PENENTUAN LIPID DALAM KHAMIR *Rhodotorula* DARI TAMAN NASIONAL GUNUNG HALIMUN

SURYANI

0304040737

UNIVERSITAS INDONESIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

DEPARTEMEN BIOLOGI

DEPOK

2008

PENENTUAN LIPID DALAM KHAMIR *Rhodotorula* DARI TAMAN NASIONAL GUNUNG HALIMUN

Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat

untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

Oleh:

SURYANI

0304040737

DEPOK

2008

SKRIPSI : PENENTUAN LIPID DALAM KHAMIR *Rhodotorula* DARI TAMAN NASIONAL GUNUNG HALIMUN

NAMA : SURYANI

NPM : 0304040737

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, 9 JULI 2008

ARIYANTI OETARI, Ph.D.	DR. TRI PANJI, MS, APU.
PEMBIMBING I	PEMBIMBING II

Tanggal lulus ujian sidang: 16 Juli 2008

Penguji I	: Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D.	(……)
Penguji II	: Dra. Setiorini, M.Kes.	(……)
Penguji III	: Dra. Sitaresmi Ismangil, M.Sc.	(……)

The message of a master

"I am master of my own destiny
and I can make my life anything
that I wish it to be"

- John McDonald -

Dedicated to
the happiness of all sentient beings

KATA PENGANTAR

Namo Buddhaya. Penulis panjatkan puji dan syukur kepada Triratna yang telah memberikan rahmat-Nya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu Ariyanti Oetari, Ph.D. selaku pembimbing I dan Bapak Dr. Tri Panji, MS, APU selaku pembimbing II atas segala bantuan, bimbingan, pengetahuan, serta masukan yang diberikan selama penulis menjalankan penelitian dan penulisan skripsi. Penulis juga menghaturkan terima kasih kepada kedua orang tua dan keluarga yang selalu memberikan doa, dukungan, dan kasih sayang.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D., Ibu Dra. Setiorini, M.Kes., dan Ibu Dra. Sitaresmi Ismangil, M.Sc. yang telah banyak memberikan masukan selama penyusunan skripsi ini. Ucapan terima kasih kepada Ibu Dra. Sitaresmi Ismangil, M.Sc. selaku Penasehat Akademik atas segala bimbingan dan nasehat yang telah diberikan selama ini. Terima kasih juga kepada seluruh staf pengajar Departemen Biologi FMIPA UI yang telah memberikan ilmu pengetahuan kepada penulis.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Ibu Retno Lestari, M.Si. (Lab. Genetika), Bapak Danuwarsa, dan Dr. Tri Panji, MS, APU (Lab. Bioproses, Balai Bioteknologi Perkebunan Indonesia) atas fasilitas yang telah diberikan. Ucapan terima kasih kepada seluruh karyawan Departemen Biologi atas bantuannya selama ini.

Kepada teman-teman seperjuangan, Maryanty, Novita, Putri, Rahany, Allein, Chaki, Putra, adik-adik Kerja Praktik, dan kakak-kakak S2 dan S3, serta pak Pri, Kak Hisni, Kak Fitri, Kak Reno di Laboratorium Mikrobiologi, terima kasih atas segala bantuan dan persahabatan selama ini. Terima kasih kepada teman-teman "Baliveau", adik-adik biologi, Keluarga Mahasiswa Buddhis Universitas Indonesia (KMBUI), dan sahabatku Xiao Ling yang telah memberikan keceriaan selama ini.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam skripsi ini. Walaupun demikian, penulis berharap skripsi ini dapat memberikan banyak manfaat bagi dunia ilmu pengetahuan.

Penulis

2008

ABSTRAK

Khamir *oleaginous* dari genus *Rhodotorula* dapat memproduksi lipid dengan kandungan asam lemak tertentu. Penelitian dilakukan untuk mengetahui persentase lipid total, kelas lipid, dan komposisi asam lemak khamir *Rh. acheniorum* SD4233, *Rh. glutinis* L4236, *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-283, *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402, dan *Rh. nothofagi* UICC-Y-253 milik UICC dari Taman Nasional Gunung Halimun. Penelitian dilakukan di Departemen Biologi, FMIPA UI, Depok dan Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor dari September 2007--April 2008. Hasil kurva pertumbuhan menunjukkan strain khamir *Rh. acheniorum* SD4233, *Rh. glutinis* L4236, *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402, dan *Rh. nothofagi* UICC-Y-253 memiliki waktu yang sama untuk pencapaian fase stasioner dalam mengakumulasi lipid, yaitu pada jam ke-72, sedangkan *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-283 pada jam ke-96. Ekstraksi lipid khamir menggunakan heksana dengan alat *Soxhlet* dan tanpa alat *Soxhlet*. Kelas lipid dideteksi dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dan komposisi asam lemak dideteksi dengan kromatografi gas-cair (KGC). Strain khamir *Rh. acheniorum* SD4233 memiliki persentase lipid total tertinggi sebesar 19,19%. Strain khamir *Rh. nothofagi* UICC-Y-253 memiliki persentase lipid total tertinggi kedua sebesar 10,76% dengan kandungan asam linoleat tertinggi sebesar 32,15% dibandingkan empat strain khamir lain. Lipid lima strain khamir mengandung ergosterol, 1,2-diolein, dan triolein. Mono-olein hanya terdeteksi pada strain

Rh. acheniorum SD4233, *Rh. glutinis* L4236, dan *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402, sedangkan 1,3-diolein tidak terdeteksi pada lipid kelima strain khamir. Strain *Rh. acheniorum* SD4233 mengandung asam laurat 0,35%, miristat 13,60%, palmitat 38,80%, stearat 1,28%, oleat 27,62%, dan linoleat 18,76%. Strain *Rh*. *glutinis* L4236 mengandung asam laurat 11,38%, miristat 7,50%, palmitat 33,94%, stearat 1,63%, oleat 29,27%, dan linoleat 15,18%. Strain *Rh*. *mucilaginosa* UICC-Y-283 mengandung asam laurat 12,61%, miristat 5,80%, palmitat 29,14%, stearat 0,76%, oleat 35,99%, dan linoleat 15,70%. Strain *Rh*. *mucilaginosa* UICC-Y-402 mengandung asam laurat 2,00%, miristat 8,81%, palmitat 27,99%, stearat 1,81%, dan oleat 60,28%. Strain *Rh*. *nothofagi* UICC-Y-253 mengandung asam laurat 5,05%, miristat 3,96%, palmitat 28,41%, oleat 30,43%, dan linoleat 31,15%.

Kata kunci: asam linoleat; 1,2-diolein, ergosterol; lipid total; mono-olein; *Rhodotorula*; triolein.

x + 102 hlm; gbr; tab; lamp.

Bibliografi : 99 (1960--2008)

DAFTAR ISI

Halaman

KATA PENGANTAR..... i

ABSTRAK..... iii

DAFTAR ISI..... v

DAFTAR GAMBAR..... viii

DAFTAR TABEL..... ix

DAFTAR LAMPIRAN..... x

BAB I. PENDAHULUAN..... 1

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA..... 5

A. Lipid..... 5

B. Asam lemak..... 7

C. Potensi lipid dari mikroorganisme..... 11

D. Lipid pada khamir..... 13

E. Khamir *Rhodotorula* F.C. Harrison..... 16

1. *Rhodotorula acheniorum* (Buhagiar & J.A. Barnett) Rodrigues de Miranda..... 17

2. *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) F.C. Harrison..... 18

3. *Rhodotorula mucilaginosa* (Jörgensen) F.C. Harrison..... 18

4. *Rhodotorula nothofagi* (Ramirez & González) Roeijmans, van Eijk & Yarrow..... 19

F. Perbanyakan biomassa..... 19

G. Analisis lipid..... 20

BAB III. BAHAN DAN CARA KERJA..... 26

A. Lokasi dan waktu penelitian..... 26

B. Bahan..... 26

1. Mikroorganisme..... 26

2. Medium..... 26

3. Bahan kimia..... 27

C. Peralatan..... 27

D. Cara kerja..... 28

1. Pembuatan medium..... 28

2. Pembuatan koloni tunggal representatif..... 28

3. Pembuatan *stock culture* dan *working culture*..... 29

4. Pengamatan makroskopik koloni..... 29

5. Pengamatan mikroskopik dan pengukuran sel..... 29

6. Pembuatan suspensi sel 30

7. Penghitungan jumlah sel 30

8. Penentuan kurva pertumbuhan..... 31

9. Perbanyakan biomassa..... 31

10.Penentuan biomassa kering..... 32

11.Ekstraksi lipid..... 32

12.Penentuan persentase lipid total..... 34

13.Penentuan kelas lipid..... 34

14.Penentuan komposisi asam lemak..... 35

15.Penyusunan dan analisis data..... 36

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN..... 37

A. Pengamatan makroskopik koloni dan mikroskopik sel..... 37

B. Kurva pertumbuhan dan waktu pemanenan biomassa..... 39

C. Persentase lipid total..... 47

D. Kelas lipid..... 50

E. Komposisi asam lemak..... 55

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN..... 60

A. Kesimpulan..... 60

B. Saran..... 61

DAFTAR ACUAN..... 62

DAFTAR GAMBAR

Gambar Halaman

1. Biosintesis lipid pada mikroorganisme *oleaginous*..... 75

2. Sintesis asam lemak jenuh dan tidak jenuh..... 76

3. Tetes-tetes lemak dalam sel *Saccharomyces cerevisiae*..... 77

4. Lima strain khamir berumur 72 jam pada medium Yeast Malt Agar (YMA)..... 77

5. Penampakan makroskopik koloni lima strain khamir pada medium Yeast Malt Agar YMA) yang telah diinkubasi selama 48 jam..... 78

6. Penampakan mikroskopik sel lima strain khamir yang ditumbuhkan pada medium Yeast Malt Agar (YMA) selama 48 jam..... 79

7. Perbanyakan biomassa khamir dalam medium Yeast Malt Broth (YMB)..... 80

8. Kurva pertumbuhan lima strain khamir..... 81

9. Sampel lipid lima strain khamir 82

10. Sampel lipid lima strain khamir dalam heksana 83

11. Kromatogram lapis tipis lipid yang diekstraksi menggunakan alat *Soxhlet*..... 84

12. Kromatogram lapis tipis lipid yang diekstraksi tanpa menggunakan alat *Soxhlet* 85

DAFTAR TABEL

Tabel Halaman

1. Hasil pengamatan makroskopik koloni khamir yang ditumbuhkan pada medium Yeast Malt Agar (YMA) pada suhu ruang (20--25)^{o} C selama 48 jam..... 86

2. Hasil pengamatan mikroskopik sel khamir yang ditumbuhkan pada medium Yeast Malt Agar (YMA) pada suhu ruang (20--25)^{o} C selama 48 jam..... 86

3. Hasil penghitungan sel dengan metode *Total Plate Count* (TPC) pada inokulum lima strain khamir 87

4. Hasil *Total Plate Count* (TPC) strain *Rh. acheniorum* SD4233 dan nilai pH setiap 24 jam selama 5 hari fermentasi 88

5. Hasil *Total Plate Count* (TPC) strain L4236 dan nilai pH setiap 24 jam selama 5 hari fermentasi..... 89

6. Hasil *Total Plate Count* (TPC) strain UICC-Y-283 dan nilai pH setiap 24 jam selama 5 hari fermentasi..... 90

7. Hasil *Total Plate Count* (TPC) strain UICC-Y-402 dan nilai pH setiap 24 jam selama 5 hari fermentasi..... 91

8. Hasil *Total Plate Count* (TPC) strain UICC-Y-253 dan nilai pH setiap 24 jam selama 5 hari fermentasi..... 92

9. Berat biomassa kering lima strain khamir yang ditumbuhkan dalam medium Yeast Malt Broth (YMB) pada fase stasioner..... 93

10. Persentase lipid total lima strain khamir yang diekstraksi menggunakan heksana dengan alat *soxhlet*, serta tanpa alat *soxhlet*..... 93

11. Nilai Rf kromatogram hasil deteksi kromatogram lapis tipis (KLT) pada sampel lipid lima strain khamir 94

12. Komposisi asam lemak lima strain khamir..... 95

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1.	Skema kerja penelitian	96
2.	Skema pengerjaan *Total Plate Count* (TPC)	97
3.	Skema pengerjaan perbanyakan biomassa dan persiapan biomassa kering	98
4.	Skema ekstraksi lipid tanpa alat *Soxhlet*	99
5.	Skema ekstraksi lipid dengan alat *Soxhlet*	100
6.	Skema penentuan kelas lipid	101
7.	Skema penentuan komposisi asam lemak	102

PENENTUAN LIPID DALAM KHAMIR *Rhodotorula* DARI TAMAN NASIONAL GUNUNG HALIMUN

SURYANI

0304040737

UNIVERSITAS INDONESIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

DEPARTEMEN BIOLOGI

DEPOK

2008

BAB I

PENDAHULUAN

Lipid adalah sekelompok senyawa yang tidak larut di dalam air, tetapi larut di dalam pelarut organik non polar seperti eter dan benzena (Zumdahl 1997: 1106). Lipid umumnya dapat dibedakan menjadi dua berdasarkan bentuk pada suhu ruang, yaitu lemak yang berbentuk padat dan minyak yang berbentuk cair (Page 1989: 198). Sebagian besar lipid tersusun atas asam lemak. Asam lemak terdiri atas dua macam, yaitu asam lemak jenuh yang tidak memiliki ikatan rangkap karbon-karbon dan asam lemak tidak jenuh yang memiliki ikatan rangkap karbon-karbon (Ritter 1996: 328).

Beberapa mikrooganisme dapat mengakumulasi lipid dengan kandungan asam lemak tidak jenuh cukup tinggi. Kelompok tersebut dinamakan mikroorganisme *oleaginous* dan meliputi bakteri, khamir, kapang, serta alga tertentu. Contoh beberapa khamir *oleaginous* adalah dari genus *Candida* Berkhout, *Cryptococcus* Vuillemin, *Lipomyces* Lodder & Kreger-van Rij, *Rhodosporidium* Banno, dan *Rhodotorula* F.C. Harrison (Ratledge 1997: 140; Buzzini & Martini 2006: 539).

Khamir dapat mengakumulasi lipid intraselular 20% hingga 70% dari berat biomassa kering (Buzzini & Martini 2006: 539). Menurut Ratledge (2002: 1047), *Rhodotorula* spp. dapat mengakumulasi lipid antara 40% hingga 70%. Ratledge dan Tan (1990: 226) melaporkan bahwa lipid total

maksimum pada *Rh*. *glutinis* 72%, *Rh*. *graminis* 41%, dan *Rh*. *mucilaginosa* 28%.

Lipid pada khamir dapat ditemukan di dinding sel, membran plasma, vakuola, mitokondria, nukleus, dan dalam bentuk tetes lemak di sitoplasma (Hunter & Rose 1971: 227). Kelas lipid utama pada khamir dapat dikelompokkan menjadi dua, yaitu lipid polar sebagai penyusun membran dan non polar sebagai cadangan energi. Lipid polar terdiri dari fosfolipid dan sterol, sedangkan lipid non polar terdiri dari triasilgliserol dan ester sterol (Rose & Veazey 1988: 271). Triasilgliserol merupakan lipid utama yang diakumulasi di dalam sel (Ratledge 1997: 140).

Perrier *dkk.* (1995: 173) melaporkan bahwa asam lemak utama pada khamir *Rhodotorula* adalah asam palmitat, oleat, dan linoleat. Alvarez *dkk*. (1992: 215) melaporkan bahwa *Rh. glutinis* mengandung asam laurat 1,5%, palmitat 30%, stearat 6%, oleat 55%, dan linoleat 5%. Menurut Ratledge dan Tan (1990: 228) *Rh*. *gracilis* mengandung asam palmitat 14%, palmitoleat 2%, stearat 4%, oleat 26%, linoleat 49%, dan linolenat 3%.

Asam linolenat dan linoleat dari lipid khamir *Rhodotorula* dapat dimanfaatkan sebagai sumber asam lemak esensial alternatif untuk suplemen kesehatan manusia atau pakan ternak (Ratledge 2004: 809; Razavi *dkk*. 2007: 1591). Manusia dan beberapa hewan tidak memiliki enzim untuk sintesis asam lemak esensial sehingga perlu disuplai dari nutrisi atau pakan (Bettelheim & March 1995: 290).

Salah satu aplikasi mikroorganisme sebagai suplemen untuk pakan ternak telah dilaporkan oleh Franklin *dkk*. tahun 1990. Pemberian tambahan pakan berupa alga laut *Schizochytrium* sp. yang mengandung asam lemak esensial pada ternak sapi menunjukkan adanya asam lemak dokosaheksanoat pada susu sapi sebesar 0,76 g per 100 g lipid total, sedangkan susu yang dihasilkan dari ternak sapi tanpa tambahan pakan alga tidak mengandung asam dokosaheksanoat (Franklin *dkk*. 1990: 2050). Ratledge (2004: 808) melaporkan beberapa perusahaan komersial telah memanfaatkan mikrooganisme untuk produksi suplemen kesehatan. Produk yang dihasilkan antara lain asam arakidonat dan dokosaheksanoat untuk formula bayi, suplemen untuk orang dewasa, suplemen untuk unggas, dan pakan ternak.

Lipid khamir mendapat perhatian besar di dunia penelitian dan industri sejak tahun 2004 karena memiliki beberapa keunggulan. Lipid khamir dapat mengandung asam lemak unik dengan jumlah atom karbon ganjil yang tidak dapat disintesis oleh tumbuhan (Ratledge 2004: 807). Perrier *dkk*. (1995: 176) melaporkan beberapa strain *Rhodotorula*, seperti *Rh. acheniorum*, *Rh. glutinis*, dan *Rh. mucilaginosa* mengandung asam lemak dengan jumlah atom karbon ganjil antara 7 hingga 25. Welch dan Burlingame (1973: 464--465) melaporkan lipid khamir *wild-type* strain X2180 mengandung asam lemak dengan jumlah atom karbon lebih dari 18 sebesar 1--2% dari asam lemak total dan asam lemak yang memiliki jumlah atom karbon ganjil dengan

konsentrasi kurang dari 5%. Selain itu, produksi lipid khamir tidak bergantung pada musim dan lahan yang luas (Dyal & Narine 2005: 450)

Beberapa spesies khamir dari genus *Rhodotorula* telah ditemukan dari Taman Nasional Gunung Halimun (TNGH) yang merupakan kawasan hutan hujan tropis (Sjamsuridzal 2007: 27), yaitu *Rh*. *acheniorum* SD4233, *Rh*. *glutinis* L4236, *Rh*. *mucilaginosa* UICC-Y-283, *Rh*. *mucilaginosa* UICC-Y-402, dan *Rh. nothofagi* UICC-Y-253. Kelima strain khamir tersebut diduga dapat mengakumulasi lipid dalam selnya dan terdapat perbedaan persentase lipid total, kelas lipid, dan komposisi asam lemak. Penelitian bertujuan untuk mengetahui persentase lipid total, kelas lipid, dan komposisi asam lemak dalam khamir *Rhodotorula* milik UICC dari Taman Nasional Gunung Halimun. Data yang diperoleh dapat menambah informasi strain khamir UICC yang berpotensi dalam mengakumulasi lipid dengan kandungan asam lemak esensial yang tinggi. Selain itu, strain khamir yang potensial dapat dimanfaatkan sebagai alternatif sumber asam lemak esensial bagi kesehatan dan pakan ternak.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. LIPID

Lipid adalah biomolekul yang tidak larut di dalam air, karena lipid umumnya merupakan molekul yang memiliki gugus non polar, sedangkan air merupakan molekul yang memiliki gugus polar. Lipid dapat larut di dalam pelarut organik non polar seperti benzena, eter, heksana, dan metanol (Zumdahl 1997: 1106; Boyer 2002: 208 & 211). Lipid dapat dikelompokkan berdasarkan struktur dan karakteristik non polar menjadi lemak (*fat*), lilin, fosfolipid, sfingolipid, glikolipid, eikosanoat, steroid, lipoprotein, dan vitamin yang larut di dalam lemak. Beberapa jenis lipid memiliki gugus polar dan non polar, sehingga bersifat amfipatik yang akan membentuk misel di dalam air (Ritter 1996: 336).

Lipid juga dapat dikelompokkan berdasarkan gugus polar dan non polar. Lipid yang hanya mengandung gugus non polar disebut lipid non polar atau lipid netral, sebagai contoh kelompok lemak (*fat*). Lipid non polar berperan dalam metabolisme, khususnya sebagai cadangan energi. Lipid yang mengandung gugus polar dan gugus non polar disebut lipid polar, sebagai contoh fosfolipid. Lipid polar berperan di dalam membran sel dan membran organel untuk melindungi isi sel dan organel dari lingkungan luar sel (Plummer 1987: 189; Boyer 2002: 208--216).

Triasilgliserol (TAG) merupakan lipid yang terdiri atas gliserol polihidroksi alkohol dan asam karboksilat berantai panjang (asam lemak) dan banyak ditemukan di alam (Zumdahl 1997: 1106). Triasilgliserol yang banyak mengandung asam lemak jenuh, berbentuk padat pada suhu ruang, dan memiliki titik cair tinggi disebut lemak. Triasilgliserol yang banyak mengandung asam lemak tidak jenuh, berbentuk cair pada suhu ruang, dan memiliki titik cair rendah disebut minyak (Ketaren 1986: 6; Boyer 2002: 211--212). Bakteri, khamir, tumbuhan, dan hewan dapat menyintesis TAG (Coleman & Lee 2004: 135).

Menurut Ratledge (1991: 438) lipid yang umumnya diakumulasi oleh mikroorganisme adalah TAG, karena TAG merupakan komponen utama cadangan energi dalam sel (Walker 1998: 12). Triasilgliserol disimpan oleh sel dalam bentuk tetes-tetes lemak di sitoplasma (Müllner & Daum 2004: 324).

Kelompok lipid lain yang terdapat pada sel khamir adalah monoasilgliserol (MAG) dan diasilgliserol (DAG). Monoasilgliserol merupakan esterifikasi pada satu gugus hidroksil gliserol, sedangkan diasilgliserol merupakan esterifikasi pada dua gugus hidroksil gliserol (Ritter 1996: 326--327). Menurut Athenstaedt dan Daum (2006: 1355) MAG dan DAG khamir merupakan hasil degradasi TAG untuk sintesis lipid polar, seperti fosfolipid.

Rest *dkk*. (1995: 305) melaporkan lipid polar utama yang terdapat pada membran plasma *Saccharomyces cerevisiae* adalah fosfolipid, sfingolipid, dan sterol. Fosfolipid merupakan lipid kompleks yang terbentuk dari gliserol, asam lemak, alkohol amino, dan gugus fosfat (Seager &

Slabaugh 1994: 215). Menurut Walker (1998: 20), fosfolipid berperan dalam permeabilitas membran sel. Sfingolipid merupakan lipid kompleks yang terbentuk dari sfingosin, asam lemak, alkohol kolin, dan gugus fosfat (Bettelheim & March 1995: 293). Plummer (1987: 192) melaporkan bahwa sfingolipid berperan dalam kestabilan struktur sel. Sterol merupakan lipid dengan tiga cincin sikloheksana yang bergabung dengan satu cincin siklopentana dan asam lemak. Menurut Madigan *dkk*. (2003: 718) jenis sterol khusus yang terdapat pada fungi adalah ergosterol. Ergosterol memiliki peranan dalam menjaga permeabilitas membran sel (Walker 1998: 238).

Beberapa mikroorganisme *oleaginous* dapat mengakumulasi lipid yang banyak di dalam sel (Ratledge 1991: 429). Khamir *Rhodosp. toruloides* yang ditumbuhkan pada medium dengan sumber karbon glukosa sebesar 7% dapat mengakumulasi lipid 76% (Li Yong-Hong *dkk*. 2006: 651). Beberapa genus Zygomycetes, seperti *Mucor* dan *Rhizopus* mengakumulasi lipid antara 10% hingga 28% ketika ditumbuhkan pada medium dengan sumber karbon glukosa sebesar 3% (Kavadia *dkk*. 2001: 341).

B. ASAM LEMAK

Sebagian besar lipid tersusun atas asam lemak. Asam lemak umumnya merupakan asam monokarboksilat berantai lurus dengan jumlah atom karbon sebanyak 4--36 (Page 1989: 194). Asam lemak memiliki gugus karboksil tunggal sebagai "*head*" dan rantai hidrokarbon sebagai "*tail*". Gugus karboksil (-COOH) merupakan gugus polar sehingga bersifat hidrofil,

sedangkan rantai hidrokarbon merupakan gugus non polar sehingga bersifat hidrofob. Rantai hidrokarbon asam lemak dapat atau tidak memiliki ikatan rangkap karbon-karbon (Boyer 2002: 209).

Asam lemak dapat dibagi menjadi dua berdasarkan ada tidaknya ikatan rangkap karbon-karbon, yaitu asam lemak jenuh dan tidak jenuh. Asam lemak jenuh tidak memiliki ikatan rangkap karbon-karbon. Asam lemak tidak jenuh memiliki ikatan rangkap karbon-karbon (Denniston *dkk*. 2004: 524). Menurut Ratledge (2002: 1047) lipid mikroorganisme lebih banyak mengandung asam lemak tidak jenuh. Menurut Walker (1998: 236), asam lemak tidak jenuh memiliki peranan penting pada integritas membran sel khamir.

Asam lemak jenuh tidak dapat mengalami proses penambahan atom hidrogen pada rantai hidrokarbon atau hidrogenasi, karena semua lengan atom karbon pada rantai hidrokarbon telah berikatan dengan atom hidrogen dan karbon (Denniston *dkk*. 2004: 524). Notasi pada asam lemak jenuh misalnya asam palmitat (16:0) menyatakan asam tersebut memiliki 16 atom karbon dan tidak ada ikatan rangkap karbon-karbon (Plummer 1987: 190). Lomascolo *dkk*. (1994: 2160) melaporkan asam palmitat merupakan salah satu asam lemak utama pada kapang strain *Penicillium*.

