

Pengaruh Gula Reduksi dan Total Nitrogen Terhadap Densitas dan Viabilitas Sel *Saccharomyces cerevisiae* dalam Fermentasi Etanol dari Molase

Ekwan Nofa Wiratno¹, Tri Ardyati^{1*}, Agustin Krisna Wardani²

¹Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang

²Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas THP, Universitas Brawijaya, Malang

ABSTRAK

Fermentasi etanol dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu kualitas mikroba (densitas dan viabilitas sel khamir), kondisi lingkungan fermentasi (suhu, pH dan oksigen terlarut) dan kualitas media fermentasi. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh variasi total nitrogen dan gula reduksi terhadap densitas dan viabilitas sel *Saccharomyces cerevisiae* (SAF Instan) selama proses fermentasi etanol dari molase. Tahapan penelitian ini terdiri dari pengukuran kadar gula reduksi, total nitrogen, konsentrasi kalsium, penentuan densitas dan viabilitas sel khamir serta analisis data. Fermentasi dilakukan selama 72 jam dengan 3 ulangan. Perlakuan konsentrasi gula reduksi (GR) dan total nitrogen (N) yaitu GR 100 N 0, GR 100 N 6, GR 100 N 10, GR 125 N 0, GR 125 N 6 dan GR 125 N 10 g/l. Penghitungan viabilitas sel dilakukan setiap 24 jam. Viabilitas tertinggi adalah GR 125 N 0 (95,76 %) dan GR 100 N 6 (95,96 %). Penurunan viabilitas sel disebabkan oleh rendahnya perkembangbiakan sel khamir (tidak terjadi peningkatan jumlah sel secara signifikan ($p>0,05$)). Hal ini terjadi karena tingginya konsentrasi kalsium (0,21 %).

Kata kunci: densitas, molase, *Saccharomyces cerevisiae*, kalsium, viabilitas

ABSTRACT

Ethanol fermentation influenced by many factor, there are microbe quality (density and viability of yeast cell), environmental condition (temperature, acidity and dissolved oxygen) and quality of fermentation medium. Aim of this research is to know effect of reducing sugar and total nitrogen variation to cell density and viability during ethanol fermentation with molasses by *Saccharomyces cerevisiae* (SAF Instant). Step of this research are determination of reducing sugar, total nitrogen and calcium, density and viability cell counting and data analysis. Treatment of reducing sugar (GR) and total nitrogen (N) there are GR 100 N 0, GR 100 N 6, GR 100 N 10, GR 125 N 0, GR 125 N 6 and GR 125 N 10 g/l. Fermentation was carried out for 72 hours with triplicates. Cell viability observed every 24 hours. High cell viability are GR 125 N 0,33 (95,76 %) and GR 100 N 6 (95,96 %). Decrease of cell viability caused by low of yeast reproduction. Low of yeast reproduction caused by high calcium concentration (0,21 %).

Key word: calcium, density, molasses, *Saccharomyces cerevisiae*, viability

* Corresponding author:

E-mail: tri_ardiyati@yahoo.com

Laboratorium Mikrobiologi, FMIPA-UB

PENDAHULUAN

Keterbatasan minyak bumi menyebabkan perlunya dilakukan peningkatan produksi bioenergi sebagai alternatif pengganti bahan bakar fosil. Penggunaan bioenergi memiliki keuntungan utama antara lain terbaharukan dan dampak negatif penggunaannya terhadap lingkungan jauh lebih rendah dibandingkan dengan penggunaan bahan bakar fosil [1]. Produksi minyak bumi Indonesia semakin menurun, sedangkan kebutuhan terhadap produk turunannya semakin meningkat, seiring dengan meningkatnya jumlah penduduk. Perbandingan kebutuhan terhadap etanol dan produksinya pada tahun 2012 mencapai 15:1 [2].

Mikroba yang aktif dalam perubahan glukosa menjadi etanol adalah khamir dari spesies *Saccharomyces cerevisiae*. Pertumbuhan khamir merupakan salah satu faktor yang berpengaruh terhadap produksi etanol. Pertumbuhan khamir dipengaruhi oleh faktor nutrisi dan faktor lingkungan. Nutrisi utama yang penting dalam kehidupan sel khamir adalah sumber karbon, nitrogen, oksigen dan hidrogen. Bahan lain yang diperlukan dalam jumlah sedikit untuk komponen sel yaitu unsur fosfor, sulfur, kalium dan magnesium. Diperlukan pula *trace minerals* dan *growth faktor* berupa asam amino, purin, pirimidin dan vitamin. *Growth faktor* yang paling penting untuk khamir meliputi biotin, asam pantotenat, inositol, thiamin, asam nikotinat dan asam folat. Faktor lingkungan terdiri dari suhu, pH, oksigen dan tekanan udara [3].

