

Stabilitas Media dan Viabilitas *Hansenula polymorpha* untuk Produksi Vaksin Hepatitis B rekombinan

Dewi Astriany^{1*}, Erman Tritama^{1,2}, Nurus Soliha¹, Dhianti Kiky Kande Dewi¹

¹Program Studi Farmasi Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia, Bandung, Indonesia

²PT Biofarma, Bandung, Indonesia

Corresponding : dewiastriany@stfi.ac.id

Abstract

Background: One way to prevent infection due to the Hepatitis B virus is by administering a vaccine. Recombinant Hepatitis B vaccine can be produced using *Hansenula polymorpha* yeast host cells. The production of this vaccine is influenced by many factors, including media conditions and host cell growth. **Objective:** This study was conducted to determine the optimal age of the media for *H. polymorpha* growth by observing the optical density and viability values, as well as to determine the effect of the freeze-thaw process on the stability of *H. polymorpha*. **Methods:** Preservation of *H. polymorpha* is carried out by storing it in a 15% glycerol solution at -80 °C. *H. polymorpha* was treated with freeze-thaw cycles of 1x, 2x, 3x, 4x, and 5x. The optical density and viability values of *H. polymorpha* grown on SYN6 media were observed on the 2nd, 4th, 6th, 8th, and 10th days. **Results:** On the 8th day, *Hansenula polymorpha* had reached its growth limit at pH 4 with a viability value of 34×10^7 cfu. **Conclusion:** From these data, it can be concluded that SYN6 media can be used as a good growth medium for *H. polymorpha* until the 6th day of storage, and *H. polymorpha* remains stable after 5 freeze-thaw cycles.

Keywords: *Hansenula polymorpha*, medium, stability, viability.

Abstrak

Pendahuluan: Salah satu langkah pencegahan terjadinya infeksi akibat virus Hepatitis B adalah dengan pemberian vaksin. Vaksin Hepatitis B rekombinan dapat diproduksi menggunakan sel inang ragi *Hansenula polymorpha*. Produksi vaksin ini dipengaruhi oleh banyak faktor di antaranya kondisi media dan pertumbuhan sel inang. **Tujuan:** Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui umur media yang masih optimal untuk pertumbuhan *H. polymorpha* dengan mengamati nilai *optical density* dan viabilitasnya, serta untuk mengetahui pengaruh proses *freeze-thaw* terhadap stabilitas *H. polymorpha*. **Metode:** Preservasi *H. polymorpha* dilakukan dengan penyimpanan dalam larutan gliserol 15% pada suhu -80°C. *H. polymorpha* diberi perlakuan siklus *freeze-thaw* sebanyak 1x, 2x, 3x, 4x, 5x. Nilai *optical density* dan nilai viabilitas *H. polymorpha* yang ditumbuhkan pada media SYN6 diamati pada hari ke-2, ke-4, ke-6, ke-8, dan ke-10. **Hasil:** Pada hari ke-8 *Hansenula polymorpha* telah mencapai batas pertumbuhannya pada pH 4 dengan nilai viabilitas 34×10^7 cfu. **Kesimpulan:** Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa media SYN6 dapat digunakan sebagai media pertumbuhan *H. polymorpha* yang baik hingga hari ke-6 penyimpanan dan *H. polymorpha* tetap stabil setelah 5 kali siklus *freeze-thaw*.

Kata kunci: *Hansenula polymorpha*, media, stabilitas, viabilitas.

PENDAHULUAN

Infeksi Virus Hepatitis B sampai saat ini masih menjadi masalah kesehatan di dunia, diperkirakan lebih dari dua milyar orang diseluruh dunia pernah terinfeksi VHB. Dari jumlah tersebut, 360 juta terinfeksi kronis sehingga menjadi kelompok resiko tinggi sakit berat sampai kematian. Salah satu upaya pencegahan dini adalah imunisasi atau vaksinasi Hepatitis B yang diberikan pada bayi menggunakan vaksin rekombinan (Rusmil, Fadlyana & Bachtiar, 2010). Prevalensi

Hepatitis B pada tahun 2007 cukup tinggi sekitar 9,4% (Balitbangkes, 2008) dan dengan pemberian vaksinasi terbukti dapat menurunkan angka prevalensi Hepatitis B di Indonesia (Lusida, Juniastuti & Yano, 2016), karena pada tahun 2018 prevalensi di Indonesia terhadap hepatitis B menurun sekitar 0,39% (Tim Riskesdas 2018, 2018).

Pada bidang medis mikroorganisme berperan sebagai inang dalam produksi vaksin rekombinan. Salah satu contohnya ragi

metilotropik *Hansenula polymorpha* yang biasa digunakan dalam pembuatan vaksin hepatitis B. *H. polymorpha* tergolong organisme GRAS (*Generally Recognized as Safe*). Ragi ini termasuk kelompok metilotropik yang memiliki jalur metabolisme metanol. Pada jalur tersebut terdapat gen-gen yang dapat terekspresi pada level tinggi, diatur oleh beberapa promotor. Karakteristik lainnya yaitu bersifat *crabtree-negatif* sehingga menguntungkan untuk fermentasi pada kecepatan dilusi tinggi, termotoleran (hingga 45°C), mengasimilasi nitrat, kecenderungan melakukan hipermanosilasi rendah, memungkinkan integrasi multikopi gen yang stabil dalam kromosomnya, dan memiliki frekuensi rekombinasi nonhomolog yang tinggi (Kim, Yoo & Kang, 2015).

