan β -karoten standar diuji menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Ekstrak yang diperoleh dan β -karoten standar masing-masing dilarutkan menggunakan pelarut *n*-heksana, kemudian dimasukkan ke dalam kuvet kaca dan dinalisis pada spektrofotometer UV-Vis. *n*-heksana digunakan sebagai

blanko dan *screening* dilakukan pada panjang gelombang 400-700 nm (Berra, 2012).

3.2.11 Kromatografi Cair-Spektroskopi Massa (KCSM /LCMS)

Sampel hasil ekstraksi dan β -karoten standar dianalisis menggunakan APCI LCMS pada m/z 443,50-444,50 (Lucini dkk; 2012). Pengujian sampel dilakukan di laboratorium Instrumentasi jurusan Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Alat yang digunakan untuk analisa adalah UHPLC dengan menggabungkan APCI dan SRM sebagai indikatornya. Diplotkan luas area dan konsentrasi β -karoten standar untuk membuat kurva kalibrasi. Dari kurva kalibrasi dihitung konsentrasi β -karoten pada sampel untuk mengetahui kadarnya.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Rehidrasi Sel Kering *R. graminis*

Ragi yang digunakan pada penelitian ini adalah *R. graminis* NBRC 0190. Spesies ini diperoleh dari NITE (National Institute of Technology and Evaluation) Biological Resource Center, atau disingkat NBRC, Jepang. Sel yang diperoleh adalah *L-dried cell*, atau sel kering, yang berbentuk serbuk berwarna oranye hampir merah. Sampel yang digunakan berupa sel kering karena sel yang disimpan dalam bentuk *L-dried* bisa bertahan hidup lebih lama dibandingkan sel yang dibekukan ataupun yang dikeringkan dengan proses *freeze-drying*. Proses penyimpanan dalam bentuk *L-dried* banyak digunakan pada sampel yang mudah rusak pada suhu ekstrim atau pembekuan. Beberapa mikroorganisme yang disimpan dengan metode ini dapat bertahan selama 1-2 tahun. (Malik, 1990).

Sel kering ragi *R. graminis* diinokulasi pada media cair (metode subbab 3.2.1) 25 mL selama 24 jam pada suhu 24 °C sebagai pre-kultur. Media yang digunakan untuk rehidrasi adalah media cair, karena media tersebut yang paling cocok digunakan untuk menghidrasi sel kering ragi (NBRC, 2004). Proses rehidrasi membutuhkan kondisi lingkungan serta medium yang sesuai agar sel kering dapat bertahan hidup. Penambahan media yang sesuai akan meningkatkan jumlah sel yang bertahan hidup, dibandingkan dengan hanya menambahkan air (Riet dan Lievens, 1994). Proses inkubasi dilakukan pada suhu 24 °C, karena pada suhu yang relatif rendah ragi akan meningkatkan jumlah sel yang bertahan hidup dibandingkan dengan yang direhidrasi pada suhu tinggi (Heckly, 1961). Sel kering diinokulasi pada media cair bertujuan untuk mengaktifkan kembali sel yang inaktif karena proses pengeringan, sehingga sel dapat diregenerasi dan dikembangkan.

Sel yang didapat dari proses prekultur diinokulasikan pada media padat untuk mendapatkan koloni. Sel prekultur diambil 10 µL kemudian dituang pada permukaan media padat. Sel diinkubasi

selama 24 hingga 48 jam hingga muncul bintik merah koloni ataupun kelompok pseudomiselium. Sel yang tumbuh pada media agar digunakan sebagai pre-kultur untuk regenerasi ragi.

4.2 regenerasi *R. graminis*

Sel ragi hasil pre-kultur diambil satu ose dan diinokulasikan pada media padat steril dalam cawan petri menggunakan metode *streak plate*. Metode *streak plate* berfungsi untuk pengenceran sel, sehingga didapatkan koloni murni yang tumbuh di media (Willey dkk; 2009). Sel diinkubasi pada inkubator suhu 28-30 °C selama 48 jam, hingga diperoleh koloni berwarna merah *coral*. Media padat steril yang digunakan adalah media agar YPG (*yeast extract*, pepton, dan glukosa) yang tiap 1 liter air mengandung glukosa 10 g, pepton 5 g, *yeast extract* 3 g, dan *microbiology agar* 15 g (NBRC, 2004). Media ini digunakan karena media ini mengandung nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan ragi *R. graminis*. Media agar pada media ini berfungsi sebagai agen pematat. Media agar digunakan karena merupakan polimer sulfat yang tidak mudah didegradasi oleh mikroorganisme serta dapat digunakan untuk mengisolasi mikroorganisme dari kontaminan (Willey dkk; 2009). Proporsi *microbiology agar* yang digunakan adalah 1,5% (15 g/L) agar media tidak mudah pecah (Bergman, 2001). Ragi merupakan organisme kemoorganotrofis, sehingga membutuhkan senyawa organik sebagai sumber karbon dan energi. Glukosa berfungsi sebagai sumber karbon yang umum digunakan untuk media mikroorganisme. Pada media ini digunakan glukosa karena spesies *Rhodotorula* dapat tumbuh dengan baik pada media dengan glukosa sebagai sumber karbon, dibandingkan dengan media yang mengandung galaktosa (Latha dkk; 2005). Pepton berfungsi sebagai sumber nitrogen, karbon, dan energi. Pepton merupakan molekul sederhana dari protein yang berasal dari proses pemecahan proteolitik daging, kasein, gelatin serta berbagai sumber protein lainnya. Nitrogen dibutuhkan untuk sintesis asam amino, purin, beberapa karbohidrat, kofaktor enzim, lipid dan

substansi lainnya. *Yeast extract* merupakan sumber vitamin B yang sangat baik, serta sumber nitrogen dan karbon (Willey dkk; 2009).

Pada media agar akan muncul koloni warna merah coral dari ragi. Penampakan morfologi dari strain *R. graminis* NBRC 0190 dapat dilihat pada Gambar 4.1. Warna yang khas ini merupakan pigmen yang khusus diproduksi oleh ragi *R. graminis* untuk menghalangi cahaya pada panjang gelombang tertentu yang dapat merusak sel (Postgate, 1994). Menurut pengamatan, penampakan sel koloni yang tumbuh setelah 48 jam adalah sel berbentuk bulat dan terdapat lapisan minyak pada permukaan pseudomiselium. Koloni pada ragi ini berukuran besar, bila dibandingkan dengan koloni bakteri. Koloni yang tumbuh kemudian digunakan sebagai inokulan pada proses selanjutnya.



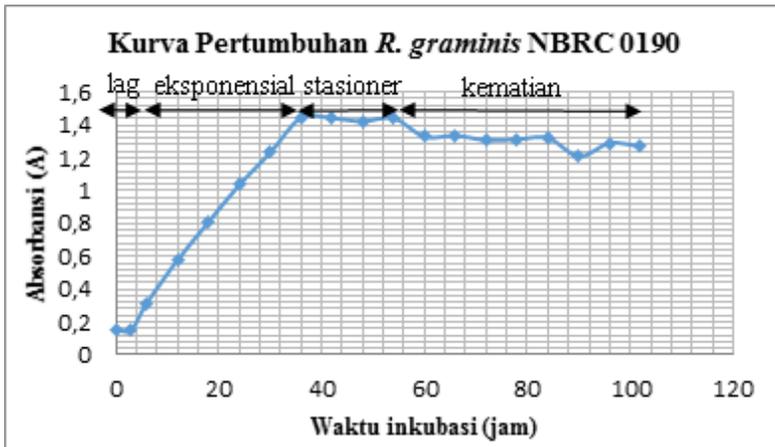
Gambar 4.1 Morfologi *R. graminis* NBRC 0190 pada media agar YPG

4.3 Kurva Pertumbuhan *R. graminis*

Pertumbuhan pada mikroorganisme didefinisikan dengan peningkatan pada komponen selular. Hal ini ditandai dengan meningkatnya jumlah sel saat terjadi reproduksi (Willey dkk; 2009). Pada ragi, pertumbuhan dikaitkan dengan kemampuan sel untuk mentranspor dan mengasimilasikan nutrisi sehingga mengintegrasikan fungsi komponen dalam sel untuk meningkatkan massa sel yang kemudian membelah (Walker, 2000). Pembelahan sel pada ragi mulai terjadi dengan tumbuhnya tunas atau *budding*. *Budding* ditandai dengan munculnya sel anak yang menyerupai sel induk, kemudian diikuti dengan pembelahan inti, pembentukan dinding sel, hingga terjadi pembelahan sel (Sherman, 1997). Pertumbuhan sel ragi pada kultur *batch* dibagi menjadi 3 fasa utama, yaitu fasa lag, fasa eksponensial dan fasa stasioner. Cara yang bisa digunakan untuk mengukur pertumbuhan pada ragi maupun bakteri adalah dengan metode spektrofotometri. Sel mikroba akan menyebar saat disinari. Sel mikroba pada suatu populasi dapat dinyatakan memiliki ukuran yang konstan, sehingga jumlah sel yang menyebar sebanding dengan jumlah biomassa sel yang muncul, dan secara tidak langsung akan menggambarkan jumlah sel (Willey dkk; 2009).