Bahan baku utama untuk produksi etanol di Indonesia adalah tetes tebu (molase). Bahan ini digunakan karena merupakan limbah pabrik gula dan tidak banyak dimanfaatkan sebagai bahan pangan pokok, seperti halnya dengan bahan berpati [1].

Molase lebih umum digunakan sebagai bahan baku industri etanol karena tidak memerlukan proses awal terlebih dahulu seperti bahan berpati atau berselulosa [4]. Namun, penggunaan konsentrasi gula reduksi dalam molase sebagai sumber karbon dan nutrisi tambahan berupa urea sebagai sumber nitrogen sangat bervariasi pada tiap industri yang memanfaatkannya. Penelitian ini penting dilakukan untuk mengetahui variasi penggunaan gula reduksi dan total nitrogen terhadap viabilitas sel khamir sehingga dapat meningkatkan produksi etanol.

METODE PENELITIAN

Pengukuran Total Nitrogen. Pengukuran total nitrogen molase dengan metode Kjeldahl [5].

Pengukuran Konsentrasi Gula Reduksi. Pengukuran konsentrasi molase murni dan molase selama tiap 24 jam pada proses fermentasi dilakukan dengan metode *3,5-dinitrosalicylic* (DNS) [6].

Pengukuran Konsentrasi Kalsium (Ca). Pengukuran konsentrasi kalsium molase dengan metode standart nasional [5].

Fermentasi Etanol. Molase diencerkan dengan akuades hingga memiliki konsentrasi gula reduksi 125 g/l dan ditambahkan urea sebanyak 0,37 g/l (pH 5,5). Molase tersebut dipanaskan pada suhu 100 °C selama 10 menit. Proses fermentasi terdiri dari pembiakan (*enrichment*), prefermentasi dan fermentasi.

Sebanyak 20 ml molase steril ditambahkan 2 g *baker yeast* SAF Instan Gold Label dan dihomogenkan dengan kecepatan 120 rpm selama 3 jam pada suhu 30 °C (Pembiakan). Hasil tersebut dimasukkan ke dalam molase steril hingga volumenya 200 ml dan dihomogenkan dengan kecepatan 120 rpm selama 12 jam pada suhu 30 °C (Prefermentasi). Setelah itu dipindahkan ke molase steril dengan konsentrasi gula reduksi dan nitrogen sebagai perlakuan (Tabel 1) hingga volumenya 1000 ml dan dihomogenkan dengan kecepatan 300 rpm selama 72 jam.

Tabel 1. Perlakuan konsentrasi gula reduksi dan total nitrogen

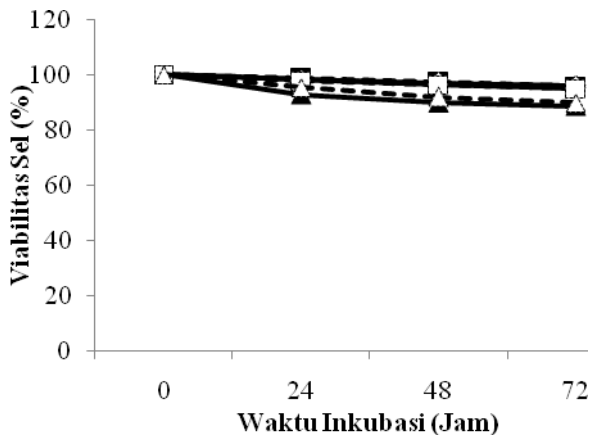
No	Perlakuan	
	Gula Reduksi (g/l)	Total Nitrogen (g/l)
1	100	2,7
2	100	6
3	100	10
4	125	3,3
5	125	6
6	125	10

Densitas dan Viabilitas Sel Khamir. Densitas dan viabilitas sel khamir ditentukan dengan metode Petroff-Hauser menggunakan hemositometer (Persamaan 1) [7].

