



PENENTUAN KOMBINASI MEDIUM TERBAIK GALAKTOSA DAN SUMBER NITROGEN PADA PROSES PRODUKSI ETANOL

Determination of The Best Medium of Galactose and Nitrogen Sources on Ethanol Production

Rofiq Sunaryanto^{1,*}, Berti Hariasih Handayani²

¹Balai Pengkajian Bioteknologi BPPT, Gedung 630 Kawasan PUSPIPTEK, Setu, Tangerang Selatan, Banten 15314

²Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Padjajaran.

*E-mail: rofiq.sunaryanto@bppt.go.id

ABSTRACT

*Ethanol is an important product for biotechnology-based industries. Ethanol can be produced from various raw materials and some types of microbes. Determination of the best combination of galactose with nitrogen sources on ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* has been done. Combination of galactose at the concentration of 3 g/L and 20 g/L with nitrogen sources (casein, peptone, and urea, each at the concentration of 10g/L) was used to obtain the best composition of fermentation medium. Fermentation was carried out for 60 hours at 30°C, 250 rpm, and working volume of 50 mL in a 250 mL erlenmeyer. The results showed that the galactose concentration of 20 g/L was able to improve the productivity of ethanol and the growth of *S. cerevisiae* cells. The combination of 20g/L galactose and 10 g/L casein produced the highest ethanol concentration (6% v/v), whereas 20 g/L galactose-10 g/L peptone and 20 g/L galactose-10 g/L urea combinations produced 2.5% and 0.58% (v/v) ethanol, respectively. The use of 3 g/L galactose mixed with several nitrogen sources produced ethanol below 0.7% (v/v).*

Keywords: *Ethanol, galactose, peptone, casein, *Saccharomyces cerevisiae**

ABSTRAK

Etanol merupakan salah satu produk penting bagi industri yang berbasis bioteknologi. Etanol dapat dihasilkan dari berbagai macam bahan baku dan beberapa jenis mikroba. Penentuan kombinasi terbaik antara galaktosa dengan sumber nitrogen pada produksi etanol menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* telah dilakukan. Konsentrasi galaktosa 3 g/L dan galaktosa 20 g/L yang dikombinasikan dengan sumber nitrogen dengan konsentrasi 10 g/L dalam hal ini kasein, pepton, dan urea digunakan sebagai perlakuan untuk mendapatkan kombinasi medium sumber karbon dan sumber nitrogen terbaik. Fermentasi untuk menghasilkan etanol dilakukan selama 60 jam pada suhu 30°C, agitasi 250 rpm dengan volume kerja 50 mL dalam erlenmeyer 250 mL. Hasil penelitian menunjukkan penambahan galaktosa dengan konsentrasi sampai dengan 20 g/L mampu memperbaiki produktivitas etanol dan pertumbuhan sel *S. cerevisiae*. Konsentrasi 20 g/L galaktosa dengan 10 g/L kasein menghasilkan produktivitas etanol paling tinggi yaitu 6%(v/v), konsentrasi galaktosa 20 g/L dengan 10 g/L pepton menghasilkan 2,5% (v/v) etanol dan konsentrasi galaktosa 20 g/L dengan 10 g/L urea menghasilkan 0,58%(v/v) etanol. Penggunaan konsentrasi galaktosa 3 g/L yang dikombinasikan dengan beberapa jenis sumber nitrogen menghasilkan etanol dibawah 0,7% (v/v).

Kata kunci: Etanol, galaktosa, pepton, kasein, *Saccharomyces cerevisiae*

PENDAHULUAN

Formulasi media komposisi merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan dalam suatu proses fermentasi, baik fermentasi untuk produksi metabolit primer maupun fermentasi untuk mendapatkan metabolit sekunder. Disamping sebagai media tumbuh biomassa mikroorganisme, media fermentasi juga berperan sebagai media induksi untuk mendapatkan metabolit yang diharapkan secara maksimal (Stanbury 1984; Christi 1999). Dengan demikian komposisi media fermentasi harus menyediakan seluruh komponen senyawa yang dibutuhkan untuk proses metabolisme sel mikroorganisme. Komponen utama yang harus dipenuhi dalam media fermentasi adalah sumber karbon dan sumber nitrogen. Dua komponen ini merupakan komponen utama untuk berlangsungnya metabolisme sel mikroorganisme baik untuk pertumbuhan sel untuk menghasilkan metabolit tertentu. Selain sumber karbon dan sumber nitrogen dalam medium fermentasi juga terkandung elemen kecil (*trace element*) seperti Fe, Zn, Cu, Mn, Co (Deesuth 2012).