Pembuatan kurva pertumbuhan pada ragi *R. graminis* dilakukan dengan metode turbidimetri pada kultur *batch*. Satu koloni sel ragi diambil menggunakan jarum ose, kemudian diinokulasikan pada 10 ml media cair YPG dan diinkubasi selama 24 jam pada *rotary shaker* inkubator pada suhu 24 °C dan kecepatan 120 rpm. Kultur ini dibuat agar sel ragi dari media padat dapat beradaptasi pada kondisi dan lingkungan media cair. Setelah diinkubasi selama 24 jam, kultur dipindahkan pada media 50 ml dan diinkubasi dengan kondisi yang sama. Pre-kultur kemudian diinokulasikan pada 15 media cair. Masing-masing volume akhir inokulan adalah 25 ml dan diinkubasi pada *rotary shaker* inkubator pada suhu 24 °C dengan kecepatan 120 rpm hingga didapatkan fasa kematian ragi. Kultur diukur absorbansinya dengan metode turbidimetri pada OD₄₀₀ setiap 3 jam sekali mulai dari jam ke nol

hingga jam ke 6 pertumbuhan, kemudian diukur setiap 6 jam hingga didapat semua fasa pertumbuhan. Dari pengukuran tersebut didapatkan kurva pertumbuhan *R. graminis* pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Kurva pertumbuhan *R. graminis* NBRC 0190

Dari kurva pertumbuhan yang diperoleh, diketahui fasa pertumbuhan pada ragi *R. graminis* adalah fasa lag (0-3 jam inkubasi), fasa eksponensial (3-36 jam inkubasi), fasa stasioner (36-54 jam inkubasi), dan fasa kematian (54-102 jam inkubasi). Pada fasa lag, sel ragi mengalami penyesuaian dengan lingkungan medium yang baru, sehingga hampir tidak terjadi pertumbuhan pada sel. Sel melakukan adaptasi dengan mensintesis ribosom dan enzim yang dibutuhkan untuk memulai pertumbuhan pada kecepatan yang lebih tinggi. (Walker, 2000). Berdasarkan pengamatan, kultur tidak mengalami kekeruhan secara signifikan.

Fasa eksponensial pada *R. graminis* terjadi selama jam ke 3 hingga jam ke 36 masa inokulasi. Sebelum mengalami fasa ini, sel ragi mengalami fasa akselerasi, yaitu sel mengalami pertumbuhan yang tajam dibandingkan dengan sebelumnya. Pada fasa eksponensial, sel ragi aktif membelah menghasilkan sel dua kali dari jumlah awal sel dan prosesnya terjadi secara konstan. Pada

fasa ini terjadi penipisan jumlah dari nutrisi esensial, akumulasi jumlah metabolit penghambat pertumbuhan, serta memperbanyak flokula sel. Kultur menjadi lebih keruh pada fasa ini (Walker, 2000).

Fasa stasioner ragi *R. graminis* terjadi mulai jam ke 36 hingga jam ke 54 inkubasi. Waktu pemanenan ragi *R. graminis* adalah pada awal fasa stasioner, yaitu 36 jam inkubasi. Fasa ini ditentukan sebagai fasa pemanenan karena pada fasa ini biomassa sel ragi dalam keadaan konstan dan kecepatan pertumbuhan sel kembali berhenti. Konsentrasi biomassa sel meningkat dari keadaan awal diketahui dari volume cairan pada akhir pertumbuhan. Pada fasa ini sel ragi *R. graminis* akan menghasilkan metabolit produk yang digunakan sebagai sumber karotenoid. Biomassa sel dari fasa ini dapat disimpan karena sel ragi dapat bertahan hidup tanpa penambahan nutrisi (Walker, 2000). Pertumbuhan sel berhenti pada fasa stasioner karena konsentrasi dari substrat sebagai sumber nutrisi telah berkurang atau mencapai batas minimal dari kebutuhan ragi (Willey dkk; 2009).

Fasa terakhir pada pertumbuhan ragi *R. graminis* adalah fasa kematian. Fasa ini terjadi karena sel mengalami autolisis atau kematian setelah fasa stasioner yang cukup lama (Walker, 2000). Jumlah sel tidak berkurang secara drastis. Namun penurunan jumlah sel mengindikasikan bahwa beberapa sel telah mengalami kematian karena kekurangan nutrisi.

4.4 Produksi Biomassa

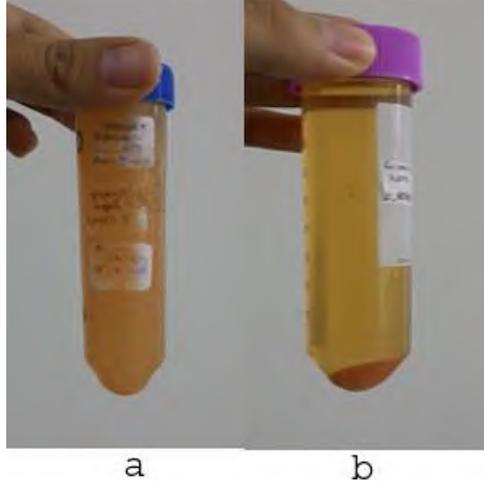
Produksi biomassa ragi *R. graminis* dilakukan dengan metode *batch*. Satu koloni ragi *R. graminis* diambil dari media padat kemudian diinokulasikan pada 25 ml media cair sebagai prekultur. Sebanyak 4 prekultur diinkubasi pada *rotary shaker* inkubator suhu 24 °C dan kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Prekultur dibuat untuk membiasakan sel ragi pada kondisi lingkungan media cair serta sebagai inokulan pada media cair volume besar. Sel akan dapat bertahan hidup pada media cair jika

minimal volume prekultuur adalah 10% dari volume total biakan (Hashsham, 2007).

Setelah diinkubasi selama 24 jam, prekultuur dimasukkan pada media cair 225 ml dan diinkubasi pada *rotary shaker* inkubator dengan pengaturan suhu 24 °C dan kecepatan 120 rpm selama 36 jam. Kultuur harus diinkubasi sambil digoyang pada *shaker* untuk optimasi transpor oksigen dan pertumbuhan pada sel selama proses inkubasi. Kebutuhan oksigen pada mikroorganisme bergantung pada densitas sel dan kecepatan pertumbuhan. Volume media yang digunakan pada kultuur tidak lebih dari 20% dari volume total erlenmeyer agar tidak terjadi kekurangan asupan oksigen pada saat proses inkubasi (Hashsham, 2007). Waktu pemanenan ragi *R. graminis* adalah 36 jam inkubasi. Hal ini ditentukan berdasarkan kurva pertumbuhan yang telah dilakukan.

Setelah inkubasi 36 jam, sel dipanen dengan metode sentrifugasi pada suhu 20 °C dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Proses sentrifugasi dilakukan untuk memisahkan biomassa atau sel dari media pertumbuhan. Prinsip dari proses sentrifugasi adalah memisahkan suspensi partikel dengan pengendapan karena pengaruh gravitasi (Ohlendieck, 2010). Kultuur ragi *R. graminis* yang diperoleh dimasukkan dalam tabung sentrifuse dan diputar pada mesin rotor dengan kecepatan tinggi untuk meningkatkan laju pengendapan sel. Kecepatan pengendapan sel dipengaruhi oleh dua faktor, yaitu berat molekul dan bentuk partikel (Yuwono, 2010). Setelah proses sentrifugasi, biomassa (pelet) dan filtrat (supernatan) akan terpisah. Biomassa akan mengendap pada dasar tabung sentrifugasi dengan penampakan berbentuk koloid berwarna pink tua, sedangkan filtrat berwarna coklat seperti media sebelum diinokulasi dengan sel ragi. Penampakan dari biomassa ini dapat dilihat pada Gambar 4.3. Biomassa yang diperoleh dipisahkan dari filtrat, kemudian dicuci dengan 5 mL aquades steril dan disentrifugasi kembali. Pencucian dilakukan 3 kali hingga tidak ada filtrat yang tersisa pada biomassa. Tujuan dari pencucian biomassa dengan aquades steril adalah untuk menghilangkan media dari sel, agar saat penyimpanan sel

tidak rusak karena proses fermentasi. Sel yang diperoleh dari 1000 ml biakan adalah 22,8826 g sel basah. Sel yang diperoleh disimpan pada *freezer* suhu 0 °C agar sel membeku untuk proses liofilisasi.



Gambar 4.3 Biomassa *R. graminis* a) sebelum sentrifugasi, b) setelah sentrifugasi

Biomassa sebanyak 22,8826 g yang diperoleh dari 1000 mL kultur yang telah dibekukan kemudian diliofilisasi. Liofilisasi dilakukan dengan menggunakan alat *vacuum freeze dryer* pada tekanan 0,11 atm dan suhu -87 °C. Pada proses liofilisasi, kristal air akan menyublim, sehingga hanya didapatkan sel kering dari ragi *R. graminis* yang murni. Tujuan dari proses ini adalah untuk menghilangkan kadar air pada sel dengan menggunakan suhu rendah, karena sel dan kandungan zat warna akan rusak pada suhu tinggi.

Keuntungan dari proses liofilisasi adalah biakan bakteri dapat disimpan dalam waktu yang lama. Proses liofilisasi tidak akan mematikan sel ragi karena molekul-molekul air dalam protoplasma langsung diubah menjadi uap (sublimasi) sehingga tidak terjadi denaturasi protein (Devianti, 2012).

Ragi setelah proses liofilisasi didapatkan massa sel kering adalah 5,0154 g. Penampakan sel kering terlihat pada Gambar 4.4. Sel berwarna merah-oranye, berbentuk seperti plastik keras. Persentase berat sel kering terhadap sel basah adalah 21,92 %.



