

EVALUASI AKTIVITAS ANTIMIKROBA DAN KEMAMPUAN PROBIOTIK SERTA UJI ENZIMATIS DARI YEAST *Rhodotorula mucilaginosa* Galur PK-S20

 Peneliti	 Ringkasan Eksekutif
<p>Ketua : Seprianto, S.Pi, M.Si (0309098702)</p> <p>Anggota Febriana Dwi Wahyuni, S.Pd, M.Si (0323029101) Dr.Titta Novianti S.Si, M.Biomed (0318116801) Mahasiswa Alfero Putra Iryanto (20180308022) Kevin Febrianus Moda (20180308024) Feby (20180308025) Regi Melati Fauziah (20190308004) Putri Mega Utami Dwi Aprilliana (20190308002)</p>	<p>Probiotik merupakan mikroba baik yang dapat menstimulasi pertumbuhan mikrobiota dalam sistem gastrointestinal. Kelompok yeast yang telah di laporkan memiliki potensial sebagai probiotik adalah genus <i>Rhodotorula</i>. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> di Indonesia sendiri belum ada dilaporkan dengan cara dieksplorasi sebagai kandidat probiotik. Yeast ini diisolasi dari ragi alami fermentasi kismis. Penelitian ini memiliki tujuan untuk mengetahui kemampuan probiotik dan kemampuan aktivitas antimikroba, serta enzimatis ekstraseluler yang dihasilkan oleh <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> PK-S20. Hasil penelitian menunjukkan bahwa <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Galur PK-S20 potensial sebagai probiotik karena mampu tumbuh baik pada media dengan pH rendah dan garam empedu serta kemampuan resistensi terhadap antibiotik. Hasil uji enzimatis menunjukkan yeast <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Galur PK-S20 hanya memiliki aktivitas amilase yang ditandai dengan terbentuknya zona hambat serta perubahan warna pada media pertumbuhan. Pengujian ekstrak etil asetat dari <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Galur PK-S20 menunjukkan adanya aktivitas antimikroba yang cukup tinggi terhadap <i>Escherichia coli</i>, <i>Listeria monocytogene</i>, <i>Staphylococcus Aureus</i> dan <i>Salmonella enteridis</i> dan aktivitas yang kecil dalam menghambat pertumbuhan <i>Pseudomonas Auroginosa</i>, <i>Salmonella enteridis</i>, dan <i>Salmonella thypimurium</i> untuk pengujian filtrat media YPD broth</p> <p>Kata Kunci : probiotik, <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>, garam empedu, antimikroba</p> <p> HKI dan Publikasi</p>

 LatarBelakang	 Hasil dan Manfaat
<p>Produksi pangan probiotik pada dasarnya melibatkan teknik fermentasi. Fermentasi merupakan suatu proses dekomposisi zat organik yang disebabkan oleh mikroorganisme atau enzim yang pada dasarnya mengubah karbohidrat menjadi alkohol atau asam organik (Swain et al., 2014). Teknologi ini juga dapat dijadikan sebagai upaya pencarian mikroba potensial probiotik baik dari golongan bakteri maupun yeast. Produk probiotik telah menjadi bidang yang berkembang pesat baik di Indonesia maupun global, menjadikan probiotik sebagai prospek pasar yang luas dengan nilai-nilai komersil yang tinggi dalam pengembangan industri pangan dan pakan. Namun, sumber daya probiotik belum sepenuhnya berkembang. Pembentukan industrialisasi probiotik dan keberadaan produksi skala kecil seperti industri rumah tangga dan keragaman produk yang dihasilkan pada umumnya tidak memenuhi persyaratan produk pangan probiotik yang diinginkan, hal ini dikarenakan kurang beragamnya pilihan mikroorganisme yang digunakan sebagai sumber probiotik.</p> <p>Salah satu jenis mikroorganisme dari kelompok yeast yang telah di laporkan memiliki potensial sebagai probiotik adalah genus <i>Rhodotorula</i> (Bonatsou et al., 2018).</p>	<p>Hasil</p> <p>Pengamatan koloni dan sel <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Galur PK-S20 secara makroskopis dan mikroskopis. Hasil pengamatan makroskopis menunjukkan koloni bewarna merah muda dengan bentuk koloni sirkular dengan tepian <i>undulate</i> (bergelombang). Warna khas ini merupakan hasil dari pigmen karotenoid yang dibuat oleh yeast untuk memblokir panjang gelombang tertentu dari cahaya yang dapat merusak sel (El-Ziney et al., 2018). Pengamatan mikroskopis sel menggunakan mikroskop dengan perlakuan sel diwarnai dengan metilen biru. Karakteristik yeast ini memiliki bentuk sel bulat sampai panjang dengan ukuran sel lebar 2,5-6,5 μm dan panjang 6,5-14 μm. Yeast yang terwarnai oleh zat metilen biru menunjukkan kematian pada sel, sedangkan yang tidak terwarnai adalah sel yang masih hidup. Menurut (Shen et al., 2014) bahwa hal ini menunjukkan terjadinya oksidasi pada sel yeast yang telah mati oleh zat metilen biru karena membran yang dimiliki oleh yeast yang telah mati tidak lagi bersifat semi permeabel. Yeast yang hidup dapat mereduksi zat metilen biru karena membran sel yeast masih aktif atau bersifat semi permeabel dalam mereduksi zat metilen biru sehingga sel tidak mampu terwarnai</p> <p>Pengamatan <i>Rhodotorula</i></p>