Untuk mendukung ketersediaan dan menjaga kestabilan genetik dari *Hansenula polymorpha* maka preservasinya harus dilakukan secara tepat. Preservasi mikroorganisme secara garis besar bertujuan untuk menjaga agar biakan tetap hidup dan genetiknya tetap stabil karena jika tidak stabil maka ada kemungkinan akan terjadi mutasi pada mikroorganisme yang dapat mengakibatkan menurunnya kualitas produksi dari vaksin. Cara penyimpanan biakan organisme yang umum adalah dengan penyimpanan dalam protektan (larutan gliserol 15%) pada suhu -80°C (*freezing*) (Puspawati, Nuraida & Adawiyah, 2010).

Protektan merupakan senyawa kimia yang berfungsi mengurangi pengaruh yang mematikan akibat proses *freezing*, baik yang berupa efek larutan (*solution effect*) maupun pembentukan kristal es ekstraseluler dan intraseluler sehingga viabilitas sel dapat terjaga. Suatu senyawa kimia yang dapat berfungsi sebagai protektan apabila memenuhi beberapa kriteria diantaranya dapat menjaga viabilitas, ciri morfologi, dan fisiologi sel selama preservasi. Selain itu, protektan harus memiliki sifat tidak beracun serta dapat berikatan dengan air membentuk larutan koligatif (Uzunova-Donova & Donev, 2005).

Freezing merupakan metode penyimpanan sel pada suhu rendah. Suhu yang digunakan dalam *freezing* berkisar antara suhu 0°C pada freezer konvensional hingga suhu -196°C pada nitrogen cair (kriopreservasi). Tujuan utama dari preservasi dengan metode *freezing* adalah menyimpan organisme tanpa terjadi perubahan

morfologi, fisiologi, biokimia, dan properti genetik. Prinsip utama *freezing* adalah mengatur perpindahan atau difusi air yang melewati membran sel melalui proses dehidrasi dan rehidrasi. Proses dehidrasi terjadi ketika sampel dibekukan, sedangkan proses rehidrasi terjadi ketika sampel dicairkan. Ketika sampel dibekukan, air di dalam sel akan keluar disebabkan lingkungan luar sel yang bersifat hipertonis akibat perubahan larutan protektan. Air yang keluar tersebut selanjutnya akan berubah menjadi kristal es ekstraseluler, kemudian protektan masuk ke dalam sel dan menggantikan cairan intraseluler. Proses ketika sampel dicairkan (*thawing*) menyebabkan terjadinya pencairan kristal es ekstraseluler. Lingkungan luar sel berubah menjadi hipotonis sehingga air akan masuk kembali ke dalam sel dan menggantikan protektan yang keluar dari dalam sel (Brockbank, James & Machael, 2007).

Proses *freezing* dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor. Umur kultur merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan proses *freezing*. Kultur yang umumnya digunakan dalam preservasi menggunakan metode *freezing* adalah kultur yang berada pada akhir fase eksponensial atau fase awal stasioner (Andersen, 2005). Faktor lain yang dapat mempengaruhi keberhasilan metode *freezing* adalah pencairan (*thawing*) yang merupakan proses pencairan kembali sel yang telah dibekukan. Proses *thawing* dapat dilakukan pada suhu ruangan (37°C) atau pada suhu tertentu pada penangas air (Brockbank, James & Machael, 2007).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan menyebutkan bahwa preservasi mikroorganisme pada suhu rendah (-80°C) dapat memperlambat kecepatan reaksi metabolisme mikroorganisme tetapi tidak akan dapat membunuh mikroorganisme. Dengan demikian ketika mikroorganisme dikeluarkan dari refrigerator -80°C dan dibiarkan untuk mencair kembali, pertumbuhan mikroorganisme akan kembali berjalan normal, tetapi pengulangan proses *freezing* dan *thawing* dikhawatirkan dapat mempengaruhi total mikroorganisme yang viabel dan stabilitas dari *Hansenula polymorpha* itu sendiri (Sibirian, Dewi & Kariada, 2012). Oleh karena itu dilakukan penelitian untuk menguji stabilitas Media SYN6 serta stabilitas *H. polymorpha* selama proses *freezing* dan *thawing*

(preservasi) serta untuk mengetahui siklus *freeze-thaw* yang masih menghasilkan biakan yang optimal dengan menggunakan pengujian *Optical Density* dan uji viabilitas.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan di antaranya adalah kultur *Hansenula polymorpha* RB11 (PT. Bio Farma), gliserol, CaCl₂, d-biotin (Sigma), isopropanol, tiamin hidroklorida (Calbiochem®), EDTA (Titriplex®), Fe(SO₄)(NH₄)₂(SO₄).6H₂O, CuSO₄.5H₂O, ZnSO₄.7H₂O, MnSO₄, NiSO₄.6H₂O, CoCl₂.6H₂O, asam borat, KI, dan Na₂MoO₄, NH₄H₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, KCl, NaCl; ekstrak ragi (Bacto™), pepton (Oxoid), dekstrosa (Oxoid); NaCl, NaOH, HCl, etanol, dan *water for injection* (WFI).