Asam lemak tidak jenuh membentuk ikatan rangkap karbon-karbon pada rantai hidrokarbon. Asam lemak tidak jenuh dapat dibagi berdasarkan jumlah ikatan rangkap karbon-karbon, yaitu asam lemak monoenoat (*monounsaturated fatty acid* atau MUFA) yang memiliki satu ikatan rangkap

karbon-karbon dan polienoat (*polyunsaturated fatty acid* atau PUFA) yang memiliki ikatan rangkap karbon-karbon lebih dari satu (Boyer 2002: 210). Notasi pada asam lemak tidak jenuh misalnya oleat (18:1) menyatakan asam tersebut memiliki 18 atom karbon dan satu ikatan rangkap karbon-karbon (Gurr *dkk*. 2002: 13). Menurut Walker (1998: 236) asam palmitoleat (16:1) dan oleat (18:1) memiliki peranan penting untuk integritas membran sel khamir.

Ratledge (1991: 434) melaporkan bahwa beberapa kapang dapat menjadi sumber asam lemak polienoat, seperti asam lemak omega 3 (n-3) dan omega 6 (n-6). Menurut Montgomery *dkk*. (1993: 169) penamaan asam lemak omega berdasarkan posisi ikatan rangkap karbon-karbon pertama dari ujung gugus metil (CH_3-). Sebagai contoh, asam lemak omega 3, α-linolenat (18:3,n-3) menyatakan asam tersebut memiliki 18 atom karbon, 3 ikatan rangkap karbon-karbon, dan asam lemak jenis omega 3 dengan posisi ikatan rangkap pertama pada karbon ketiga dan keempat dari ujung gugus metil. Hung-Der Jang *dkk*. (2000: 41) melaporkan kapang *Mortierella alpina* dapat menghasilkan asam lemak omega 3, yaitu asam α-linolenat (18:3,n-3) dan asam eikosapentanoat (20:5,n-3), serta asam lemak omega 6, yaitu asam linoleat (18:2,n-6), asam γ-linolenat (18:3,n-6), dan asam arakidonat (20:4, n-6). Swaaf *dkk*. (2003: 666) melaporkan mikroalga *Crypthecodinium cohnii* menghasilkan asam lemak omega 3 dokosaheksanoat (22:6,n-3).

Asam lemak disintesis di dalam sitoplasma. Prekursor asam lemak adalah asetil KoA yang memiliki dua atom karbon. Hal tersebut

menyebabkan sebagian besar asam lemak yang berada di alam memiliki jumlah atom karbon genap (Boyer 2002: 209). Sumber asetil KoA dalam sintesis asam lemak dapat berasal dari degradasi karbohidrat atau asam lemak (McGarry 2002: 698). Menurut Montgomery *dkk*. (1993: 751) glukosa merupakan sumber utama untuk pembentukan asetil KoA yang digunakan dalam sintesis asam lemak. Glukosa diubah menjadi asam piruvat melalui proses glikolisis. Asam piruvat masuk ke dalam siklus Krebs di mitokondria. Pada mikroorganisme *oleaginous*, asam sitrat yang merupakan senyawa antara siklus Krebs banyak diakumulasi dalam mitokondria. Asam sitrat dikeluarkan dari mitokondria ke sitoplasma untuk diubah menjadi asetil KoA dengan bantuan enzim *ATP: citrate lyase* (Gambar 1) (Ratledge 2004: 810). Menurut Ratledge (2002: 1047) mikroorganisme *non oleaginous* tidak memiliki enzim *ATP: citrate lyase*.

Sintesis asam lemak memerlukan *fatty acid synthase* (FAS) yang merupakan enzim kompleks. Sebagian besar hasil akhir sintesis asam lemak adalah asam palmitat (Boyer 2002: 503--506; McGarry 2002: 698). Menurut Ratledge (2004: 812), asam lemak tidak jenuh monoenoat dan polienoat pada mikroorganisme disintesis dari asam palmitat dengan bantuan enzim elongase dan desaturase yang berlangsung dalam retikulum endoplasma (Gambar 2).

Mikroorganisme dapat menyintesis asam lemak yang unik yaitu asam lemak dengan jumlah atom karbon ganjil atau jumlah atom karbon banyak. Perrier *dkk*. (1995: 176) melaporkan beberapa strain *Rhodotorula*, seperti

Rh. acheniorum, *Rh. glutinis*, dan *Rh. mucilaginosa* mengandung asam lemak dengan jumlah atom karbon ganjil antara 7 hingga 25, yaitu C_7, C_{15}, C_{17}, C_{19}, C_{21}, dan C_{25}. Welch & Burlingame (1973: 464--465) melaporkan lipid khamir *wild-type* strain X2180 mengandung asam lemak dengan jumlah atom karbon lebih dari 18 sebesar 1--2% dari asam lemak total, yaitu C_{22}, C_{24}, C_{26}, dan C_{28}. Selain itu, juga ditemukan adanya asam lemak yang memiliki jumlah atom karbon ganjil dengan konsentrasi kurang dari 5%, seperti C_{15}, C_{23}, C_{27}, dan C_{29}.

C. POTENSI LIPID DARI MIKROORGANISME

Asam lemak esensial merupakan asam lemak yang tidak dapat disintesis oleh manusia dan hewan, tetapi diperlukan dalam tubuh (Seager & Slabaugh 1994: 210). Asam lemak esensial terdiri dari asam linoleat yang merupakan prekursor untuk omega 6 (asam γ-linolenat dan arakidonat), dan asam α-linolenat yang merupakan prekursor untuk omega 3 (asam eikosapentanoat dan dokosaheksanoat) (Boyer 2002: 212). Asam lemak esensial dapat diperoleh dari lipid mikroorganisme, tumbuhan, dan beberapa hewan. Mikroorganisme dapat dimanfaatkan sebagai sumber asam lemak esensial alternatif yang potensial dibandingkan tumbuhan dan beberapa hewan. Produksi asam lemak omega 3 dan 6 pada tumbuhan dan ikan bergantung pada musim dan lokasi, sedangkan mikroorganisme tidak. Tumbuhan umumnya tidak dapat menyintesis asam lemak omega 3 atau 6 yang memiliki atom karbon lebih dari 18, sedangkan mikroorganisme dapat.

Ikan laut dalam merupakan sumber asam lemak omega 3 terbesar, namun jumlahnya semakin berkurang akibat penangkapan yang berlebihan dan juga dapat terkontaminasi oleh logam berat akibat pencemaran limbah (Nichols 2003: 35).

Asam lemak omega 3 dan 6 memiliki peranan penting dalam kesehatan manusia. Asam γ-linolenat merupakan prekursor untuk asam arakidonat, sedangkan asam arakidonat merupakan prekursor untuk eikosanoat yang berperan sebagai hormon untuk regulasi fisiologi, seperti penggumpalan darah. Asam dokosaheksanoat banyak terkandung dalam air susu ibu yang berperan untuk perkembangan otak dan penglihatan pada bayi (Ritter 1996: 329 & 343).

Mikroorganisme dapat menjadi sumber yang sangat potensial untuk asam lemak omega 3 dan 6. Kavadia *dkk*. (2001: 343) melaporkan beberapa strain Zygomycetes yang termasuk ke dalam genus *Zygorhynchus*, *Mortierella*, *Rhizopus*, *Mucor*, dan *Cunninghamella* dapat menghasilkan asam γ-linolenat. Tri-Panji *dkk*. (1996: 39) melaporkan bahwa mikroalga *Spirulina platensis* dapat menjadi sumber asam γ-linolenat. Swaaf *dkk*. (2003: 666) melaporkan mikroalga *Crypthecodinium cohnii* dapat menjadi sumber asam dokosaheksanoat.

Achmadi *dkk*. (2000: 68) melaporkan ekstrak lipid *Spirulina platensis* meningkatkan konsentrasi *high density lipoprotein* (HDL) pada plasma darah kelinci yang diberi pakan kolesterol sebesar 28 mg/dl menjadi 66 mg/dl. Ekstrak lipid tersebut mengandung asam γ-linolenat paling tinggi 0,49%

dibandingkan asam lemak lain, seperti asam palmitat, stearat, dan oleat. Franklin *dkk*. (1999: 2050) melaporkan bahwa ternak sapi yang diberi tambahan pakan alga laut *Schizochytrium* sp. menghasilkan asam lemak omega 3 dokosaheksanoat pada susu sapi.

Ratledge (2004: 808) melaporkan asam arakidonat dan dokosaheksanoat telah diproduksi secara komersial dari beberapa mikroorganisme. Martek Biosciences Corporation memproduksi dokosaheksanoat (*life*`*s*DHA$^{TM}$) dari mikroalga *Crypthecodinium cohnii* dan *Schizochytrium* sp.. Produk *life*`*s*DHA^{TM} dicampur dalam formula untuk bayi, produk susu, yogurt, dan jus untuk anak-anak, ibu yang sedang menyusui, dan orang dewasa (Martek Biosciences Corporation 2008: 1).

D. LIPID PADA KHAMIR

Khamir merupakan salah satu mikroorganisme yang dapat mengakumulasi lipid di dalam sel (Ratledge 1991: 434). Kelompok khamir yang dapat mengakumulasi lipid lebih dari 20% disebut sebagai khamir *oleaginous* (Ratledge & Tan 1990: 224). Menurut Buzzini dan Martini (2006: 539), beberapa genus khamir dapat mengakumulasi lipid 20--70% dari berat biomassa kering, antara lain genus *Candida*, *Cryptococcus*, *Lipomyces*, *Rhodosporidium*, dan *Rhodotorula*. Khamir *Rhodotorula* spp., *L*. *starkeyi* dan *Cr*. *curvatus* diketahui dapat mengakumulasi lipid antara 40% hingga 70% (Ratledge 2002: 1047). Lipid total maksimum dapat dihasilkan oleh *Rh*. *glutinis* sebesar 72%, *Rh. graminis* sebesar 41%, dan *Rh*. *mucilaginosa*

28% (Ratledge & Tan 1990: 226). Lipid utama yang terdapat pada khamir dapat dikelompokkan menjadi lipid polar, yaitu dari kelas fosfolipid dan sterol serta lipid netral, yaitu dari kelas triasilgliserol dan ester sterol (Rose & Veazey 1988: 271). Menurut Ratledge (1997: 140) triasilgliserol merupakan lipid utama yang diakumulasi di dalam sel.

Lipid pada khamir dapat ditemukan di dinding sel, membran sel, vakuola, mitokondria, dan nukleus. Dinding sel mengandung lipid, umumnya 3--10% dari berat dinding sel kering atau 0,1--1% dari berat biomassa kering (Hunter & Rose 1971: 227; Rattray *dkk.* 1975: 199). Selain itu, lipid dapat juga ditemukan dalam bentuk tetes lemak di dalam sel khamir (Gambar 3) (Robinow 1975: 8; Buzzini & Martini 2006: 539). Athenstaedt dan Daum (2006: 1355) melaporkan bahwa tetes lemak khamir terdiri dari triasilgliserol dan ester sterol. Triasilgliserol merupakan lipid utama yang terdapat pada tetes lemak khamir (Hunter & Rose 1971: 256).

Menurut Hunter dan Rose (1971: 227) membran sel umumnya mengandung lipid dengan asam lemak tidak jenuh yang tinggi, seperti asam palmitoleat dan oleat. Menurut Ratledge dan Tan (1990: 225) triasilgliserol khamir yang diakumulasi dalam bentuk tetes lemak mengandung asam lemak jenuh seperti asam palmitat dan stearat, dan asam lemak tidak jenuh seperti asam oleat dan linoleat.

Komponen asam lemak dari lipid khamir umumnya memiliki memiliki 16 atom karbon (C_{16}) dan 18 atom karbon (C_{18}) (Rattray *dkk*. 1975: 200). Yonghong Li *dkk*. (2007: 312) melaporkan lipid khamir *Rhodosp. toruloides*

Y4 mengandung asam palmitat, stearat, oleat, dan linoleat. McMurrough dan Rose (1971: 754) melaporkan komposisi asam lemak khamir *C. utilis* terdiri dari asam palmitat, palmitoleat, stearat, oleat, linoleat, dan linolenat.

Faktor-faktor yang umumnya memengaruhi pertumbuhan khamir juga memengaruhi lipid total, komposisi lipid, dan asam lemak. Faktor-faktor tersebut antara lain adalah nutrien, suhu, pH, dan waktu inkubasi (Hunter & Rose 1971: 215--216).

Khamir *oleaginous* akan mengakumulasi lipid intraselular dalam jumlah besar bila ditumbuhkan dalam medium mengandung sumber karbon konsentrasi tinggi (Ratledge & Tan 1990: 224). Sumber karbon yang dapat digunakan untuk akumulasi lipid pada khamir antara lain glukosa, fruktosa, galaktosa, dan laktosa. Saxena *dkk*. (1998: 501) melaporkan glukosa merupakan sumber karbon terbaik untuk akumulasi lipid pada *Rh*. *minuta* IIP-30 yaitu sebesar 48%. Li Yong-Hong *dkk*. (2006: 651) melaporkan khamir *Rhodosp. toruloides* yang ditumbuhkan pada medium dengan sumber karbon glukosa sebesar 7% dapat mengakumulasi lipid 76%. Granger *dkk*. (1993: 785) melaporkan *Rh. glutinis* mengakumulasi lipid 30--40% pada medium dengan sumber karbon glukosa sebesar 3%.

Suhu memengaruhi lipid total dan komposisi asam lemak khamir. Johnson *dkk*. (1992: 382) melaporkan produksi lipid oleh *Rh*. *glutinis* IIP-30 optimum pada suhu 30^{o}C dengan konsentrasi lipid sebesar 66%. McMurrough dan Rose (1971: 753) melaporkan komposisi asam lemak *C. utilis* yang diinkubasi suhu 25^{o}C mengandung asam oleat sebesar 35,1%

dan asam linoleat sebesar 27,9%, sedangkan yang diinkubasi pada suhu 30^{o}C mengandung asam oleat sebesar 39,2% dan asam linoleat sebesar 34% dari asam lemak total.

Johnson *dkk*. (1992: 382) melaporkan pengaruh pH pada akumulasi lipid dalam *Rh*. *glutinis* IIP-30. Lipid total *Rh*. *glutinis* IIP-30 yang ditumbuhkan pada medium yang memiliki pH 3, 4, 5, dan 6 adalah 12%, 66%, 48%, dan 44%. Hasil tersebut menunjukkan pH 4 merupakan pH yang sesuai untuk akumulasi lipid dalam jumlah banyak.

Menurut Hunter dan Rose (1971: 215) waktu inkubasi memengaruhi akumulasi lipid pada khamir. Somashekar dan Joseph (2000: 492) melaporkan *Rh. gracilis* mengakumulasi lipid sebesar 57% pada fase stasioner setelah diinkubasi selama 120 jam. Sabry *dkk*. (1990: 310) melaporkan lipid total maksimum sebesar 24,1% dicapai *Rh*. *glutinis* pada saat khamir tersebut mencapai fase stasioner akhir.

E. KHAMIR *Rhodotorula* F.C. Harrison

Khamir merupakan fungi uniselular yang dapat bereproduksi secara aseksual dan seksual. Reproduksi secara aseksual dilakukan dengan cara bertunas atau membelah, dengan membentuk sterigmata, serta dengan atau tanpa membentuk miselium sejati dan miselium palsu. Reproduksi secara seksual dilakukan dengan menghasilkan spora seksual tanpa membentuk tubuh buah (Alexopoulos *dkk*. 1996: 272; Yarrow 1998: 80--84).

Rhodotorula merupakan salah satu contoh genus khamir yang bereproduksi dengan cara bertunas dengan atau tanpa menghasilkan miselium sejati dan miselium palsu. Pola pertunasan dapat multilateral atau multipolar. Sel khamir *Rhodotorula* umumnya berbentuk bulat, oval, atau memanjang. Sel khamir pada medium agar gandum akan memperbanyak diri membentuk koloni yang umumnya berwarna kuning atau merah. Warna tersebut disebabkan oleh produksi pigmen karotenoid (Fell & Statzell-Tallman 1998: 800).

Rhodotorula merupakan khamir yang berada pada fase aseksual (anamorfik). Khamir genus *Rhodotorula* termasuk ke dalam famili Sporobolomycetaceae dari ordo Filobasidiales dan kelas Urediniomycetes dari filum Basidiomycota (Boekhout *dkk*. 1998: 613 & 624). Khamir *Rhodotorula* memiliki habitat yang luas. Anggota dari genus tersebut dapat ditemukan di air, bagian dalam bunga, permukaan bunga, permukaan daun tumbuhan atau *phylloplane*, sedimen, serangga, dan tanah (Spencer & Spencer 1997: 39--57).

1. *Rhodotorula acheniorum* (Buhagiar & J.A. Barnett) Rodrigues de Miranda

Rhodotorula acheniorum umumnya memiliki bentuk sel elips dan memanjang pada medium ekstrak gandum 5%, sedangkan sel berukuran (1,6--3,9)x(2,4--8,2) µm. Khamir tersebut dapat membentuk tangkai pendek untuk mendukung tunas baru. Koloni memiliki warna merah muda

kekuningan dan tekstur halus hingga kasar pada medium agar berisi ekstrak gandum 5% (Fell & Statzell-Tallman 1998: 805).

2. *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) F.C. Harrison

Rhodotorula glutinis umumnya memiliki bentuk sel ovoid, bulat, dan memanjang pada medium ekstrak gandum 5%, sedangkan sel berukuran (2,3--5,0)x(4,0--10) µm. Koloni memiliki warna merah koral hingga merah salmon atau jingga muda pada medium agar berisi ekstrak gandum 5%. Koloni memiliki permukaan halus, mengerut, atau mengilap, serta memiliki tekstur mukoid atau seperti mentega. Tepi koloni dapat tidak beraturan atau lurus (Fell & Statzell-Tallman 1998: 814).

3. *Rhodotorula mucilaginosa* (Jörgensen) F.C. Harrison

Rhodotorula mucilaginosa umumnya memiliki bentuk sel ovoid dan bulat pada medium ekstrak gandum 5%, sedangkan sel berukuran (2--8)x (2--12) µm. Khamir tersebut bereproduksi dengan pertunasan multilateral. Susunan sel dapat tunggal, berpasangan, rantai pendek, atau berkelompok. Koloni memiliki warna jingga safron, merah salmon muda, atau merah koral pada medium agar berisi ekstrak gandum 5%. Koloni memiliki permukaan halus, mengerut, atau mengilap, sedangkan tepi koloni lurus (Fell & Statzell-Tallman 1998: 821).

4. *Rhodotorula nothofagi* (Ramirez & González) Roeijmans, van Eijk & Yarrow

Rhodotorula nothofagi memiliki bentuk sel ovoid dan memanjang pada medium yang berisi glukosa, ekstrak khamir, dan pepton dengan ukuran sel (2--6)x(4,7--8,7) µm. Susunan sel dapat tunggal atau berpasangan. Koloni memiliki warna merah muda kekuningan yang terang pada medium agar berisi ekstrak gandum 5%. Koloni memiliki permukaan halus atau mengilap, serta memiliki tekstur seperti mentega dan tepi koloni lurus (Fell & Statzell-Tallman 1998: 823).

F. PERBANYAKAN BIOMASSA

Biomassa khamir dapat diperbanyak melalui fermentasi. Fermentasi dapat berlangsung secara fermentatif atau respiratif bergantung pada sifat mikroorganisme, seperti aerob, anaerob, atau anaerob fakultatif. Berdasarkan substrat, fermentasi dapat dibagi dua yaitu fermentasi substrat padat dan substrat cair. Fermentasi substrat cair dapat dilakukan secara *batch* atau *continuous*. Fermentasi yang umumnya dilakukan dalam skala laboratorium adalah fermentasi *batch* (Gandjar *dkk*. 1992: 92; Lowrie & Wells 1994: 51). Berdasarkan produk mikroorganisme yang ingin diperoleh, fermentasi dapat dilakukan secara diam atau dengan pengocokan (Gandjar 2006: 40).

Perbanyakan biomassa khamir dengan fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain, substrat atau medium, volume inokulum, suhu, dan kecepatan pengocokan (Stanbury *dkk*. 1995: 148). Oladipo *dkk*. (2007: 2175) melaporkan perbanyakan biomassa khamir *Lipomyces* untuk akumulasi lipid melalui fermentasi dalam medium Yeast Extract Broth yang berlangsung selama 168 jam dalam *shaker incubator* pada suhu 28^{o}C. Chuan-Chao Dai (2007: 2133) melaporkan perbanyakan biomassa khamir *Rh. glutinis* untuk akumulasi lipid melalui fermentasi dalam medium cair berisi glukosa 10%, ekstrak khamir 0,8%, dan pepton 0,3% serta volume inokulum sebesar 5%. Fermentasi dilakukan dalam *shaker incubator* selama 96 jam dengan kecepatan 180 rpm/menit pada suhu 28^{o}C. Aoki *dkk*. (2002: 2633) melaporkan perbanyakan biomassa khamir *Pichia methanolica* untuk akumulasi lipid dan asam dokosaheksanoat melalui fermentasi dalam medium Yeast Malt Broth yang ditambahkan asam dokosaheksanoat. Fermentasi berlangsung selama 72 jam pada suhu 25^{o}C dalam *resiprocal shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm/menit.

G. ANALISIS LIPID

Penentuan lipid dari khamir *Rhodotorula* memerlukan analisis lipid total, kelas lipid, dan asam lemak yang terdapat di dalam sel. Analisis tersebut memerlukan proses ekstraksi terlebih dahulu. Ekstraksi lipid dapat dilakukan menggunakan pelarut atau secara mekanik. Ekstraksi menggunakan pelarut umumnya digunakan untuk sampel yang sedikit dan dapat dilakukan dengan

alat *Soxhlet* atau tanpa alat *Soxhlet*. Ekstraksi secara mekanik umumnya digunakan untuk sampel yang banyak dan menggunakan peralatan khusus, seperti *expeller* (Ketaren 1986: 36; Pavia *dkk*. 1995: 187; Anderson 2005: 9).

Ekstraksi lipid dapat dilakukan menggunakan pelarut organik non polar seperti heksana, kloroform, dan metanol (Zumdahl 1997: 1106). Kloroform dan metanol merupakan pelarut organik yang bersifat toksik dan karsinogenik (Schneiter dan Daum 2006a: 44). Menurut Fajardo *dkk*. (2007: 120) heksana merupakan pelarut organik non polar yang murah dan memiliki tingkat toksisitas yang rendah. Lomascolo *dkk*. (1994: 2161) melaporkan pelarut heksana umumnya digunakan untuk ekstraksi lipid.

Kavadia *dkk*. (2001: 345) melaporkan ekstraksi lipid beberapa strain Zygomycetes menggunakan pelarut heksana. Lipid total yang diperoleh dari strain *Zygorhynchus moelleri*, *Mucor isabellin*a, dan *Cunninghamella* sebesar 26,6%, 28,1%, dan 28,1%. Somashekar *dkk*. (2001: 317) melaporkan ekstraksi lipid beberapa strain kapang menggunakan pelarut heksana. Lipid total yang diperolah pada strain *Mucor hiemalis* dan *Mucor* sp.1 adalah 9,75±1,13% dan 15,52±1,70%. Perrier *dkk*. (1995: 174) melaporkan ekstraksi lipid beberapa khamir *Rhodotorula* menggunakan pelarut heksana untuk lipid netral dan campuran kloroform:metanol (2:1, v/v) untuk lipid polar. Lipid total *Rh. acheniorum* dan *Rh. glutinis* yang diperoleh adalah sebesar 31,2% dan 10%.

Metode yang dapat digunakan untuk analisis lipid, antara lain penyulingan, partisi, atau kromatografi. Metode penyulingan dapat

memisahkan asam lemak berdasarkan panjang rantai karbon, namun tidak efisien dalam memisahkan asam lemak tidak jenuh. Metode partisi dapat memisahkan asam lemak menggunakan pelarut, namun memerlukan peralatan yang besar dan rumit. Metode yang umumnya digunakan adalah kromatografi karena dapat memberikan hasil yang lebih cepat dan memiliki resolusi yang tinggi dibandingkan metode penyulingan dan partisi (Fontell *dkk*. 1960: 393--402; Mayes 2000: 157).

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran senyawa menggunakan fase diam dan fase gerak. Kromatografi yang digunakan untuk pemisahan berbagai kelas lipid adalah kromatografi lapis tipis (KLT) (*thin layer chromatography* atau TLC), sedangkan untuk pemisahan asam lemak adalah kromatografi gas-cair (KGC) (*gas liquid chromatography* atau GLC) (Kuksis 1983: B76).

Kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan pelat tipis sebagai fase diam dan eluen (pelarut) sebagai fase gerak. Pelat tipis dapat berupa lembaran logam atau polimer yang dilapisi oleh aluminium oksida, silika gel, atau selulosa. Fase gerak dapat menggunakan satu jenis atau campuran eluen (Gritter *dkk.* 1991: 6 & 115). Kromatografi lapis tipis mempunyai beberapa kelebihan yaitu murah, mudah dilakukan, cepat, dan dapat mendeteksi komponen zat dalam konsentrasi relatif rendah (Plummer 1987: 85).

Hasil dari kromatografi lapis tipis adalah kromatogram dengan berbagai *spot* yang terpisah. Lipid umumnya tidak berwarna, sehingga

memerlukan visualisasi *spot* yang terpisah dengan senyawa tertentu. Senyawa yang dapat digunakan antara lain 2`,7`-*dichlorofluorescein* (Gurr *dkk*. 2002: 10), uap iodin (Kaneko *dkk.* 1976: 839), dan asam sulfur 50% (Blagović *dkk*. 2001: 176). Menurut Schneiter & Daum (2006b: 76) uap iodin dan asam sulfur merupakan senyawa yang umum digunakan. Penggunaan uap iodin tidak merusak kromatogram, lebih cepat, tetapi tidak dapat mendeteksi senyawa di bawah 1µg, sedangkan asam sulfur dapat mendeteksi senyawa di bawah 1µg, tetapi dapat merusak kromatogram.