Gambar 4.4 Sel kering *R. graminis*

4.5 Pemisahan Lipid Total dan β -karoten dari *R. graminis*

Sel kering ragi sebanyak 2,6367 g hasil liofilisasi diekstrak menggunakan campuran pelarut metanol:kloroform (1:2) pada suhu 50 °C. Pelarut yang digunakan adalah campuran kloroform dan metanol karena campuran tersebut bersifat semipolar, yang kepolarannya mendekati kepolaran lipid, sehingga paling baik untuk mengekstrak lipid dalam sel (Devianti, 2012). Kombinasi dari metanol dan pelarut lain yang kurang polar lebih efektif untuk mengekstrak karoten dibandingkan dengan etanol, aseton, dan aseton/ metanol/ heksana (Carilho dkk; 2014). Sel diekstrak sebanyak 6 kali hingga didapatkan ekstrak dengan warna yang memudar. Penampakan dari hasil ekstraksi ini dapat dilihat pada Gambar 4.5. Ekstrak yang diperoleh berwarna jingga hingga

memudar berwarna kuning. Hal ini menggambarkan adanya zat warna karotenoid pada ragi tersebut.



Gambar 4.5 Ekstrak cair dari sel *R. graminis*

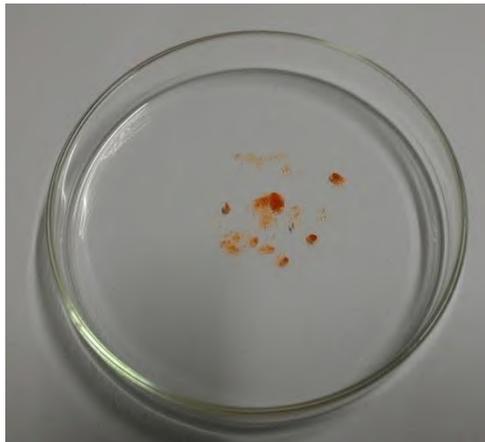
Ekstrak cair yang didapatkan dari sel *R. graminis* kemudian dievaporasi menggunakan *vacuum rotary evaporator* untuk menghilangkan pelarut yang ada. Prinsip dari proses evaporasi ini adalah vakum destilasi. Sampel dipanaskan di bawah suhu titik didih pelarut agar zat yang terkandung dalam pelarutnya tidak rusak saat dipanaskan. Lipid total yang diperoleh berwujud gel dan minyak berwarna jingga pekat atau coklat dengan massa 0,4795 g atau 18,18% dari berat sel kering. Penampakan dari hasil evaporasi dapat dilihat pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6 Lipid total sel *R. graminis*

Hasil ekstrak yang telah dievaporasi dipisahkan kandungan β -karotennya dengan dilarutkan dalam *n*-heksana, kemudian

diekstraksi dengan menambahkan metanol. Ekstraksi cair-cair ini menggunakan pelarut metanol:*n*-heksana (1:2) karena karoten akan lebih larut pada pelarut yang lebih non polar, senyawa-senyawa yang bersifat polar akan larut pada metanol. Dalam ekstraksi karoten, *n*-heksana digunakan sebagai pelarut utama dalam ekstraksi (Carilho dkk; 2014). Dari hasil ekstraksi didapatkan fasa *n*-heksana dan fasa metanol. Fasa yang berada di atas (*n*-heksana) adalah fasa yang mengandung β -karoten. Kemudian fasa *n*-heksana diekstrak lagi dengan menambahkan metanol. Ekstraksi dilakukan dengan pengulangan agar ekstrak yang didapatkan lebih murni. Ekstrak yang didapatkan kemudian dievaporasi dan ditimbang. Hasil dari ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 4.7. Ekstrak yang didapatkan berbentuk gel dan berwarna jingga, sebanyak 0,0416 gram atau 8,67% dari lipid total.



Gambar 4.7 Ekstrak yang mengandung β -karoten

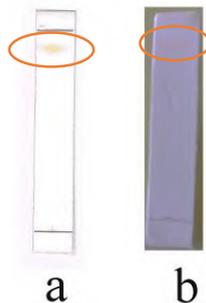
4.6 Identifikasi β -karoten menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sampel yang diperoleh dari ekstraksi cair-cair dianalisis lebih lanjut menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) untuk mengetahui kemurnian sampel. Metode kromatografi adalah

metode yang digunakan untuk menggambarkan pemisahan suatu campuran berdasarkan distribusi senyawa antara dua fasa yang terpisah (Spangenberg dkk; 2011).

Sampel ekstrak dan β -karoten standar masing-masing sebanyak 10 mg dilarutkan pada *n*-heksana kemudian ditotolkan pada plat silika alumunium yang telah diberi tanda garis atas dan garis bawah. Tanda garis atas dan garis bawah membantu memudahkan dalam pengamatan distribusi sampel pada plat KLT. Hal ini akan memudahkan dalam pengukuran nilai R_f sampel (Stahl dkk; 1965). Kemudian plat elusi pada gelas beker dengan eluen kloroform 100%. Pemilihan eluen didasarkan pada sifat dan kepolaran sampel. Menurut Britton (2013), β -karoten merupakan senyawa yang memiliki sifat kepolaran yang rendah (non polar) sehingga lebih mudah larut pada pelarut non polar. Pada uji KLT digunakan eluen kloroform karena kloroform merupakan pelarut yang cenderung bersifat non polar, sehingga akan memberikan distribusi noda yang bagus pada plat KLT.

Hasil plat KLT setelah elusi dapat dilihat pada Gambar 4.8. Pada plat ekstrak dan β -karoten standar terdapat satu noda berwarna jingga dan dapat terlihat tanpa bantuan lampu UV. Berdasarkan perhitungan, didapatkan nilai R_f 0,90 pada ekstrak dan 0,90 pada β -karoten standar. Nilai R_f dari sampel dan β -karoten standar adalah sama, dan memiliki penampakan warna noda yang sama. Dari nilai R_f dapat diketahui bahwa sampel adalah senyawa yang kurang polar karena memiliki nilai R_f yang mendekati 1 (Touchstone dan Dobbins, 1983). Noda berwarna jingga ini mengindikasikan bahwa sampel yang diperoleh mengandung karotenoid.

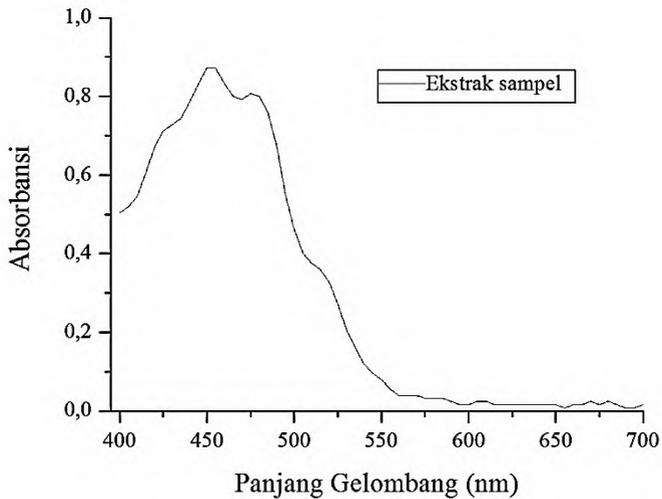


Gambar 4.8 Analisis KLT menggunakan kloroform 100%, a) β -karoten standar dan b) ekstrak sampel

Plat kemudian diamati pada lampu UV 254 nm dan 366 nm untuk melihat pemisahan sampel dan jika terdapat pengotor. Kedua lampu indikator ini membantu melihat posisi pemisahan sampel. Pada lampu UV 254 nm, plat silika akan berpendar sehingga subsatansi yang menyerap panjang gelombang ini akan tampak gelap dengan latar belakang yang berpendar warna kuning kehijauan (Touchstone dan Dobbins, 1983). Noda sampel tidak berpendar dan tidak terlihat pada indikator lampu UV 254 nm karena sampel tidak mengalami fluoresensi, serta tidak ada noda lain yang tampak. Sedangkan pada lampu UV 366 nm noda berpendar karena mengalami fluoresensi dan silika gel tidak, serta tidak terlihat noda lain.

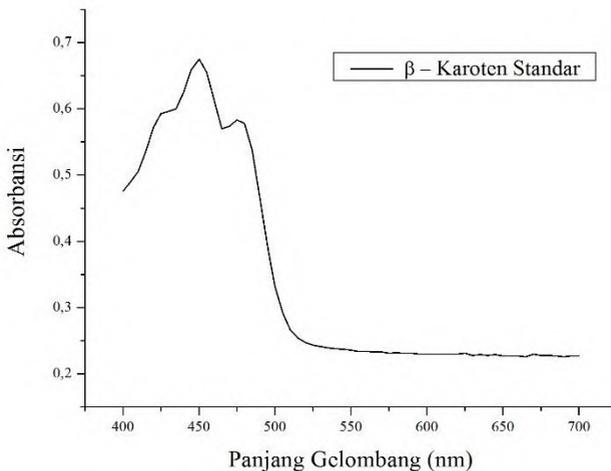
4.7 Identifikasi β -karoten menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Ekstrak yang diperoleh dari ekstraksi cair-cair kemudian dianalisa secara kualitatif menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Sampel diambil 20 mg kemudian dilarutkan pada 10 mL *n*-heksana dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400-700 nm. Hasil yang diperoleh dari spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada Gambar 4.9. Dari spektra UV-Vis dapat dilihat bahwa terdapat 3 puncak panjang gelombang maksimum pada sampel, yaitu pada λ_{maks} 425 nm, 450 nm, dan 475 nm.



Gambar 4.9 Spektra UV-Vis sampel

Analisis juga dilakukan pada β -karoten standar untuk dijadikan pembanding terhadap sampel. β -karoten standar dilarutkan dengan *n*-heksana dan diuji pada spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang yang sama dengan pengujian pada sampel. Hasil analisis spektrofotometer UV-Vis β -karoten standar dapat dilihat pada Gambar 4.10. Dari spektra UV-Vis dapat dilihat bahwa terdapat 3 puncak panjang gelombang maksimum pada β -karoten standar, yaitu pada λ_{maks} 425 nm, 450 nm, dan 475 nm.



