

KARAKTERISASI MORFOLOGI SEL REKOMBINAN DAN PIGMEN HASIL FUSI PROTOPLAS INTERSPESIFIK *Phaffia rhodozyma* DAN *Chlorella pyrenoidosa* H Chick

Indah Sulistyarini¹⁾, Hermin Pancasakti Kusumaningrum²⁾, Endang Kusdiyantini²⁾
¹⁾Stifar “Yayasan Farmasi Semarang, ²⁾Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

ABSTRACT

Protoplast fusion technique is a process of fusion between protoplasts of one organism to other organisms, so that the resulting recombinant cells with varying characters derived from its parent. This study did Phaffia rhodozyma interspecies fusion and Chlorella pyrenoidosa. The purpose of this study was to analyze the morphological characteristics of cells results protoplast fusion recombinant yeast P. rhodozyma and microalgae C. pyrenoidosa. Protoplast fusion technique performed in 4 phases, namely the isolation of protoplasts, protoplast fusion, and analysis of recombinant cell morphological characters. The results showed that the recombinant cells have morphological characters derived from the parent P. rhodozyma and of the parent C. pyrenoidosa. But was character of the parent P. rhodozyma more dominant. Recombinant cells capable of producing pigment and lutein astaxanthin. Astaxanthin pigment levels in recombinant cell height in a shorter time than the parent P. rhodozyma.

Keywords: fusion of protoplasts, Phaffia rhodozyma, Chlorella pyrenoidosa, Carotenoids, Recombinant Cells

PENDAHULUAN

Teknik rekayasa genetika telah banyak digunakan untuk meningkatkan kualitas produk tanaman maupun jamur yang dikonsumsi. Teknik fusi protoplas merupakan proses peleburan protoplas dari satu organisme dengan organisme yang lain, dengan karakter genetik yang sama atau berbeda (Djajanegara dan Khobar, 2009; Santoso dan Nursandi, 2003). Teknik tersebut merupakan salah satu teknik rekayasa genetika sederhana, yang dapat menghasilkan hibrid dengan sifat yang lebih unggul (Kusumaningrum *et al.*, 2003).

Teknik fusi protoplas secara intensif mampu meningkatkan kemampuan dari sel induk karena mereka umumnya bersifat multinukleid sehingga mudah dilakukan hibridisasi seksual, mutagenesis maupun aplikasi teknologi DNA rekombinan (Wijanarka, 2008).

Penelitian ini menerapkan fusi protoplas interspesies antara khamir *Phaffia rhodozyma* dan mikroalga *Chlorella pyrenoidosa*. *P. rhodozyma* dipilih karena merupakan khamir penghasil karotenoid dengan jenis pigmen: astaxanthin sebesar 83-87%; phoenicoxanthin 5-7%; 3-hidroksi echinenone 3-4%; echinenone 2-4% dan β -karoten 2-2,5% (Andrewes *et al.*, 1976; Schmidt, 2010).

C. pyrenoidosa mempunyai kemampuan menghasilkan karotenoid, seperti β -karoten, α -karoten, anthaxanthin, neoxanthin, zeaxanthin dan lutein. Lutein yang dihasilkan *C. pyrenoidosa* cukup besar, yaitu mencapai 11,404 ppm, lebih besar dari yang dihasilkan *C. vulgaris* yaitu sebesar 9,462 ppm (Kusmiati, *et al.*, 2010).

Kedua karotenoid tersebut berperan penting sebagai antioksidan. Senyawa antioksidan mampu menghambat

pembentukan radikal bebas yang disebabkan oleh oksidasi asam nukleat, protein, lemak, DNA sehingga mencegah berbagai penyakit degeneratif seperti kanker, diabetes, stroke, dan hipertensi (McGee, *et al.*, 2006 dalam Biranti, *et al.*, 2009). Dengan demikian diharapkan penelitian ini menghasilkan sel rekombinan yang mampu menghasilkan kedua jenis enzim tersebut.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari proses fusi protoplasma *P.rhodozyma* dan *C.pyrenoidosa*, dan menganalisis karakter morfologi koloni, sel, dan pigmen yang dihasilkan.