Alat

Pada penelitian ini digunakan *shaker incubator* (Innova42), laminar air flow (Biobase), autoklaf (Telstar), pompa filtrasi (Watson Marlow), mikroskop (Olympus), pH meter (Mettler Toledo), dan spektrofotometer UV-Visibel (Shimadzu).

Metode

Penentuan Profil Pertumbuhan *Hansenula polymorpha*

Sebelum menentukan profil pertumbuhan *H. polymorpha* generasi ke-44 rekombinan, dibuat kurva baku yang menunjukkan hubungan antara OD₆₀₀ kultur dengan jumlah sel viabel. 1% kultur stok *H. polymorpha* RB11 diinokulasikan ke dalam 250 mL medium SYN6 pada labu Erlenmeyer 1L. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 32°C, agitasi 250 rpm, selama 24 jam untuk aktivasi. Kultur dari aktivasi lalu diinokulasikan sebanyak 10% ke dalam 250 mL SYN6 dalam *baffled* Erlenmeyer 1L dan diinkubasi pada suhu 32°C, agitasi 250 rpm selama 16 jam hingga diperoleh OD₆₀₀ >1. Kultur dialiquot ke dalam beberapa *falcon tube* 15 mL steril kemudian diencerkan dengan SYN6 baru, hingga diperoleh OD₆₀₀ sekitar 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1. Masing-masing kultur dengan *optical density* yang berbeda diencerkan dengan larutan fisiologis (0,9 % NaCl) steril secara bertahap dari mulai konsentrasi 1x10⁻¹ hingga 1x 10⁻⁷. Dipilih tiga pengenceran terakhir untuk masing-masing sampel dengan OD berbeda. Sebanyak 0,1 mL sampel yang telah diencerkan tersebut diinokulasikan pada YPD padat dengan metode

sebar. YPD padat dalam cawan petri tersebut diinkubasi pada suhu 32°C selama 48 jam lalu dilakukan perhitungan koloni total. Hasil perhitungan sel viabel diplot ke dalam kurva antara OD₆₀₀ dengan jumlah sel viabel hingga diperoleh persamaan kurva baku.

Selanjutnya sebanyak 1% stok *H. polymorpha* diinokulasikan pada 250 mL SYN6 cair dalam labu Erlenmeyer 1L hingga diperoleh OD₆₀₀ awal 0,4. Kultur tersebut diinkubasi pada suhu 32°C, 250 rpm, selama 24 jam. Kultur tersebut diinokulasikan pada labu *baffled* Erlenmeyer 1L berisi 250 mL medium SYN6. OD₆₀₀ kultur dicek secara berkala setiap 4 jam mulai dari jam ke-0 hingga jam ke-48. Pengecekan OD₆₀₀ dilakukan dengan menuang 1 mL kultur ke kuvet bersih, kemudian dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer UV-Visibel. Nilai OD₆₀₀ setiap waktu lalu dimasukkan dalam persamaan kurva baku dan diperoleh jumlah sel (cfu/mL). Jumlah sel diplot terhadap waktu untuk menghasilkan kurva pertumbuhan. Waktu generasi dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$G = \frac{t}{3.3 \log b/B}$$

Dimana

G : waktu generasi (jam)

t : Interval waktu (jam)

b : jumlah sel di akhir interval

B: jumlah sel di awal interval (Todar, 2012).

Pengujian Stabilitas Media SYN6

Kultur *H. polymorpha* diinokulasikan ke dalam dua media SYN6 yang berbeda. Media SYN6 yang segar digunakan sebagai kontrol dan Media SYN6 yang berumur digunakan sebagai media uji. Sebelum kultur diinokulasikan, media terlebih dahulu di uji pH, konduktivitas dan diamati secara visual. Kultur *H. polymorpha* diinokulasikan ke dalam 250 mL media SYN6 pada labu Erlenmeyer 1L dengan OD₆₀₀ awal sekitar 0,4 lalu diinkubasi pada kondisi 32°C, 250 rpm, selama 24 jam, inokulasi dilakukan sebanyak triplo untuk media uji. Hasil kultur dilakukan uji OD₆₀₀ dan viabilitas. Pengujian stabilitas media SYN6 dilakukan setelah media SYN6 berumur 2 hari, 4 hari, 6 hari, 8 hari, dan 10 hari.

Subkultur Berulang

Kultur stok *H. polymorpha* RB11 generasi ke-84 diinokulasikan dalam medium SYN6 sebanyak 4-7 mL dengan OD₆₀₀ awal sekitar 0,4 lalu diinkubasi pada 32°C, 250 rpm, selama 24 jam. Setiap 24 jam, kultur diinokulasikan

pada medium baru dengan kondisi yang dibuat sama dengan kultivasi sebelumnya untuk menjaga kultur dalam fase logaritmik. Subkultur berulang tersebut dilakukan untuk memperoleh generasi ke-88, 92, 96, 100, dan 104 yang diambil setiap 24 jam.