Beberapa peneliti telah melaporkan penggunaan KLT untuk pemisahan lipid khamir. Blagović *dkk*. (2001: 177) melaporkan penggunaan KLT untuk pemisahan lipid polar dan netral pada khamir *Sacch. uvarum*. Eluen yang digunakan adalah petroleum eter:dietil eter:asam asetat (70:30:2, v/v). Pemisahan tersebut menunjukkan lipid polar terdiri dari fosfolipid dan lipid netral terdiri dari MAG, DAG, TAG, lanosterol, ergosterol, ester sterol, dan asam lemak bebas.

Pham dan Rasco (2001: 289) melaporkan analisis kelas lipid dengan KLT pada beberapa strain potensial penghasil lipid, antara lain *C. utilis*, *Rh. glutinis*, dan *Rh. minuta*. Campuran eluen yang digunakan adalah heksana:dietil eter:asam format (80:20:2, v/v/v) dan kromatogram dideteksi dengan 2`,7`-*dichlorofluorescein*. Kromatogram beberapa strain tersebut menunjukkan adanya MAG, DAG, TAG, sterol, ester kolesterol, dan asam lemak bebas.

Kaneko *dkk*. (1976: 839) melaporkan pemisahan lipid netral pada 30 spesies khamir menggunakan KLT. Eluen yang digunakan adalah petroleum eter:dietil eter:asam asetat (90:10:1, v/v). Visualisasi kromatogram menggunakan uap iodin. Tiga puluh spesies khamir, antara lain *Sacch. cerevisiae, C. utilis,* dan *Rh. glutinis* memiliki komposisi lipid netral dan polar yang hampir sama. Lipid netral terdiri dari triasilgliserol, sterol, ester sterol, dan asam lemak bebas. Lipid polar terdiri dari fosfolipid, kardiolipin, dan seramida.

Kromatografi gas-cair (KGC) merupakan kromatografi yang menggunakan cairan yang tidak mudah menguap dalam kolom sebagai fase diam dan gas seperti nitrogen sebagai fase gerak. Hasil KGC adalah kromatogram berupa kurva dengan tinggi puncak dan waktu retensi yang berbeda. Waktu retensi adalah waktu yang diperlukan suatu senyawa dari campuran untuk mencapai puncak maksimum dihitung dari waktu penyuntikan campuran senyawa. Setiap senyawa memiliki waktu retensi yang berbeda. Konsentrasi setiap senyawa yang telah dipisahkan oleh KGC dapat dihitung dari luas puncak yang terbentuk karena konsentrasi berbanding lurus dengan luas puncak. Kromatografi gas-cair memiliki kepekaan, kecepatan, ketelitian, dan kesederhanaan dalam pemisahan dan identifikasi campuran senyawa yang mudah menguap (McNair & Bonelli 1988: 1--8).

Tri-Panji *dkk*. (1998: 51) melaporkan penggunaan KGC untuk penentuan komposisi asam lemak pada *Rhi*. *oryzae* yang ditumbuhkan dalam

medium limbah cair pengolahan kopi. Hasil KGC menunjukkan konsentrasi asam palmitoleat sebesar ± 18%, oleat ± 40%, linoleat ± 20%, dan γ-linolenat ± 22%. Alvarez *dkk*. (1992: 214) melaporkan penggunaan KGC untuk penentuan komposisi asam lemak *Rh. glutinis* yang ditumbuhkan dalam medium dengan sumber karbon molase tebu. Hasil KGC menunjukkan konsentrasi asam laurat 1,5%, palmitat 30%, stearat 6%, oleat 55%, dan linoleat 5%.

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

A. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia (FMIPA UI), Depok dan Laboratorium Bioproses Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia selama 8 bulan dari September 2007--April 2008.

B. BAHAN

1. Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan adalah lima strain dari empat spesies *Rhodotorula* milik University of Indonesia Culture Collection (UICC) yang berasal dari Taman Nasional Gunung Halimun. Kelima strain tersebut adalah *Rh*. *acheniorum* SD4233, *Rh*. *glutinis* L4236, *Rh*. *mucilaginosa* UICC-Y-283, *Rh*. *mucilaginosa* UICC-Y-402, dan *Rh*. *nothofagi* UICC-Y-253 (Gambar 4).

2. Medium

Medium Potato Dextrose Agar (PDA) digunakan untuk pemeliharaan khamir di dalam *stock culture* dan *working culture*. Medium Yeast Malt Agar (YMA) yang ditambahkan antibiotik tetrasiklin digunakan untuk pertumbuhan, pemurnian, serta pengamatan makroskopik dan mikroskopik. Medium Yeast

Malt Broth (YMB) digunakan sebagai medium perbanyakan biomassa khamir untuk akumulasi lipid melalui fermentasi.

3. Bahan kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan pada penelitian berasal dari berbagai merk. Bahan kimia dari merk Difco adalah agar (*bacto agar*), ekstrak gandum (*malt extract*), ekstrak khamir (*yeast extract*), pepton, dan PDA. Bahan kimia dari merk Merck adalah asam asetat, dietil eter, glukosa, dan heksana. Bahan kimia dari merk Sigma adalah standar campuran mono-olein, 1,2-diolein, 1,3-diolein, dan triolein, serta standar ergosterol. Bahan kimia lainnya adalah alkohol, aseton teknis, spirtus, dan tetrasiklin [Phaphros].

C. PERALATAN

Peralatan yang digunakan pada penelitian adalah berbagai peralatan yang umum digunakan di dalam Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia. Peralatan yang digunakan adalah autoklaf [Hirayama HA 240 MIV], autoklaf [Hirayama HL 36 AE], *freeze-drier* [Edwards Modulyo], *reciprocal shaker incubator* [OSK Seiwa Reiko], kromatografi gas-cair [Hitachi 263-50], kompor listrik [Tanita], lemari pendingin [Sharp], pengaduk magnet [As One], *microwave oven* [Hitachi], mikropipet [Gilson], oven [Blue M], oven [Heraeus], pemanas air [Kenwood], sentrifugator Biofuge Primo [Heraeus], timbangan analitik [Sartorius], timbangan digital [And EW-300G], dan vorteks [Thermolyne tipe Maxi Mix II]. Peralatan habis pakai yang digunakan adalah

kapas, kertas pH indikator universal [Merck], pelat kromatografi lapis tipis [Merck], tabung [Eppendorf], tabung sentrifugasi [Iwaki], tip [Axygen], dan tisu.

D. CARA KERJA

Alur kerja penelitian terdiri dari beberapa tahap. Tahapan kerja penelitian secara umum dapat dilihat pada Lampiran 1.

1. Pembuatan medium

Medium Potato Dextrose Agar (PDA) dibuat berdasarkan petunjuk kemasan. Medium Yeast Malt Agar (YMA) dibuat berdasarkan Yarrow (1998: 79). Medium YMA steril untuk cawan petri ditambahkan antibiotik tetrasiklin sebanyak 500 mg/l pada saat suhu medium mencapai 40--50^{o}C. Medium Yeast Malt Broth (YMB) dibuat berdasarkan Yarrow (1998: 79) yang dimodifikasi pada sumber karbon glukosa dan ekstrak gandum yaitu menjadi 0,3% ekstrak khamir, 0,5% pepton, 0,9% ekstrak gandum, dan 3% glukosa.

2. Pembuatan koloni tunggal representatif

Pembuatan koloni tunggal representatif dilakukan dengan metode *quadrant-streak* berdasarkan Cappuccino & Sherman (2002: 13--14). Satu ose biakan khamir diambil dari *original culture*, kemudian digores pada medium YMA steril yang telah ditambahkan tetrasiklin di dalam cawan petri. Goresan dibuat dalam empat arah kuadran. Medium yang telah digores,

kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam hingga diperoleh koloni tunggal representatif pada kuadran keempat.

3. Pembuatan *stock culture* dan *working culture*

Pembuatan *stock culture* dan *working culture* dibuat berdasarkan Yarrow (1998: 78) dan Cappuccino & Sherman (2002: 8). Satu ose koloni tunggal representatif digores pada medium PDA miring steril secara *zig-zag* dari permukaan bagian bawah hingga permukaan bagian atas medium. Medium yang telah digores, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam. Biakan yang telah tumbuh, kemudian disimpan di dalam lemari pendingin pada suhu 4--12^{o} C selama 6--8 bulan sebagai *stock culture*. *Working culture* merupakan salah satu *stock culture* yang digunakan untuk kerja penelitian.

4. Pengamatan makroskopik koloni

Pengamatan makroskopik koloni dilakukan berdasarkan Yarrow (1998: 81--82). Ciri-ciri koloni yang diamati yaitu warna, tekstur, tepi, permukaan, dan profil koloni. Pengamatan dilakukan pada biakan berumur 48 jam yang ditumbuhkan dalam medium YMA pada suhu ruang (20^{o}--25^{o}) C.

5. Pengamatan mikroskopik dan pengukuran sel

Pengamatan mikroskopik khamir dilakukan berdasarkan Yarrow (1998: 81). Biakan yang tumbuh pada medium YMA diinkubasi selama 48 jam pada

suhu ruang. Pengamatan mikroskopik meliputi bentuk sel, susunan sel, tipe pertunasan, dan ukuran sel. Pengukuran sel dilakukan menggunakan mikrometer pada 20 sel yang representatif, kemudian dibuat rentang ukuran sel.

6. Pembuatan suspensi sel

Satu ose biakan diambil dari *working culture*, kemudian digores secara *zig-zag* pada medium YMA sebanyak 15 gores dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Pembuatan suspensi sel dilakukan dengan menambahkan 5 ml akuades steril ke dalam tabung biakan. Biakan dikerik menggunakan jarum tanam bulat steril, kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks.

7. Penghitungan jumlah sel

Penghitungan jumlah sel menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) dengan pengenceran berseri berdasarkan Cappuccino & Sherman (2002: 121). Suspensi sel diencerkan di dalam akuades steril hingga diperoleh faktor pengenceran 10^{-5}, 10^{-6}, dan 10^{-7} dengan dua kali pengulangan pada masing-masing faktor pengenceran. Sebanyak 0,1 ml suspensi sel dari masing-masing faktor pengenceran diambil menggunakan mikropipet. Suspensi sel tersebut disebar ke permukaan medium YMA yang telah ditambahkan tetrasiklin menggunakan spatel Drygalski. Biakan diinkubasi selama 48 jam, kemudian jumlah koloni yang tumbuh di permukaan medium dihitung.

Koloni yang tumbuh dan dapat dihitung berjumlah antara 30--300 koloni (CFU=*Colony Forming Unit*) (Madigan *dkk*. 2003: 146). Penghitungan CFU dilakukan berdasarkan Gandjar *dkk*. (1992: 40) dengan rumus:

$$\text{Jumlah CFU/ml} = \frac{\text{Jumlah koloni yang terhitung}}{\text{Volume yang diinokulasi x faktor pengenceran}}$$

8. Penentuan kurva pertumbuhan

Penentuan kurva pertumbuhan dilakukan dengan menghitung jumlah CFU/ml menggunakan metode TPC berdasarkan Cappuccino & Sherman (2002: 121). Sebanyak 1 ml suspensi sel yang diambil setiap 24 jam (jam ke-0, 24, 48, 72, 96, dan 120) diencerkan ke dalam akuades steril hingga diperoleh faktor pengenceran 10^{-5}, 10^{-6} , dan 10^{-7}. Sebanyak 0,1 ml suspensi sel dari masing-masing faktor pengenceran diambil menggunakan mikropipet. Suspensi sel tersebut disebar ke permukaan medium YMA yang telah ditambahkan tetrasiklin menggunakan spatel Drygalski. Biakan diinkubasi selama 48 jam, kemudian dilakukan penghitungan jumlah koloni yang tumbuh di permukaan medium. Jumlah sel dinyatakan dalam *Colony Forming Unit* permililiter (CFU/ml). Skema pengerjaan TPC dapat dilihat pada Lampiran 2.

9. Perbanyakan biomassa

Perbanyakan biomassa khamir dilakukan dengan fermentasi bertujuan mengetahui fase-fase pertumbuhan untuk penentuan waktu pemanenan

biomassa. Sebanyak 10% suspensi sel (20 ml) dimasukkan ke dalam 180 ml medium YMB modifikasi dalam erlenmeyer berukuran 1.000 ml hingga total volume medium adalah 200 ml. Fermentasi berlangsung selama 120 jam menggunakan *resiprocal shaker incubator* dengan kecepatan 110 rpm/menit pada suhu 30^{o}C untuk pembuatan kurva pertumbuhan. Pemanenan biomassa dilakukan pada saat khamir telah mencapai fase stasioner berdasarkan kurva pertumbuhan.

10. Penentuan biomassa kering

Suspensi sel disentrifugasi pada kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet yang berisi sel dibilas dua kali dengan akuades steril. Biomassa yang telah diperoleh kemudian dibekukan dalam *freezer* selama 1 hari agar dapat dikeringkan dalam kondisi beku. Pengeringan sel dilakukan dengan *freeze-dryer* pada suhu di bawah -40^{o} C selama 8--9 jam selama 3 hari berturut-turut. Biomassa yang telah kering disimpan dalam desikator, kemudian ditimbang sebanyak 3 kali selama 3 hari berturut-turut hingga diperoleh berat konstan. Skema penentuan biomassa kering dapat dilihat pada Lampiran 3.

11. Ekstraksi lipid

Ekstraksi lipid menggunakan pelarut heksana dilakukan dalam alat *Soxhlet* dan tanpa alat *Soxhlet* untuk membandingkan waktu, alat, dan volume pelarut yang diperlukan. Ekstraksi lipid menggunakan pelarut

heksana tanpa alat *Soxhlet* berdasarkan Tri-Panji (Komunikasi pribadi) yang dimodifikasi. Sebanyak 1,5 g biomassa kering khamir ditumbuk hingga halus selama 10 menit, lalu ditambahkan 5 ml heksana dan ditumbuk kembali selama 10 menit. Biomassa kering yang telah halus dicampur dengan 10 ml pelarut heksana. Campuran biomassa dan pelarut dihomogenkan dengan vorteks selama 5 menit, kemudian didiamkan hingga terbentuk dua fraksi yaitu pelet yang berisi biomassa dan supernatan yang berisi pelarut heksana yang telah mengikat lipid. Ekstraksi dilakukan kembali pada pelet dengan cara yang sama sebanyak dua kali. Semua supernatan diuapkan dalam oven pengering pada suhu 105^{o} C hingga semua pelarut heksana menguap dan lipid ditimbang berulang kali hingga diperoleh berat konstan. Pengerjaan ekstraksi untuk setiap sampel biomassa dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Skema ekstraksi lipid tanpa menggunakan alat *Soxhlet* dapat dilihat pada Lampiran 4.

Ekstraksi lipid menggunakan alat *Soxhlet* dilakukan oleh Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian Bogor berdasarkan SNI 01-2891-1992. Sebanyak 2 g biomassa kering khamir yang telah halus dibungkus dengan kertas saring, kemudian diletakkan dalam alat *Soxhlet*. Alat *Soxhlet* dihubungkan dengan labu penampung hasil ekstrak dan pendingin. Pelarut heksana digunakan untuk proses esktraksi dengan memanaskan labu penampung hasil ekstrak pada suhu 80^{o} C selama 6 jam. Pelarut heksana disuling dan labu penampung hasil ekstrak lipid dikeringkan dalam oven pengering pada suhu 105^{o} C, lalu ditimbang berulang kali hingga

diperoleh berat konstan. Skema ekstraksi lipid menggunakan alat *Soxhlet* dapat dilihat pada Lampiran 5.

12. Penentuan persentase lipid total

Penentuan persentase kandungan lipid khamir dilakukan dengan menimbang lipid yang diperoleh dari hasil ekstraksi. Persentase lipid total dihitung berdasarkan Ketaren (1986: 37) dengan rumus:

$$\text{Persentase lipid (\%)} = \frac{\text{Berat lipid (g)}}{\text{Berat biomassa kering yang diperiksa (g)}} \text{ X } 100\%$$

13. Penentuan kelas lipid

Penentuan kelas lipid dilakukan berdasarkan Pham & Rasco (2001: 289) dan Rickers-Haunerland (2008: 1) menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Pelat KLT (8x10 cm^2, tebal 0,25 mm) digores dengan jarum sebagai batas antar lintasan spot dengan lebar lintasan 1 cm. Batas bawah 1,5 cm dan atas 0,5 cm pada pelat KLT ditandai dengan pensil. Sebanyak 1µl standar lipid berupa campuran mono-olein, 1,2-diolein, 1,3-diolein, dan triolein ditotolkan pada titik awal lintasan pertama, kemudian standar ergosterol dan lipid khamir ditotolkan pada lintasan lain dengan cara yang sama. Pelat KLT kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* berukuran 500 ml yang telah dijenuhkan dengan 30 ml eluen selama 15 menit. Eluen yang digunakan berupa campuran heksana:dietil eter:asam asetat (60:40:1, v/v/v). Pelat dikeluarkan setelah elusi, dan dipaparkan pada uap iodin hingga

muncul *spot-spot* pada pelat. Setiap *spot* yang muncul dihitung nilai *ratio-to-front* (Rf) dan kemudian dibandingkan dengan standar lipid. Nilai Rf dihitung berdasarkan Pavia *dkk*. (1995: 765) dengan rumus:

$$Rf = \frac{\text{Lintasan } spot \text{ dari batas bawah (cm)}}{\text{Lintasan eluen dari batas bawah hingga batas atas pelat (cm)}}$$

Skema pengerjaan KLT dapat dilihat pada Lampiran 6.

14. Penentuan komposisi asam lemak

Penentuan komposisi asam lemak dilakukan oleh Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian Bogor berdasarkan AOAC (1995: 28.057) menggunakan kromatografi gas-cair (KGC). Sebanyak 200 mg lipid khamir dan 5 ml NaOH-metanol 0,5 N dimasukkan ke labu yang dilengkapi pendingin balik, kemudian dilakukan refluks selama 20 menit menggunakan *water bath* pada suhu 80^{o}C. Sampel yang telah dingin selanjutnya ditambahkan 5 ml BF_3-metanolat dan dilakukan refluks kembali selama 20 menit. Sampel yang telah dingin ditambahkan 2 ml larutan NaCl jenuh dan 2 ml heksana, kemudian dikocok. Lapisan heksana yang terdapat pada bagian atas campuran dipindahkan ke dalam botol berisi Na-sulfat, kemudian sampel diinjeksikan ke dalam alat KGC. Kondisi alat tersebut yaitu: suhu injektor 200^{o}C, suhu detektor 250^{o}C, suhu kolom terprogram 180^{o}C/5^{o}C/menit, jenis detektor *flame ionization detector* (FID), dengan gas pembakar hidrogen, gas pembawa nitrogen dialirkan dengan kecepatan alir 50 ml/menit, dan jenis kolom *diethyleneglycol succinate* (DEGS) dengan

diameter 0,1 mm dan panjang 4 m. Skema pengerjaan KGC dapat dilihat pada Lampiran 7.

15. Penyusunan dan analisis data

Data disusun dalam bentuk Gambar, Kurva, dan Tabel. Data kualitatif dan kuantitatif dianalisis secara deskriptif. Data kualitatif meliputi pengamatan makroskopik koloni dan mikroskopik sel. Data kuantitatif meliputi penghitungan jumlah sel untuk penentuan kurva pertumbuhan, berat biomassa kering, lipid total, kelas lipid dan komposisi asam lemak.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. PENGAMATAN MAKROSKOPIK KOLONI DAN MIKROSKOPIK SEL

Pengamatan makroskopik dilakukan untuk mengetahui warna, tekstur, permukaan, tepi, dan profil koloni lima strain khamir yang digunakan. Pengamatan mikroskopik bertujuan mengetahui bentuk, ukuran, pola pertunasan, dan susunan sel dari lima strain khamir yang digunakan. Strain-strain khamir tersebut ditumbuhkan pada medium YMA dan diinkubasi selama 48 jam. Menurut Yarrow (1998: 78) YMA merupakan medium yang sesuai untuk pertumbuhan khamir. Menurut Boundy-Mills (2006: 83), umumnya khamir membentuk koloni di medium agar setelah diinkubasi selama 48 jam hingga 72 jam. Thyagarajan dan Naylor (1961: 129) melaporkan bahwa sel *Rh. glutinis* aktif membelah pada saat berumur 24 jam hingga 48 jam.

Hasil pengamatan makroskopik menunjukkan koloni dari strain *Rh. acheniorum* SD4233, *Rh. glutinis* L4236, *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-283, *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402, dan *Rh. nothofagi* UICC-Y-253 memiliki variasi warna, yaitu berturut-turut putih, jingga, merah muda, merah muda pucat, dan krem (Gambar 5 & Tabel 1). Menurut Fell dan Statzell-Tallman (1998: 800), warna koloni khamir *Rhodotorula* disebabkan oleh produksi pigmen karotenoid. Maldonade *dkk*. (2007: 68) melaporkan bahwa jenis

pigmen karotenoid yang diproduksi oleh *Rh. graminis* dan *Rh. mucilaginosa* adalah ß-karoten dan torulen. Lima strain khamir memiliki tekstur, tepi, dan profil koloni yang sama yaitu seperti mentega (*butyrous*), lurus, dan menggunung. Permukaan koloni kelima strain khamir terdapat perbedaan antara mengilap atau kusam. Strain *Rh. acheniorum* SD4233, *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-283, dan *Rh. nothofagi* UICC-Y-253 menunjukkan permukaan mengilap, namun strain *Rh. glutinis* L4236 dan *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402 menunjukkan permukaan kusam.

Hasil pengamatan mikroskopik menunjukkan adanya variasi bentuk sel pada masing-masing strain khamir, yaitu bulat, semi bulat, oval, elips, dan memanjang (Gambar 6 & Tabel 2). Berdasarkan hasil pengamatan, sel strain *Rh. acheniorum* SD4233, *Rh. glutinis* L4236, *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-283, dan *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402 umumnya berbentuk bulat dan semi bulat, sedangkan *Rh. nothofagi* UICC-Y-253 umumnya berbentuk memanjang. Menurut Fell dan Statzell-Tallman (1998: 800), sel khamir *Rhodotorula* umumnya berbentuk bulat, oval, atau memanjang. Hasil pengamatan mikroskopik menunjukkan adanya keragaman ukuran sel pada masing-masing strain khamir (Tabel 2). Ukuran sel kelima strain khamir yang ditumbuhkan dalam medium YMA hampir sama dengan ukuran sel yang dideskripsikan oleh Fell dan Statzell-Tallman (1998: 805--825) pada *Rh. acheniorum*, *Rh. glutinis*, *Rh. mucilaginosa*, dan *Rh. nothofagi* yang ditumbuhkan dalam medium berisi ekstrak gandum 5%.

Kelima sel strain khamir menunjukkan pola pertunasan yang sama, yaitu multipolar (Tabel 2). Menurut Fell dan Statzell-Tallman (1998: 800), sel khamir *Rhodotorula* umumnya memiliki pola pertunasan multipolar atau multilateral. Pertunasan multipolar adalah tunas yang tumbuh pada berbagai sisi sel. Bertunas merupakan cara reproduksi aseksual pada khamir *Rhodotorula*. Tunas tersebut merupakan sel anak yang akan menjadi calon sel induk (Yarrow 1998: 80).

Sel-sel pada masing-masing kelima strain khamir membentuk susunan tunggal, berpasangan, atau membentuk rantai pendek (Tabel 2). Menurut Fell dan Statzell-Tallman (1998: 821 & 823), susunan sel *Rh. mucilaginosa* dan *Rh. nothofagi* dapat tunggal, berpasangan, rantai pendek, atau berkelompok.

B. KURVA PERTUMBUHAN DAN WAKTU PEMANENAN BIOMASSA

Fase pertumbuhan khamir dapat dibagi menjadi empat, yaitu fase lag, log, stasioner, dan kematian. Fase pertumbuhan khamir diketahui dari kurva pertumbuhan yang dibuat setelah dilakukan perbanyakan biomassa khamir melalui fermentasi. Perbanyakan biomassa khamir dilakukan selama 120 jam karena diduga khamir telah melakukan semua fase pertumbuhan. Kurva pertumbuhan yang telah diperoleh digunakan untuk menjadi acuan dalam pemanenan biomassa khamir yang mengakumulasi lipid.

Perbanyakan khamir berlangsung dalam medium Yeast Malt Broth (YMB) yang mengandung glukosa, ekstrak khamir, ekstrak gandum, dan

pepton. Menurut Yarrow (1998: 78) YMB merupakan medium yang sesuai untuk pertumbuhan khamir karena menyediakan sumber nutrien seperti karbon, nitrogen, hidrogen, oksigen, fosfor, sulfur, dan vitamin. Khamir akan menggunakan sumber nutrien tersebut terlebih dahulu untuk keperluan sel, seperti pembentukan enzim atau biomolekul untuk komponen sel. Bila terdapat sumber karbon berlebih setelah keperluan sel terpenuhi, maka sumber karbon tersebut akan digunakan untuk pembentukan cadangan lipid dalam bentuk tetes-tetes lemak dalam sel. Medium YMB untuk perbanyakan biomassa khamir ditambahkan sumber karbon glukosa dan ekstrak gandum berlebih agar khamir mengakumulasi lipid. Menurut Ratledge dan Tan (1990: 224) khamir akan mengakumulasi lipid di dalam sel bila ditumbuhkan dalam medium dengan sumber karbon konsentrasi tinggi. Granger *dkk*. (1993: 785) melaporkan *Rh. glutinis* yang ditumbuhkan dalam medium dengan sumber karbon glukosa sebesar 3% dapat mengakumulasi lipid 30% hingga 40%.