METODE PENELITIAN

Kultur pembiakan *P. rhodozyma*

P. rhodozyma dari kultur murni ditanam ke media YM sebanyak 10 ml. Media YM mengandung: glukosa 10 g/L, pepton 5 g/L, ekstrak yeast 3 g/L, ekstrak malt 3 g/L at pH 5 pada suhu ruang. Kultur diinkubasi selama 18-24 jam pada *rotaryshaker* dengan kecepatan 180 rpm

Kultur pembiakan *Chlorella pyrenoidosa*

C. pyrenoidosa didapatkan dari BBPBAP (Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau) Jepara. *C. pyrenoidosa* dikultivasi dalam medium Walne dengan pencahayaan dari lampu neon 2000 lux.

Isolasi protoplas sel *P. rhodozyma*

Protoplas *P. rhodozyma* diisolasi dengan modifikasi metode Chun *et al.*, (1992). Sel dengan kerapatan 10^7 diambil 5 ml, disentrifugasi 3500 rpm selama 15 menit. Pelet sel direndam dalam larutan penstabil osmotik yang mengandung Bufer Fosfat (pH 7) ; 0,6 MgSO₄. 7H₂O. Protoplas diperoleh dengan menambahkan larutan enzim lizozim sebanyak 0,2 ml dengan konsentrasi 2-3 mg/ml dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2-3 jam, kemudian disentrifugasi 3500 rpm selama 20 menit yang menghasilkan pelet protoplas *P. rhodozyma*.

Isolasi protoplas sel *P. rhodozyma*

Protoplas sel *C. pyrenoidosa* diperlakukan dengan metode Tjahjono *et al.* (1994) dan metode Uppalati & Fujita (2002). Sel *C. pyrenoidosa* dengan kerapatan sekitar 10^7 sel/ ml disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, kemudian pelet diambil. Pelet disuspensikan dengan buffer potasium phosphat yang mengandung 3 % buffer NaCl, 1 mM CaCl and 0.1 M 2- 2 mercaptoethanol. Kemudian sel diberi perlakuan 1 % 10 mg/ml enzim lizozym pada suhu 35° C selama 20 menit.

Fusi Protoplast *C. pyrenoidosa* dan *P. rhodozyma*.

Fusi protoplas Khamir *P. rhodozyma* dan Mikroalga *C. pyrenoidosa* pada penelitian inidilakukan dengan metode Chun *et al.*, (1992) dalam Hersugondo *et al.*, (2010) yaitu dengan menambah larutan penginduksi fusi protoplas (35% PEG 6000; 1 mM CaCl₂. 2H₂O; Glisin; Larutan penstabil osmotik). Persiapan fusi protoplas *C.pyrenoidosa* dilakukan dengan menambahkan protoplas *C. pyrenoidosa* dengan media walne yang ditambah dengan 35% PEG 6000, 5 mM glicin dan 10 mM CaCl selama 45 menit. Masing-masing suspensi protoplas *P. rhodozyma* dan *C. pyrenoidosa* diambil sebanyak 0,2 ml kemudian dicampur dan diinkubasi pada suhu 37°C. Selesai diinkubasi disentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit kemudian pelet diambil, dicuci dengan 4 ml larutan penstabil osmotik untuk menghilangkan PEG kemudian disentrifugasi 3500 rpm selama 10 menit.

Regenerasi Sel Hasil Fusi Protoplasma

Pelet hasil fusi ditambah 0,2 ml penstabil osmotik, kemudian ditanam ke media YMA lalu diinkubasi pada suhu 27°C.

Analisis Sel Rekombinan

1. Karakterisasi Sel Rekombinan

Gelas obyek dibersihkan dengan etanol 96%. Diambil satu ose koloni (dari media padat PDA) atau suspensi (dari media cair

Walne) kemudian diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40 X 10.