Pengujian Stabilitas Menggunakan Freeze Thawing

Kultur *H. polymorpha* RB11 generasi ke-88 dibagi menjadi dua kultur. Kultur I langsung dinokulasikan ke dalam media segar SYN6 sedangkan kultur II dimasukkan ke dalam freezer suhu -80°C dan dibiarkan sampai membeku. Setelah kultur membeku, kultur dikeluarkan dan dicairkan (satu siklus *freeze-thaw*). Kemudian kultur diinokulasikan ke dalam media SYN6 dengan OD_{600} awal sekitar 0,4 lalu diinkubasi pada 32°C , 250 rpm selama 24 jam. Kontrol yang digunakan yaitu kultur seed *H. polymorpha* RB11 generasi ke-88 tanpa mengalami siklus *freeze-thaw*. Hasil kultur dilakukan uji OD_{600} dan uji viabilitas. Pengujian stabilitas ini juga dilakukan pada *seed culture* *H. polymorpha* RB11 generasi ke-88 yang telah mengalami siklus *freeze-thaw* sebanyak 2, 3, 4, dan 5 kali dengan masing-masing kontrol *seed culture* *H. polymorpha* RB11 generasi ke-92, 96, 100, dan generasi ke-104.

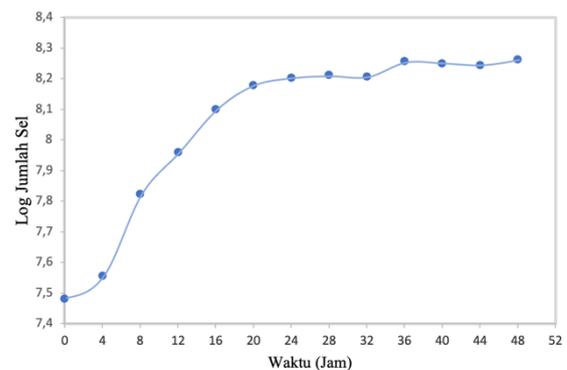
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini digunakan kultur *H. polymorpha* yang berasal dari PT. Bio Farma. Kultur ini digunakan dalam pembuatan vaksin Hepatitis B rekombinan. Subkultur maupun produksi vaksin dilakukan pada medium SYN6. Medium ini minimal berisi garam-garam, vitamin, dan *trace element* yang telah dioptimasi untuk memungkinkan pertumbuhan sel *H. polymorpha* pada densitas tinggi, serta dapat ditambahkan sumber karbon yang sesuai dengan model fermentasi yang diinginkan (Stöckmann *et al.*, 2009). Kultivasi *H. polymorpha* memungkinkan suplementasi media dengan glukosa atau gliserol. Pada sistem fermentasi dua sumber karbon yang digunakan dalam produksi, dimana penggunaan gliserol lebih disarankan. Gliserol umumnya tidak menyebabkan pembentukan metabolit samping yang tidak diinginkan seperti etanol dan asam-asam organik, dimana metabolit tersebut dapat mengganggu pertumbuhan sel dan sintesis protein rekombinan (Gellissen, 2002). Berdasarkan ketentuan WHO dalam WHO *Technical Report Series* No.978 tahun 2013 aneks 4,

dicantumkan bahwa sel inang untuk produksi vaksin harus stabil selama periode penyimpanannya sebagai data pendukung dari bagian studi stabilitas *H. polymorpha*.

Profil Pertumbuhan *Hansenula polymorpha*

H. polymorpha dikultur pada media SYN6 dalam kondisi yang telah disesuaikan dengan tahapan pada produksi vaksin. Pada profil pertumbuhan *H. polymorpha* sebagaimana ditampilkan Gambar 1, dapat diamati bahwa *H. polymorpha* mengalami fase logaritmik selama 24 jam pertama. Mulai dari jam ke-24 sampai ke-48 pertumbuhan mulai melambat dan jumlah sel cenderung konstan yang menandakan fase stasioner.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan *Hansenula polymorpha* pada media SYN6

Agar sel yang dikultur tetap berada pada fase logaritmik, maka subkultur dilakukan setiap 24 jam. Hal ini bertujuan untuk menjaga agar waktu generasi tetap konstan di setiap subkultur, sehingga selama kultivasi dapat diperkirakan generasi yang diperoleh. Untuk perhitungan waktu generasi didasarkan pada pertambahan jumlah sel dibanding jumlah sel awal selama rentang waktu tertentu. Dalam hal ini kultur ditumbuhkan dengan inokulum awal sekitar $2,6 \times 10^7$ dan dipanen pada 24 jam dengan rata-rata jumlah sel $9,13 \times 10^7$, sehingga diperoleh waktu generasi 6,63 jam. Dengan waktu generasi tersebut, diperkirakan setiap 24 jam fase logaritmik diperoleh 3,61 generasi.