Perbanyakan biomassa kelima strain khamir menggunakan fermentasi kocok dengan kecepatan pengocokan sebesar 110 rpm/menit. Lima strain khamir yang digunakan merupakan khamir *Rhodotorula* aerob obligat (Deak 2006: 161). Menurut Gandjar (2006: 40) pengocokan bertujuan meningkatkan aerasi untuk penyediaan oksigen. Menurut Spencer *dkk*. (1997: 72) khamir aerob memerlukan oksigen untuk pertumbuhan. Fonairon-Bonnefond *dkk*. (2002: 179) melaporkan bahwa sintesis asam lemak tidak jenuh dan sterol pada khamir *Sacch. cerevisiae* memerlukan oksigen. Selain

itu, biomassa khamir *Sacch. cerevisiae* yang dihasilkan menjadi rendah bila tidak terdapat oksigen.

Perbanyakan biomassa khamir berlangsung pada suhu 30^{o}C agar pertumbuhan kelima strain khamir lebih optimal. Lima strain khamir yang digunakan pada penelitian merupakan khamir mesofilik. Menurut Deak (2006: 146) khamir mesofilik tumbuh baik pada suhu 20--30^{o} C.

Volume inokulum yang digunakan untuk memulai perbanyakan biomassa khamir dengan fermentasi adalah 10% dari volume total. Menurut Stanbury *dkk*. (1995: 148) volume inokulum yang umumnya digunakan adalah 3% hingga 10% dari volume total. Sabry *dkk*. (1990: 310) menggunakan volume inokulum sebesar 5% dari volume total medium dengan sumber karbon molase untuk perbanyakan biomassa khamir *Rh. glutinis* yang mengakumulasi lipid. Hassan *dkk*. (1994: 535) menggunakan volume inokulum sebesar 10% dari volume total medium berisi jus buah pir untuk perbanyakan biomassa khamir *Cr. curvatus* yang mengakumulasi lipid.

Inokulum lima strain khamir memiliki jumlah *Colony Forming Unit* (CFU) per ml dengan kisaran (1,20--4,00)x10^{8} (Tabel 3). Kisaran jumlah sel 10^{8} merupakan kisaran jumlah sel yang optimal untuk memulai perbanyakan biomassa khamir. Bossie & Martin (1989: 6409) melaporkan jumlah sel yang dapat digunakan untuk memulai perbanyakan biomassa khamir adalah (1--2)x10^{8} per ml.

Pertumbuhan lima strain khamir dalam medium ditandai dengan kekeruhan medium karena adanya peningkatan jumlah sel. Kekeruhan medium ditunjukkan dari medium yang semula berwarna cokelat bening menjadi keruh dan berwarna sesuai dengan warna koloni masing-masing strain, yaitu krem, merah muda, dan merah (Gambar 7). Medium yang menjadi keruh dan berwarna mengindikasikan adanya banyak sel dan pigmen karotenoid khamir *Rhodotorula* yang sedang tumbuh. Perrier *dkk*. (1995: 177) melaporkan beberapa strain *Rhodotorula* seperti *Rh. acheniorum*, *Rh. glutinis*, *Rh. minuta*, dan *Rh. mucilaginosa* menghasilkan karotenoid. Peningkatan jumlah sel dari hasil TPC yang diambil pada jangka waktu 24 jam digunakan untuk pembuatan kurva pertumbuhan.

Fase lag mulai terjadi setelah inokulum khamir dimasukkan ke dalam medium perbanyakan biomassa khamir. Lamanya waktu fase lag kelima strain khamir tidak diketahui secara pasti pada penelitian ini karena pada jam ke-24 telah terjadi peningkatan jumlah sel (Gambar 8). Nilai pH medium pada jam ke-0 setelah diinokulasi khamir hampir mendekati pH medium, yaitu 6,0. Perubahan nilai pH yang tidak signifikan mengindikasikan khamir belum aktif melakukan pertumbuhan (metabolisme), sehingga belum mengeluarkan metabolit yang dapat mengubah pH medium. Khamir diduga melakukan pembentukan enzim dalam sel yang diperlukan untuk mengurai nutrien dalam medium. Sabry *dkk*. (1990: 312) melaporkan fase lag sel khamir *Rh. glutinis* yang ditumbuhkan dalam medium dengan sumber karbon molase bit berlangsung selama kurang dari 24 jam dan tidak terjadi perubahan nilai pH.

Aktivitas biokimia sel tetap berlangsung, namun sel belum melakukan perbanyakan sel secara signifikan.

Fase log kelima strain khamir ditandai dengan adanya peningkatan jumlah sel pada jam ke-24 (Gambar 8 & Tabel 4--8). Menurut Tortora *dkk*. (2001: 173) sel aktif membelah dan jumlah sel meningkat dengan cepat pada fase log. Aktivitas metabolisme sel juga meningkat (Batzing 2002: 53). Pada fase log terjadi penurunan nilai pH yang mengindikasikan adanya asam-asam organik yang dihasilkan akibat metabolisme oleh biakan khamir. Singh *dkk*. (2006: 862) melaporkan bahwa sel khamir *Sacch. cerevisiae* mulai memasuki fase log yang ditandai dengan perbanyakan sel yang aktif melakukan metabolisme. Menurut Walker (1998: 207) metabolisme khamir dapat menghasilkan asam organik seperti asam asetat, sitrat, dan suksinat yang dapat dikeluarkan oleh sel ke medium. Belviso *dkk.* (2004: 671--672) melaporkan khamir *Sacch. cerevisiae* menghasilkan asam asetat sebesar 0,2--1,0 g/l pada fase log.

Strain *Rh. acheniorum* SD4233, *Rh. glutinis* L4236, *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402, dan *Rh. nothofagi* UICC-Y-253 memiliki fase stasioner yang hampir sama, yaitu setelah jam ke-48 hingga sebelum jam ke-72, kecuali *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-283 setelah jam ke-72 hingga sebelum jam ke-96 (Gambar 8 & Tabel 4--8). Pada fase stasioner, jumlah sel yang bertambah seimbang dengan jumlah sel yang mati (Tortora *dkk*. 2001: 174). Menurut Madigan *dkk*. (2003: 145), sel-sel umumnya masih melakukan proses biosintesis pada fase stasioner, seperti akumulasi lipid. Apabila masih

terdapat sumber karbon pada fase stasioner, maka karbon tersebut akan disimpan sel sebagai cadangan lipid (Batzing 2002: 55). Pada fase stasioner, penurunan nilai pH tidak terlalu signifikan dan berkisar 4,0--4,7. Johnson *dkk*. (1992: 382) melaporkan khamir *Rh. glutinis* IIP-30 pada fase stasioner mengandung lipid total maksimum sebesar 66% pada pH 4.

Strain *Rh. acheniorum* SD4233, *Rh. glutinis* L4236, *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402, dan *Rh. nothofagi* UICC-Y-253 memiliki fase kematian dengan jam yang sama, yaitu pada jam ke-96, kecuali *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-283 pada jam ke-120 (Gambar 8 & Tabel 4--8). Fase kematian kelima strain khamir ditandai dengan penurunan jumlah sel. Penurunan jumlah sel dapat disebabkan oleh berkurangnya nutrien dan oksigen sehingga aktivitas biokimia sel menjadi menurun dan sel akhirnya mati. Kisaran nilai pH fermentasi kelima strain khamir pada fase kematian adalah sebesar 4,0--4,7. Nilai pH tersebut mengindikasikan adanya asam-asam organik yang dihasilkan oleh khamir. Menurut Batzing (2002: 55) asam-asam organik yang terlalu banyak dalam medium dapat bersifat racun bagi sel. Razavi *dkk*. (2007: 1593) melaporkan terjadi penurunan nilai pH dari 6 pada fase lag menjadi 3,8 pada fase kematian khamir *Sporobolomyces ruberrimus*.

Pemanenan biomassa strain *Rh. acheniorum* SD4233, *Rh. glutinis* L4236, *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402, dan *Rh. nothofagi* UICC-Y-253 dilakukan setelah diinkubasi 72 jam, sedangkan *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-283 dilakukan setelah diinkubasi 96 jam karena diperkirakan kelima strain khamir tersebut telah memasuki fase stasioner. Sabry *dkk*. (1990: 310)

melaporkan lipid total maksimum *Rh*. *glutinis* dicapai pada saat khamir mencapai fase stasioner akhir setelah diinkubasi selama 192 jam karena kabon berlebih digunakan untuk mengakumulasi lipid.

Hasil penelitian menunjukkan kelima strain khamir melakukan semua fase pertumbuhan selama 120 jam inkubasi. Waktu untuk melaksanakan masing-masing fase pertumbuhan hampir sama. Empat strain khamir memiliki waktu fase stasioner yang sama, yaitu jam ke-72, sedangkan satu strain lainnya pada jam ke-96. Pemanenan biomassa dilakukan pada fase stasioner karena diduga khamir telah mengakumulasi lipid.

C. PERSENTASE LIPID TOTAL

Pada penelitian ini, banyaknya lipid yang dikandung dalam lima strain khamir ditunjukkan oleh persentase lipid total, sedangkan kandungan lipid bergantung pada lipid yang diakumulasi dan metode ekstraksi yang digunakan. Menurut Rattray *dkk*. (1975: 209) lipid yang diakumulasi dipengaruhi oleh strain atau spesies khamir, komposisi medium, dan kondisi fermentasi untuk perbanyakan biomassa seperti suhu, pH, dan kecepatan pengocokan. Gurr *dkk*. (2002: 3) melaporkan efisiensi ekstraksi dipengaruhi oleh jenis pelarut, alat, dan kondisi ekstraksi.

Biomassa yang digunakan untuk ekstraksi lipid dikeringkan menggunakan metode *freeze-drying* (Tabel 9). Ekstraksi lipid menggunakan biomassa kering karena tidak memerlukan perlakuan dengan larutan garam, penanganan mudah, dan pengerjaan lebih cepat. Menurut Smith dan Onions

(1994: 37) metode *freeze-drying* dapat menjaga kestabilan bentuk, struktur, dan aktivitas produk mikroorganisme. Nyns *dkk*. tahun 1968 melaporkan bahwa ekstraksi lipid khamir *C. lipolytica* lebih efisien dengan biomassa beku-kering dibandingkan biomassa basah (*lihat* Hunter & Rose 1971: 213--214). Ohta *dkk*. (1983: 342) melaporkan bahwa lipid khamir *Hansenula polymorpha* diesktraksi menggunakan biomassa beku-kering dan dihasilkan lipid total sebesar 58%.

Persentase lipid total kelima strain khamir diperoleh setelah biomassa kering diekstraksi menggunakan alat *Soxhlet*, serta tanpa alat *Soxhlet*. Lipid dari lima strain khamir tersebut menunjukkan adanya variasi warna (Gambar 9 & 10). Warna tersebut kemungkinan disebabkan oleh pigmen karotenoid yang dihasilkan oleh lima strain khamir ikut terekstraksi. Menurut Page (1989: 206) karotenoid juga termasuk ke dalam kelompok lipid. Oleh karena itu, karotenoid dapat diekstraksi dengan metode ekstraksi lipid.

Lipid total setiap strain khamir yang diperoleh berdasarkan ekstraksi tanpa menggunakan alat *Soxhlet* menunjukkan adanya variasi persentase (Tabel 10). Persentase lipid total tertinggi terdapat pada strain khamir *Rh. acheniorum* SD4233 sebesar 19,19% dan *Rh. nothofagi* UICC-Y-253 sebesar 10,76%. Variasi persentase lipid total menunjukkan spesies yang berbeda mengandung persentase lipid total yang berbeda (Tabel 10). Menurut Hunter dan Rose (1971: 212) spesies yang berbeda akan mengandung persentase lipid total yang berbeda bergantung pada kemampuan masing-masing spesies dalam mengakumulasi lipid. Ratledge

(2004: 809) melaporkan kemampuan mengakumulasi lipid bergantung pada pembentukan asetil KoA yang banyak dari asam sitrat oleh khamir dengan bantuan enzim *ATP:citrate lyase* (ACL).

Persentase lipid total kelima strain khamir berdasarkan ekstraksi lipid menggunakan alat *Soxhlet* juga menunjukkan hasil yang bervariasi untuk setiap strain khamir (Tabel 10). Persentase lipid total tertinggi terdapat pada strain *Rh. acheniorum* SD4233 sebesar 5,12% dan *Rh. nothofagi* UICC-Y-253 sebesar 4,65%. Perrier *dkk*. (1995: 174) melaporkan lipid total beberapa strain *Rhodotorula* dan lipid total tertinggi terdapat pada strain *Rh. acheniorum* sebesar 31,2% dan *Rh. bacarum* sebesar 18,8% yang diekstraksi dengan alat *Soxhlet.*

Lipid total lima strain khamir yang diekstraksi menggunakan alat *Soxhlet*, serta tanpa alat *Soxhlet* menunjukkan adanya kesamaan urutan tertinggi hingga terendah. Kesamaan urutan mengindikasikan data yang konsisten untuk kedua metode ekstraksi.

Hasil ekstraksi lipid lima strain khamir menggunakan dua metode ekstraksi menunjukkan persentase lipid total yang berbeda, walaupun ditumbuhkan dalam medium dan kondisi pertumbuhan yang sama. Hal tersebut mengindikasikan metode ekstraksi yang berbeda mempengaruhi persentase lipid total yang diperoleh. Kedua metode tersebut masing-masing memiliki kelebihan dan kekurangan. Metode ekstraksi tanpa menggunakan alat *Soxhlet* lebih mudah dilakukan dibandingkan dengan alat *Soxhlet*. Waktu pengerjaan lebih singkat, biaya yang diperlukan relatif lebih murah,

dan metode tersebut dapat digunakan untuk deteksi awal kandungan lipid khamir. Kekurangan metode tersebut adalah terdapat kemungkinan sel terbawa dalam hasil ekstraksi. Pada metode ekstraksi menggunakan alat *Soxhlet,* tidak ada kemungkinan sel terbawa ke dalam hasil ekstraksi, namun biaya yang diperlukan lebih mahal karena memerlukan alat dan banyak pelarut organik, serta waktu pengerjaan lebih lama. Metode ekstraksi tanpa alat *Soxhlet* perlu dioptimasi antara lain pada tahap penumbukan sel untuk pelisisan sel sehingga lipid yang dapat dikeluarkan oleh sel lebih banyak.

Persentase lipid total kelima strain khamir *Rhodotorula* relatif rendah dibandingkan informasi yang dilaporkan Ratledge (2002: 1047) bahwa *Rhodotorula* spp. dapat mengakumulasi lipid antara 40% hingga 70%. Persentase lipid total yang rendah dapat disebabkan oleh strain atau spesies khamir yang digunakan, jenis sumber karbon, konsentrasi sumber karbon, kondisi fermentasi, dan metode ekstraksi yang digunakan.

Strain atau spesies khamir yang berbeda dapat menyebabkan kandungan lipid sel khamir yang berbeda. Alvarez *dkk*. (1992: 214) melaporkan khamir *Rh. glutinis* L/24-2-1 memiliki lipid total sebesar 39%. Johnson *dkk*. (1992: 382) melaporkan spesies khamir yang sama dengan strain berbeda yaitu *Rh. glutinis* IIP-30 memiliki lipid total sebesar 66%. Saxena *dkk*. (1998: 501) melaporkan khamir *Rh. minuta* memiliki lipid total sebesar 48%. Hasil penelitian yang dilaporkan para peneliti tersebut menunjukkan persentase lipid total bergantung pada strain khamir yang digunakan.

Kandungan lipid sel khamir dapat dipengaruhi oleh jenis dan konsentrasi sumber karbon. Sabry *dkk*. (1990: 310) melaporkan produksi lipid oleh *Rh*. *glutinis* menggunakan molase bit 6% sebagai sumber karbon menghasilkan lipid total sebesar 24,1%. Perrier *dkk*. (1995: 175) melaporkan khamir *Rh. glutinis* yang ditumbuhkan dalam medium Yeast Nitrogen Base yang ditambahkan 1% glukosa mengandung lipid total 15,2%.

Kondisi fermentasi dan metode ekstraksi dapat memengaruhi kandungan lipid sel khamir. Alvarez *dkk*. (1992: 214) melaporkan ekstraksi lipid khamir *Rh. glutinis* yang ditumbuhkan secara *batch* dalam medium dengan sumber karbon molase tebu selama 72 jam pada suhu 32^{o} C. Ekstraksi lipid menggunakan alat *Soxhlet* dengan pelarut organik dietil eter dan menghasilkan lipid total sebesar 39%. Johnson *dkk*. (1992: 382) melaporkan ekstraksi lipid khamir *Rh. glutinis* yang ditumbuhkan secara *fed-batch* dalam medium dengan sumber karbon glukosa selama 120 jam dan pada suhu 30^{o} C. Ekstraksi lipid menggunakan pelarut kloroform:metanol (2:1) menghasilkan lipid total sebesar 66%. Somashekar dan Joseph (2000: 491) melaporkan ekstraksi lipid khamir *Rh. gracilis* yang ditumbuhkan secara *batch* dalam medium dengan sumber karbon glukosa 4% selama 96 jam dalam *incubator shaker orbital* pada suhu 28 ± 2^{o} C. Ekstraksi lipid menggunakan alat *Soxhlet* dengan pelarut petroleum eter menghasilkan lipid total sebesar 55%.

Berdasarkan persentase lipid total dan berat biomassa kering yang telah diperoleh, belum dapat diketahui korelasi yang jelas antara lipid total

dan berat biomassa kering. Biomassa kering tertinggi diperoleh dari strain *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-283 yang menghasilkan persentase lipid total terendah. Hal tersebut mengindikasikan masing-masing spesies khamir *Rhodotorula* yang digunakan memiliki kemampuan pertumbuhan (perbanyakan biomassa) dan akumulasi lipid yang berbeda. Sabry *dkk*. (1990: 311) melaporkan bahwa tidak terdapat hubungan yang konsisten antara akumulasi lipid dengan berat biomassa khamir. Khamir *Sacch. cerevisiae* VIII memiki biomassa kering sebesar 534 mg dan mengandung lipid total sebesar 7,12%, sedangkan *Sacch. cerevisiae* IXV (SB) memiliki biomassa kering sebesar 464 mg dan mengandung lipid total sebesar 11,64%.

Berdasarkan hasil ekstraksi menggunakan dua metode menunjukkan strain *Rh. acheniorum* SD4233 dan *Rh. nothofagi* UICC-Y-253 memiliki persentase lipid total yang relatif tinggi dibandingkan strain-strain lainnya. Kedua strain khamir tersebut berpotensi dalam mengakumulasi lipid.

D. KELAS LIPID

Kelas lipid dideteksi dari lipid hasil ekstraksi dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Standar kelas lipid menggunakan campuran mono-olein (monoasilgliserol), 1,2-diolein dan 1,3-diolein (diasilgliserol), dan triolein (triasilgliserol), serta ergosterol. Menurut Ratledge (1997: 140) triasilgliserol merupakan lipid netral utama yang diakumulasi dalam bentuk tetes lemak di dalam sitoplasma sel khamir. Ergosterol merupakan lipid polar yang

umumnya terdapat pada membran sel kelompok fungi untuk menjaga permeabilitas membran (Walker 1998: 238).

Kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan pada sampel lipid hasil ekstraksi menggunakan alat *Soxhlet*, serta tanpa alat *Soxhlet*. Eluen yang digunakan sebagai fase gerak dalam KLT adalah heksana:dietil eter:asam asetat dengan perbandingan volume 50:50:1, 60:40:1, dan 80:20:1. Berdasarkan kromatogram yang dihasilkan, eluen heksana:dietil eter:asam asetat dengan perbandingan volume 60:40:1 merupakan campuran eluen terbaik karena menghasilkan pemisahan *spot-spot* yang lebih baik. Menurut Pavia *dkk*. (1995: 762) urutan kepolaran dari paling non polar hingga paling polar berturut-turut adalah heksana, dietil eter, dan asam asetat. Sampel lipid merupakan campuran senyawa yang memiliki kepolaran yang berbeda, sehingga diperlukan campuran eluen yang memiliki tingkat kepolaran yang berbeda untuk memisahkan campuran lipid.

Kromatogram yang diperoleh divisualisasi menggunakan uap iodin karena metode tersebut paling sederhana, tidak merusak kromatogram, dan hasil *spot* lebih cepat diperoleh. Menurut Pavia *dkk*. (1995: 763) iodin akan bereaksi dengan senyawa organik membentuk senyawa kompleks yang berwarna cokelat atau kuning. Kromatogram hasil KLT menunjukkan adanya *spot-spot* kuning yang terpisah (Gambar 11 & 12). *Spot* kuning mengindikasikan senyawa kompleks yang terbentuk akibat reaksi iodin dan lipid.

Standar lipid campuran mono-olein, 1,2-diolein, 1,3-diolein, dan triolein menunjukkan empat *spot* yang terpisah. *Spot-spot* tersebut mengindikasikan standar lipid yang murni. Empat *spot* standar lipid campuran menunjukkan nilai Rf yang berbeda (Tabel 11). Urutan nilai Rf dari tertinggi hingga terendah mengindikasikan triolein, 1,3-diolein, 1,2-diolein, dan mono-olein. Schneiter dan Daum (2006b: 79) melaporkan bahwa triasilgliserol akan memiliki nilai Rf yang relatif lebih tinggi dibandingkan diasilgliserol dan monoasilgliserol pada pemisahan lipid dengan KLT menggunakan fase diam pelat silika gel dan eluen petroleum eter:dietil eter:asam asetat (70:30:2, v/v/v). Menurut Mayes (2000: 157) 1,3 diasilgliserol memiliki nilai Rf lebih tinggi dibandingkan 1,2 diasilgliserol pada pemisahan lipid dengan KLT menggunakan fase diam pelat silika gel dan eluen heksana:dietil eter:asam format (80:20:2, v/v/v). Lipid non polar akan bermigrasi dengan cepat menjauhi titik asal sampel dan memiliki nilai Rf yang relatif tinggi, sedangkan lipid polar sebaliknya (Schneiter & Daum 2006b: 76).

Standar ergosterol menunjukkan satu *spot* pada kromatogram. *Spot* tersebut memiliki nilai Rf hampir mendekati nilai Rf 1,2-diolein. Nilai Rf yang hampir mendekati menunjukkan adanya kesamaan kepolaran. Schneiter dan Daum (2006b: 79) melaporkan bahwa sterol dan diasilgliserol memiliki nilai Rf yang hampir sama pada pemisahan lipid dengan KLT menggunakan fase diam pelat silika gel dan eluen heksana:dietil eter:asam format (80:20:2, v/v/v).

Spot-spot pada kromatogram sampel lipid lima strain khamir hasil ekstraksi menggunakan alat *Soxhlet* selalu menunjukkan adanya ergosterol, 1,2-diolein, dan triolein (Gambar 11). *Spot* yang mengindikasikan mono-olein hanya terdeteksi pada kromatogram untuk sampel lipid strain *Rh. acheniorum* SD4233, *Rh. glutinis* L4236, dan *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402. *Spot* yang mengindikasikan 1,3-diolein tidak terdeteksi pada kromatogram sampel lipid kelima strain khamir.

Spot-spot pada kromatogram sampel lipid lima strain khamir hasil ekstraksi tanpa menggunakan alat *Soxhlet* selalu menunjukkan adanya ergosterol dan triolein (Gambar 12). *Spot* yang mengindikasikan 1,2-diolein hanya terdeteksi pada kromatogram untuk sampel lipid strain *Rh. glutinis* L4236. S*pot* yang mengindikasikan mono-olein dan 1,3-diolein tidak terdeteksi pada kromatogram sampel lipid kelima strain khamir.

Lipid 1,3-diolein tidak terdeteksi pada lipid lima strain khamir, sedangkan mono-olein tidak terdeteksi pada strain *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-283 dan *Rh. nothofagi* UICC-Y-253. Hal tersebut mengindikasikan jenis kedua lipid terdapat dalam konsentrasi rendah sehingga tidak terekstraksi dan tidak terdeteksi dengan KLT. Menurut Hunter dan Rose (1971: 218) monoasilgliserol dan diasilgliserol khamir berasal dari hasil degradasi triasilgliserol dan umumnya terdapat dalam konsentrasi rendah. Blagović *dkk*. (2001: 177) melaporkan lipid khamir *Sacch*. *uvarum* yang dideteksi dengan KLT menunjukkan adanya monoasilgliserol, diasilgliserol, triasilgliserol, ergosterol, ester sterol, dan asam lemak bebas.

Setiap titik asal penotolan sampel lipid lima strain khamir hasil ekstraksi pada kromatogram menunjukkan adanya *spot* cokelat yang pekat. *Spot* tersebut kemungkinan merupakan kelas lipid yang memiliki tingkat kepolaran yang lebih tinggi dibandingkan ergosterol. Menurut Schneiter dan Daum (2006b: 79) fosfolipid dan ergosterol merupakan lipid polar pada khamir.

Kromatogram sampel lipid lima strain khamir hasil ekstraksi menggunakan alat *Soxhlet*, serta tanpa alat *Soxhlet* menunjukkan adanya *spot-spot* yang tidak diketahui kelas lipidnya secara pasti. *Spot-spot* tersebut terletak antara *spot* 1,3-diolein dan triolein, serta setelah triolein. Kelas lipid tidak dapat diketahui secara pasti karena standar lipid yang digunakan tidak lengkap. *Spot-spot* yang terletak di antara 1,3-diolein dan triolein tersebut diduga merupakan kelas lipid lain yang memiliki tingkat kepolaran relatif rendah dibandingkan 1,3-diolein. Menurut Mayes (2000: 157) asam lemak bebas memilik tingkat kepolaran relatif lebih rendah dibandingkan sterol dan 1,3-diasilgliserol. *Spot* yang terletak di atas *spot* triolein kemungkinan merupakan kelas lipid yang memiliki tingkat kepolaran relatif lebih rendah dibandingkan triolein. Menurut Schneiter dan Daum (2006b: 79) ester sterol merupakan lipid netral khamir yang tingkat kepolaran relatif lebih rendah dibandingkan triasilgliserol dan memiliki nilai Rf yang lebih tinggi. MüIlner dan Daum (2004: 324) melaporkan khamir menyimpan lipid netral triasilgliserol dan ester sterol dalam bentuk tetes-tetes lemak sebagai cadangan energi.