Gambar 4.10 Spektra UV-Vis β -karoten standar

Puncak – puncak spektra UV-Vis tersebut muncul diakibatkan oleh adanya ikatan rangkap terkonjugasi yang menyerap cahaya sehingga terjadi transisi elektron (perpindahan elektron dari tingkat energi yang rendah ke tingkat energi yang lebih tinggi) (Hendayana dan Kodorahman, 2014). Panjang gelombang absorpsi (λ_{max}) dan bentuk spektrum pada spektrofotometer UV-Vis adalah karakteristik dari gugus kromofor. Menurut Rodriguez-Amaya (2001), puncak-puncak ini menunjukkan bahwa senyawa yang didapat adalah golongan karotenoid, karena memiliki puncak 3 spektrum yang berada pada range panjang gelombang 400-500 nm. Rodriguez-Amaya (2001) juga melaporkan bahwa senyawa β -karoten dalam pelarut *n*-heksana dan petroleum eter mempunyai serapan panjang gelombang maksimal pada tiga puncak yaitu pada 425, 450, 477 nm. Serapan sampel dan β -karoten standar yang dilakukan dibandingkan dengan Rodriguez-Amaya (2001) terjadi pergeseran panjang gelombang sebesar ± 2 nm. Rodriguez-Amaya dan Kimura

(2004) melaporkan perbedaan pembacaan panjang gelombang pada spektrofotometer pada rentang 400–500 nm adalah $\pm 1-2$ nm. Bentuk spektra dari ekstrak dan standar β -karoten yang dilakukan memiliki pola yang hampir sama dengan spektra β -karoten Rodriguez-Amaya (2001) pada Gambar 2.19.

4.8 Karakterisasi β -karoten menggunakan FTIR

Ekstrak yang diperoleh diambil sedikit dan digerus dengan KBr hingga homogen. Sampel kemudian dijadikan pelet dan dianalisis menggunakan FTIR. Data yang diperoleh terlampir di lampiran 6. Analisis ini bertujuan untuk mengetahui gugus fungsi yang ada pada senyawa.

Analisis FTIR dilakukan pada daerah jarak menengah yaitu pada bilangan gelombang dari 4000 hingga 400 cm^{-1} . Serapan khusus pita pada sampel terjadi pada bilangan gelombang tertentu. Serapan khusus ekstrak dibandingkan dengan serapan β -karoten standar pada Ammawath dan Che Man (2010) dapat dilihat pada Tabel 4.1.

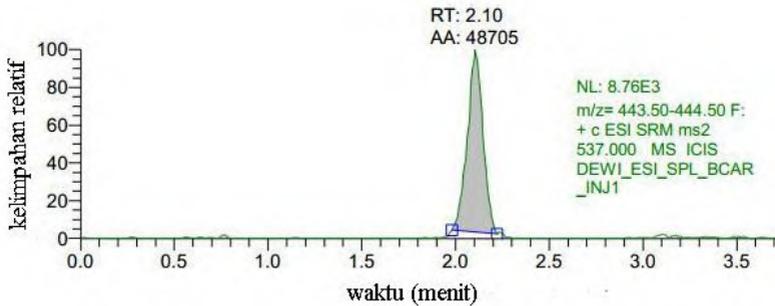
Jika diamati dari bilangan gelombang serapan yang diperoleh, dapat dijelaskan bahwa sampel tersebut mirip dengan spektra β -karoten standar karena memiliki serapan pita pada bilangan yang hampir sama. Serapan pada bilangan gelombang 2920 cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan C-H (sp^2) yang menyatakan alkena, bilangan gelombang 2850 cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan C-H (sp^3), bilangan gelombang 1462 menunjukkan adanya CH_2 *bending*. Terdapat serapan pada bilangan gelombang 1377 cm^{-1} yang menunjukkan adanya *splitting* gugus dimetil.

Tabel 4.1 Perbandingan nilai bilangan gelombang ekstrak dan β -karoten standar Ammawath (2010)

Ikatan	Bilangan gelombang sampel (cm^{-1})	Bilangan gelombang β -karoten standar (cm^{-1}) (Ammawath dan Che Man, 2010)
CH_2 dan CH_3 simetris dan asimetris vibrasi stretching	2920; 2850	2922; 2862
CH_2 scissoring	1462,09	1445
<i>Splitting</i> gugus dimetil	1377,22	1360
CH	1035,81	1033
Trans alkena terkonjugasi $\text{CH}=\text{CH}$	960,58	962

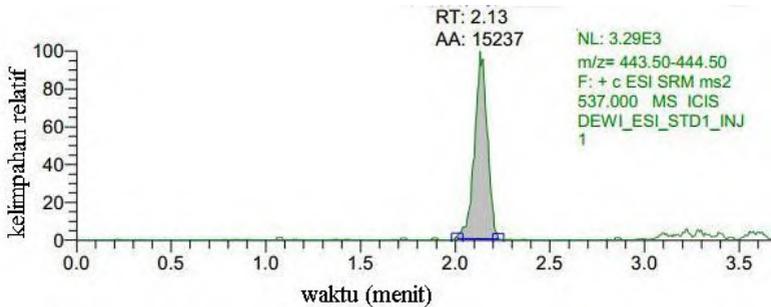
4.9 Identifikasi β -karoten menggunakan KCSM/LCMS

Sampel ekstrak yang didapat dianalisis menggunakan kromatografi cair spektrometer massa (LCMS). Analisis ini bertujuan untuk mengetahui kandungan β -karoten secara kuantitatif. Hasil ekstrak sebanyak 0,15 mg dilarutkan pada 1 ml aseton dan kemudian dianalisis pada KCSM pada massa molekul beta karoten yaitu m/z 537, dengan menggunakan ion positif dan produk ion m/z 443,50-444,50. Hasil kromatogram ekstrak dapat dilihat pada Gambar 4.11.



Gambar 4.11 Kromatogram sampel pada m/z 443,50-444,50

Kemudian dibuat kurva kalibrasi menggunakan β -karoten standar. β -karoten standar dianalisis pada LCMS pada massa molekul β -karoten yaitu m/z 537, dengan menggunakan ion positif dan produk ion m/z 443,50-444,50, dengan konsentrasi 0,250; 0,500; 0,750; dan 1,000 $\mu\text{g/L}$. Hasil kromatogram β -karoten standar pada konsentrasi 0,250 $\mu\text{g/L}$ dapat dilihat pada Gambar 4.12.



Gambar 4.12 Kromatogram β -karoten standar pada konsentrasi 0,250 $\mu\text{g/L}$

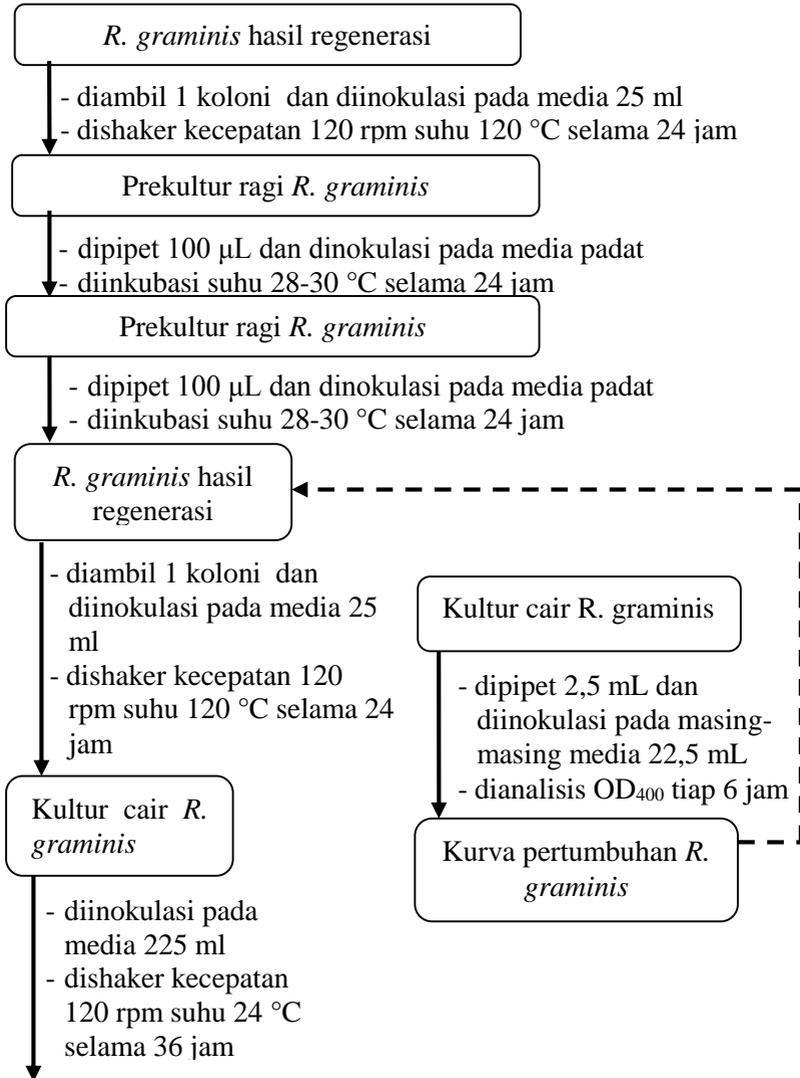
Pada gambar 4.10 dan 4.11 terlihat puncak yang muncul pada fragmentasi m/z 443,50-444,50. Analisis dilakukan pada fragmentasi ini karena β -karoten pada ion positif menjadi produk ion pada m/z 444,4 (Lucini dkk; 2012). Puncak sampel memiliki waktu retensi 2,10 dan memiliki luas area 48705. Sedangkan pada