Pengujian Stabilitas Media SYN6

Media SYN6 adalah media sintesis yang cocok untuk budidaya *H. polymorpha* dengan kepadatan sel tinggi (*high density cultivation*). Komponen dari SYN6 dapat dibagi menjadi dua bagian yaitu basal media dan suplemen. Basal media terdiri dari larutan campuran garam (*salt*

mix), gliserol, dan air. Suplemen terdiri dari larutan kalsium klorida, mikroelemen, vitamin, dan trace elements (Gellissen, 2002). Media SYN6 sebagai kontrol dibuat dengan mencampurkan setiap komponen media tepat saat inokulum akan di inokulasikan sedangkan media SYN6 sebagai media uji, semua komponen media dicampurkan mulai dari hari ke-0 dan didiamkan selama 10 hari. Inokulum yang diinokulasikan menggunakan inokulum yang setiap 24 jam diinokulasikan ke media baru untuk menjaga inokulum tetap segar sehingga tidak ada faktor lain dari inokulum yang dapat mempengaruhi pengujian. Pada pengamatan secara visual, setelah komponen media uji di campurkan media berwarna hijau jernih namun, setelah didiamkan beberapa jam media menjadi keruh dan saat media telah didiamkan selama 24 jam teramati terbentuknya endapan putih di dasar botol yang jika di aduk membuat media menjadi keruh. Pada hari ke-2 endapan putih tidak lagi mengendap di dasar botol, membuat media tampak keruh namun setelah di aduk media menjadi lebih keruh. Pada hari ke-4 dan hari ke-6 masih terlihat perbedaan dari sebelum media diaduk dan setelah media diaduk, setelah media diaduk terlihat lebih keruh. Namun pada hari ke-8 dan hari ke-10 saat sebelum media diaduk dan setelah media diaduk tidak terlihat perbedaan yang jelas. Terbentuknya endapan menandakan jumlah padatan yang terlarut dalam sebuah larutan menurun, hal ini dapat disebabkan karena nilai konduktivitas media SYN6 yang mengalami penurunan setiap harinya seperti yang terlihat pada Tabel 1. Konduktivitas pada hari ke-2 yaitu 18582,8 μScm^{-1} dan semakin menurun hingga 17316,8 μScm^{-1} pada hari ke-10. Menurut Irwan (2016) terdapat hubungan antara jumlah zat padat terlarut dengan nilai konduktivitas listrik dimana semakin besar jumlah padatan terlarut di dalam larutan maka kemungkinan jumlah ion dalam larutan juga akan semakin besar, sehingga nilai konduktivitas listrik juga akan semakin besar (Irwan & Afdal, 2016).

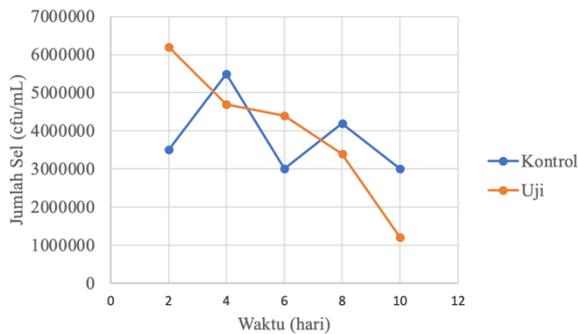
Tabel 1. Hasil pengujian stabilitas media SYN6 pada berbagai umur media

| Pengujian | pH | Konduktivitas (μScm^{-1}) | OD ₆₀₀ | | OD ₆₀₀ Akhir*Fp | Viabilitas (cfu/mL) | |
|------------|------|---|-------------------|-------|-------------------------------|---------------------|------------------|
| | | | Awal | Akhir | | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ |
| Kontrol | 4,41 | 19251,8 | 0,441 | 0,681 | 1,051 | 178 | 35 |
| Hari ke-2 | 4,48 | 18582,8 | 0,412 | 0,729 | 1,210 | 257 | 62 |
| Kontrol | 4,41 | 19269,1 | 0,422 | 0,444 | 1,366 | 170 | 55 |
| Hari ke-4 | 4,22 | 18624,9 | 0,420 | 0,451 | 1,376 | 251 | 47 |
| Kontrol | 4,42 | 18347,0 | 0,421 | 0,466 | 1,186 | 166 | 30 |
| Hari ke-6 | 4,12 | 17537,2 | 0,433 | 0,543 | 1,386 | 156 | 44 |
| Kontrol | 4,37 | 18139,6 | 0,454 | 0,521 | 1,288 | - | 42 |
| Hari ke-8 | 4,03 | 17434,3 | 0,416 | 0,509 | 1,273 | 180 | 34 |
| Kontrol | 4,33 | 18154,5 | 0,427 | 0,451 | 1,225 | 164 | 30 |
| Hari ke-10 | 4,01 | 17316,8 | 0,415 | 0,502 | 1,188 | 88 | 12 |

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Barroso dkk. (2023) diketahui bahwa nilai konduktivitas memiliki hubungan yang linear dengan *Total Dissolved Solids* (TDS) atau jumlah padatan terlarut. Pada penelitian tersebut teramati bahwa konduktivitas meningkat seiring dengan peningkatan TDS yang ditunjukkan oleh adanya peningkatan konsentrasi sulfat dan ion lainnya (Barroso *et al.*, 2023). Dalam penelitian Hayashi (2004) yang juga melakukan penelitian untuk melihat hubungan antara konduktivitas listrik dengan TDS, diketahui keduanya memiliki hubungan yang kompleks tergantung pada komposisi kimia dan kekuatan ion dalam larutan tersebut (Hayashi, 2004). Media SYN6 mengandung banyak komponen yang termasuk di dalamnya seperti garam, logam, dan vitamin. Hal ini memungkinkan untuk terjadinya interaksi antar zat yang menimbulkan terjadinya endapan putih.