2. Analisis Pigmen Pada Sel Rekombinan dan Induk

Sampel sebanyak 5 mL disentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, dan pelet dicuci dengan 5 ml akuades sebanyak 2 kali. Pelet selanjutnya dicuci dengan 5 ml aseton dan divortex agar homogen, setelah itu disentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Pelet dikeringanginkan, kemudian ditambah dengan *glass beads* berdiameter 0,5 mm (0,25 g) dan 2,5 ml DMSO yang telah dipanaskan pada suhu 55°C. Selanjutnya ditambah 2,5 mL aseton, 2,5 mL petroleum eter dan 2,5 mL NaCl 20%. Larutan disentrifus selama 2 menit dan didapatkan 3 fase, fase paling atas (fase petroleum eter) diambil dengan pipet tetes dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 474 nm (Schroeder and Johnson, 1993; Thimotius *et al.*, 2003). Hasil analisis dengan metode spektrofotometri dilanjutkan dengan kromatografi cair kinerja tinggi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Isolasi Protoplas

Isolasi protoplas *P. rhodozyma* dengan metode Chun *et al.*, (1992) menunjukkan bahwa dinding sel *P. rhodozyma* mengalami kerusakan. Kerusakan dinding sel *P. rhodozyma* dibuktikan dengan berubahnya bentuk sel yang elips menjadi bulat, karena sel tidak lagi dibatasi oleh dinding sel, sehingga apabila berada di dalam media cair, cairan media berdifusi masuk ke dalam sel mengalami pembesaran, dan bentuk sel berubah menjadi bulat. Selain itu cairan sel tampak lebih jernih dibandingkan sel sebelum dilisiskan, karena cairan dari luar sel masuk sehingga cairan sel menjadi lebih encer.

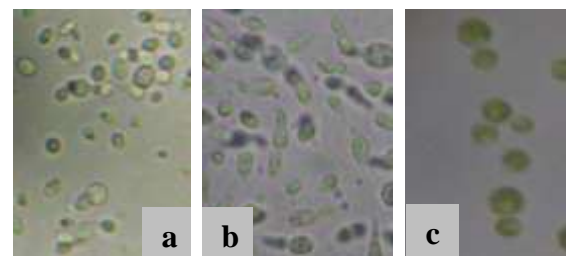
Pelisisan dinding sel *C. pyrenoidosa* dengan menggunakan metode Tjahjono *et al.*, (1994) dan metode Uppalati & Fujita (2002). Hasilnya menunjukkan bahwa dinding sel *C. pyrenoidosa* tidak terlisiskan sempurna. Hal ini terjadi karena secara

umum komponen dinding *Chlorella* tersusun atas selulosa dan *sporopollenin*. *Sporopollenin* merupakan suatu biopolimerkarotenoid yang mempunyai kemampuan resisten terhadap degradasi enzim atau oleh reagen-reagen kimia yang kuat (Wirosaputro, 2002).

Analisis Morfologi Sel Rekombinan

Hasil pengamatan sel rekombinan pada media YMA menunjukkan bahwa inkubasi 1 hari sel rekombinan bersifat multinukleat. Struktur multinukleat ini dapat berasal dari fusi protoplas intraspecies *P. rhodozyma*, karena menurut Libkind *et al.*, (2006) *P. rhodozyma* termasuk dalam sub divisi Basidiomycetous. Khamir Basidiomycetous pada kondisi lingkungan tertentu mampu melakukan reproduksi secara seksual apabila terjadi konjugasi/ gabungan antara sel yang satu dengan sel yang lain, yang mempunyai sifat sama atau berbeda. Siklus hidup secara seksual tersebut dengan cara membentuk *many buds* atau pembentuk sel anak secara berulang-ulang yang disebut pseudohifa. Semakin lama waktu inkubasi, menunjukkan sel bertambah panjang, dan berseptat-septat (Phaff, 2001). Sel rekombinan ditunjukkan pada gambar 1.

Munculnya reproduksi secara seksual tersebut didukung adanya pengaruh fusi atau konjugasi dua sel uniseluler. Perlakuan fusi dengan menggunakan PEG 35% memungkinkan terbentuknya kontak antara sel satu dengan sel lainnya, sehingga struktur sel yang berseptat-septat dapat terjadi (Svoboda, 1978). Induk *P. rhodozyma* secara normal (tanpa pengaruh PEG 35%) akan mengalami reproduksi dengan pembentukan tunas pada inkubasi 3 hari.