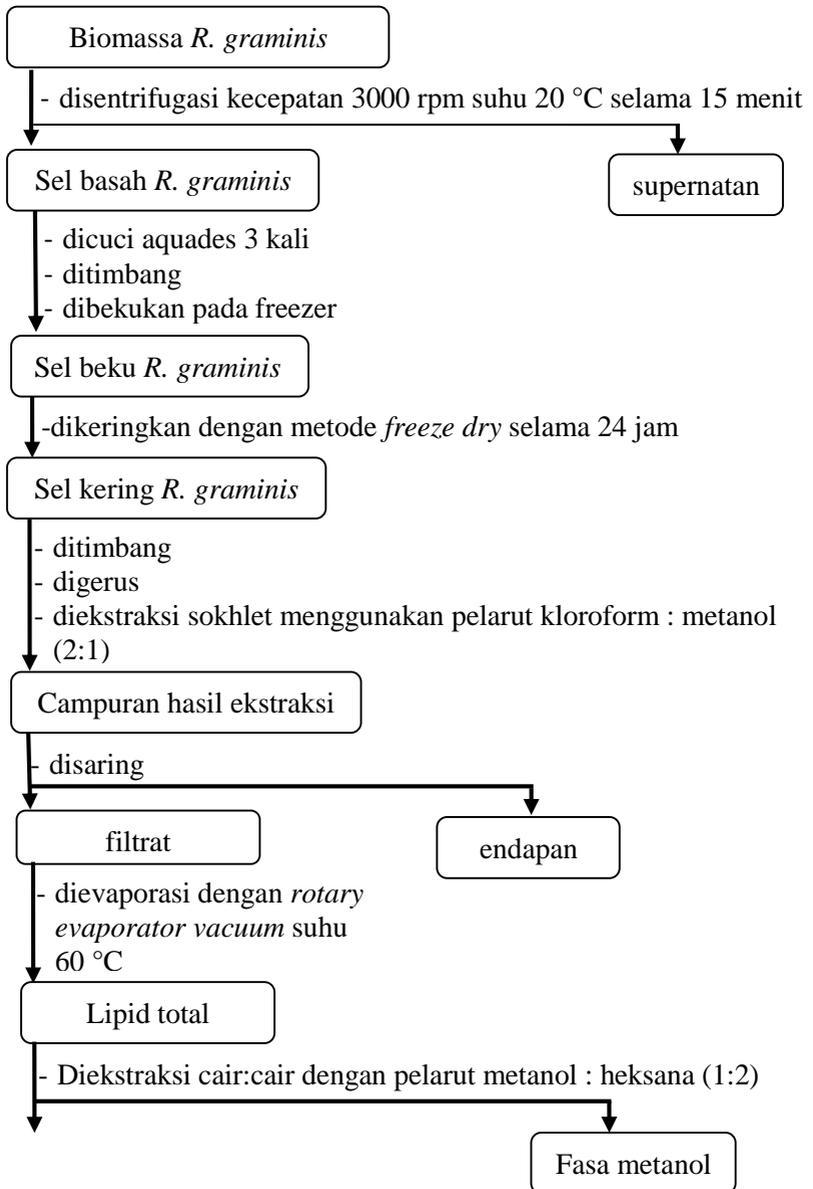
standar, didapatkan waktu retensi pada 2,13 dan luas area adalah 15237. Perbedaan luas puncak ini bisa disebabkan karena konsentrasi sampel dan standar yang berbeda.

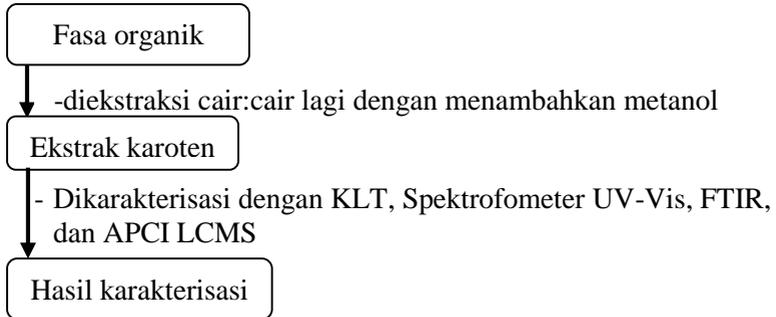
Dari hasil analisis β -karoten standar didapatkan data luas area puncak. Data luas puncak ini kemudian diplotkan dengan konsentrasi dan didapatkan persamaan $y = 66261x$, dengan y adalah luas area yang didapatkan dari proses analisis β -karoten standar, dan x adalah konsentrasi β -karoten standar. Dari persamaan tersebut dapat dilakukan perhitungan pada sampel untuk mengetahui kandungan β -karoten pada sampel. Dari perhitungan, didapatkan konsentrasi β -karoten pada sampel adalah 0,735 $\mu\text{g/ml}$.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”.

LAMPIRAN 1 SKEMA KERJA







LAMPIRAN 2 DATA DAN PERHITUNGAN

1. Komposisi Media Cair

- Glukosa = 10 gram
- Pepton = 5 gram
- *Yeast extract* = 3 gram
- Aquades = 1000 mL

2. Komposisi Media Padat

- Glukosa = 10 gram
- Pepton = 5 gram
- *Yeast extract* = 3 gram
- Agar = 15 gram
- Aquades = 1000 mL

3. Pembuatan 250 mL Larutan Stok A

Larutan stok A adalah larutan glukosa yang dibuat dengan faktor pemekatan 20. Jadi dibutuhkan 200 gram glukosa dalam 1 Liter pelarut.

$$\begin{aligned} \text{Massa glukosa} &= \frac{200 \text{ gram}}{1000 \text{ mL}} \times 250 \text{ mL} \\ &= 50 \text{ gram} \end{aligned}$$

4. Pembuatan 250 mL Larutan Stok B

Larutan stok B adalah larutan campuran pepton dan *yeast extract* dengan pemekatan 20 kali. Jadi dibutuhkan 100 gram pepton dan 60 gram *yaest extract* dalam 1 liter larutan.

$$\begin{aligned} \text{Massa pepton} &= \frac{100 \text{ gram}}{1000 \text{ mL}} \times 250 \text{ mL} \\ &= 25 \text{ gram} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa } \textit{yeast extract} &= \frac{60 \text{ gram}}{1000 \text{ mL}} \times 250 \text{ mL} \\ &= 15 \text{ gram} \end{aligned}$$

5. Pembuatan Media Cair

Media cair dibuat menggunakan campuran dari larutan stok A dan larutan stok B.

a) Untuk pembuatan 10 ml media cair

$$\begin{aligned} \text{Volume glukosa} &= 0,1 \text{ gram} : \frac{200 \text{ gram}}{1000 \text{ mL}} \\ &= 0,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume pepton} &= 0,05 \text{ gram} : \frac{100 \text{ gram}}{1000 \text{ mL}} \\ &= 0,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume yeast extract} &= 0,03 \text{ gram} : \frac{60 \text{ gram}}{1000 \text{ mL}} \\ &= 0,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

Jadi, dibutuhkan 0,5 mL stok A dan 0,5 mL stok B.

b) Media cair 25 mL dibuat dari larutan stok 1,25 mL A dan 1,25 mL larutan stok B

c) Media cair 50 mL dibuat dari 2,5 mL larutan stok A dan 2,5 mL larutan stok B

d) Media cair 250 mL dibuat dari 12,5 mL larutan stok A dan 12,5 mL larutan stok B

6. Pembuatan Media Padat

Media padat dibuat menggunakan campuran dari Agar, larutan stok A, dan larutan stok B. Dibutuhkan media agar sebanyak 15 gram dalam 1 liter media. Untuk membuat 20 petridish media agar, dibutuhkan 250 mL larutan media padat.

$$\begin{aligned} \text{Massa agar} &= \frac{15 \text{ gram}}{1000 \text{ mL}} \times 250 \text{ mL} \\ &= 3,75 \text{ gram} \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat media agar sebanyak 20 petridish dibutuhkan 3,75 gram agar, 12,5 larutan stok A, dan 12,5 larutan stok B.

7. Perhitungan Biomassa

Biomassa yang diperoleh dari pembiakan dalam 4x250 mL media cair adalah:

No.	Erlenmeyer ke-	Massa Sel Basah (g)
1.	1	5,535
2.	2	5,7979
3.	3	5,7959
4.	4	5,7538
Total		22,8826

Massa sel basah: 22,8826 gram/L

Massa sel kering: 5,0154 gram/L

$$\begin{aligned} \% \text{berat sel kering thd sel basah} &= \frac{5,0154 \text{ gram}}{22,8826 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 21,92 \% \end{aligned}$$

8. Perhitungan Ekstraksi Sel

Massa sel kering: 2,6367 gram

Massa residu: 1,4216 gram

$$\begin{aligned} \text{Massa sel terekstrak} &= 2,6367 \text{ gram} - 1,4216 \text{ gram} \\ &= 1,2151 \text{ gram} \end{aligned}$$

$$\% \text{ sel terekstrak} = \frac{1,2151 \text{ gram}}{2,6367 \text{ gram}} \times 100\% = 46,08 \%$$

9. Persentase Lipid Total

Persentase lipid total yang diperoleh dapat dihitung dari perbandingan massa lipid total dengan massa sel kering.

Massa lipid total yang diperoleh adalah 0,4795 gram.

$$\begin{aligned} \% \text{ lipid total} &= \frac{\text{m lipid total (g)}}{\text{m sel kering (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{0,4795 \text{ gram}}{2,6367 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 18,18 \% \end{aligned}$$

10. Persentase β -karoten

Persentase β -karoten yang diperoleh dapat dihitung dari perbandingan massa β -karoten dengan massa lipid total.