Banyak mikroorganisme yang memiliki faktor pertumbuhan spesifik yang harus dimasukkan ke dalam media agar budidaya berhasil. Dengan adanya komponen yang rusak dalam suatu media dapat mempengaruhi pertumbuhan dari sel mikroorganisme sel yang kelaparan, yang mengisi kultur yang berhenti tumbuh sebagai respons terhadap habisnya satu atau lebih nutrisi yang ditentukan, dapat memiliki efek signifikan pada respons seluler secara keseluruhan dan kelangsungan hidup jangka panjang.

Perbandingan viabilitas *H. polymorpha* pada media SYN6 kontrol dengan media SYN6 uji yang ditunjukkan pada Gambar 2, dapat diamati bahwa nilai viabilitas *H. polymorpha* pada media uji mengalami penurunan setiap harinya.



Gambar 2. Grafik perbandingan viabilitas *Hansenula polymorpha* pada Media SYN6 Kontrol dengan Media SYN6 Uji.

Penurunan viabilitas pada hari ke-2 dan hari ke-8 pada grafik terlihat mengalami penurunan yang signifikan, namun nilai OD₆₀₀ pada hari ke-2 lebih kecil yaitu 1,210 dibandingkan dengan nilai OD₆₀₀ pada hari ke-4 sebesar 1,376. sementara viabilitas hari ke-2 lebih besar yaitu 62x10⁷ cfu/mL dibandingkan dengan viabilitas hari ke-4 sebesar 47x10⁷ cfu/mL, nilai OD₆₀₀ dan viabilitas pada hari ke-2 tidak linear.

Penurunan viabilitas pada hari ke-8 ke hari ke-10 pada grafik terlihat mengalami penurunan yang signifikan, namun viabilitas pada hari ke-8 yaitu 34x10⁷ cfu/mL telah mencapai batas minimal dari pengujian viabilitas untuk mikroorganisme yaitu 30-300 cfu/mL dan pada hari ke 8 penurunan jumlah viabilitasnya lebih besar dibandingkan dengan penurunan di hari ke 6. Jika dilihat dari tabel OD akhir yang telah dikalikan faktor pengenceran pada hari ke-8 pun mengalami penurunan dari 1,386 menjadi 1,273 dan viabilitasnya dari 44x10⁷ menjadi 34x10⁷ cfu/mL. Melihat faktor lain seperti pH, penurunan jumlah viabilitas setiap harinya juga dapat disebabkan karena pH media yang teramati pada media uji juga mengalami penurunan setiap harinya. Perubahan pH pada media dapat menyebabkan sel mengalami denaturasi enzim dan protein lain, sehingga sel tidak mampu untuk membuat komponen-komponen sel lainnya untuk pertumbuhan sel dan besar kemungkinan sel akan mengalami kematian (Black & Black, 2017). Sehingga pada hari ke-8 *H. polymorpha* telah mencapai batas pertumbuhannya pada pH 4.

Subkultur Berulang

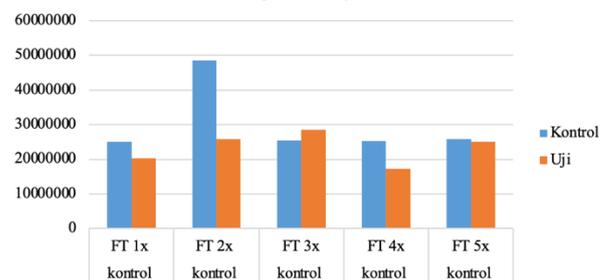
Subkultur berulang dilakukan untuk mendapatkan kultur segar sebagai kontrol positif saat pengujian stabilitas *H. polymorpha* menggunakan siklus freeze-thaw. Diperkirakan

perolehan generasi setiap kali subkultur sebesar 3,61 generasi, dihitung dengan membagi waktu inkubasi yaitu 24 jam dengan waktu generasi yaitu 6,63 jam. Setiap dilakukan subkultur, OD₆₀₀ awal selalu disamakan sekitar 0,4. Hal ini dikarenakan untuk menyamakan kondisi awal saat pembuatan kurva baku dan kurva pertumbuhan agar dapat memprediksi jumlah pertumbuhan sel viable *H. polymorpha*. Lima sampel generasi digunakan untuk analisis kestabilan *H. polymorpha* menggunakan siklus freeze-thaw yaitu generasi ke 88, 92, 96, 100, dan 104.