Gambar 1.a. Sel *P. rhodozyma*. b. Sel Rekombinan. c. Sel *C. pyrenoidosa*

Pembentukan septat pada *P. rhodozyma* selain dipengaruhi oleh fusi dapat juga dipengaruhi oleh adanya lingkungan yang kekurangan nutrisi. Kekurangan nutrisi seperti nitrogen dan oksigen akan menyebabkan proses meiosis cepat terjadi sedangkan pemisahan sel anak dengan sel induk membutuhkan waktu yang lama. Namun demikian hal ini terjadi setelah lama waktu inkubasi (Wiratno *et al.*, 2006).

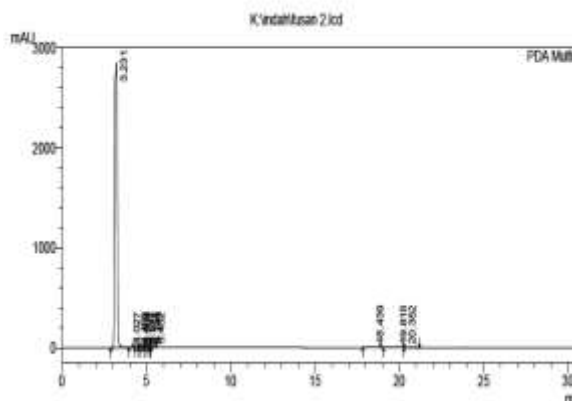
Analisis Pigmen Pada Sel Rekombinan

Pigmen sel rekombinan diekstraksi dari kultur media YM. Pengukuran dilakukan pada inkubasi 1 hari sampai dengan 6 hari, dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dan KCKT.

Hasil analisis pigmen menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis menunjukkan bahwa sel rekombinan menghasilkan pola spektra karotenoid dengan puncak spektra pada panjang gelombang \pm 495 nm. Menurut Libkind (2006), spektra pada panjang gelombang 483 nm menunjukkan pola spektra astaksanthin.

Sel rekombinan inkubasi 1 hari menunjukkan puncak spektra hanya pada panjang gelombang 495. Namun mulai inkubasi 2 hari memunculkan puncak spektra yang lain. Hal ini dimungkinkan muncul pigmen yang lain selain astaksanthin.

Analisis pigmen tersebut dilanjutkan dengan menggunakan metode KCKT. Hasil kromatogram KCKT menunjukkan bahwa sel rekombinan dengan inkubasi 5 hari, mampu menghasilkan pigmen lutein (Gambar. 2). Pigmen lutein yang dihasilkan hanya sebesar 0,096 % luas area. Hasil ini dimungkinkan terbentuk karena ada sel rekombinan interspesies *C. pyrenoidosa* dan *P. rhodozyma*, karena kultur yang diekstraksi sebelumnya sudah diamati secara mikroskopis tidak terdapat sel *C. pyrenoidosa* dalam kondisi tunggal, karena *C. pyrenoidosa* pada media YM dalam waktu inkubasi 2 hari sudah mati.

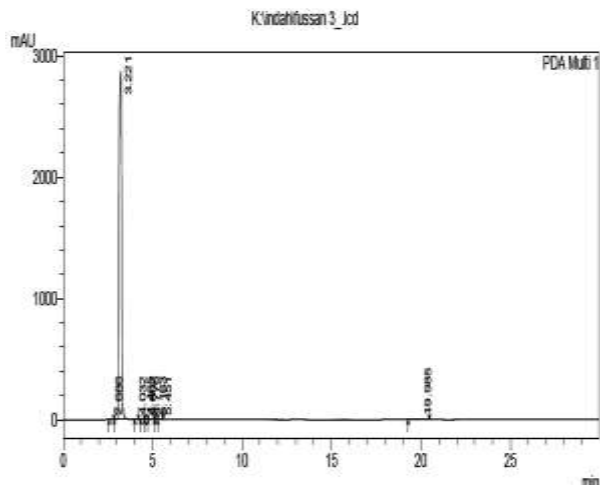


Gambar 2. Kromatogram HPLC sel rekombinan inkubasi 5 hari

Tabel. 1. Data pigmen berdasarkan waktu retensinya pada sel rekombinan inkubasi 5 hari