Perbandingan jumlah sumber karbon dengan sumber nitrogen (C/N) juga berpengaruh terhadap proses metabolisme sel. Namun demikian dalam pemilihan media kompleks, perbandingan komposisi C/N tidak dapat ditentukan dengan tepat. Setiap mikroorganisme memiliki karakteristik tersendiri dalam pemilihan jenis sumber karbon maupun sumber nitrogen (Schnierda et al. 2014).

Sumber karbon dan nitrogen yang dibutuhkan untuk metabolisme mikroorganisme di alam biasanya tersedia dalam bentuk senyawa kompleks. *Yeast* mampu menggunakan bermacam-macam senyawa kompleks yang tersedia di alam. Hal ini disebabkan adanya enzim yang dapat membantu mendegradasi dan mencerna untuk dimetabolisme oleh sel mikroba (Miranda et al. 2012). Beberapa komponen seperti *beet*, *cane* molases telah banyak digunakan untuk media fermentasi produksi etanol (Gendy et al. 2013; Fadel et al. 2013). Molasses banyak mengandung gula seperti sukrosa, glukosa, fruktosa, dan maltotriosa, serta beberapa mineral, ion logam, asam nukleat, asam amino dalam jumlah yang relatif sedikit. Namun demikian untuk keperluan

penelitian terutama untuk mengetahui pengaruh sumber karbon atau nitrogen maka perlu digunakan media definitif untuk memudahkan pengamatan. Pada proses fermentasi khususnya produksi etanol, penambahan glukosa yang terlalu besar justru akan menurunkan produktivitas etanol atau biasa disebut katabolit represi (Arshad et al. 2014). Pada katabolit represi ini metabolisme sel akan menggunakan gula sederhana seperti glukosa yang mudah dicerna terlebih dahulu, selanjutnya menghidrolisis gula rantai yang lebih panjang. Untuk menghidrolisis gula rantai panjang dibutuhkan beberapa enzim guna membantu proses pencernaan. Adanya glukosa berlebih maka tidak dibutuhkan lagi enzim untuk degradasi gula. Salah satu alternatif sumber karbon yang dapat digunakan untuk produksi etanol yang dapat mencegah terjadinya katabolit represi adalah sumber karbon galaktosa. Menurut Duvnjak et al. (1987) penggunaan galaktosa sebagai sumber karbon untuk produksi etanol memberikan rendemen pertumbuhan sel yang paling kecil dibandingkan dengan sumber karbon lainnya seperti glukosa dan laktosa namun demikian galaktosa menunjukkan produktivitas etanol yang paling tinggi dibandingkan sumber karbon lainnya. Menurut Kim et al. (2014) penggunaan galaktosa sebagai sumber karbon untuk produksi etanol menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* mampu memperbaiki produktivitas etanol. Konsentrasi galaktosa 20g/L merupakan konsentrasi paling optimum untuk produksi etanol.

Nitrogen merupakan salah satu makromolekul di dalam sel mikroorganisme yang memiliki peran yang sangat besar dalam penyusunan struktur sel dan fungsinya (Wang et al. 2012). Mikroorganisme memiliki mekanisme yang mengontrol penyediaan suplai nitrogen secara kontinyu. Menurut Miranda et al. (2012) amonium, asparagin, glutamin, dan glutamat dapat digunakan sebagai sumber nitrogen pada media pertumbuhan *yeast*. Seperti halnya gula, sumber nitrogen juga mengalami mekanisme katabolit represi. Pada saat sumber nitrogen primer tidak ada maka sumber nitrogen yang lain seperti nitrit, nitrat, amida, dan asam amino maupun peptida akan digunakan. Penggunaan sumber nitrogen sekunder memerlukan enzim spesifik dalam penggunaannya (Magasanik dan Kaiser 2002).

Menurut Fernandez et al. (2012) enzim nitrat reduktase mempengaruhi konversi nitrat menjadi ion amonium yang direpresi oleh adanya amoniak. Sehingga amoniak atau ion amonium lebih disukai untuk digunakan sebagai sumber nitrogen. Pemilihan sumber nitrogen sangat diperlukan untuk mendapatkan hasil yang optimum. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kombinasi galaktosa dengan sumber nitrogen (urea, pepton, kasein) terbaik untuk menghasilkan produktivitas etanol tertinggi menggunakan *S. cerevisiae*.