Pengujian Stabilitas menggunakan Freeze-Thaw

Kultur *H. polymorpha* diberi perlakuan siklus freeze-thaw sebanyak satu kali kemudian di subkultur ke dalam media SYN6 untuk pengamatan nilai OD₆₀₀ dan setelah 24 jam kultur diinokulasikan ke dalam media YPD untuk pengamatan viabilitasnya. Begitupun selanjutnya untuk kultur *H. polymorpha* yang sudah diberi perlakuan siklus freeze-thaw sebanyak dua kali sampai lima kali dan kontrol positif yang digunakan adalah kultur *H. polymorpha* yang segar. Secara keseluruhan dapat dikatakan bahwa hasil OD₆₀₀ dan uji viabilitas kultur *H. polymorpha* yang diberi perlakuan siklus freeze-thaw dengan kultur yang segar hasilnya tidak berbeda secara signifikan yang ditunjukkan pada Gambar 3, hanya saja pada kultur *H. polymorpha* yang diberi perlakuan siklus freeze-thaw sebanyak tiga kali hasilnya lebih besar dibandingkan dengan kontrol.

Perbandingan Viabilitas *Hansenula polymorpha* Siklus FT dengan kultur fresh



Gambar 3. Perbandingan viabilitas *Hansenula polymorpha* dengan kultur segar

Hal ini dapat disebabkan karena perbedaan OD₆₀₀ awal yang berbeda cukup jauh yakni untuk awal kontrol sebesar 0,403 sedangkan untuk uji sebesar 0,428, karena jumlah kultur awal yang masuk kedalam media berbeda sehingga untuk jumlah kultur yang tumbuh pun akan berbeda.

Tabel 2. Hasil pengujian stabilitas *Hansenula polymorpha* menggunakan siklus freeze thawing

| Pengujian | pH | OD ₆₀₀ | | OD ₆₀₀ Akhir*Fp | Viabilitas (cfu/mL) | |
|-----------|------|-------------------|-------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | Awal | Akhir | | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ |
| Kontrol | 5,00 | 0,408 | 0,634 | 2,124 | 2,5 x 10 ⁷ | 6,1 x 10 ⁷ |
| FT 1x | 5,00 | 0,409 | 0,577 | 1,704 | 2,03 x 10 ⁷ | 4,1 x 10 ⁷ |
| Kontrol | 4,98 | 0,402 | 0,726 | 2,134 | 4,85 x 10 ⁷ | 1,4 x 10 ⁸ |
| FT 2x | 5,01 | 0,409 | 0,586 | 1,757 | 2,573 x 10 ⁷ | 5,867 x 10 ⁷ |
| Kontrol | 4,98 | 0,403 | 0,576 | 1,946 | 2,54 x 10 ⁷ | 2,3 x 10 ⁷ |
| FT 3x | 5,01 | 0,428 | 0,670 | 1,983 | 2,85 x 10 ⁷ | 1,08 x 10 ⁸ |
| Kontrol | 5,00 | 0,414 | 0,532 | 1,883 | 2,52 x 10 ⁷ | 5,1 x 10 ⁷ |
| FT 4x | 4,99 | 0,403 | 0,653 | 1,368 | 1,72 x 10 ⁷ | 3,75 x 10 ⁷ |
| Kontrol | 4,98 | 0,408 | 0,669 | 1,869 | 2,59 x 10 ⁷ | 6,8 x 10 ⁷ |
| FT 5x | 4,99 | 0,406 | 0,572 | 1,837 | 2,5 x 10 ⁷ | 6,1 x 10 ⁷ |

Berdasarkan data pada Tabel 1, maka dapat dikatakan bahwa *H. polymorpha* tetap stabil selama proses penyimpanan atau selama proses freeze-thaw. Hal ini dikarenakan pada kultur *H. polymorpha* ada penambahan cairan protektan (gliserol) selama proses penyimpanan. Ketika kultur *H. polymorpha* dibekukan, air di dalam sel akan keluar yang selanjutnya akan berubah menjadi kristal es ekstraseluler, kemudian protektan masuk ke dalam sel dan menggantikan cairan intraseluler sehingga kultur *H. polymorpha* tidak mengalami kerusakan sel. Gliserol secara luas telah dikenal dan dimanfaatkan sebagai krioprotektan sel bakteri melalui metode simpan beku (freezing stroge) karena mampu meminimalisir efek larutan yang dapat menyebabkan terbentuknya kristal es dalam sel (Susilawati & Purnomo, 2016). Selain itu umur kultur *H. polymorpha* yang digunakan adalah saat kultur menunjukkan fase akhir eksponensial, sel yang tumbuh secara eksponensial secara umum lebih tahan terhadap pembekuan dan memiliki viabilitas yang lebih tinggi (Andersen, 2005), sehingga saat dilakukan pengujian siklus freeze-thaw hasil viabilitas dari kultur *H. polymorpha* dapat dikatakan tetap stabil.