Peak	Waktu Retensi	Jenis pigmen	Area (%)
1	3,231	Astaxanthin	99,407
2	4,466	Neoxanthin	0,026
3	4,782	Violaxanthin	0,044
4	5,154	Auroxanthin	0,008
5	5,452	Auroxanthin	0,010
6	18,439	β -karoten	0,067
7	19,815	Astaxanthin ester	0,270
8	20,352	Lutein	0,096

Pada inkubasi 6 hari, pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer menunjukkan bahwa puncak spektra 495 nm terdapat absorbansi paling tinggi yaitu sebesar 0,745. Hasil pengukuran dengan menggunakan metode KCKT menunjukkan bahwa inkubasi 6 hari sel rekombinan mampu menghasilkan pigmen astaksanthin paling tinggi.



Gambar 3. Kromatogram HPLC sel rekombinan inkubasi 6 hari.

Tabel 2. Data pigmen berdasarkan waktu retensinya pada sel rekombinan inkubasi 6 hari

Peak	Waktu Retensi	Jenis pigmen	Area (%)
1	3,221	Astaksanthin	99,728
2	4,465	Neoxanthin	0,032
3	4,776	Violaxanthin	0,055
4	5,451	Auroxanthin	0,015
5	19,985	Astaxanthin ester	0,106

Kromatogram hasil pengukuran pigmen pada inkubasi 6 hari menghasilkan pigmen astaksanthin dengan luas area 99,728 %. Hasil kromatogram HPLC menunjukkan bahwa sel rekombinan dengan inkubasi 6 hari menghasilkan pigmen astaksanthin dengan luas area 99,728 %. Pada waktu inkubasi yang sama, hasil ini lebih tinggi dibandingkan dengan induk *P. rhodozyma*. Hal ini sesuai dengan pertumbuhan yang terjadi baik pada induk *P. rhodozyma* dan sel rekombinan. Keduanya menghasilkan pigmen astaksanthin pada saat sel mencapai fase pertumbuhan stasioner.

Analisis Kuantitatif Kadar Pigmen Karotenoid

Berdasarkan rumus perhitungan total karotenoid metode An et al, 1989, maka

dapat ditentukan kadar astaksanthin dengan analog bahwa *P. rhodozyma* menghasilkan astaksanthin sebesar 90% dari total karotenoid yang dihasilkan. Oleh karena itu dapat ditentukan kadar pigmen astaksanthin pada tabel 3. berikut ini:

Tabel 3. Data pigmen astaksanthin pada induk *P. rhodozyma* dan pada sel rekombinan

Inkubasi (hari)	Kadar Pigmen Astaksanthin $\mu\text{g/g}$ berat kering sel	
	<i>P. rhodozyma</i>	Sel rekombinan
1	0,371	0,412
2	0,475	0,393
3	0,572	0,468
4	0,589	0,454
5	0,659	0,551
6	0,668	0,839
7	0,839	0,476
8	0,791	-
9	0,734	-

Berdasarkan tabel 3, dapat diketahui bahwa sel rekombinan pada inkubasi 6 hari menghasilkan pigmen astaksanthin lebih tinggi dibandingkan induk *P. rhodozyma*, yaitu mencapai 0,839 $\mu\text{g/g}$ berat kering sel. Induk *P. rhodozyma* menghasilkan pigmen astaksanthin dengan kadar 0,839 $\mu\text{g/g}$ pada waktu inkubasi yang lebih lama yaitu 7 hari. Hal ini menunjukkan bahwa sel rekombinan mampu menghasilkan pigmen astaksanthin dengan jumlah yang lebih besar dalam waktu yang relatif lebih singkat. Kadar pigmen lutein dapat dianalogkan dari total pigmen astaksanthin yang telah diperoleh, yaitu sebesar 0,00081 $\mu\text{g/g}$ berat kering sel. Hasil ini menunjukkan bahwa sel rekombinan interspesies *P. rhodozyma* dan *C. pyrenoidosa* telah terbentuk.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sel rekombinan mempunyai karakter morfologi yang berasal dari induk *P.*

rhodozyma dan induk *C. pyrenoidosa*. Namun karakter induk *P. rhodozyma* lebih dominan. Kadar pigmen astaksanthin pada sel rekombinan tinggi dalam waktu yang lebih singkat dibanding induk *P. rodozyma*. Terbentuk sel rekombinan interspesies *P. rodozyma* dan *C. pyrenoidosa*, karena pigmen yang dihasilkan adalah astaksanthin dan lutein.