Massa β -karoten yang diperoleh adalah 0,0416 gram.

$$\begin{aligned}
 \% \beta\text{-karoten} &= \frac{m \beta\text{-karoten (g)}}{m \text{ lipid total (g)}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,0416 \text{ gram}}{0,4795 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 8,67 \%
 \end{aligned}$$

11. Perhitungan Nilai Rf

nilai Rf dari sampel yang dielusi menggunakan pelarut kloroform 100% dapat dihitung sebagai berikut:

jarak tempuh sampel: 3,8 cm

jarak tempuh eluen: 4,2 cm

$$Rf = \frac{\text{jarak yang ditempuh komponen (cm)}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut (cm)}}$$

$$\begin{aligned}
 Rf &= \frac{3,8 \text{ (cm)}}{4,2 \text{ (cm)}} \\
 &= 0,9047
 \end{aligned}$$

nilai Rf dari β -karoten standar yang dielusi menggunakan pelarut kloroform 100% dapat dihitung sebagai berikut:

jarak tempuh sampel: 4,6 cm

jarak tempuh eluen: 5,1 cm

$$Rf = \frac{\text{jarak yang ditempuh komponen (cm)}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut (cm)}}$$

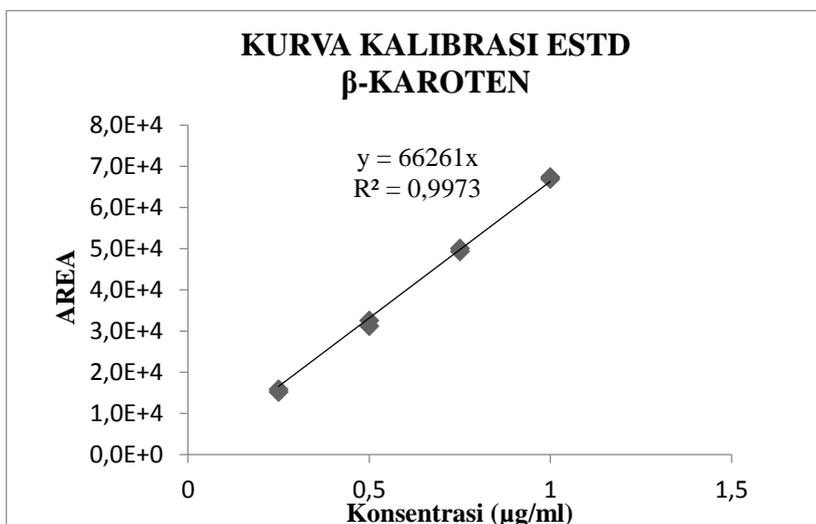
$$\begin{aligned}
 Rf &= \frac{4,6 \text{ (cm)}}{5,1 \text{ (cm)}} \\
 &= 0,9019
 \end{aligned}$$

12. Perhitungan Konsentrasi β -karoten dengan Metode LCMS

Konsentrasi β -karoten yang ada pada ekstrak dapat dihitung dengan menggunakan persamaan yang didapat pada *plotting* luas area dan konsentrasi dari β -karoten standar. Data yang diperoleh pada pembuatan kurva standar adalah sebagai berikut:

No	Nama STANDARD	Kons. ($\mu\text{g/mL}$)	(Area)
1	DEWI_ESI_STD1_INJ1	0,250	15237
	DEWI_ESI_STD1_INJ2	0,250	15844
2	DEWI_ESI_STD2_INJ1	0,500	32534
	DEWI_ESI_STD2_INJ2	0,500	31253
3	DEWI_ESI_STD3_INJ1	0,750	49369
	DEWI_ESI_STD3_INJ2	0,750	50045
4	DEWI_ESI_STD4U_INJ1	1,000	67358
	DEWI_ESI_STD4U_INJ2	1,000	66898

Dari data tersebut diperoleh kurva standar beta karoten pada m/z 537 adalah sebagai berikut:



Pada pengukuran sampel, diperoleh data area sebagai berikut:

No	Nama Sampel	Berat Sampel (mg)	Area
1	B_CAR_SPL_V0T0_in1	1,50	48.705
2	B_CAR_SPL_V0T0_in2	1,50	48.654
3	B_CAR_SPL_V0T0_in3	1,50	55.058

Sehingga untuk penghitungan konsentrasi sampel, dapat dihitung dengan persamaan $y = 66261x$. Injek sampel pertama, dapat dihitung konsentrasi sebagai berikut:

$$y = 66261x$$

$$x = \frac{y}{66261}$$

$$= \frac{65754}{66261}$$

$$= 0,735$$

Dan untuk injeksi selanjutnya dihitung dengan cara yang sama, dan diperoleh data sebagai berikut:

No	Nama Sampel	KONS. TKR ($\mu\text{g/ml}$)
1	B_CAR_SPL_V0T0_in1	0,74
2	B_CAR_SPL_V0T0_in2	0,73
3	B_CAR_SPL_V0T0_in3	0,83

LAMPIRAN 3
DATA PENGUKURAN KURVA
PERTUMBUHAN *R. graminis*

Berikut ini adalah data yang diperoleh dari pengukuran optical density *R. graminis* dengan metode turbiditas. Optical density adalah absorbansi.

Waktu (jam)	Optical Density (A)
0	0,152
3	0,154
6	0,315
12	0,579
18	0,811
24	1,037
30	1,232
36	1,445
42	1,442
48	1,422
54	1,422
60	1,441
66	1,328
72	1,336
78	1,308
84	1,313
90	1,321
96	1,290
102	1,270

LAMPIRAN 4
HASIL IDENTIFIKASI β -KAROTEN
MENGGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER UV-
Vis

Berikut adalah data serapan pada panjang gelombang 400-700 nm pada saat karakterisasi ekstrak menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Data diambil pada interval panjang gelombang 5.

Panjang Gelombang (λ)	Absorbansi (A)	Panjang Gelombang (λ)	Absorbansi (A)
400	0,063	515	0,045
405	0,065	520	0,041
410	0,068	525	0,034
415	0,076	530	0,026
420	0,084	535	0,020
425	0,089	540	0,015
430	0,091	545	0,012
435	0,093	550	0,010
440	0,098	555	0,007
445	0,104	560	0,005
450	0,109	565	0,005
455	0,109	570	0,005
460	0,104	575	0,004
465	0,100	580	0,004
470	0,099	585	0,004
475	0,101	590	0,003
480	0,101	595	0,002
485	0,095	600	0,002
490	0,084	605	0,003
495	0,069	610	0,003
500	0,058	615	0,002
505	0,050	620	0,002
510	0,047	625	0,002

630	0,002	670	0,003
635	0,002	675	0,002
640	0,002	680	0,003
645	0,002	685	0,002
650	0,002	690	0,001
655	0,001	695	0,001
660	0,002	700	0,002
665	0,002		

LAMPIRAN 5

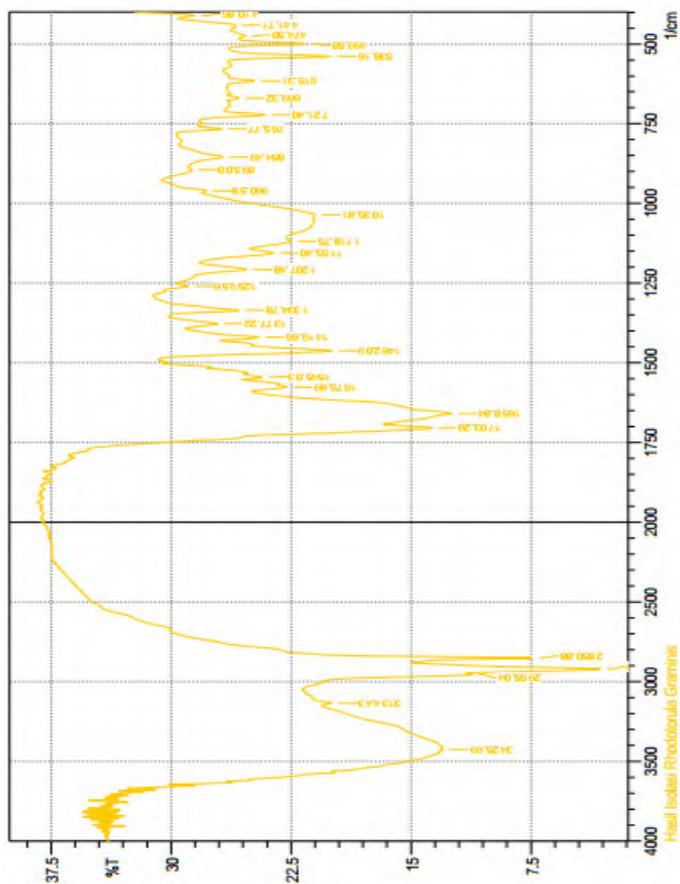
HASIL IDENTIFIKASI β -KAROTEN STANDAR MENGUNAKAN SPEKTRIFOTOMETER UV- Vis

Berikut adalah data serapan pada panjang gelombang 400-700 nm pada saat karakterisasi β -karoten standar menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Data diambil pada interval panjang gelombang 5.