Rhodotorula sp. adalah yeast uniseluler yang ditandai dengan tingkat pertumbuhan yang tinggi diberbagai habitat. Beberapa spesies dari *Rhodotorula* merupakan organisme saprofit yang dapat diisolasi dari sumber lingkungan seperti tanah, air tawar, air laut, fermentasi susu, salad buah, fermentasi buah dan sayur (Sattarova & K. Sattarova, 2013). Bahkan Yu et al., (2015) melaporkan *Rhodotorula mucilaginosa* strain JMUY14 berhasil diisolasi dari sedimen laut dalam antartica. Yeast ini memiliki warna kuning, orange atau merah dan dikenal sebagai yeast karetogenik atau yeast merah muda karena memiliki kemampuan produksi karotenoid yang mana senyawa ini dilaporkan memiliki kemampuan aktivitas antimikroba (Yoo et al., 2016).



Metode

Pengujian ketahanan terhadap garam empedu umumnya dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif. Garam empedu adalah zat pengemulsi lipid yang dilepaskan ke duodenum setelah asupan makanan dan memiliki aktivitas antimikroba; oleh karena itu, probiotik harus memiliki toleransi empedu atau mekanisme eksklusi di tempat lain untuk bertahan hidup di usus (Kumar et al., 2012). Konsentrasi

mucilaginosa Galur PK-S20 berdasarkan pertumbuhan optimal pada berbagai temperatur menunjukkan yeast mampu tumbuh baik di suhu 28 °C dan tidak tumbuh pada suhu 6 °C dan 37 °C (Gambar 3). Berdasarkan kemampuan tumbuh pada suhu tersebut menunjukkan bahwa isolat yeast tersebut bersifat mesofil yakni mampu hidup pada suhu 20-30°C. Berdasarkan ketidakmampuan tumbuh pada suhu 6 °C maka *Rhodotorula mucilaginosa* Galur PK-S20 bukan termasuk sifat psikrofil yakni yeast yang mampu tumbuh pada suhu dibawah 20°C (Fadhli & Kusdiyantini, Endang, 2019). Menurut (Xi-Lin et al., 2014) bahwa uji pertumbuhan merupakan salah satu uji untuk mengidentifikasi jenis yeast. Umumnya yeast dapat hidup pada suhu 20-28 °C. Beberapa yeast tertentu ada yang mampu hidup dalam kondisi ekstrim yakni dibawah suhu 15°C dan juga pada suhu tertentu seperti 30 °C sampai 37 °C. Kemampuan hidup yeast yang berbeda dalam berbagai suhu menunjukkan perbedaan genus maupun spesies.

***Rhodotorula mucilaginosa* Galur PK-S20 sebagai Kandidat Probiotik**

Salah satu syarat utama agar suatu mikroorganisme dapat dimanfaatkan sebagai probiotik ialah toleransi terhadap pH rendah dan garam empedu. Hasil pengujian sifat probiotik menunjukkan bahwa nilai OD₆₆₀

garam empedu 0,3% dianggap penting untuk pemilihan probiotik potensial tetapi dalam keadaan makan, konsentrasi garam empedu dari usus manusia dapat meningkat hingga 2% di ileum (Psani & Kotzekidou, 2006). Mekanisme ketahanan mikroba terhadap garam empedu kemungkinan berasal pada kemampuan mikroba dalam memproduksi enzim *bile salt hydrolase* (Ogunremi et al., 2015)

Aktivitas Antibakteri dari Filtrat Yeast *Rhodotorula mucilaginosa* Galur PK-S20

Pengujian aktivitas antibakteri dari filtrat yeast *Rhodotorula mucilaginosa* Galur PK-S20 dengan pelarut etil asetat terhadap 7 spesies bakteri patogen diantaranya *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteridis*, *Listeria monocytogen* *Salmonella thypimurium* dan *Bacillus subtilis*. Aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat (*clear zone*) pada media NA (*nutrient agar*) yang terdapat bakteri uji di sekitar kertas cakram dengan berbagai perlakuan