DAFTAR PUSTAKA

- Biranti, F., M. Nursid., dan Cahyono., 2009. Analisis Kuantitatif β -karoten dan Uji Aktivitas Karotenoid dalam Alga Coklat *Turbinariadecurrens*. *Jurnal Sains dan Matematika (JSM)*;90-96.
- Chun S.B., J, E, Chin., & S, G, H, Bai., 1992. Strain Improvement of *P. rhodozyma* by Protoplast Fusion. *FEMS Microbiol. Lett.*, 93: 221-226.
- Djajanegara, I. N. dan K, E, Khobar. 2009. Kondisi Optimum Fusi Protoplas Antara Jamur Tiram Putih (*Pleurotus floridae*) dan Brown Oyster Mushroom (*Pleurotus cystidiosusi*). *Berita Biologi* 9(5).
- Hersugondo., H, P, Kusumaningrum., dan M, Zainuri. 2010. Application of Aquaculture Natural Food Produce by Protoplast Fusion Process of *Dunaliella salina* and *Phaffia rhodozyma*. *Jurnal Ilmu Kelautan* Vol. 15 (4) 236-242.
- Kusumaningrum, H. P., E, Kusdiyantini., dan Wijanarka., 2003. Produksi Astaxanthin *Phaffia rhodozyma* Melalui Tehnik Fusi Protoplas. Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro. Semarang.
- Kusmiati., N, W, S, Agustini., S, W, Tamat., dan M, Irawati., 2010. Ekstraksi dan Purifikasi Senyawa Lutein dari Mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* Galur Lokal Ink. LIPI Cibinong Jakarta dan Universitas Pancasila Jagakarsa Jakarta.
- Libkind, D., C, Tognetti., R, Ruffini., J, P, Sampaio., and M, V, Broock. 2006. *Nithophyllomyces Dendrorhous*(*Phaffia Rhodozyma*) On Stomata Of *Cyttaria Hariotii* In Northwestern Patagonian Nothofagus Forests. Universidade Nova De Lisboa Caparica, Portugal, 2829-516.
- Phaff, H. J. 2011. Yeast. Encyclopedia Of Life Science. Nature Publishing Group// www.els.net
- Schmidt, I., H, Schewe., S, Gassel., C, Jin., J, Buckingham., M, Hübeline., G, Sandmann., and J, Schrader. 2010. Biotechnological Production Of Astaxanthin with *Phaffiarhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*. Springer-Verlag. 3 November; 1-25.
- Timotius, K. H., A, W, Purnomo., dan V, Meitiniarti., 2003. Produksi Astaxanthin Oleh Khamir Merah (*Phaffiarhodozyma*) Ditumbuhkan Dalam Air Kelapa yang Ditambah Ekstrak Khamir. *Jurnal. Teknol. Dan Industri Pangan*, XIV(2).
- Wijanarka., E, Kusdiyantini., dan H, P, Kusumaningrum., 2008. Produksi Inulinase Fusan 3 Hasil Fusi Protoplas Interspesifik *Kluyveromyces marxianus* dan *Torulospira pretoriensis*. *Jurnal Sains dan Matematika (JSM)* 16(2):88-96.
- Wiratno, E. N., T, Ardyati., dan A, K, Wardani. 2006. Pengaruh Gula Reduksi dan Total Nitrogen Terhadap Densitas dan Viabilitas Sel *Saccharomyces cerevisiae* dalam Fermentasi Etanol dari Molase. Laboratorium Mikrobiologi F MIPA-UB.
- Libkind, D., D. M. Moline, V. Garcia., S. Fontenia., and M.V. Broock. 2008. *J. Ind. Microbiol Biotechnol* 35: 151-158.