BAHAN DAN METODE

Preparasi inokulum

Galur yang digunakan dalam studi ini adalah *S. cerevisiae* yang merupakan kultur koleksi Laboratorium Balai Pengkajian Bioteknologi BPPT. Inokulum disiapkan dengan mensuspensikan *S. cerevisiae* dari agar miring ke dalam medium perbanyakan sel dengan komposisi pepton 3 g/L, yeast extract 3 g/L, KH_2PO_4 1 mg/L, malt extract 3 g/L, glukosa 5 g/L, dan sukrosa 5 g/L. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 15 jam dengan pH awal sebesar 6,2. Kultur perbanyakan sel diperoleh minimal 5×10^6 sel/mL. Inokulum siap ditransfer ke medium fermentasi etanol.

Media dan proses fermentasi

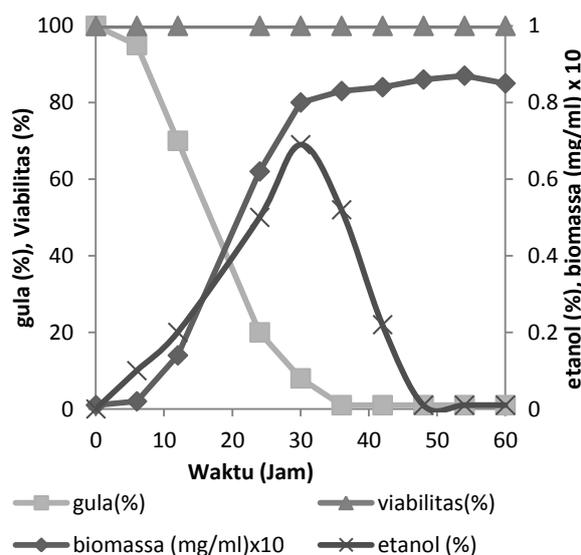
Media fermentasi yang digunakan meliputi media dasar dengan komposisi glukosa 5 g/L, yeast extract 1,7 g/L, KH_2PO_4 1 mg/L, MgSO_4 5 mg/L, dan media perlakuan yaitu galaktosa dengan dua variasi perlakuan konsentrasi yaitu 3 g/L dan 20 g/L, yang dikombinasikan dengan perlakuan penambahan sumber nitrogen 10 g/L dimana ada 3 jenis sumber nitrogen yang digunakan yaitu kasein, urea, dan pepton. Larutan gula disterilisasi secara terpisah dengan media lain dan dicampurkan kembali sebelum inokulasi dilakukan. pH awal medium diatur sebesar 6,2. Selanjutnya inokulum yang telah disiapkan sebelumnya diinokulasikan ke dalam media fermentatif sebanyak 3% (v/v) dan diinkubasi dalam inkubator *shaker* pada suhu 30°C kecepatan pengadukan 250 rpm. Fermentasi dilakukan selama 60 jam dan dilakukan pengambilan sampel setiap 6 jam sekali.

Fermentasi dilakukan dalam flask 250 mL dengan volumer kerja 50 mL.

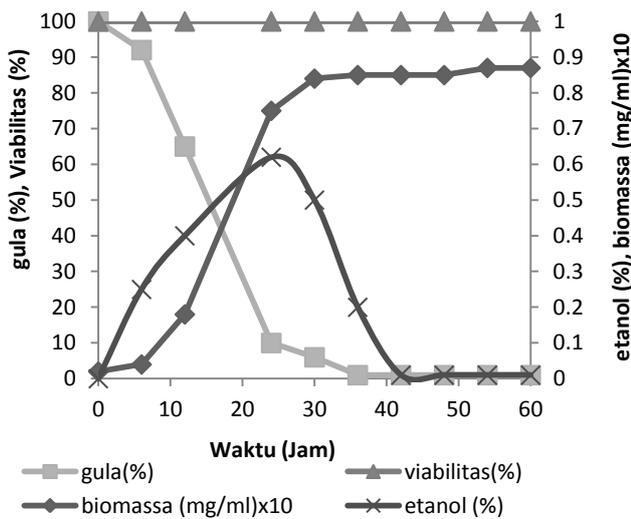
HASIL DAN PEMBAHASAN

Fermentasi dilakukan dengan variasi konsentrasi galaktosa dan variasi jenis sumber nitrogen. Hasil fermentasi menggunakan konsentrasi galaktosa 3 g/L dan kasein 10 g/L sebagai sumber nitrogen disajikan pada Gambar 1.