Hasil analisis kelas lipid menggunakan kromatografi lapis tipis menunjukkan lipid lima strain khamir mengandung ergosterol, 1,2-diolein, dan triolein. Lipid mono-olein hanya terdeteksi pada strain *Rh. acheniorum* SD4233, *Rh. glutinis* L4236, dan *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402. Lipid lima strain khamir tidak terdeteksi adanya 1,3-diolein. Berdasarkan kromatogram, *spot* triolein pada lipid semua strain khamir tampak lebih besar dibandingkan *spot* lainnya. Hal tersebut dapat mengindikasikan konsentrasi triolein yang relatif lebih tinggi dibandingkan konsentrasi lipid lainnya.

E. KOMPOSISI ASAM LEMAK

Komposisi asam lemak dari lipid hasil ekstraksi dideteksi dengan kromatografi gas-cair (KGC). Standar asam lemak yang digunakan dalam KGC adalah asam laurat, miristat, palmitat, stearat, oleat, dan linoleat. Menurut Walker (1998: 236--237) asam-asam lemak tersebut umumnya merupakan penyusun lipid khamir.

Hasil analisis komposisi asam lemak dengan KGC menunjukkan adanya asam lemak jenuh dan tidak jenuh pada lipid kelima strain khamir. Asam lemak jenuh meliputi asam laurat, miristat, palmitat, dan stearat, sedangkan asam lemak tidak jenuh meliputi asam oleat (monoenoat) dan linoleat (polienoat). Terdapat perbedaan komposisi asam lemak kelima strain khamir yang ditunjukkan dari variasi persentase asam lemak jenuh dan tidak jenuh (Tabel 12). Lima strain khamir yang digunakan terdiri dari empat spesies. Menurut Rattray *dkk*. (1975: 201) spesies khamir yang berbeda

akan memiliki komposisi asam lemak yang berbeda. Perrier *dkk*. (1995: 175) melaporkan khamir *Rh. mucilaginosa* yang ditumbuhkan dalam medium Yeast Nitrogen Base mengandung asam laurat 0,05%, miristat 1,53%, palmitat 14,94%, stearat 3,11%, oleat 49,29%, dan linoleat 14,71%. Alvarez *dkk*. (1992: 215) melaporkan khamir *Rh. glutinis* yang ditumbuhkan dalam medium molase tebu mengandung asam laurat 1,5%, palmitat 30%, stearat 6%, oleat 55%, dan linoleat 5%.

Asam palmitat merupakan asam lemak jenuh yang memiliki persentase relatif lebih tinggi pada lipid kelima strain khamir dibandingkan asam laurat, miristat, dan stearat. Hal tersebut mengindikasikan lima strain khamir relatif lebih banyak menyintesis asam lemak jenuh dalam bentuk asam palmitat. Persentase asam palmitat tertinggi terdapat pada strain khamir *Rh. acheniorum* SD4233 sebesar 38,30%, sedangkan terendah pada *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402 sebesar 27,99%.

Menurut Gaffney (1991: 155) asam palmitat merupakan produk utama sintesis asam lemak. Asam palmitat dapat diubah menjadi asam lemak baru yang memiliki jumlah atom karbon kurang dari 16 atau lebih, seperti asam laurat, miristat, dan stearat. Ratledge dan Tan (1990: 225) melaporkan bahwa asam palmitat merupakan salah satu asam lemak jenuh yang menyusun triasilgliserol khamir dalam bentuk tetes lemak.

Asam laurat dan miristat merupakan asam lemak jenuh pada lipid kelima strain khamir yang memiliki persentase relatif lebih rendah dibandingkan asam palmitat. Persentase asam laurat tertinggi terdapat pada

strain *Rh. glutinis* L4236 sebesar 11,38%, sedangkan terendah pada *Rh. acheniorum* SD4233 sebesar 0,35%. Persentase asam miristat tertinggi terdapat pada *Rh. acheniorum* SD4233 sebesar 13,60%, sedangkan terendah pada *Rh. nothofagi* UICC-Y-253 sebesar 3,96%. Menurut Gaffney (1991: 155) asam laurat dan miristat dibentuk dari asam palmitat melalui pemendekan rantai karbon.

Asam stearat merupakan asam lemak jenuh yang memiliki persentase relatif lebih rendah pada lipid kelima strain khamir dibandingkan asam laurat, miristat, dan palmitat. Persentase asam stearat tertinggi terdapat pada strain *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402 sebesar 1,81%, sedangkan terendah pada *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-283 sebesar 0,76%. Asam stearat *Rh. nothofagi* UICC-Y-253 tidak terdeteksi. Asam stearat yang tidak terdeteksi mungkin disebabkan senyawa tersebut hanya terdapat dalam konsentrasi rendah di bawah 0,01 ppm sehingga tidak dapat dideteksi oleh alat KGC yang memiliki batas limit deteksi 0,01 ppm. Persentase asam stearat yang relatif rendah pada kelima strain khamir mengindikasikan telah banyak asam stearat yang diubah menjadi asam lemak tidak jenuh (monoenoat). Menurut Montgomery *dkk*. (1993: 760) asam stearat dapat diubah menjadi asam oleat dengan bantuan enzim desaturase $\Delta 9$.

Asam oleat merupakan asam lemak tidak jenuh (monoenoat) yang memiliki persentase relatif tinggi pada lipid lima strain khamir. Persentase asam oleat tertinggi terdapat pada strain *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402 sebesar 60,28%, sedangkan terendah pada *Rh. acheniorum* SD4233

sebesar 27,62%. Konsentrasi asam oleat yang relatif tinggi pada keempat strain khamir mengindikasikan banyak asam stearat yang telah diubah menjadi asam oleat. Menurut Walker (1998: 236--237) sintesis asam oleat pada khamir berlangsung melalui desaturasi oksidatif dengan bantuan enzim desaturase. Asam oleat merupakan asam lemak utama penyusun triasilgliserol dalam tetes-tetes lemak yang berperan dalam integritas membran sel khamir.

Asam linoleat merupakan asam lemak tidak jenuh (polienoat) yang memiliki persentase relatif lebih rendah dibandingkan asam oleat. Persentase asam linoleat tertinggi terdapat pada strain *Rh. nothofagi* UICC-Y-253 sebesar 32,13%, sedangkan terendah pada *Rh. glutinis* L4236 sebesar 15,18%. Asam linoleat *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402 tidak terdeteksi. Asam linoleat yang tidak terdeteksi kemungkinan hanya terdapat dalam konsentrasi rendah di bawah 0,01 ppm. Diduga hanya sedikit asam oleat yang diubah menjadi asam linoleat sehingga tidak terdeteksi. Menurut Montgomery *dkk*. (1993: 760) asam linoleat dibentuk dari desaturasi asam oleat dengan bantuan enzim desaturase $\Delta 12$.

Hasil analisis komposisi asam lemak kelima strain khamir menunjukkan persentase asam palmitat, oleat, dan linoleat lebih tinggi dibandingkan asam laurat, miristat, dan stearat. Perrier *dkk.* (1995: 173) melaporkan bahwa asam lemak utama pada khamir *Rhodotorula* adalah asam palmitat, oleat, dan linoleat. Hassan *dkk*. (1994: 536) melaporkan

asam oleat dan palmitat merupakan asam lemak utama pada lipid khamir *Cr. curvatus*.

Hasil penelitian menunjukkan strain khamir *Rh. nothofagi* UICC-Y-253 berpotensi menghasilkan asam linoleat dengan persentase relatif tinggi dibandingkan empat strain khamir lainnya. Asam linoleat merupakan asam lemak esensial yang diperlukan dalam bidang kesehatan manusia. Asam linoleat berperan sebagai prekursor sintesis asam lemak omega 6 lainnya, seperti asam arakidonat yang berperan sebagai prekursor untuk sintesis hormon dalam regulasi fisiologi tubuh. Asam lemak lain dengan jumlah atom karbon ganjil dan lebih dari 18 yang tidak dapat dideteksi oleh kromatografi gas-cair (KGC) dapat dideteksi dengan *gas chromatography-mass spectrometry* (GC-MS).

Salah satu kemungkinan pemanfaatan strain khamir tersebut adalah dalam bentuk lipid ekstrak atau biomassa kering sebagai suplemen dalam produk makanan, susu, atau pakan ternak. Khamir yang dimanfaatkan sebagai suplemen dalam pakan ternak akan menguntungkan ternak tersebut karena memperoleh asam linoleat. Manusia yang mengonsumsi ternak tersebut dengan demikian juga mendapat keuntungan memperoleh asam linoleat.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. Lipid total khamir strain *Rh*. *acheniorum* SD4233, *Rh*. *nothofagi* UICC-Y-253, *Rh*. *mucilaginosa* UICC-Y-402, *Rh*. *glutinis* L4236 berturut-turut sebesar 19,19%, 10,76%, 3,53%, dan 4,28% setelah khamir mencapai fase stasioner pada jam ke-72. Lipid total khamir strain *Rh*. *mucilaginosa* UICC-Y-283 sebesar 1,48% setelah khamir mencapai fase stasioner pada jam ke-96.
2. Lipid pada lima strain khamir mengandung ergosterol, 1,2-diolein, dan triolein, sedangkan mono-olein hanya terdekteksi pada strain *Rh. acheniorum* SD4233, *Rh. glutinis* L4236, dan *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402. Lipid 1,3-diolein tidak terdeteksi pada semua strain khamir.
3. Strain *Rh*. *acheniorum* SD4233 mengandung asam laurat 0,35%, miristat 13,60%, palmitat 38,80%, stearat 1,28%, oleat 27,62%, dan linoleat 18,76%. Strain *Rh*. *glutinis* L4236 mengandung asam laurat 11,38%, miristat 7,50%, palmitat 33,94%, stearat 1,63%, oleat 29,27%, dan linoleat 15,18%. Strain *Rh*. *mucilaginosa* UICC-Y-283 mengandung asam laurat 12,61%, miristat 5,80%, palmitat 29,14%, stearat 0,76%, oleat 35,99%, dan linoleat 15,70%. Strain *Rh*. *mucilaginosa* UICC-Y-402 mengandung asam laurat 2,00%, miristat 8,81%, palmitat 27,99%, stearat 1,81%, dan

oleat 60,28%. Strain *Rh*. *nothofagi* UICC-Y-253 mengandung asam laurat 5,05%, miristat 3,96%, palmitat 28,41%, oleat 30,43%, dan linoleat 31,15%.

B. SARAN

1. Perlu dilakukan optimasi metode ekstraksi yang telah digunakan untuk memperoleh lipid yang lebih banyak.
2. Perlu dilakukan deteksi komposisi asam lemak dari strain khamir *Rh*. *nothofagi* UICC-Y-253 dengan *gas chromatography-mass spectrometry* (GC-MS) untuk memperoleh komposisi asam lemak yang lebih lengkap.
3. Perlu dilakukan optimasi komposisi medium melalui pemilihan jenis dan konsentrasi sumber karbon dan kondisi fermentasi (nutrien, suhu, pH, dan kecepatan pengocokan) agar khamir mengakumulasi lebih banyak lipid.

DAFTAR ACUAN

Achmadi, S.S., Sulistiyani & Tri-Panji. 2000. Efek ekstrak lipid *Spirulina platensis* pada plasma darah kelinci yang diberi pakan kolesterol. *Hayati* **7**(3): 66--70.

Alexopoulos, C.J., C.W. Mims & M. Blackwell. 1996. *Introductory mycology*. 4th ed. John Wiley & Sons, Inc., New York: x + 487 hlm.

Alvarez, R.M., B. Rodríguez, J.M. Romano, A.O. Díaz, E. Gómez, D. Miró, L. Navarro, G. Saura & J.L. García. 1992. Lipid accumulation in *Rhodotorula glutinis* on sugar cane molasses in single-stage continuous culture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 214--215.

Anderson, D. 2005. A primer on oils processing technology. *Dalam:* Shahidi, F. (ed.). 2005. *Bailey`s industrial oil and fat products*. 6th ed. John Wiley & Sons, Inc., (?): 1--55.

AOAC. 1995. *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists*. Vol. IIA. AOAC International, Washington: 28.057.

Aoki, H., N. Miyamoto, Y. Furuya, M. Mankura, Y. Endo & K. Fujimoto. 2002. Incorporation and accumulation of docosahexaenoic acid from the medium by *Pichia methanolica* HA-32. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**(12): 2632--2638.

Athenstaedt, K. & G. Daum. 2006. The life cycle of neutral lipids: Synthesis, storage and degradation. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**: 1355--1369.

Batzing, B.L. 2002. *Microbiology: An introduction*. Brooks/Cole, Australia: xx + 780 hlm.

Belviso, S., L. Bardi, A.B. Bartolini & M. Barzona. 1994. Lipid nutrition of *Saccharomyces cerevisiae* in winemaking. *Can. J. Microbiol*. **50**(9): 669--674.

Bettelheim, F.A. & J. March. 1995. *Introduction to organic & biochemistry*. 2nd ed. Harcourt Brace College Publishers, Fort Worth: xxviii + 510 hlm.

Blagović, B., J. Rupčić, M. Mesarić, K. Georgiú & V. Marić. 2001. Lipid composition of Brewer`s yeast. *Food Technol. Biotechnol.* **39**(3): 175--181.

Boekhout, T., R.J. Bandoni, J.W. Fell & K.J. Kwon-Chung. 1998. Discussion of teleomorphic and anamorphic genera of heterobasidiomycetous yeasts. *Dalam:* Kurtzman, C.P. & J.W. Fell (eds.). 1998. *The yeasts: A taxonomic study*. 4th ed. Elsevier, Amsterdam: 608--634.

Bossie, M.A. & C.E. Martin. 1989. Nutritional regulation of yeast Δ-9 fatty acid desaturase activity. *J. Bacteriol.* **171**(12): 6409--6413.

Boundy-Mills, K. 2006. Methods for investigating yeast biodiversity. *Dalam:* Rosa, C. & G. Peter (eds.). 2006. *The yeast handbook: Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer-Verlag, Berlin: 67--100.

Boyer, R. 2002. *Concepts in biochemistry*. 2nd ed. Brooks/Cole Thomson Learning, Australia: xxv + 626 hlm.

Buzzini, P. & A.V. Martini. 2006. Yeast biodiversity and biotechnology. *Dalam:* Rosa, C. & G. Peter (eds.). 2006. *The yeast handbook: Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer-Verlag, Berlin: 531--539.

Cappuccino, J.G. & N. Sherman. 2002. *Micobiology: A laboratory manual*. Benjamin/Cummings, San Francisco: xvi + 491 hlm.

Chuan-Chao Dai, Jie Tao, Feng Xie, Yi-Jun Dai & Mo Zhao. 2007. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *Afr. J. Biotechnol.* **6**(18): 2130--2134.

Coleman, R.A. & D.P. Lee. 2004. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog. Lipid Res.* **43**: 134--176.

Deak, T. 2006. Environmental factors influencing yeasts. *Dalam:* Rosa, C. & G. Peter (eds.). 2006. *The yeast handbook: Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer-Verlag, Berlin: 155--174.

Denniston, K.J., J.J. Topping & R.L. Caret. 2004. *General, organic, and biochemistry*. 4th ed. McGraw Hill Higher Education, Boston: xxxi + 880 hlm.

Dyal, S.D. & S.S. Narine. 2005. Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. *Food Res. Int.* **38**: 445--467.

Fajardo, A.R., L.E. Cerdán, A.R. Medina, F.G.A. Fernández, P.A.G. Moreno & E.M. Grima. 2007. Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **109**: 120--126.

Fell, J.W. & A. Statzell-Tallman. 1998. *Rhodotorula* F.C. Harrison. *Dalam:* Kurtzman, C.P. & J.W. Fell (eds.). 1998. *The yeasts: A taxonomic study*. 4th ed. Elsevier, Amsterdam: 800--827.

Fonairon-Bonnefond, C., V. Demaretz, E. Rosenfeld & J.M. Salmon. 2002. Oxygen addition and sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* **93**(2): 176--182.

Fontell, K., R.T. Holman & G. Lambertsen. 1960. Some new methods for separation and analysis of fatty acids and other lipids. *J. Lipid Res.* **1**(5): 391--404.

Franklin, S.T., K.R. Martin, R.J. Baer, D.J. Schingoethe & A.R. Hippen. 1999. Dietary marine algae (*Schizochytrium* sp.) increases concentrations of conjugated linoleic, docosahexaenoic and transvaccenic acids in milk of dairy cows. *J. Nutr.* **88**: 2048--2055.

Gaffney, J.J. 1992. Lipid biosynthesis. *Dalam:* Smith, C.A. & E.J. Wood (eds.). 1992. *Molecular and cell biochemistry: Biosynthesis.* Chapman & Hall, London: 154--182.

Gandjar, I., I.R. Koentjoro, W. Mangunwardoyo & L. Soebagya. 1992. *Pedoman praktikum mikrobiologi dasar*. Jurusan Biologi FMIPA UI, Depok: vii + 87 hlm.

Gandjar, I. 2006. Pertumbuhan. *Dalam:* Gandjar, I., W. Sjamsuridzal & A. Oetari (eds.). 2006. *Mikologi dasar dan terapan*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta: 36--46.

Gritter, R.J., J.M. Bobbitt & A.E. Schwarting. 1991. *Pengantar kromatografi*. Terj. dari *Introduction to chromatography*, oleh Padmawinata, K. Penerbit ITB, Bandung: 10a + 266 hlm.

Granger, L.M., P. Perlot, G. Goma & A. Pareilleux. 1993. Effect of various nutrient limitations on fatty acid production by *Rhodotorula glutinis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 784--789.

Gurr, M.I., J.L. Harwood & K.N. Frayn. 2002. *Lipid biochemistry: An introduction*. 5th ed. Blackwell Science, Oxford: xvi + 320 hlm.

Hassan, M., P.J. Blanc, A. Pareilleux & G. Goma. 1994. Production of single-cell oil from prickly-pear juice fermentation by *Cryptococcus curvatus* grown in batch culture. *World J. Microbiol. Biotechnol*. **10**: 534--537.

Hung-Der Jang, Yuh-Yih Lin & Shang-Shyng Yang. 2000. Polyunsaturated fatty acid production with *Mortierella alpina* by solid fermentation. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **41**: 41--48.

Hunter, K. & A.H. Rose. 1971. Yeast lipids and membranes. *Dalam:* Rose, A.H. & J.S. Harrison (eds.). 1971. *The yeasts.* Volume 2. Academic Press, London: 211--269.

Johnson, V., M. Singh, V.S. Saini, V.R. Sista & N.K. Yadav. 1992. Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 382--384.

Johnson, V.W, M. Singh & N.K. Yadav. 1994. Influence of growth conditions on the accumulation of ergosterol by *Rhodotorula glutinis*. *World J. Microbiol. Biotechnol*. **10**: 114--115.

Johnson, V.W, M. Singh, V.S. Saini, D.K. Adhikari, V. Sista & N.K. Yadav. 1995. Utilization of molasses for the production of fat by an oleaginous yeast, *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 1--4.

Kaneko, H., M. Hosohara, M. Tanaka & T. Itoh. 1976. Lipid composition of 30 species of yeast. *Lipids* **11**(12): 837--844.

Kavadia, A., M. Komaitis, I. Chevalot, F. Blanchard, I. Marc & G. Aggelis. 2001. Lipid and γ- linolenic acid accumulation in strains of Zygomycetes growing in glucose. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **78**(4): 341--346.

Ketaren, S. 1986. *Pengantar teknologi minyak dan lemak pangan.* Penerbit Universitas Indonesia (UI-Press), Jakarta: xiii + 315 hlm.

Kuksis, A. 1983. Lipids. *Dalam*: Heftmann, E. (ed.).1983. *Journal of chromatography library-volume 22B*. *Chromatography: Fundamentals and applications of chromatographic and electrophoretic methods*. *Part B: Applications*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam: B75--B146.

Li Yong-Hong, Liu Bo, Zhao Zong-Bao & Bai Feng-Wu. 2006. Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodosporidium toruloides*. *Chin. J. Biotechnol.* **22**(4): 650--656.

Lomascolo, A, E. Dubreucq, V. Perrier & P. Galzy. 1994. Mycelial lipid composition of three *Penicillium* strains. *J. Dairy Sci.* **77**: 2160--2167.

Lowrie, P. & S. Wells. 1994. *Microbiology and biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge: 96 hlm.

Madigan, M.T., J.M. Martinko & J. Parker. 2003. *Brock biology of microorganisms*. 10th ed. Prentice-Hall International Inc., Upper Saddle River: xxv + 1019 hlm.

Maldonade, I.R., A.R.P. Scamparini & D.B. Rodriguez-Amaya. 2007. Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* **38**: 65--70.

Martek Biosciences Corporation. 2008. *Life's*DHA™ is already in some of your favorite foods and supplements. (?): 1 hlm. http://consumer.martek.com/findinglifesdha/. 12 April 2008, pk. 15.04.

Mayes, P.A. 2000. Lipid yang memiliki makna fisiologis. *Dalam*: Murray, R.K., D.K. Grammer, P.A. Mayes & V.W. Rodwell (eds.). 2000. *Biokimia Harper*. 25th ed. Terj. dari *Harper`s Biochemistry*, oleh Hartono, A. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta: 148--159.

McGarry, J.D. 2002. Lipid metabolism I: Utilization and storage of energy in lipid form. *Dalam*: Devlin, T.M. (ed.). 2002. *Textbook of biochemistry with clinical correlations*. 5th ed. Wiley-Liss, New York: 693--721.

McMurrough, I. & A.H. Rose. 1971. Effect of temperature variation on the fatty acid composition of *Candida utilis*. *J. Bacteriol.* **107**(3): 753--758.

McNair, H.M. & E.J. Bonelli. 1988. *Dasar kromatografi gas*. 5th ed. Terj. dari *Basic gas chromatography*, oleh Padmawinata, K. Penerbit ITB, Bandung: 13a + 249 hlm.

Moat, A.G., J.W. Foster & M.P. Spector. 2002. *Microbial physiology*. 4th ed. Pearson Education, Inc., Upper Saddle River: xx + 715 hlm.

Montgomery, R., R.L. Dryer, T.W. Conway & A.A. Spector. 1993. *Biokimia: Suatu pendekatan berorientasi kasus*. Jilid 2. 4th ed. Terj. dari *Biochemistry: A case-oriented approach*, oleh Ismadi, M. Gadjah Mada university Press, Yogyakarta: xiii + (687--1377).

Müllner, H. & G. Daum. 2004. Dynamics of neutral lipid storage in yeast. *Acta Biochim. Pol.* **51**(2): 323--347.

Nichols, P.D., S.I. Blackburn & A. Green. 2003. New Australian single cell and crop plant sources of health-enhancing long-chain omega-3 oils. *Aust. Biotechnol.* **13**(5): 35--37.

Ohta, K., S.C. Wijeyaratne, S. Chavanich, V. Mahamontri. N. Nilubol & S. Hayashida. 1983. Lipid composition of a thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* affected by growth temperature. *Annual Reports of ICME* **6**: 342--346.

Oladipo, I.C., Adebiyi, A.O., Ayandele, A.A., Adebiyi, A.P. & Adelowo, O.O. 2007. Determintion of the growth rate and volume of lipid produced by *Lipomyces* species isolated from shear butter leaf (*Vitellaria paradoxa*). *Afr. J. Biotechnol.* **6**(18): 2174--2176.

Page, D.S. 1989. *Prinsip-prinsip biokimia*. 2nd ed. Terj. dari *Principles of biological chemistry*, oleh Soendoro, R. Penerbit Erlangga, Jakarta: xiii + 465 hlm.

Pavia, D.L., G.M. Lampman, G.S. Kriz & R.G. Engel. 1995. *Organic laboratory techniques: A microscale approach*. 2nd ed. Saunders College Publishing, Fort Worth: xviii + 915 hlm.

Perrier, V., E. Dubreucq & P. Galzy. 1995. Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. *Arch. Microbiol*. **164**(3): 173--179.

Pham, L.J. & P.M. Rasco. 2001. A study on the lipid components of some single cell isolates for specialty fats and oils production. *Proceedings of the fourth Asia-Pasific Biotechnology Congress & 30th Annual Philippine Society for Microbiology in Lahug, Cebu City Philippines 16--18 May 2001.* Philippine Society for Microbiology, Inc., Lahug: 286--289.

Plummer, D.T. 1987. *An introduction to practical biochemistry.* 2nd ed. McGraw-Hill Book Company (UK) Limited, London: xxiii + 362 hlm.

Ratledge, C. 1991. Microorganisms for lipids. *Acta Biotechnol.* **11**(5): 429--438.

Ratledge, C. 1997. Microbial lipids. *Dalam:* Rehm, H.J. & G. Reed (eds.). 1997. *Biotechnology*. Volume 7. 2nd ed. VCH, Weiheim, Germany: 133--197.

Ratledge, C. 2002. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochem. Soc. Trans*. **30**: 1047--1050.

Ratledge, C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* **86**(11): 807--815.

Ratledge, C. & K.H. Tan. 1990. Oils and fats: Production, degradation, and utilization by yeasts. *Dalam:* Verachtert, H. & R. De Mot (eds.). 1990. *Yeasts: Biotechnology and biocatalysis*. Marcel Dekker, Inc., New York: 223--253.

Rattray, J.B.M, A. Schibeci & D.K. Kidby. 1975. Lipid of yeasts. *Bacteriol. Rev*. **39**(3): 197--231.

Razavi, S. Hadi, S.M. Mousavi, H.M. Yeganeh & I. Marc. 2007. Fatty acid and carotenoid production by *Sporobolomyces ruberrimus* when using technical glycerol and ammonium sulfate. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**(10): 1591--1597.

Rest, M.E. Van Der, A.H. Kamminga, A. Nakano, Y. Anraku, B. Poolman & W.N. Konings. 1995. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: Structure, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev*. **59**(2): 304--322.