Hasil uji menunjukkan adanya aktivitas antibakteri pada beberapa spesies bakteri patogen. Diameter zona hambat yang terbentuk dari masing – masing spesies berbeda – beda. Kemampuan ekstrak etil asetat basah (Eb) dan kering (Ek) dari *Rhodotorula mucilaginosa* Galur PK-S20

biakan yeast ialah $> 0,01$ setelah ditumbuhkan dalam media dengan pH rendah maupun media yang mengandung *bile salt*. Biakan *Rhodotorula mucilaginosa* PK-S20 mengalami pertumbuhan sel yang cukup signifikan setelah diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang (28 °C) dengan kondisi terkocok pada kondisi pH rendah. Hal ini dibuktikan dengan nilai OD yang diukur pada saat sel ditambahkan pada media pertumbuhan (0 Jam) lebih rendah di bandingkan dengan pengukuran pada saat 48 jam kecuali pada pH 2 yang mengalami sedikit penurunan jumlah sel dari OD₆₆₀ 0,7005 (0 jam) menjadi OD₆₆₀ 0,5871 (48 jam), hal ini dikarenakan media kultivasi terlalu asam

Adanya perbedaan zona penghambatan yang terbentuk dari masing – masing spesies diduga dipengaruhi oleh beberapa hal, seperti tingkat sensitifitas dari organisme uji, kecepatan difusi dari senyawa antibakteri dan konsentrasi senyawa antibakteri yang digunakan (Ghazali et al., 2021). Penggunaan antibiotik tetracyclin sebagai kontrol positif dikarenakan antibiotik ini memiliki spektrum kerja yang luas, jadi

mampu menghambat *Escherichia coli* (sebesar 11,00 mm dan 13,00 mm) dan *Listeria monocytogenes* (10,00 mm dan 7,00 mm), namun tidak untuk *Pseudomonas Auroginosa*, *Bacillus subtilis* dan *Salmonella thypimurium*. Aktivitas antibakteri yang cukup baik dari ekstrak etil asetat kering (Ek) untuk *Staphylococcus Aureus* dengan zona hambat 14,00 mm. Sedangkan kemampuan filtrat media YPD *Rhodotorula mucilaginosa* menunjukkan aktivitas yang kecil dalam menghambat pertumbuhan *Pseudomonas Auroginosa*, *Salmonella enteridis*, dan *Salmonella thypimurium*.

mampu menghambat pertumbuhan banyak spesies bakteri dengan kemampuan aktivitas yang beragam. Isolat *Rhodotorula mucilaginosa* Galur PK-S20 yang dipilih menunjukkan adanya aktivitas antimikroba dalam melawan patogen enterik, oleh karena itu, yeast ini bisa jadi digunakan untuk pencegahan infeksi usus tertentu.



Kesimpulan

Rhodotorula mucilaginosa Galur PK-S20 potensial sebagai probiotik karena mampu tumbuh baik pada media dengan pH rendah dan garam empedu serta kemampuan resistensi terhadap antibiotik. Hasil uji enzimatis menunjukkan yeast *Rhodotorula mucilaginosa* Galur PK-S20 hanya memiliki aktivitas amilase yang ditandai dengan terbentuknya zona hambat serta perubahan warna pada media pertumbuhan. Pengujian ekstrak etil asetat dari *Rhodotorula mucilaginosa* Galur PK-S20 menunjukkan adanya aktivitas antimikroba terhadap *Escherichia coli*, *Listeria monocytogene*, *Staphylococcus Aureus* dan *Salmonella enteridis*. Penelitian lebih lanjut yeast ini dapat aplikasikan pada pangan terutama



Ucapan terimakasih

Terima Kasih kepada LPPM Universitas Esa Unggul yang telah mendanai penelitian ini, Laboratorium Terpadu Fikes dalam yang telah memFasilitas agar penelitian berjalan lancar. Serta mahasiswa Bioteknologi yang turut membantu dalam penelitian ini