Panjang Gelombang (λ)	Absorbansi (A)	Panjang Gelombang (λ)	Absorbansi (A)
400	0,476	515	0,254
405	0,49	520	0,247
410	0,506	525	0,243
415	0,536	530	0,241
420	0,572	535	0,239
425	0,593	540	0,238
430	0,596	545	0,237
435	0,6	550	0,236
440	0,625	555	0,234
445	0,659	560	0,234
450	0,675	565	0,233
455	0,655	570	0,233
460	0,612	575	0,231
465	0,57	580	0,232
470	0,574	585	0,231
475	0,583	590	0,231
480	0,578	595	0,230
485	0,538	600	0,230
490	0,467	605	0,230
495	0,396	610	0,230
500	0,333	615	0,230
505	0,292	620	0,230
510	0,266	625	0,231

630	0,228	670	0,230
635	0,229	675	0,228
640	0,228	680	0,228
645	0,229	685	0,227
650	0,227	690	0,226
655	0,227	695	0,227
660	0,227	700	0,227
665	0,226		

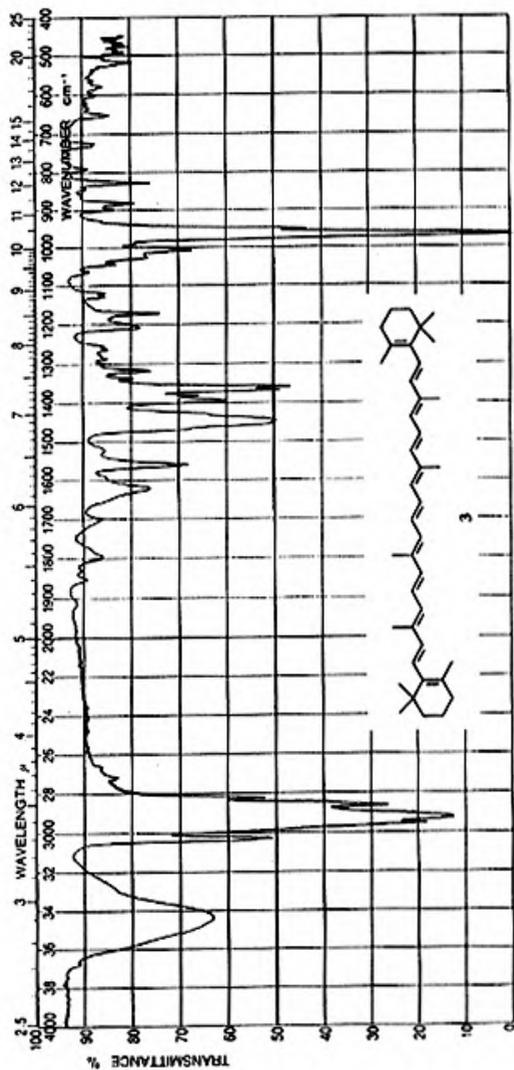
LAMPIRAN 6 HASIL KARAKTERISASI EKSTRAK SAMPEL MENGUNAKAN FTIR



Berikut adalah data yang diperoleh pada saat karakterisasi ekstrak menggunakan FTIR:

	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	410.85	28.489	2.318	420.5	399.28	11.218	0.397
2	441.71	25.985	0.571	445.57	420.5	14.129	0.159
3	474.5	25.371	0.579	484.15	455.22	17.034	0.123
4	499.58	21.633	4.462	513.08	484.15	17.775	0.884
5	538.16	20.018	6.398	555.52	513.08	26.001	1.463
6	615.31	24.773	1.642	632.67	601.81	18.122	0.282
7	669.32	25.755	0.766	677.04	661.81	9.013	0.119
8	721.4	24.115	3.141	740.69	709.83	17.941	0.609
9	765.77	26.852	1.809	786.98	758.05	15.778	0.209
10	854.49	26.776	2.403	883.43	815.92	37.034	0.969
11	895	28.706	0.619	925.86	885.36	21.553	0.199
12	960.58	27.796	0.47	964.44	927.79	19.502	0.058
13	1035.81	20.987	0.826	1043.52	966.37	47.496	0.435
14	1118.75	22.515	0.943	1141.9	1109.11	20.732	0.313
15	1155.4	23.592	2.37	1184.33	1143.83	24.047	0.701
16	1207.48	25.282	3.426	1249.91	1186.26	35.55	1.245
17	1259.56	28.932	1.007	1271.13	1251.84	10.237	0.144
18	1334.78	25.773	4.555	1350.22	1288.49	33.103	1.347
19	1377.22	27.103	2.432	1392.65	1356	19.983	0.612
20	1419.66	24.487	3.025	1429.3	1392.65	20.952	0.693
21	1462.09	19.943	7.456	1485.24	1444.73	25.08	2.471
22	1545.03	24.32	1.21	1552.75	1535.39	10.496	0.201
23	1575.89	22.756	1.194	1589.4	1568.18	13.331	0.237
24	1658.84	12.443	6.875	1691.63	1591.33	77.865	8.654
25	1703.2	13.717	5.339	1770.71	1693.56	49.167	2.289
26	2850.88	7.39	9.773	2879.82	2679.21	131.37	5.31
27	2920.32	3.17	9.799	2947.33	2881.75	72.322	14.665
28	2955.04	11.194	1.168	3049.56	2947.33	75.629	-6.035
29	3134.43	19.946	0.857	3151.79	3109.35	29.2	0.308
30	3425.69	12.999	0.159	3443.05	3414.12	25.541	0.077

Berikut adalah spektrum FTIR pada β -karoten standar:



“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian yang telah dilakukan adalah bahwa *R. graminis* NBRC 0190 mengandung senyawa β -karoten. Senyawa yang diperoleh berbentuk seperti gel minyak berwarna jingga. Ragi mengandung lipid total sebesar 0,4795 g dari total sel kering 2,6367 g, atau sebanyak 18,18% dari berat sel kering dan lipid non polar (β -karoten) sebanyak 0,0416 g atau 8,67% dari berat lipid total. Dari analisis LCMS dapat diketahui bahwa kadar β -karoten pada *R. graminis* NBRC 0190 adalah 0,735 $\mu\text{g/mL}$.

5.2 Saran

Penelitian ini masih perlu dilanjutkan dengan melakukan uji aktivitas seperti uji antioksidan ataupun uji lain sehingga dapat memberikan kontribusi pada bidang kesehatan maupun industri.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR PUSTAKA

- Ami, D., Posteri, R., & Paolo, M. (2014). Fourier Transform Infrared Spectroscopy As A Method To Study Lipid Accumulation In Oleaginous Yeasts. *Journal Bitechology for Biofuels*, 7-12.
- Ammawath, W., & Che Man, Y. (2010). A rapid method for determination of commercial β -carotene in RBD palm olein by Fourier transform infrared spectroscopy. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 443-452.
- Anam, C., & Sirojudin. (2007). *Analisis Gugus Fungsi Pada Sampel Uji Bensin dan Spiritus Menggunakan Spektroskopi FTIR*. Jakarta: Berkala Fisika.
- Arifulloh. (2013). *Ekstraksi Likopen dari Buah Tomat (*Lycopersicum esculentum* Mill.) dengan Berbagai Komposisi Pelarut*. Jember: Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- Armstrong, G. A. (1997). Genetics of Eubacterial Carotenoids Biosynthesis: A Colorful Tale. *Annu. Rev. Microbiol.*, 629–659.
- Bellanger, A.-P., Grenouillet, F., Francois, N., Skana, F., & Millon, L. (2013). Inhibitory Effect of Chromogenic Culture Media on The Growth of *Rhodotorula*: Relevance to The Diagnosis of *Rhodotorula* spp. Infections. *Acta Pathologica Microbiologica Et Immunologica Scandinavica*, 1109-1117.
- Bergman, L. W. (2001). Growth and Maintenance of Yeast. Dalam P. N. MacDonald, *Methods in Molecular Biology Vol. 177, Two-Hybrid Systems: Methods and Protocols* (hal. 9-40). Totowa: Humana Press Inc.

- Berra, W. G. (2012). HPLC Method Optimization and Validation for Determination of Lycopene in Tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) Fruits. *Science, Technology and Arts Research Journal*, 16.
- Britton, G., Jensen, S. L., & Pfander, H. (2013). Carotenoids Volume IA: Isolation and Analysis. Dalam Arifullah, *Ekstraksi Likopen dari Buah Tomat (Lycopersicum esculentum Mill.) dengan Berbagai Komposisi Pelarut* (hal. 9). Jember: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- Carilho, K. T., Cepeda, A., Regal, P., & Fente, C. (2014). Review of Method for Analysis of Carotenoid. *Trends in Analytical Chemistry* 46, 49-73.
- Choo, Y. M., & Basiron, Y. (2013). Palm Oil Carotenoids. J. Food and Nutrition Bulletin. Dalam Yulianti, *Ekstraksi β -Karoten dari Wortel dengan Pelarut Heksana dan Petroleum Eter* (hal. 8-11). Makassar: Program Pasca Sarjana.
- Das, A., Yoon, S.-H., & Lee, S.-H. (2007). An Update on Microbial Carotenoid Production: Application of Recent Metabolic Engineering Tools. *Appl Microbiol Biotechnol*, 505.
- Devianti, V. (2012). *Pola Asam Lemak Bakteri yang Diduga Algaligenes Latus*. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Durham, D. R., McNamee, C. G., & Stewart, D. B. (1984). Dissimilation of Aromatic Compounds in *Rhodotorula graminis*: Biochemical Characterization of Pleiotropically Negative Mutants. *Journal of Bacteriology*, 771-777.
- Goodwin, T. W. (1980). *The Biochemistry of the the Carotenoids volume 1: Plants*. London: Chapman and Hall.