Rickers-Haunerland, J. 2008. Lipid analysis: Thin layer chromatography. (?): 1 hlm. http://www.sfu.ca/bisc/bisc-429/TLC.html. 28 April 2008, pk. 15.04.

Ritter, P. 1996. *Biochemistry: A foundation*. Brooks/Cole Publishing Company, Pacific Groove: xxvii + 822 hlm.

Robinow, C.F. 1975. The preparation of yeasts for light microscopy. *Dalam:* Prescott, D.M (ed.). 1975. *Methods in cell biology: Yeast cells*. Volume XI. Academic Press, New York: 1--22.

Rose, A.H. & F.J. Veazey. 1988. Membranes and lipids of yeasts. *Dalam:* Campbell, I. & J.H. Duffus (eds.). 1988. *Yeasts: A practical approach*. IRL Press, Oxford: 255--275.

Sabry, S.A., K.M. Ghanem & H.H. Yusef. 1990. Production of microbial lipids from beet molasses. *J. Islamic Acad. Sci*. **3**(4): 310--313.

Saxena, V., Sharma, C.D., Bhagat, S.D., Saini, V.S. & Adhikari, D.K. 1998. Lipid and fatty acid biosynthesis by *Rhodotorula minuta*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**(4): 501--505.

Schneiter, R & G. Daum. 2006a. Extraction of yeast lipids. *Dalam:* Wei Xiao (ed.). 2006. *Methods in molecular biology: Yeasts protocol.* Volume 313. 2nd ed. Humana Press Inc., Totowa: 41--45.

Schneiter, R & G. Daum. 2006b. Analysis of yeast lipids. *Dalam:* Wei Xiao (ed.). 2006. *Methods in molecular biology: Yeasts protocol.* Volume 313. 2nd ed. Humana Press Inc., Totowa: 75--84.

Seager, S.L. & M.R. Slabaugh. 1994. *Organic and biochemistry for today.* 2nd ed. West Publishing Company, Minneapolis: xxi + 404 hlm.

Sjamsuridzal, W. 2007. *Yeast diversity and conservation in Gunung Halimun National Park, Indonesia*. Final Report of Nagao Natural Environment Foundation Research Grant, Depok: iii + 254 hlm.

Singh, G.P., G. Volpe, C.M. Creely, H. Grötsch, I.M. Geli & D. Petrov. 2006. The lag phase and G_1 phase of single yeast cell monitored by Raman microspectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **37**: 858--864.

Smith, D. & A.H.S. Onions. 1994. *The preservation and maintenance of living fungi.* 2nd ed. CAB International, Wallingford: vii + 122 hlm.

Somashekar, D. & R. Joseph. 2000. Inverse relationship between carotenoid and lipid formation in *Rhodotorula gracilis* according to the C/N ratio of the growth medium. *World J. Microbiol. Biotechnol*. **16**: 491--493.

Somashekar, D, G. Venkateshwaran, C. Srividya, Krishnanand, K. Sambaiah B.R. Lokesh. 2001. Efficacy of extraction methods for lipid and fatty acid composition from fungal cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol*. **17**: 317--320.

Spencer, J.F.T. & D.M. Spencer. 1997. Ecology: Where yeasts live. *Dalam:* Spencer, J.F.T. & D.M. Spencer (eds.). 1997. *Yeasts in natural and artificial habitats.* Springer-Verlag, Berlin: 33--58.

Spencer, J.F.T., D.M. Spencer & L.I.C.D. Figueroa. 1997. Yeasts as living objects: Yeast nutrition. *Dalam:* Spencer, J.F.T. & D.M. Spencer (eds.). 1997. *Yeasts in natural and artificial habitats.* Springer-Verlag, Berlin: 68--79.

Stanbury, P.F., A. Whitaker & S.J. Hall. 1995. *Principles of fermentation technology.* 2nd ed. Elsevier Science, The Boulevard: xviii + 357 hlm.

Swaaf, M.E. De, L. Sjitsma & J.T. Pronk. 2003. High-cell-density fed-batch cultivation of docosahexaenoic acid producing marine alga *Crypthecodinium cohnii*. *Biotechnol. Bioeng.* **81**: 666--672.

Thyagarajan, T.R. & H.B. Naylor. 1961. Cytology of *Rhodotorula glutinis*. *J. Bacteriol.* **83**: 127--136.

Tortora, G.J., B.R. Funke & C.L. Case. 2001. *Microbiology: An introduction*. Benjamin/Cummings, San Francisco: xxiv + 887 hlm.

Tri-Panji, S.S. Achmadi & E. Tjahjadarmawan. 1996. Produksi asam γ-linolenat dari ganggang mikro *Spirulina platensis* menggunakan limbah lateks pekat. *Menara Perkebunan* **64**(1): 34--44.

Tri-Panji, I. Farida & P. Citroreksoko. 1998. Utilization of coffee processing effluent as growth medium for *Rhizopus oryzae*, producing γ-linolenic acid. *Menara Perkebunan* **66**(1): 47--54.

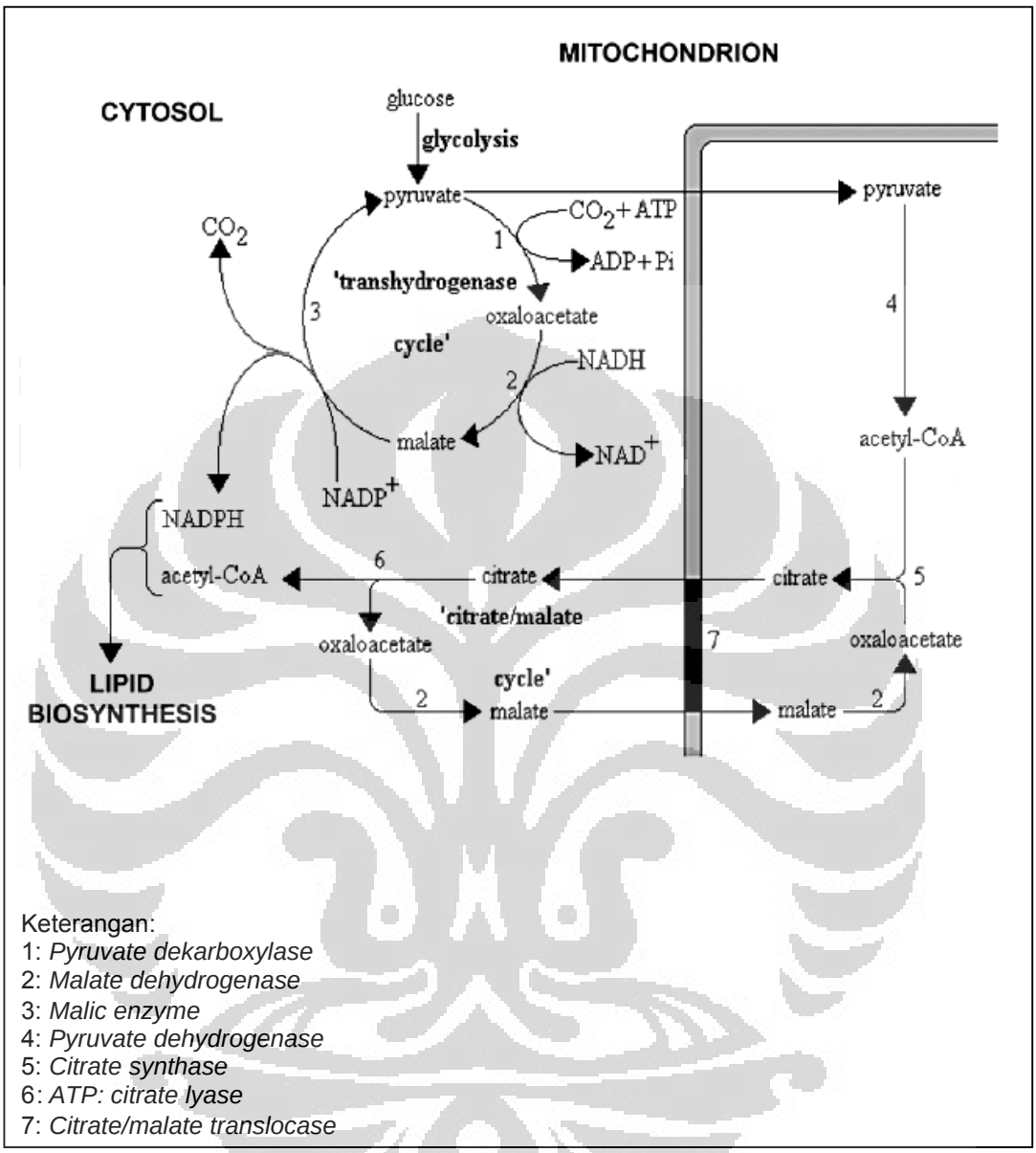
Walker, G.M. 1998. *Yeast physiology and biotechnology*. John Wiley & Sons, Chichester: ix + 350 hlm.

Welch, J.W. & L. Burlingame. 1973. Very long-chain fatty acid in yeast. *J. Bacteriol.* **115**(1): 464--466.

Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. *Dalam:* Kurtzman, C.P. & J.W. Fell (eds.). 1998. *The yeasts: A taxonomic study*. 4th ed. Elsevier, Amsterdam: 77--100.

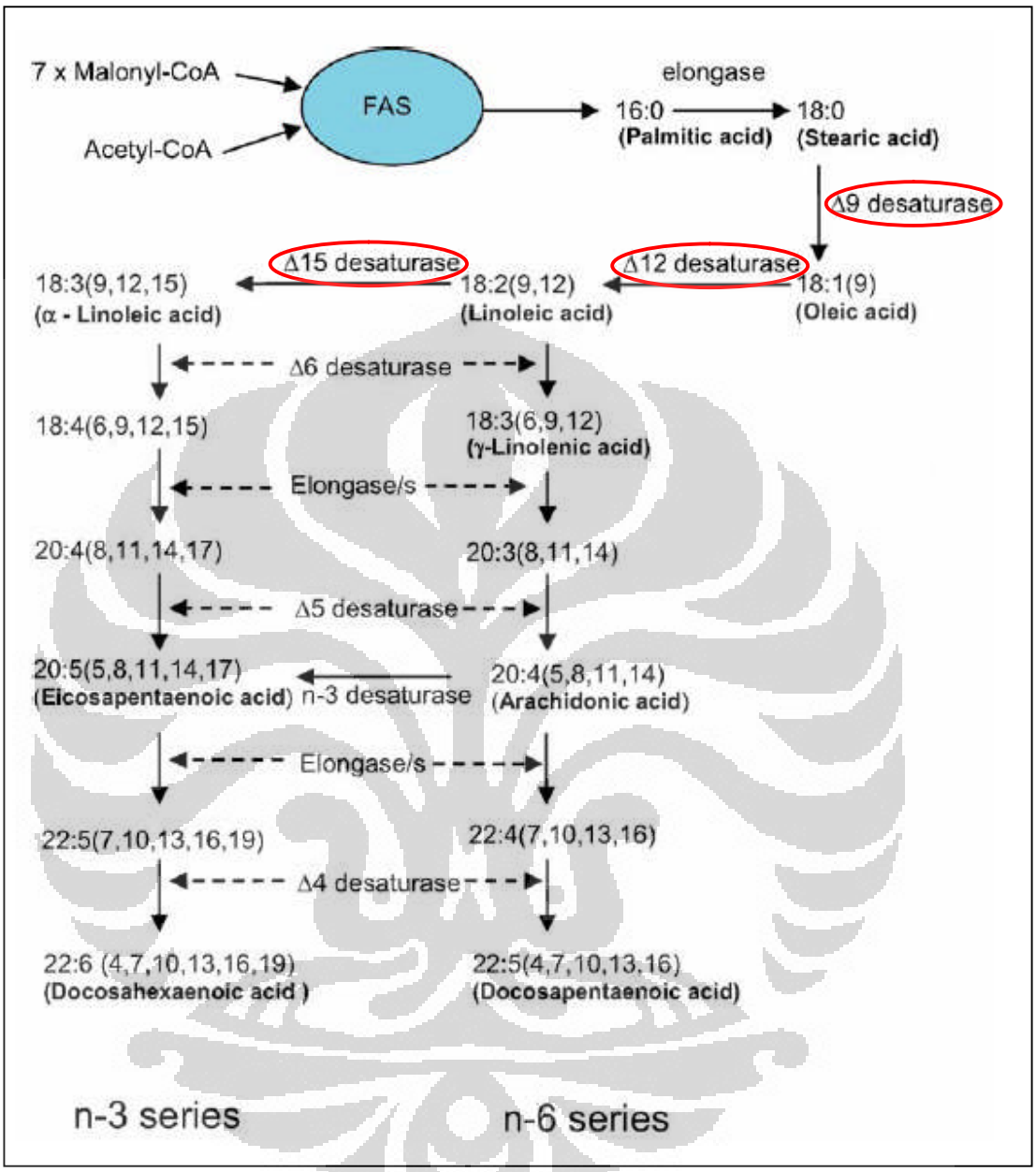
Yonghong Li, Zongbao Zhao & Fengwu Bai. 2007. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enz. Microbial Technol.* **41**: 312--317.

Zumdahl, S.S. 1997. *Chemistry*. 4th ed. Houghton Mifflin Company, Boston: xxiii + 1118 hlm.

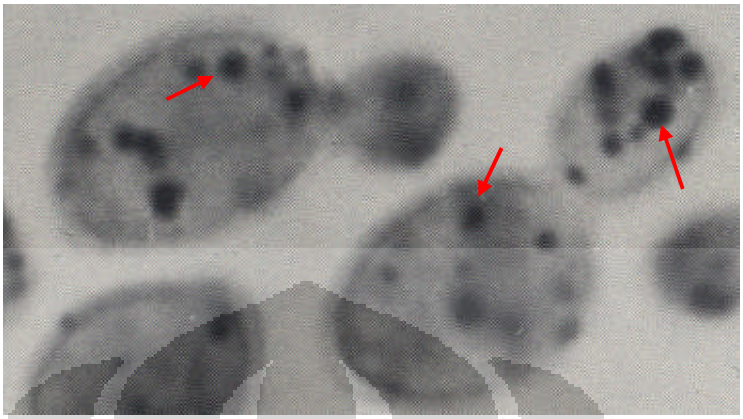


Keterangan:
1: *Pyruvate dekarboxylase*
2: *Malate dehydrogenase*
3: *Malic enzyme*
4: *Pyruvate dehydrogenase*
5: *Citrate synthase*
6: *ATP: citrate lyase*
7: *Citrate/malate translocase*

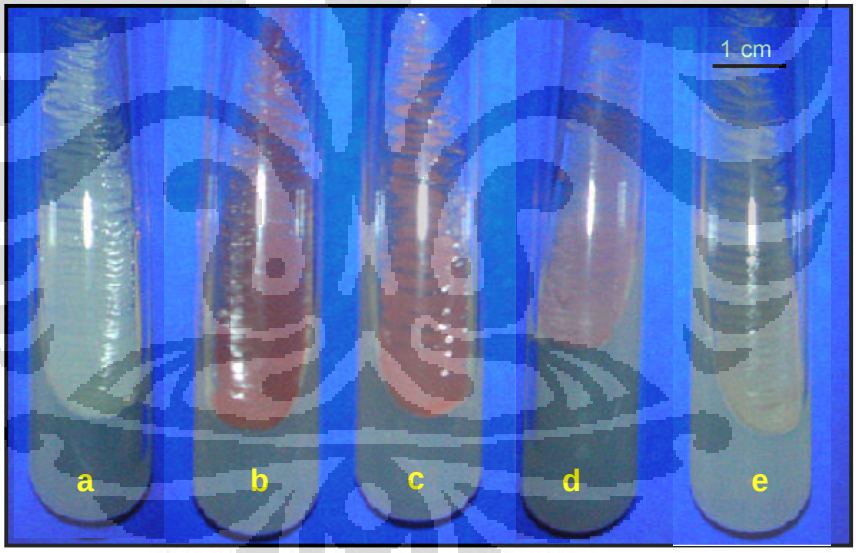
Gambar 1. Biosintesis lipid pada mikroorganisme *oleaginous*
[Sumber: Ratledge 2004: 810.]



Gambar 2. Sintesis asam lemak jenuh dan tidak jenuh
[Sumber: Ratledge 2004: 812.]

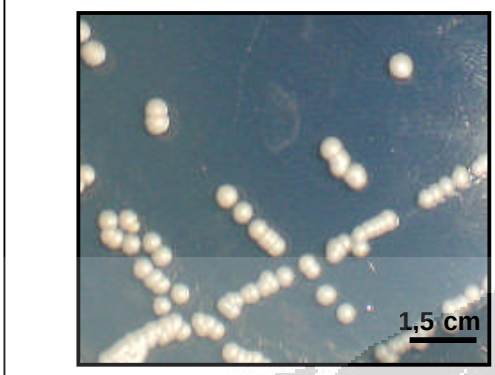


Gambar 3. Tetes-tetes lemak dalam sel *Saccharomyces cerevisiae* [Sumber: Robinow 1975: 8.]

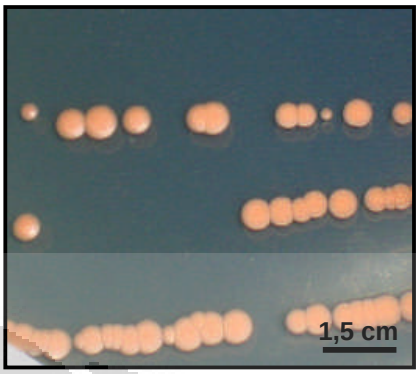


Keterangan:
a: Strain *Rh. acheniorum* SD4233
b: Strain *Rh. glutinis* L4236
c: Strain *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-283
d: Strain *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402
e: Strain *Rh. nothofagi* UICC-Y-253

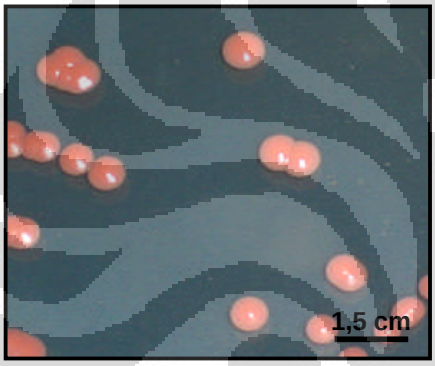
Gambar 4. Lima strain khamir berumur 72 jam pada medium Yeast Malt Agar (YMA)



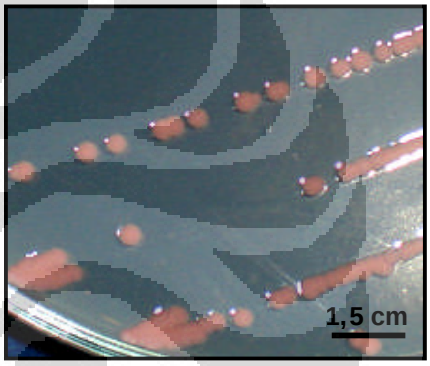
a. Strain *Rh. acheniorum* SD4233



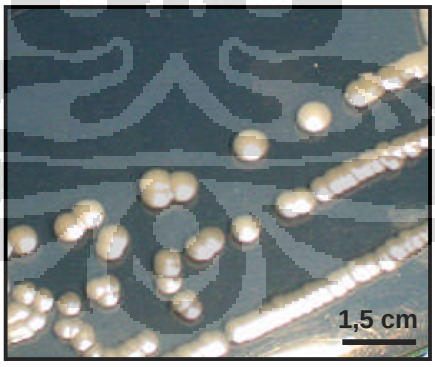
b. Strain *Rh. glutinis* L4236



c. Strain *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-283

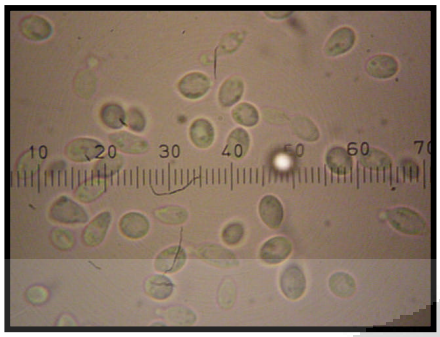


d. Strain *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402

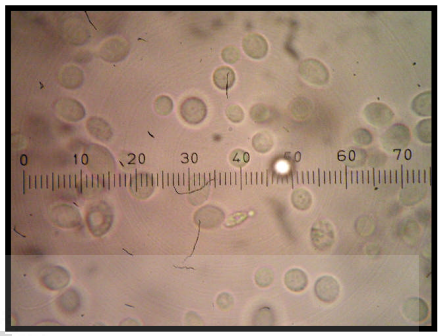


e. Strain *Rh. nothofagi* UICC-Y-253

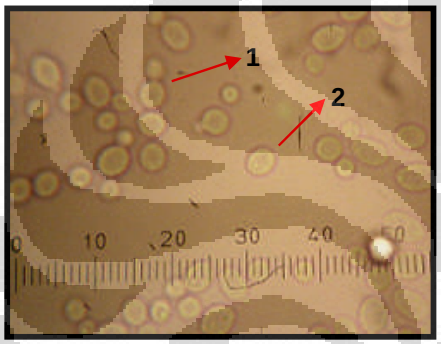
Gambar 5. Penampakan makroskopik koloni lima strain khamir pada medium Yeast Malt Agar (YMA) yang telah diinkubasi selama 48 jam.



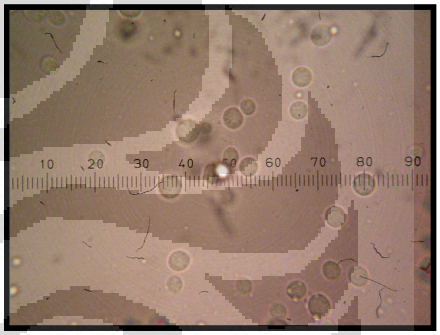
a. Strain *Rh. acheniorum* SD4233



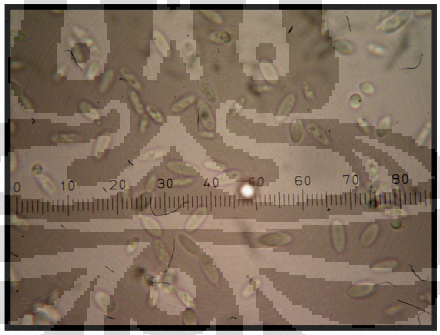
b. Strain *Rh. glutinis* L4236



c. Strain *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-283



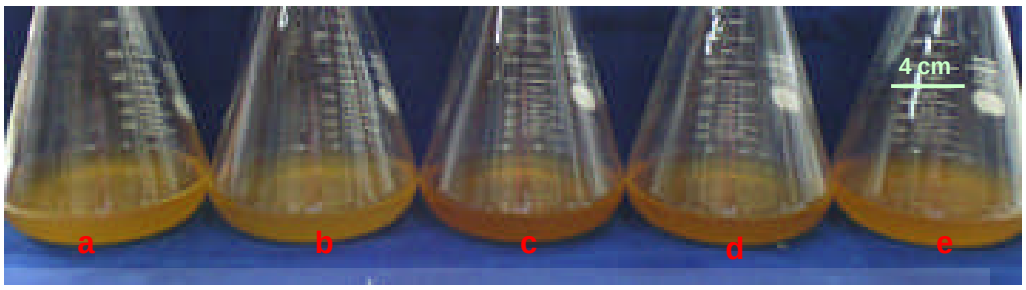
d. Strain *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402



e. Strain *Rh. nothofagi* UICC-Y-253

Keterangan:
1. Sel yang bertunas
2. Sel vegetatif

Gambar 6. Penampakan mikroskopik sel lima strain khamir yang ditumbuhkan pada medium Yeast Malt Agar (YMA) selama 48 jam

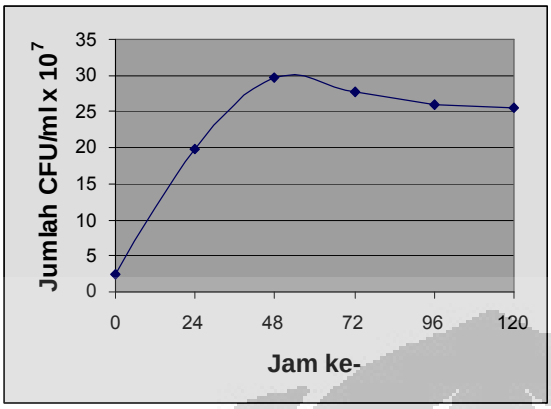


Sebelum fermentasi

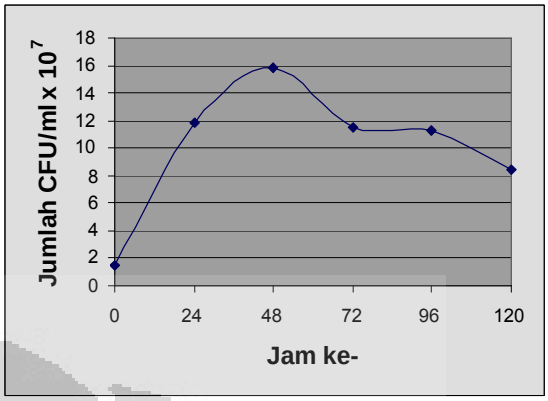
Sesudah fermentasi

Keterangan:
a: Strain *Rh. acheniorum* SD4233 pada jam ke-72
b: Strain *Rh. glutinis* L4236 pada jam ke-72
c: Strain *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-283 pada jam ke-96
d: Strain *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402 pada jam ke-72
e: Strain *Rh. nothofagi* UICC-Y-253 pada jam ke-72

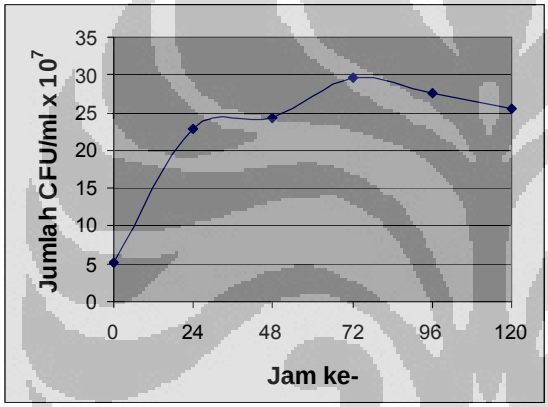
Gambar 7. Perbanyakan biomassa khamir dalam medium Yeast Malt Broth