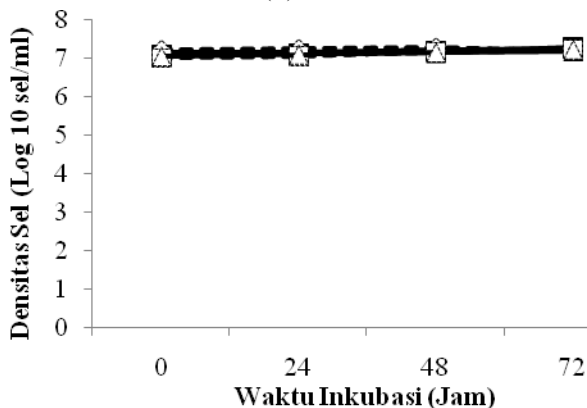
$$\text{Viabilitas sel} = \frac{\text{Jumlah sel hidup}}{\text{Jumlah total sel}} \times 100 \% \quad (1)$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Terjadi penurunan viabilitas sel khamir seiring dengan peningkatan waktu inkubasi (Gambar 1). Penurunan viabilitas sel khamir tercepat terjadi pada perlakuan GR 100 N 10. Hal ini disebabkan oleh rendahnya konsentrasi gula reduksi (100 g/l) dan tingginya konsentrasi nitrogen (10 g/l) dalam media. Meskipun dengan konsentrasi total nitrogen sama, tetapi perlakuan GR 125 N 10 memiliki viabilitas sel yang lebih tinggi. Hal ini dapat disebabkan karena gula reduksi dalam media tersebut lebih tinggi. Viabilitas tertinggi adalah GR 125 N 0 (95,76 %) dan GR 100 N 6 (95,96 %).



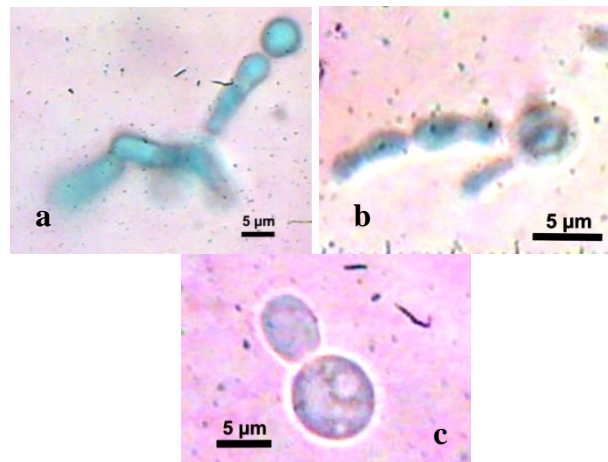
Gambar 1. Viabilitas sel khamir berbagai perlakuan selama waktu fermentasi GR 100 N 2,7 (◆), GR 125 N 3,3 (◇), GR 100 N 6 (■), GR 125 N 6 (□), GR 100 N 10 (▲), GR 125 N 10 (△)



Gambar 2. Densitas sel khamir berbagai perlakuan selama waktu fermentasi GR 100 N 2,7 (◆), GR 125 N 3,3 (◇), GR 100 N 6 (■), GR 125 N 6 (□), GR 100 N 10 (▲), GR 125 N 10 (△)

Penurunan viabilitas sel menunjukkan bahwa perkembangbiakan sel khamir mengalami penghambatan karena tidak terjadi peningkatan jumlah sel secara signifikan ($p > 0,05$) selama proses fermentasi (Gambar 2). Secara umum, ketika awal proses fermentasi (24-48 jam) terjadi kenaikan jumlah sel khamir sehingga etanol yang dihasilkan juga mengalami kenaikan yang signifikan [8; 9]. Hal ini disebabkan oleh tingginya konsentrasi kalsium (0,21 %) dalam media molase [10].

Sel *Saccharomyces cerevisiae* yang berbentuk pseudohifa pada fase perkembangan vegetatif (Gambar 3) terjadi apabila terjadi kekurangan nitrogen [11]. Hal ini disebabkan oleh proses meiosis yang terjadi cepat sedangkan pemisahan sel anak dan sel induk belum terjadi. Pembentukan pseudohifa memberikan keuntungan bagi khamir dalam pencarian nutrisi. Selain faktor kekurangan nitrogen, pembentukan pseudohifa dapat disebabkan karena ketidakmampuan khamir untuk mengonsumsi gula, terlalu terbatasnya oksigen [12], tingginya fosfat [13] dan rendahnya sumber karbon [14]. Tetapi, pseudohifa ternyata terjadi pula pada kondisi hipernitrogen (> 6 g/l) dan tingginya konsentrasi gula reduksi (> 100 g/l) (Gambar 3). Munculnya pseudohifa pada media yang kaya nitrogen dimungkinkan terjadi akibat pengaruh *isoamyl alcohol* (IAA) [15; 16].