- Guillen, M. D., & Cabo, N. (1997). Infrared Spectroscopy in the Study of Edible Oils and Fats. *Science Food Agriculture*, 1-11.
- Harjadi, W. (1993). *Ilmu Kimia Analitik Dasar*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Hartman, L., Hawke, J. C., Shorland, F. B., & di Menna, M. E. (1959). The Fatty Acid Composition of *Rhodotorula graminis* Fat. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 81, 346-352.
- Hashsham, S. A. (2007). Culture Techniques. Dalam C. A. Reddy, T. J. Beveridge, & J. A. Breznak, *Methods for General and Molecular Microbiology 3rd Edition* (hal. 270-285). Washington D. C.: ASM Press.
- Heckly, R. (1961). Preservation of Bacteria by Lyophilization. Dalam W. W. Umbreit, *Advances in Applied Microbiology vol. 3* (hal. 1). New York: Academic Press.
- Hendayana, S., & Kodorahman, A. (2014). Analitik Instrument. Dalam T. Octaviani, & A. Guntarti, *Penetapan Kadar β -Karoten pada Beberapa Jenis Cabe (Genus *Capsicum*) dengan Metode Spektrofotometri Tampak* (hal. 104-105). Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan.
- Horning, E. C., & Carroll, D. (1974). Liquid Chromatograph-mass spectrometer- computer analytical systems: A continuous-flow system based on atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A volume 99*, 13-21.
- Isler, O. (1971). *Carotenoids*. Basle Switzerland: Springer Basel AG.
- ITIS, R. (2004). *ITIS Standard Report Page: Rhodotorula graminis*. Dipetik Juli 6, 2015, dari ITIS Report: http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=194706/

- Kaur, B., Chakraborty, D., & Kaur, H. (2008). Production and Stability Analysis of Yellowish Pink Pigments from *Rhodotorula rubra* MTCC 1446. *The Internet Journal of Microbiology* volume 7, 1-7.
- Khopkar, S. (2003). *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI-Press.
- Kohlstadt, I. (2013). *Advancing Medicine with Food and Nutrients, Second Edition*. Boca Raton: CRC Press.
- Kurtzman, C. P., & Fell, J. W. (1998). *The Yeast: A Taxonomic Study Fourth Edition*. Amsterdam: Elsevier Science B. V.
- Landgrebe, J. (1972). Theory and Practice in the Organic Laboratory. Dalam A. J. Gordon, & R. A. Ford, *The Chemist's Companion* (hal. 3-14). Canada: John Wiley & Son Inc.
- Latha, B. V., Jeevaratnam, K., Murali, H. S., & Manja, K. S. (2005). Influence of Growth Factor on Carotenoids Pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from Natural Source. *Indian Journal of Biotechnology* vol. 4, 353-357.
- Lucini, L., Pellizzoni, M., & Baffi, C. (2012). Rapid determination of lycopene and β -carotene in tomato by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Journal Science Food Agriculture*, 12997-1303.
- Malik, K. (1990). A Simplified Liquid-Drying Method for the Preservation of Microorganisms Sensitive to Freezing and Freeze-Drying. *Journal of Microbiological Methods* 12, 125-132.
- Menna, M. E. (1958). Two New Species of Yeasts from New Zealand. *Journal General Microbiology* 18, 269-272.
- Moh, M., Man, Y. C., Badlishah, B., & Jinap, S. (1999). Quantitative Analysis of Palm Carotene Using Fourier

Transform Infrared and Near Infrared Spectroscopy. *JAACS vol. 76*, 249-255.

- Moline, M., Libkind, D., & Broock, M. v. (2012). Production of Torularhodin, Torulene, and b-Carotene by *Rhodotorula* Yeasts. *Microbial Carotenoids From Fungi: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 898*, 275-283.
- NBRC. (2004, Juni 1). *Microorganisms Distribution Catalogue more Information*. Dipetik Maret 1, 2015, dari National Institute of Technology and Evaluation: <http://www.nbrc.nite.go.jp/NBRC2/NBRCMediumDetailServlet?NO=703>
- Ohlendieck, K. (2010). Centrifugation. Dalam K. Wilson, & J. Walker, *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology 7th Edition* (hal. 73-99). Cambridge: Cambridge University Press.
- Padmawinata, K. (1985). *Analisis Obat Secara kromatografi dan Mikroskopi*. Bandung: ITB.
- Postgate, J. (1994). *The Outer Reaches of Life*. New York: Cambridge University Press.
- Riet, K. v., & Lievens, L. C. (1994). Convective Drying of Bacteria: II. Factors Influencing Survival. Dalam A. Fiechter, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol. 51* (hal. 71-89). Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Rodrigues-Amaya, D. B., & Kimura, M. (2004). *Handbook for Carotenoid Analysis*. Washington DC: HarvestPlus.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2001). *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. Washington DC: ILSI PRESS.
- Selfi, Z., Mahmoudabadi, A. Z., & Hydrinia, S. (2013). Isolation, Identification, and Susceptibility Profile of *Rhodotorula*

- Species Isolated from Two Educational Hospitals in Ahvaz. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 1-7.
- Serlahwaty, D., Farida, Y., & Asriyana, T. (2009). Penetapan Kadar β -Karoten dalam Buah Paprika Merah, Kuning dan Hijau (*Capsicum annum* var. *annuum* L.) secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Seminar Nasional PATPI (Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia)*, 1-7.
- Sherman, F. (1997). Yeast Genetics. Dalam R. A. Meyers, *The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine* 6 (hal. 302-325). Weinheim: VCH Pub.
- Silverstein. (1991). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5th ed.,. New York: John Wiley & Sons.
- Sizer, F. S., & Whitney, E. (2006). *Nutrition: Concepts and Controversies*. Belmont, USA: Thomson Higher Education.
- Spangenberg, B., Poole, C. F., & Weins, C. (2011). *Quantitative Thin-Layer Chromatography: A Practical Survey*. Berlin : Springer.
- Spencer, J., & Tulloch, A. (1964). Extracellular Glycolipids of *Rhodotorula* Species. *Canadian Journal of Chemistry*, 42.
- Stahl, E. (2009). Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi. Dalam M. Dewina A. P., *Pengoptimuman Fase Gerak KLT Menggunakan Desain Campuran untuk Pemisahan Komponen Ekstrak Meniran (Phyllanthus niruri)* (hal. 1-4). Bogor: Departemen Kimia FMIPA IPB.
- Stahl, E., Bolliger, H. R., & Brenner, M. (1965). *Thin-Layer Chromatography A Laboratory Handbook*. New York: Academic Press Inc.
- Sun, B., Lin, Y., & Wu, P. (2007). Structure Analysis of Poly(N-isopropylacrylamide) Using Near-Infrared Spectroscopy

- and Generalized Two-Dimensional Correlation Infrared Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* volume 61, 765-771.
- Touchstone, J. C., & Dobbins, M. F. (1983). *Practice of Thin Layer Chromatography*. Canada: John Wiley & Sons.
- Tulloch, A. P., & Spencer, J. F. (1964). Extracellular Glycolipids of *Rhodotorula* Species. *Canadian Journal of Chemistry*. Volume 42 , 830-835.
- Vachali, P., Bhosale, P., & Bernstein, P. S. (2012). Microbial Carotenoids. Dalam J.-L. Barredo, *Microbial Carotenoids From Fungi: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 898 (hal. 41-59). New York: Springer Science+Business Media .
- Van Uden, N. (1984). *Temperature profiles of yeasts: Advances in Microbial Physiology*. West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd.
- Walker, G. M. (2000). *Yeast Physiology and Biotechnology*. West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd.
- Wallford, J. (2013). Development in Food Colours-1 Applied Science. Dalam *Ekstraksi β -Karoten dari Wortel dengan Pelarut Heksana dan Petroleum Eter* (hal. 28-30). Makassar: Universitas Hasanuddin.
- Willey, J. M., Sheerwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2009). *Prescott's Principle of Microbiology*. New York: McGraw-Hill Higher Education.
- Wilson, I., Poole, & Edward, R. (2013). Encyclopedia of Separation Sciens. Dalam Arifulloh, *Ekstraksi Likopen dari Buah Tomat (*Lycopersicum esculentum* Mill.) dengan Berbagai Komposisi Pelarut* (hal. 1-10). Jember: Kimia FMIPA Universitas Jember.

- Ye, Z.-W., Jiang, J.-G., & Wu, G.-H. (2008). Biosynthesis and Regulation of Carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and Prospects. *Biotechnology Advances* 26, 352–360.
- Yuwono, T. (2010). Makromolekul dan Interaksi Molekular. Dalam T. Yuwono, *Biologi Molekular* (hal. 22-37). Jakarta: Penerbit Erlangga.

BIODATA PENULIS



Penulis bernama lengkap Dewy Fatimah Tri Ary Murti. Penulis dilahirkan di Kediri pada tanggal 7 Juli 1992. Penulis merupakan anak ketiga dari 5 bersaudara. Penulis telah menempuh pendidikan di TK ABA II (1997-1999), SDN Tulungrejo 1 (1999-2005), MTs N 1 Pare (2005-2008), SMA Negeri 1 Pare (2008-2011), dan S1 di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam ITS Surabaya (2011-2016). Penulis diterima di ITS melalui jalur SNMPTN tulis dan terdaftar dalam nomor registrasi pokok

1411100130. Selama kuliah, penulis mengikuti LDJ sebagai staff Keputrian periode kepengurusan 2012-2013 dan 2013-2014 jurusan Kimia ITS. Penulis pernah melakukan kerja praktek di PT. IPAL-SIER dan di tempatkan di laboratorium Analisis Limbah dan Hasil Pengolahannya.

Semasa kuliah penulis mengambil kolokium bidang Kimia Mikroorganisme dan tugas akhir di bawah bimbingan Prof. Surya Rosa Putra, MS dan Drs. Refdinal Nawfa, MS. Pada masa akhir studi, penulis melakukan penelitian mengenai isolasi dan identifikasi kandungan β -karoten dari ragi *Rhodotorula graminis* NBRC 0190. Penulis berharap dari hasil penelitian yang ditulis dalam skripsi ini dapat memberikan manfaat dalam pengembangan ilmu pengetahuan di bidang kimia, khususnya kimia mikroorganisme.

Penulis dapat dihubungi di:

e-mail: dewifatimah60@gmail.com

mobile: 082231634569/ 085649777849

“Halaman ini sengaja dikosongkan”