Storey dan Storey (2005) melaporkan bahwa pembentukan kristal es pada cairan intraseluler dapat menyebabkan kerusakan langsung pada sel dan jaringan. Proses freezing memungkinkan tergantungnya air ekstraseluler oleh kristal es sehingga konsentrasi cairan ekstraseluler meningkat (hipertonis). Pollari (2008) menyatakan bahwa peningkatan konsentrasi cairan ekstraseluler menyebabkan keluarnya cairan intraseluler melalui membran sel akibat perbedaan gradien osmotik antara lingkungan ekstraseluler yang hipertonis dengan lingkungan dalam sel yang hipotonis

(Pollari, 2009). Peristiwa ini yang disebut dehidrasi sel. Dehidrasi dapat menyebabkan terlalu banyak cairan intraseluler yang meningkatkan sel sehingga berdampak pada perubahan volume sel dibawah ambang batas volume sel minimum. Hal tersebut berdampak pada besarnya tekanan terhadap membran sel dan membran organel sehingga fungsi membran terganggu. Sel yang terdehidrasi terlalu kuat dapat menyebabkan lisis.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini disimpulkan bahwa Media SYN6 dapat digunakan sebagai media pertumbuhan *H. polymorpha* yang baik hingga hari ke-6 penyimpanan. Pada hari ke-8 pertumbuhan *H. polymorpha* telah mencapai batas pertumbuhannya dengan nilai viabilitas 34x10⁷ cfu. *H. polymorpha* yang disimpan dengan penambahan gliserol menggunakan metode freezing pada suhu -80°C dapat stabil hingga lima kali siklus freeze-thaw.

DAFTAR PUSTAKA

- Andersen, R. A. 2005. *Algal Culturing Techniques*. Burlington: Elsevier Academic Press.
- Balitbangkes. 2008. *Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) 2007*. Jakarta.
- Barroso, A. et al. 2023. A New Acidity-Based Approach for Estimating Total Dissolved Solids in Acidic Mining Influenced Water, *Water (Switzerland)*, 15(16), pp. 1–14.
- Black, J. G. and Black, L. J. 2017. *Microbiology : Principles and Explorations*. Arlington: Wiley-Blackwell.
- Brockbank K.G.M., James, C.C., and Machael, T. J. 2007. *Cryopreservation Guide, ATCC Guide*, pp. 1–16.
- Gellissen, G. 2002. *Hansenula polymorpha: Biology and Applications, Hansenula polymorpha*, p. 347.
- Hayashi, M. 2004. Temperature-electrical conductivity relation of water for environmental monitoring and geophysical data inversion, *Environmental Monitoring and Assessment*, 96(1–3), pp. 119–128.
- Irwan, F. and Afdal, A. 2016. Analisis Hubungan Konduktivitas Listrik Dengan Total Dissolved Solid (TDS) dan Temperatur Pada Beberapa Jenis Air, *Jurnal Fisika Unand*, 5(1), pp. 85–93.
- Kim, H., Yoo, S. J. and Kang, H. A. 2015. Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins, *FEMS Yeast Research*, 15(1).

- Lusida, M. I., Juniastuti and Yano, Y. 2016. Current hepatitis B virus infection situation in Indonesia and its genetic diversity, *World Journal of Gastroenterology*, 22(32), pp. 7264–7274.
- Pollari, M. 2009. *Cyanobacterial Acclimation to Changing Environmental Conditions: Roles for group 2 sigma factors in Synechocystis sp. PCC 6803*. Turku.
- Puspawati, N. N., Nuraida, L. and Adawiyah, D. R. 2010. Penggunaan berbagai jenis bahan pelindung untuk mempertahankan viabilitas bakteri asam laktat yang diisolasi dari air susu ibu pada proses pengeringan beku, *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, XXI(1), pp. 59–65.
- Rusmil, K., Fadlyana, E. and Bachtiar, N. S. 2010. Booster Vaksinasi Hepatitis B Terhadap Anak yang Non Responder, *Sari Pediatri*, 12(2), p. 88.
- Siburian, E. T. P., Dewi, P. and Kariada, N. 2012. Pengaruh suhu dan waktu penyimpanan terhadap pertumbuhan bakteri dan fungi ikan bandeng, *Jurnal of Life Science*, 1(2), pp. 101–105.
- Stöckmann, C. et al. 2009. Process development in *Hansenula polymorpha* and *Arxula adenivorans*, a re-assessment, *Microbial Cell Factories*, 8, pp. 1–10.
- Storey, K.B. & Storey, J.M. 2005. *Extremophiles : Encyclopedia of Life Support Systems*. Oxford : UNESCO-EOLSS Publisher. 25.
- Susilawati, L. and Purnomo, E. S. 2016. Viabilitas Sel Bakteri Dengan Cryoprotectant Agents Berbeda (Sebagai Acuan Dalam Preservasi Culture Collection di Laboratorium Mikrobiologi), *Biogenesis: Jurnal Ilmiah Biologi*, 4(1), pp. 34–40.
- Tim Riskesdas. 2018. Laporan Riskesdas 2018 Nasional, *Lembaga Penerbit Balitbangkes*.
- Uzunova-Doneva, T. and Donev, T. 2005. Anabiosis and conservation of microorganisms, *Journal of Culture Collections*, 4, pp. 17–28.