Gambar 3. *Saccharomyces cerevisiae* yang mengalami pseudohifa pada perlakuan total nitrogen 10 g/l, a. Gula reduksi 100 g/l, b. Gula reduksi 125 mg/l dan c. Sel normal

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa secara umum terjadi penurunan viabilitas sel. Viabilitas sel khamir tertinggi pada perlakuan GR 125 N 0,33 (95,76 %) dan GR 100 N 6 (95,96 %). Penurunan viabilitas sel disebabkan oleh perkembangbiakan sel khamir mengalami penghambatan (tidak terjadi peningkatan jumlah sel secara signifikan ($p>0,05$)). Hal ini terjadi karena tingginya konsentrasi kalsium (0,21 %).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Dr. Suharjono, M. Si., Dr. Elok Zubaidah dan Yoga Dwi Jadmiko, M.App.Sc. atas segala dorongan, dukungan dan saran yang sangat mendukung terselesaikannya jurnal ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Kurniawan, Y., A. Susmiadi dan A. Toharisman. 2005. *Potensi Pengembangan Industri Gula Sebagai Penghasil Energi Di Indonesia*, Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia (P3GI), Pasuruan.
- [2] ESDM. 2012. Produksi, konsumsi, ekspor dan impor minyak Indonesia 2009. <http://www.migas.esdm.go.id/wap/?op=Berita&id=2787>. Diakses 26 Juni 2012.
- [3] Loureiro, V. dan M. Malfeito-Ferreira. 2003. Spoilage yeasts in the wine industry, *Int. J. of Food Microb.* **86**, 23-50.
- [4] da Silva, G.P., E.F. de Araújo, D.O. Silva dan W.V. Guimarães. 2005. Ethanolic Fermentation of Sucrose, Sugarcane Juice and Molasses by *Escherichia Coli* Strain K011 and *Klebsiella Oxytoca* Strain P2. *Braz. J. of Microb.* **36**, 395-404.
- [5] Sudarmadji, S., Haryono dan B. Suhardi. 1996. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Penerbit Liberty, Yogyakarta.
- [6] Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* **3**, 426-248.
- [7] Doyle, A. dan J.B. Griffiths. 2000. *Cell and tissue culture for medical research*. John Wiley & Son, New York.
- [8] Supriyanto, T. dan Wahyudi. 2010. Proses Produksi Etanol oleh *Saccharomyces cerivisiae* dengan Operasi Kontinyu pada Kondisi Vakum, Jurusan Teknik Kimia Universitas Diponegoro, Semarang.
- [9] Ingledew, M.W.. 1993. Yeasts for production of fuel ethanol. *The Yeasts* **5**, 245-286.
- [10] Balakumar, S. dan V. Arasaratnam. 2009. Comparison of industrial scale ethanol production from palmyrah-based carbon source by commercial yeast and a mixed culture from palmyrah toddy, *J. of Instr. Brew.* **115**, 105-109.
- [11] Chotineeranat, S., R. Wansuksri, K. Piyachomkwan, P. Chatakanonda, P. Weerathaworn dan K. Sriroth . 2010. Effect of calcium ions on ethanol production from molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. *Sug. Tech.* **12**, 120-124.
- [11] Ceccata-Antonini, S.R. dan P.E. Sudbery. 2004. Filamentous Growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz. J. of Microb.* **35**, 73-181.
- [12] Gimeno, C.J., P.O. Ljungdahl, C.A. Styles dan G.R. Fink. 1992. Unipolar cell divisions in the yeast *Saccaromyces cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell.* **68**, 1077-1090.
- [13] Sudbery, P., N. Gow dan J. Berman. 2012. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*, *Trends in Microb.* **23**, 1-8.
- [14] Lorenz, M.C., S. Cutler dan J. Heitman. 2000. Characterization of Alcohol-induced Filamentous Growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. of the Cell.* **11**, 183-199.
- [15] Ceccata-Antonini, S.R. dan P.C. da Silva. 2002. Hyphal-Like Extension and Pseudohyphal Formation in Industrial Strains of Yeasts Induced by Isoamyl Alcohol. *Braz. J. of Microb.* **33**, 209-212.
- [16] Hauser, M., P. Horn, H. Tournu, N.C. Hauser, J.D. Hoheisel, A.J.P. Brow dan J.R. Dickinson. 2007. A transcriptome analysis of isoamyl alcohol-induced filamentation in yeast reveals a novel role for Gre2p as isovaleraldehyde reductase. *FEMS Yeast Res* **7**, 84-92.