pada makanan dan minuman fermentasi serta mengkarakterisasi senyawa antimikroba yang dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Adelabu, B. A., Kareem, S. O., Oluwafemi, F., & Abideen Adeogun, I. (2019). Bioconversion of corn straw to ethanol by cellulolytic yeasts immobilized in *Mucuna urens* matrix. *Journal of King Saud University - Science*, *31*(1), 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.07.005>
- Ana, P. A. de O., Maria, A. S., Heloiza, F. A.-P., Andre, R., Marcelo, F. da P., Gustavo, G. F., & Rodrigo, S. R. L. (2015). Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid state fermentation and evaluation of the catalytic properties of enzymatic extracts. *African Journal of Biotechnology*, *14*(14), 1215–1223. <https://doi.org/10.5897/ajb2014.14062>
- Bajaj, B. K., Raina, S., & Singh, S. (2013). Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *Journal of Basic Microbiology*, *53*(8), 645–656. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200187>
- Chen, M., Chen, X., Tian, L., Liu, Y., & Niu, J. (2020). Enhanced intestinal health, immune responses and ammonia resistance in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed dietary hydrolyzed yeast (*Rhodotorula mucilaginosa*) and *Bacillus licheniformis*. *Aquaculture Reports*, *17*(May), 100385. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100385>
- Cissé, H., Kagambèga, B., Sawadogo, A., Tankoano, A., Sangaré, G., Traoré, Y., Irène, I., Ouoba, L., & Savadogo, A. (2019). Affiliations: Laboratory of Applied Biochemistry and Immunology, University Joseph KI-ZERBO, 03 BP Institute Rural Economy of Bamako, BP 258 Bamako, Mali Contact: *Scientific African*, e00175. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00175>
- Coelho, A. R., Celli, M. G., Ono, E. Y. S., Wosiacki, G., Hoffmann, F. L., Pagnocca, F. C., & Hirooka, E. Y. (2007). *Penicillium expansum* versus antagonist yeasts and patulin degradation in vitro. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *50*(4), 725–733. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132007000400019>
- Czerucka, D., Piche, T., & Rampal, P. (2007). Review article: Yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, *26*(6), 767–778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x>
- Freire, A. L., Ramos, C. L., Souza, P. N. D. C., Cardoso, M. G. B., & Schwan, R. F. (2017). Nondairy Beverage Produced by Controlled Fermentation with Potential Probiotic Starter Cultures of Lactic Acid Bacteria and Yeast. *International Journal of Food Microbiology*, *248*, 39–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.011>
- Fialho, M. B., de Andrade, A., Bonatto, J. M. C., Salvato, F., Labate, C. A., & Pascholati, S. F. (2016). Proteomic response of the phytopathogen *Phyllosticta citricarpa* to antimicrobial volatile organic compounds from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Research*, *183*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.002>
- Gadanhó, M., & Sampaio, J. P. (2002). Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodotorula*: *Rh. glutinis sensu stricto* and *Rh. dairenensis* comb. nov. *FEMS Yeast Research*, *2*(1), 47–58. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(01\)00062-9](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(01)00062-9)

- García-Hernández, Y., Rodríguez, Z., Brandão, L. R., Rosa, C. A., Nicoli, J. R., Elías Iglesias, A., Pérez-Sánchez, T., Salabarría, R. B., & Halaihel, N. (2012). Identification and in vitro screening of avian yeasts for use as probiotic. *Research in Veterinary Science*, 93(2), 798–802. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.09.005>
- Ghazali, M., Zaki, M., & Hidayati, E. (2021). Antibacterial Activity of Methanol Extract of *Sargassum polycystum* on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Biologi Tropis*, 21(1), 199-205.
- Ogunremi, O. R., Sanni, A. I., & Agrawal, R. (2015). Probiotic potentials of yeasts isolated from some cereal-based Nigerian traditional fermented food products. *Journal of Applied Microbiology*, 119(3), 797–808. <https://doi.org/10.1111/jam.12875>
- Sattarova, R. K., & K. Sattarova, R. (2013). Endophytic Yeast *Rhodotorula rubra* Strain TG-1: Antagonistic and Plant Protection Activities. *Biochemistry & Physiology: Open Access*, 02(01), 1–5. <https://doi.org/10.4172/2168-9652.1000104>
- Xi-Lin, X., Guang-Li, F., Hong-Wei, L., Xiao-Feng, L., Guang-lei, Z., & Xing-Long, X. (2014). Isolation, identification and control of osmophilic spoilage yeasts in sweetened condensed milk. *African Journal of Microbiology Research*, 8(10), 1032–1039. <https://doi.org/10.5897/ajmr2013.6203>
- Yolmeh, M., Hamed, H., & Khomeiri, M. (2016). Antimicrobial Activity of Pigments Extracted from *Rhodotorula glutinis* Against Some Bacteria and Fungi. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences, In Press*(In Press). <https://doi.org/10.17795/zjrms-4954>
- Yoo, A. Y., Alnaeeli, M., & Park, J. K. (2016). Production control and characterization of antibacterial carotenoids from the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* AY-01. *Process Biochemistry*, 51(4), 463–473. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.01.008>