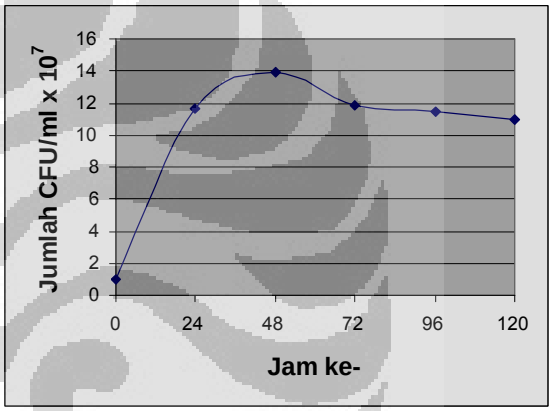
a. Strain *Rh. acheniorum* SD4233



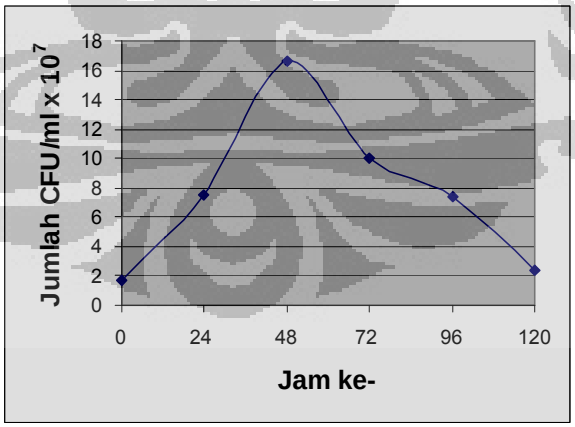
b. Strain *Rh. glutinis* L4236



c. Strain *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-283

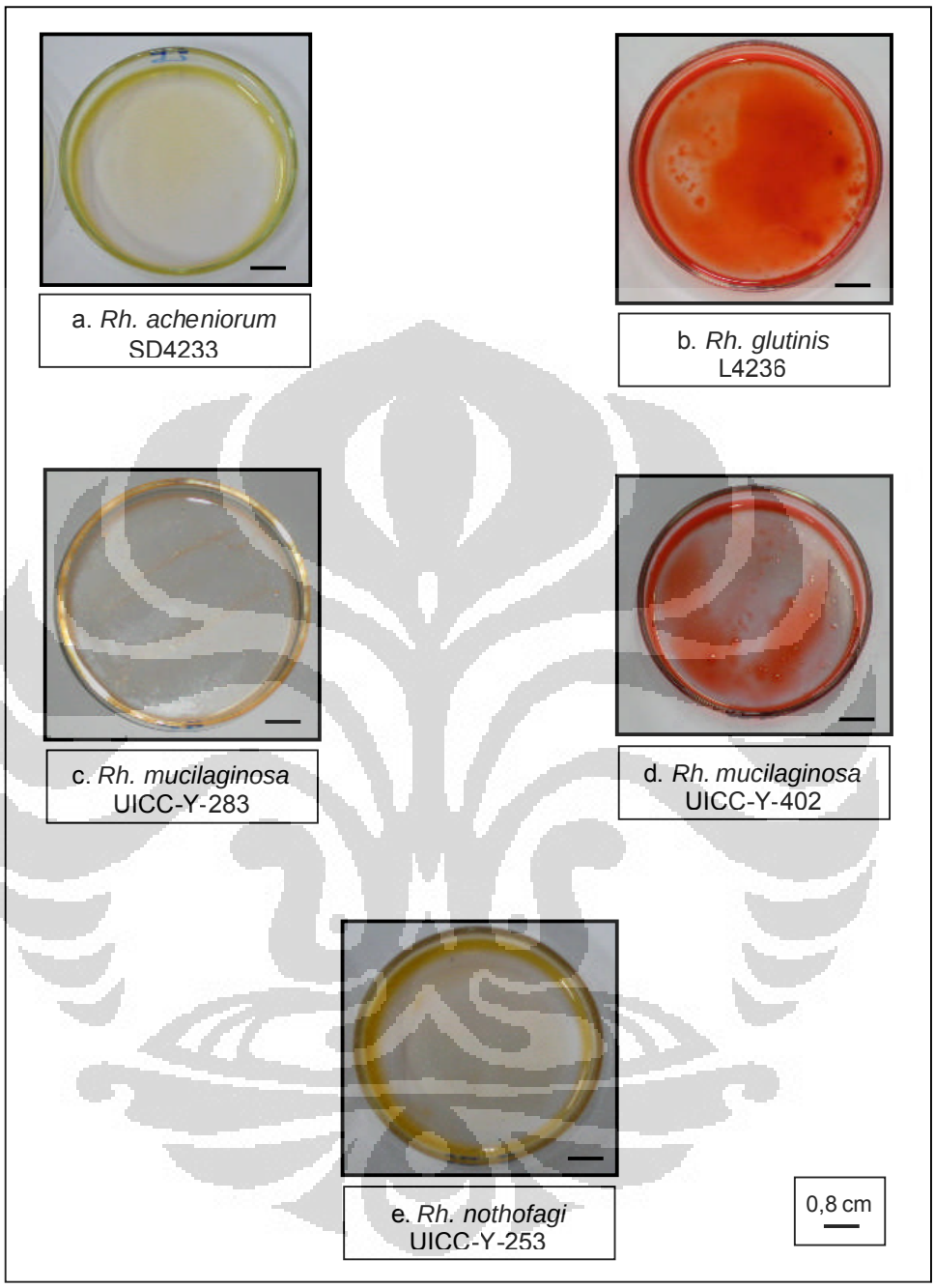


d. Strain *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402

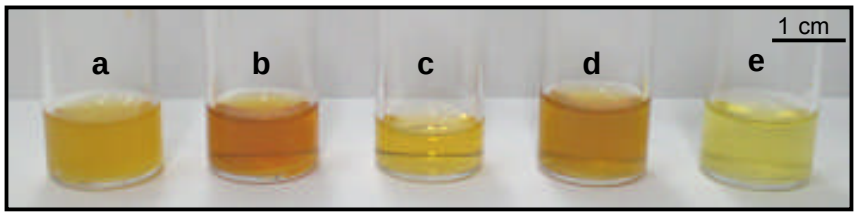


e. Strain *Rh. nothofagi* UICC-Y-253

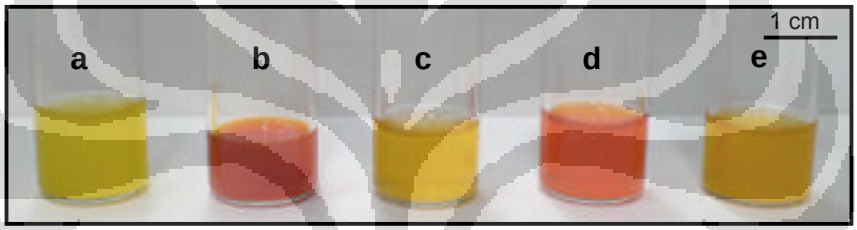
Gambar 8. Kurva pertumbuhan lima strain khamir



Gambar 9. Sampel lipid lima strain khamir



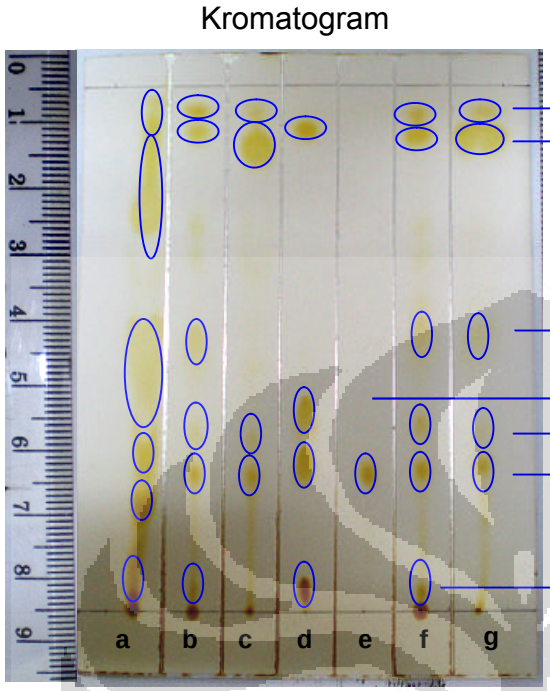
Sampel lipid khamir hasil ekstraksi menggunakan alat *Soxhlet*



Sampel lipid khamir hasil ekstraksi tanpa menggunakan alat *Soxhlet*

Keterangan:
a: Strain *Rh. acheniorum* SD4233
b: Strain *Rh. glutinis* L4236
c: Strain *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-283
d: Strain *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402
e: Strain *Rh. nothofagi* UICC-Y-253

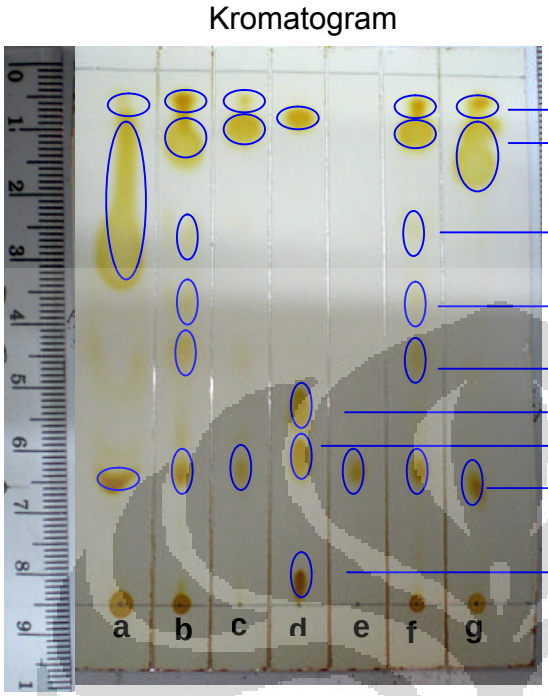
Gambar 10. Sampel lipid lima strain khamir dalam heksana



Keterangan:

a : strain *Rh. acheniorum* SD4233
b : strain *Rh. glutinis* L4236
c : strain *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-283
d : standar lipid campuran mon-olein, 1,2-diolein, 1,3-diolein, dan triolein
e : standar lipid ergosterol
f : strain *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402
g : strain *Rh. nothofagi* UICC-Y-253
td : tidak diketahui
Eluen : heksana:dietil eter:asam asetat (60:40:1, v/v/v)

Gambar 11. Kromatogram lapis tipis dari lipid yang diekstraksi menggunakan alat *Soxhlet*



Nilai Rf	Kelas lipid
0,97--098	td
0,93--096	Triolein
0,74	td
0,60	td
0,49--051	td
0,40	1,3-diolein
0,31	1,2-diolein
0,24--0,27	Ergosterol
0,04	Mono-olein

Keterangan:

a : strain *Rh. acheniorum* SD4233
b : strain *Rh. glutinis* L4236
c : strain *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-283
d : standar lipid campuran monoolein, 1,2-diolein, 1,3-diolein, dan triolein
e : standar lipid ergosterol
f : strain *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402
g : strain *Rh. nothofagi* UICC-Y-253
td : tidak diketahui
Eluen : heksana:dietil eter:asam asetat (60:40:1, v/v/v)

Gambar 12. Kromatogram lapis tipis dari lipid yang diekstraksi tanpa menggunakan alat *Soxhlet*

Tabel 1
Hasil pengamatan makroskopik koloni khamir yang ditumbuhkan pada medium Yeast Malt Agar (YMA) pada suhu ruang (20--25)^{o} C selama 48 jam

Strain khamir	Asal strain	Warna	Tekstur	Permukaan	Tepi	Profil
Rh. acheniorum SD4233	Sedimen sungai	Putih	*Butyrous*	Mengilap	Lurus	Menggunung
Rh. glutinis L4236	Serasah	Jingga	*Butyrous*	Kusam	Lurus	Menggunung
Rh. mucilaginosa UICC-Y-283	Tanah	Merah muda	*Butyrous*	Mengilap	Lurus	Menggunung
Rh. mucilaginosa UICC-Y-402	Moluska	Merah muda pucat	*Butyrous*	Kusam	Lurus	Menggunung
Rh. nothofagi UICC-Y-253	Serasah	Krem	*Butyrous*	Mengilap	Lurus	Menggunung

Tabel 2
Hasil pengamatan mikroskopik sel khamir yang ditumbuhkan pada medium Yeast Malt Agar (YMA) pada suhu ruang (20--25)^{o} C selama 48 jam

Strain khamir	Bentuk sel	Susunan sel	Pertunasan	Ukuran sel
Rh. acheniorum SD4233	Bulat, semi bulat, oval, memanjang	Tunggal, berpasangan, rantai pendek	Multipolar	p = (5--10) µm l = (2,5--5) µm
Rh. glutinis L4236	Bulat, semi bulat, oval, memanjang	Tunggal, berpasangan, rantai pendek	Multipolar	p = (3,75--8,75) µm l = (2,5--7,5) µm
Rh. mucilaginosa UICC-Y-283	Bulat, semi bulat, oval, memanjang	Tunggal, berpasangan, rantai pendek	Multipolar	p = (2,5--7,5) µm l = (2,5--5) µm
Rh. mucilaginosa UICC-Y-402	Bulat, semi bulat	Tunggal, berpasangan, rantai pendek	Multipolar	p = (5--7,5) µm l = (5--7,5) µm
Rh. nothofagi UICC-Y-253	Memanjang, elips, oval, bulat, semi bulat	Tunggal, berpasangan, rantai pendek	Multipolar	p = (5--10) µm l = (2,5--5) µm

Tabel 3
Hasil penghitungan sel dengan metode *Total Plate Count* (TPC) pada inokulum lima strain khamir

Kode strain	10^{-5}		Jumlah sel (CFU/ml)	10^{-6}		Jumlah sel (CFU/ml)	10^{-7}		Jumlah sel (CFU/ml)	Kisaran jumlah sel (CFU/ml)
	a	b		a	b		a	b		
SD4233	139	142	$1{,}41 \times 10^8$	14	19	$1{,}65 \times 10^8$	2	3	$2{,}50 \times 10^8$	$(1{,}41 - 2{,}50) \times 10^8$
L4236	124	134	$1{,}29 \times 10^8$	11	17	$1{,}40 \times 10^8$	1	5	$3{,}00 \times 10^8$	$(1{,}29 - 3{,}00) \times 10^8$
UICC-Y-283	>300	>300	~	42	44	$4{,}30 \times 10^8$	4	6	$5{,}00 \times 10^8$	$(4{,}30 - 5{,}00) \times 10^8$
UICC-Y-402	116	182	$1{,}49 \times 10^8$	10	14	$1{,}20 \times 10^8$	2	4	$3{,}00 \times 10^8$	$(1{,}20 - 3{,}00) \times 10^8$
UICC-Y-253	144	164	$1{,}54 \times 10^8$	15	17	$1{,}60 \times 10^8$	2	6	$4{,}00 \times 10^8$	$(1{,}54 - 4{,}00) \times 10^8$

Tabel 4
Hasil *Total Plate Count* (TPC) strain *Rh. acheniorum* SD4233 dan nilai pH setiap 24 jam selama 5 hari fermentasi

Jam ke-	pH	Pengenceran	Jumlah koloni	Jumlah sel (CFU/ml)	Jumlah sel (CFU/ml)
0	5,5	10^{-4}	215	$2,21 \times 10^{7}$	$2,47 \times 10^{7}$
			226		
		10^{-5}	30	$3,20 \times 10^{7}$	
			34		
		10^{-6}	2	$2,00 \times 10^{7}$	
			2		
24	4,7	10^{-4}	>300	~	$1,99 \times 10^{8}$
			>300		
		10^{-5}	162	$1,63 \times 10^{8}$	
			164		
		10^{-6}	23	$2,35 \times 10^{8}$	
			24		
48	4,4	10^{-4}	>300	~	$2,97 \times 10^{8}$
			>300		
		10^{-5}	212	$2,13 \times 10^{8}$	
			213		
		10^{-6}	36	$3,80 \times 10^{8}$	
			40		
72	4,0	10^{-4}	>300	~	$2,76 \times 10^{8}$
			>300		
		10^{-5}	221	$2,22 \times 10^{8}$	
			222		
		10^{-6}	33	$3,30 \times 10^{8}$	
			33		
96	4,0	10^{-4}	>300	~	$2,60 \times 10^{8}$
			>300		
		10^{-5}	243	$2,55 \times 10^{8}$	
			266		
		10^{-6}	25	$2,65 \times 10^{8}$	
			28		
120	4,0	10^{-4}	>300	~	$2,56 \times 10^{8}$
			>300		
		10^{-5}	223	$2,27 \times 10^{8}$	
			231		
		10^{-6}	27	$2,85 \times 10^{8}$	
			30		

Tabel 5
Hasil *Total Plate Count* (TPC) strain *Rh. glutinis* L4236 dan nilai pH setiap 24 jam selama 5 hari fermentasi

Jam ke-	pH	Pengenceran	Jumlah koloni	Jumlah sel (CFU/ml)	Jumlah sel (CFU/ml)
0	5,8	10^{-4}	137	$1,38 \times 10^{7}$	$1,46 \times 10^{7}$
			139		
		10^{-5}	10	$1,00 \times 10^{7}$	
			10		
		10^{-6}	2	$2,00 \times 10^{7}$	
			2		
24	4,0	10^{-4}	>300	~	$1,19 \times 10^{8}$
			>300		
		10^{-5}	120	$1,23 \times 10^{8}$	
			126		
		10^{-6}	11	$1,15 \times 10^{8}$	
			12		
48	4,0	10^{-4}	>300	~	$1,58 \times 10^{8}$
			>300		
		10^{-5}	123	$1,26 \times 10^{8}$	
			128		
		10^{-6}	19	$1,90 \times 10^{8}$	
			19		
72	4,0	10^{-4}	>300	~	$1,15 \times 10^{8}$
			>300		
		10^{-5}	119	$1,20 \times 10^{8}$	
			121		
		10^{-6}	10	$1,10 \times 10^{8}$	
			12		
96	4,0	10^{-4}	>300	~	$1,14 \times 10^{8}$
			>300		
		10^{-5}	111	$1,13 \times 10^{8}$	
			114		
		10^{-6}	11	$1,15 \times 10^{8}$	
			12		
120	4,0	10^{-4}	>300	~	$8,40 \times 10^{7}$
			>300		
		10^{-5}	92	$9,30 \times 10^{7}$	
			94		
		10^{-6}	6	$7,50 \times 10^{7}$	
			9		

Tabel 6
Hasil *Total Plate Count* (TPC) strain *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-283 dan nilai pH setiap 24 jam selama 5 hari fermentasi

Jam ke-	pH	Pengenceran	Jumlah koloni	Jumlah sel (CFU/ml)	Jumlah sel (CFU/ml)
0	6,0	10^{-4}	>300	~	$5{,}10 \times 10^{7}$
			>300		
		10^{-5}	62	$6{,}20 \times 10^{7}$	
			62		
		10^{-6}	4	$4{,}00 \times 10^{7}$	
			4		
24	5,0	10^{-5}	184	$1{,}89 \times 10^{8}$	$2{,}28 \times 10^{8}$
			194		
		10^{-6}	24	$2{,}45 \times 10^{8}$	
			25		
		10^{-7}	2	$2{,}50 \times 10^{8}$	
			3		
48	5,0	10^{-5}	216	$2{,}22 \times 10^{8}$	$2{,}42 \times 10^{8}$
			228		
		10^{-6}	24	$2{,}55 \times 10^{8}$	
			27		
		10^{-7}	2	$2{,}50 \times 10^{8}$	
			3		
72	4,7	10^{-5}	214	$2{,}13 \times 10^{8}$	$2{,}97 \times 10^{8}$
			213		
		10^{-6}	31	$3{,}30 \times 10^{8}$	
			35		
		10^{-7}	3	$3{,}50 \times 10^{8}$	
			4		
96	4,4	10^{-5}	191	$1{,}88 \times 10^{8}$	$2{,}76 \times 10^{8}$
			185		
		10^{-6}	32	$3{,}40 \times 10^{8}$	
			35		
		10^{-7}	1	$3{,}00 \times 10^{8}$	
			7		
120	4,4	10^{-5}	161	$1{,}61 \times 10^{8}$	$2{,}55 \times 10^{8}$
			160		
		10^{-6}	30	$3{,}05 \times 10^{8}$	
			31		
		10^{-7}	3	$3{,}00 \times 10^{8}$	
			3		

Tabel 7
Hasil *Total Plate Count* (TPC) strain *Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402 dan nilai pH setiap 24 jam selama 5 hari fermentasi

Jam ke-	pH	Pengenceran	Jumlah koloni	Jumlah sel (CFU/ml)	Jumlah sel (CFU/ml)
0	5,8	10^{-4}	102	$1,07 \times 10^{7}$	$1,02 \times 10^{7}$
			112		
		10^{-5}	10	$1,00 \times 10^{7}$	
			10		
		10^{-6}	1	$1,00 \times 10^{7}$	
			1		
24	5,0	10^{-4}	>300	~	$1,17 \times 10^{8}$
			>300		
		10^{-5}	107	$1,18 \times 10^{8}$	
			128		
		10^{-6}	11	$1,15 \times 10^{8}$	
			12		
48	4,7	10^{-4}	>300	~	$1,39 \times 10^{8}$
			>300		
		10^{-5}	110	$1,13 \times 10^{8}$	
			115		
		10^{-6}	16	$1,65 \times 10^{8}$	
			17		
72	4,7	10^{-4}	>300	~	$1,19 \times 10^{8}$
			>300		
		10^{-5}	104	$1,07 \times 10^{8}$	
			109		
		10^{-6}	13	$1,35 \times 10^{8}$	
			14		
96	4,7	10^{-4}	>300	~	$1,15 \times 10^{8}$
			>300		
		10^{-5}	102	$1,05 \times 10^{8}$	
			107		
		10^{-6}	12	$1,25 \times 10^{8}$	
			13		
120	4,7	10^{-4}	>300	~	$1,10 \times 10^{8}$
			>300		
		10^{-5}	101	$1,05 \times 10^{8}$	
			108		
		10^{-6}	11	$1,15 \times 10^{8}$	
			12		

Tabel 8
Hasil *Total Plate Count* (TPC) strain *Rh. nothofagi* UICC-Y-253 dan nilai pH setiap 24 jam selama 5 hari fermentasi

Jam ke-	pH	Pengenceran	Jumlah koloni	Jumlah sel (CFU/ml)	Jumlah sel (CFU/ml)
0	6,0	10^{-4}	192	$2,06 \times 10^{7}$	$1,69 \times 10^{7}$
			219		
		10^{-5}	20	$2,00 \times 10^{7}$	
			20		
		10^{-6}	1	$1,00 \times 10^{7}$	
			1		
24	4,0	10^{-4}	>300	~	$7,50 \times 10^{7}$
			>300		
		10^{-5}	75	$7,50 \times 10^{7}$	
			75		
		10^{-6}	7	$7,50 \times 10^{7}$	
			8		
48	4,0	10^{-4}	>300	~	$1,66 \times 10^{8}$
			>300		
		10^{-5}	145	$1,47 \times 10^{8}$	
			148		
		10^{-6}	17	$1,85 \times 10^{8}$	
			20		
72	4,0	10^{-4}	>300	~	$1,00 \times 10^{8}$
			>300		
		10^{-5}	100	$1,00 \times 10^{8}$	
			100		
		10^{-6}	10	$1,00 \times 10^{8}$	
			10		
96	4,0	10^{-4}	>300	~	$7,45 \times 10^{7}$
			>300		
		10^{-5}	77	$7,90 \times 10^{7}$	
			81		
		10^{-6}	7	$7,00 \times 10^{7}$	
			7		
120	4,0	10^{-4}	156	$1,58 \times 10^{7}$	$2,38 \times 10^{7}$
			160		
		10^{-5}	24	$2,55 \times 10^{7}$	
			27		
		10^{-6}	3	$3,00 \times 10^{7}$	
			3		

Tabel 9
Berat biomassa kering lima strain khamir yang ditumbuhkan dalam medium Yeast Malt Broth (YMB) pada fase stasioner

Strain khamir	Waktu inkubasi (jam)	Berat biomassa kering (g/l)
Rh. mucilaginosa UICC-Y-283	96	12,44
Rh. acheniorum SD4233	72	11,54
Rh. mucilaginosa UICC-Y-402	72	7,83
Rh. glutinis L4236	72	7,69
Rh. nothofagi UICC-Y-253	72	5,55

Tabel 10
Persentase lipid total lima strain khamir yang diekstraksi menggunakan heksana dengan alat *Soxhlet*, serta tanpa alat *Soxhlet*

Strain khamir	Persentase lipid total (%)	
	Dengan *Soxhlet*	Tanpa *Soxhlet*
Rh. acheniorum SD4233	5,12	19,19
Rh. nothofagi UICC-Y-253	4,65	10,76
Rh. glutinis L4236	1,96	4,28
Rh. mucilaginosa UICC-Y-402	2,80	3,53
Rh. mucilaginosa UICC-Y-283	1,79	1,48

Tabel 11

Nilai Rf kromatogram hasil deteksi kromatogram lapis tipis (KLT) pada sampel lipid lima strain khamir

Standar lipid		Nilai Rf	Kelas lipid
Lipid campuran	Mono-olein	0,06	Mono-olein
	1,2-diolein	0,31	1,2-diolein
	1,3-diolein	0,40	1,3-diolein
	Triolein	0,93	Triolein
Ergosterol		0,27	Ergosterol
Sampel lipid		**Nilai Rf**	**Dugaan kelas lipid**
Rh. acheniorum SD4233	Hasil ekstraksi dengan alat *Soxhlet*	0,04	Mono-olein
		0,24	Ergosterol
		0,34	1,2-diolein
		0,56	Tidak diketahui
		0,94	Triolein
		0,98	Tidak diketahui
	Hasil ekstraksi tanpa alat *Soxhlet*	0,24	Ergosterol
		0,96	Triolein
		0,98	Tidak diketahui
Rh. glutinis L4236	Hasil ekstraksi dengan alat *Soxhlet*	0,05	Mono-olein
		0,27	Ergosterol
		0,34	1,2-diolein
		0,54	Tidak diketahui
		0,93	Triolein
		0,97	Tidak diketahui
	Hasil ekstraksi tanpa alat *Soxhlet*	0,26	Ergosterol
		0,51	Tidak diketahui
		0,60	Tidak diketahui
		0,74	Tidak diketahui
		0,96	Triolein
		0,98	Tidak diketahui
Rh. mucilaginosa UICC-Y-283	Hasil ekstraksi dengan alat *Soxhlet*	0,27	Ergosterol
		0,32	1,2-diolein
		0,93	Triolein
		0,97	Tidak diketahui
	Hasil ekstraksi tanpa alat *Soxhlet*	0,27	Ergosterol
		0,96	Triolein
		0,98	Tidak diketahui

(Lanjutan Tabel 11)

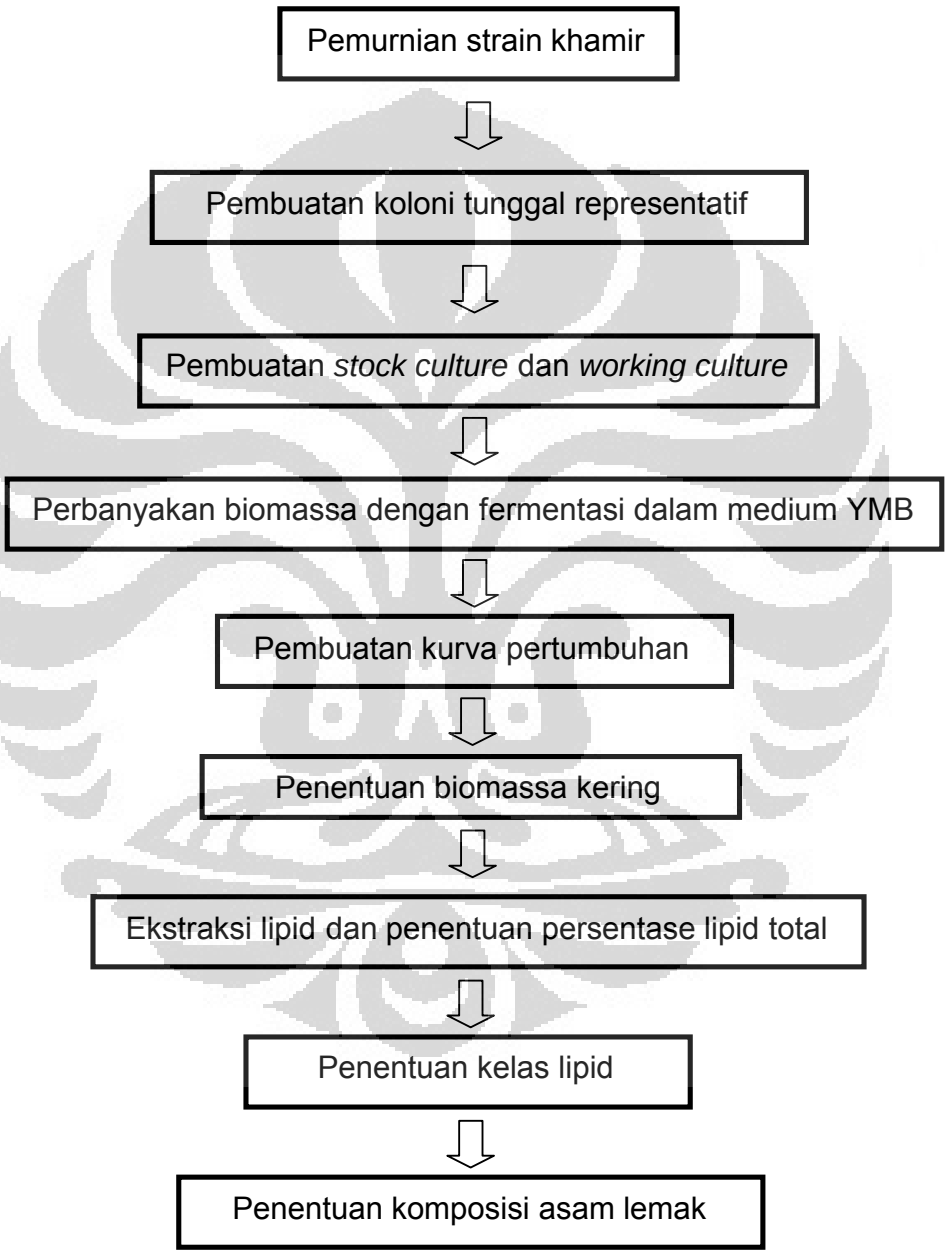
Sampel lipid		Nilai Rf	Dugaan kelas lipid
Rh. mucilaginosa UICC-Y-402	Hasil ekstraksi dengan alat *Soxhlet*	0,05	Mono-olein
		0,27	Ergosterol
		0,38	Tidak diketahui
		0,55	Tidak diketahui
		0,95	Triolein
		0,97	Tidak diketahui
	Hasil ekstraksi tanpa alat *Soxhlet*	0,24	Ergosterol
		0,49	Tidak diketahui
		0,60	Tidak diketahui
		0,74	Tidak diketahui
		0,96	Triolein
		0,97	Tidak diketahui
Rh. nothofagi UICC-Y-253	Hasil ekstraksi dengan alat *Soxhlet*	0,28	Ergosterol
		0,36	Tidak diketahui
		0,54	Tidak diketahui
		0,95	Triolein
		0,98	Tidak diketahui
	Hasil ekstraksi tanpa alat *Soxhlet*	0,24	Ergosterol
		0,96	Triolein
		0,98	Tidak diketahui

Tabel 12
Komposisi asam lemak lima strain khamir

Jenis asam lemak	Persentase (%) terhadap total asam lemak				
	Rh. acheniorum SD4233	*Rh. glutinis* L4236	*Rh. mucilaginosa* UICC-Y-283	*Rh. mucilaginosa* UICC-Y-402	*Rh. nothofagi* UICC-Y-253
Laurat	0,35	11,38	12,61	2,00	5,05
Miristat	13,60	7,50	5,80	8,81	3,96
Palmitat	38,30	33,94	29,14	27,99	28,41
Stearat	1,28	1,63	0,76	1,81	Tidak terdeteksi
Oleat	27,62	29,27	35,99	60,28	30,43
Linoleat	18,76	15,18	15,70	Tidak terdeteksi	32,15

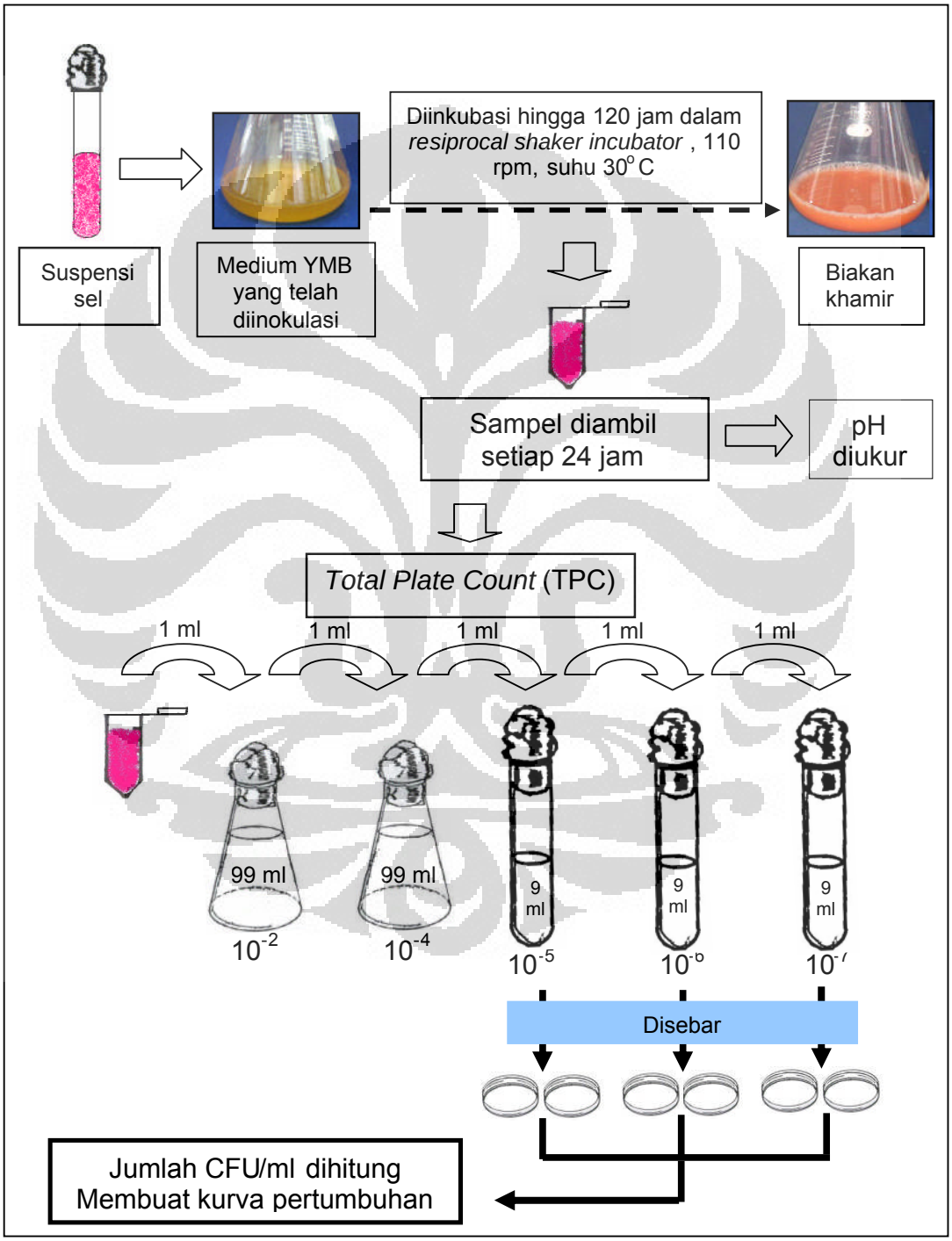
Lampiran 1

Skema kerja penelitian



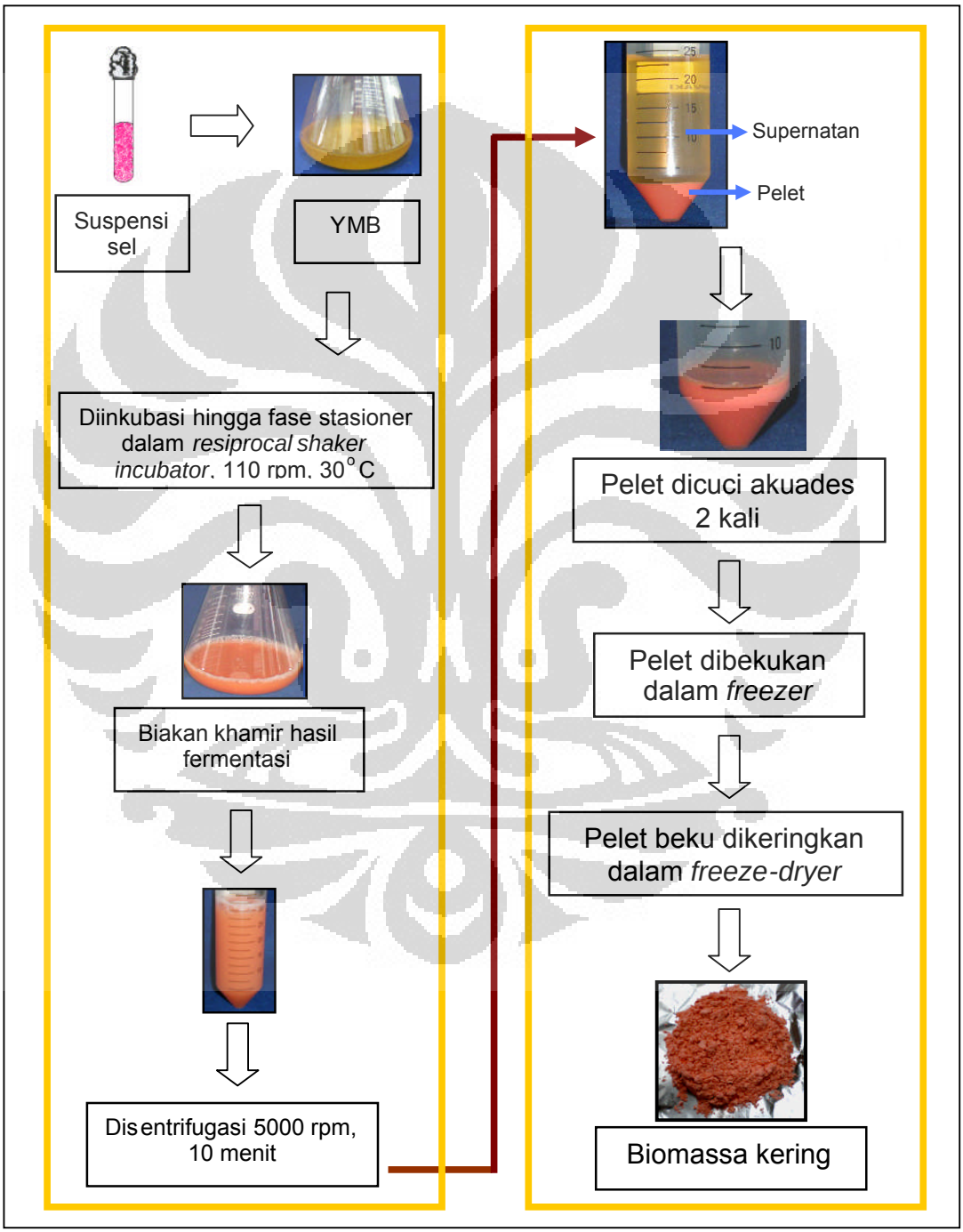
Lampiran 2

Skema pengerjaan *Total Plate Count* (TPC)



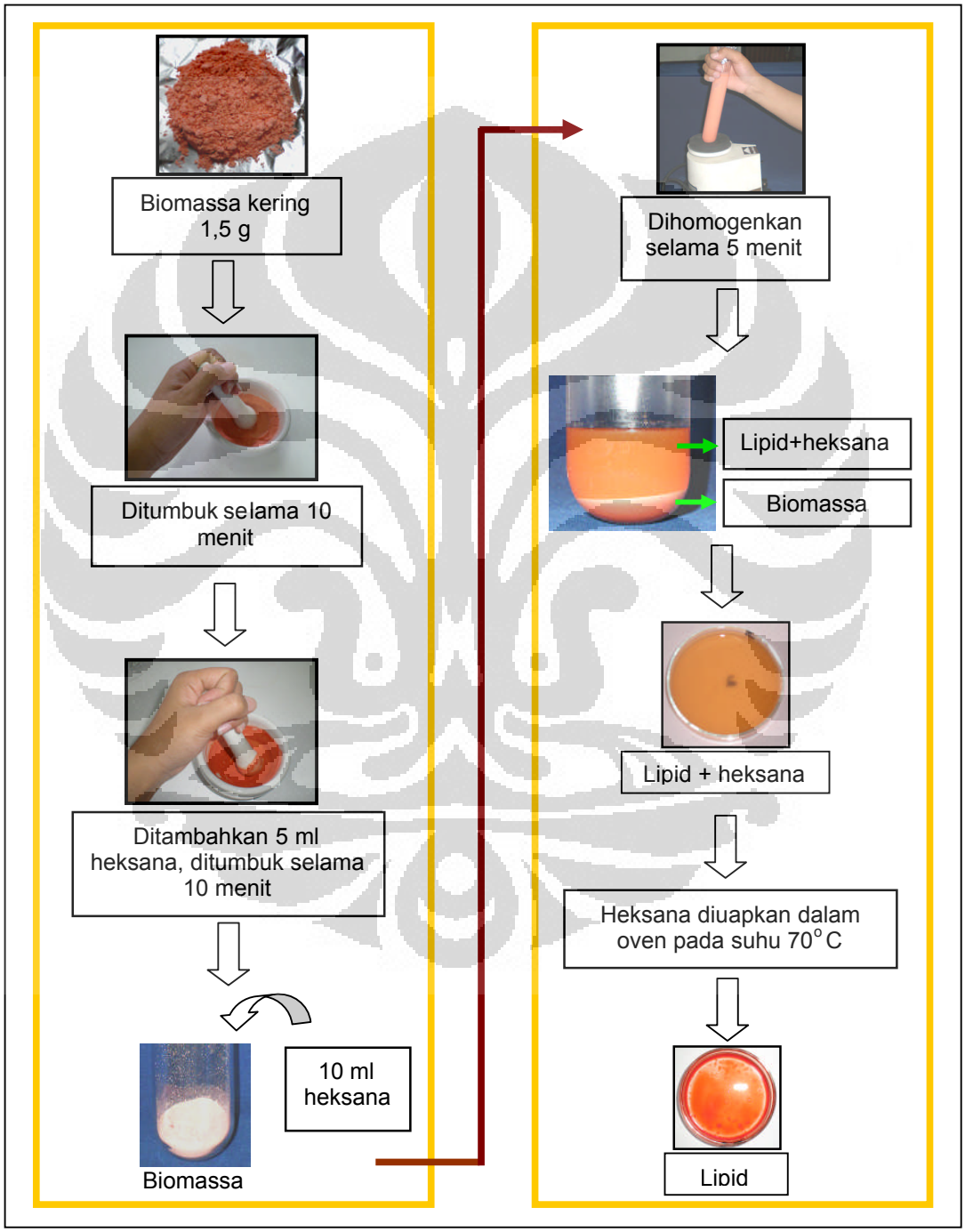
Lampiran 3

Skema perbanyakan biomassa dan persiapan biomassa kering



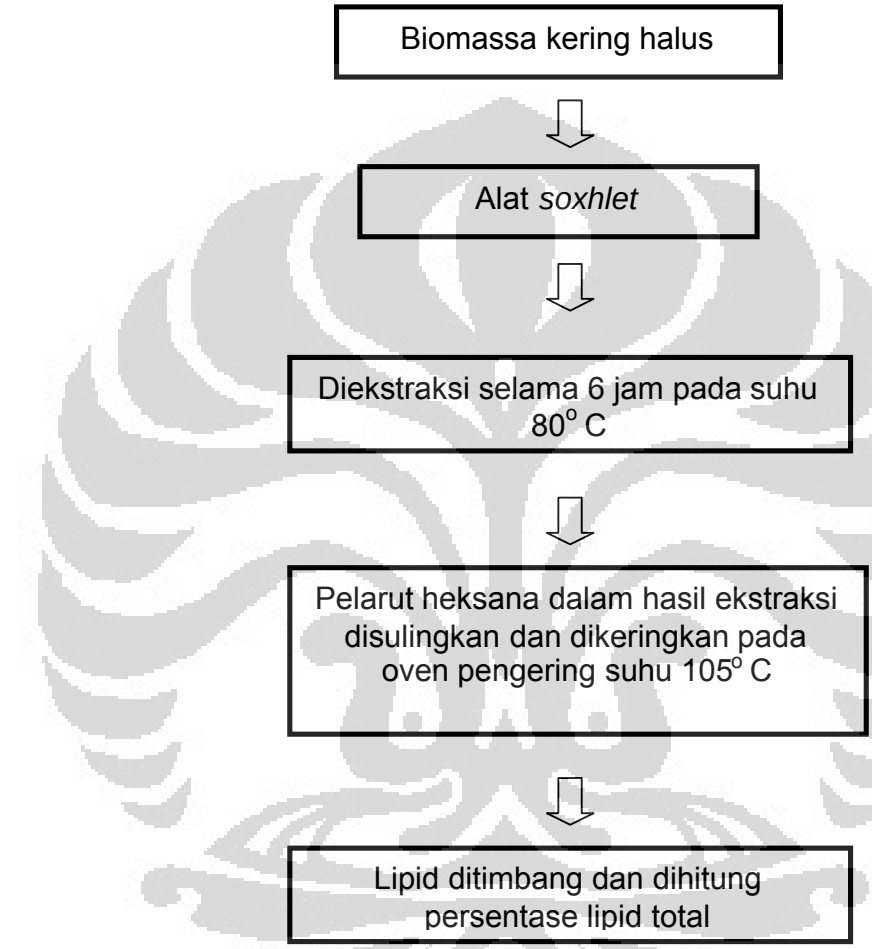
Lampiran 4

Skema ekstraksi lipid tanpa alat *soxhlet*



Lampiran 5

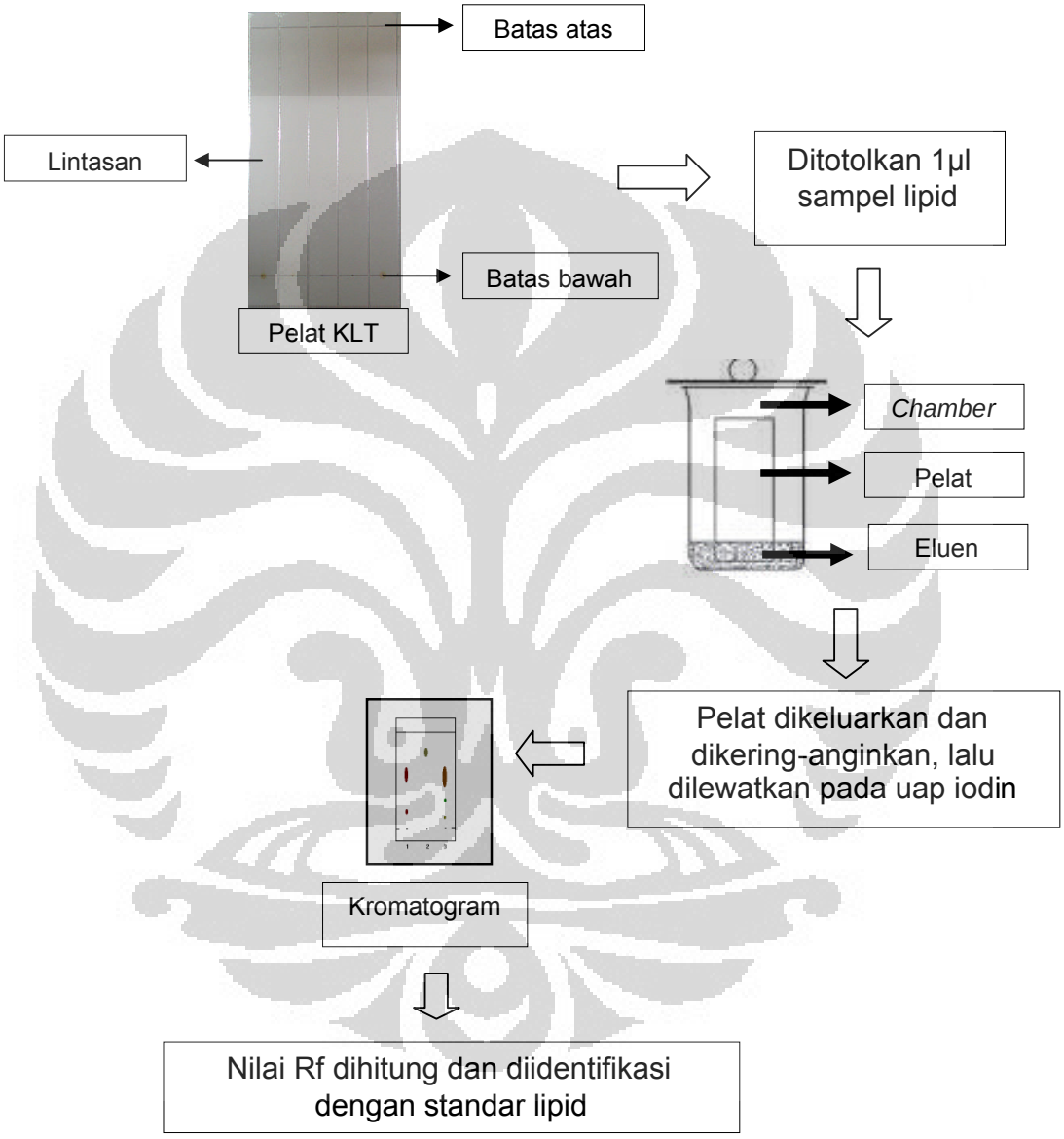
Skema ekstraksi lipid dengan alat *soxhlet*



$$\text{Persentase lipid (\%)} = \frac{\text{Berat lipid (g)}}{\text{Berat biomassa kering yang diperiksa (g)}} \times 100\%$$

Lampiran 6

Skema penentuan kelas lipid



$$Rf = \frac{\text{Lintasan } \textit{spot} \text{ dari batas bawah (cm)}}{\text{Lintasan eluen dari batas bawah hingga batas atas pelat (cm)}}$$

Lampiran 7

Skema penentuan komposisi asam lemak

---

200 mg lipid khamir +
5 ml NaOH-metanol 0,5 N

↓

Direfluks selama 20 menit menggunakan *water bath* suhu 80^{o}C

↓

Ditambah 5 ml BF3-metanolat

↓

Direfluks kembali selama 20 menit

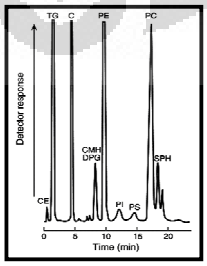
↓

Lapisan heksana dipindahkan ke botol berisi Na-sulfat

↓

Kromatografi Gas Cair

↓



Kromatogram