Dari Gambar 1 terlihat bahwa produksi etanol berasosiasi dengan pertumbuhan biomassa sampai jam ke-30. Konsentrasi etanol dan biomassa secara terus bertambah secara simultan, dilain pihak konsentrasi gula terus berkurang. Setelah jam ke-30 terjadi penurunan konsentrasi etanol secara tajam. Konsentrasi gula menjadi minimum, pertumbuhan biomassa juga berhenti atau stasioner. Turunnya konsentrasi etanol diduga karena digunakannya etanol untuk proses metabolisme sel, terlihat pada jam yang sama konsentrasi gula mencapai kondisi minimum. Karena tidak adanya sumber karbon yang siap dimetabolisme seperti halnya glukosa atau galaktosa maka sel berusaha mendegradasi sumber karbon lainnya dalam hal ini etanol. Pada saat konsentrasi gula minimum pertumbuhan biomassa juga mengalami penurunan namun demikian viabilitas sel masih tetap tidak berubah.



Gambar 1. Pola pertumbuhan dan produksi etanol pada proses fermentasi menggunakan *S. cerevisiae* dengan media galaktosa 3 g/L dan kasein 10 g/L



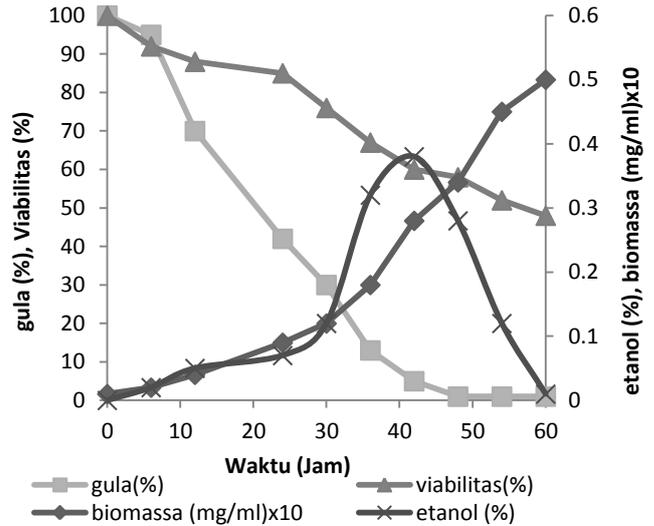
Gambar 2. Pola pertumbuhan dan produksi etanol pada proses fermentasi menggunakan *S. cerevisiae* dengan media galaktosa 3 g/L dan pepton 10 g/L

Pola yang sama ditunjukkan dalam percobaan menggunakan media sumber karbon galaktosa 3 g/L dan pepton 10 g/L. Hasil fermentasi menggunakan konsentrasi galaktosa 3 g/L dan pepton 10 g/L disajikan pada Gambar 2.

Pola pertumbuhan dan produktivitas etanol dengan menggunakan media pepton memiliki pola yang sama dengan media galaktosa dan kasein. Namun demikian pada media pepton kecepatan metabolisme sel untuk mengkonsumsi gula lebih tinggi dibandingkan pada media kasein. Terbukti pada jam ke 24 konsentrasi gula yang tersisa pada media pepton sebesar 10 % dan pada media kasein sebesar 20%. Demikian pula dengan pertumbuhan selnya. Pada jam ke-24 biomassa pada media pepton menunjukkan 7,8 mg/mL dan pada media kasein mencapai 6,1 mg/mL. Namun demikian kecepatan metabolisme dan pertumbuhan biomassa pada media pepton ini tidak dibarengi dengan produksi etanol. Terlihat produktivitas maksimum etanol pada media pepton hanya mencapai 0,6%, dan pada media kasein mencapai 0,7%.

Hasil fermentasi menggunakan konsentrasi galaktosa 3 g/L dan urea sebagai sumber nitrogen disajikan pada Gambar 3.

Penggunaan urea sebagai sumber nitrogen memberikan produk fermentasi yang rendah dibandingkan dengan pepton dan

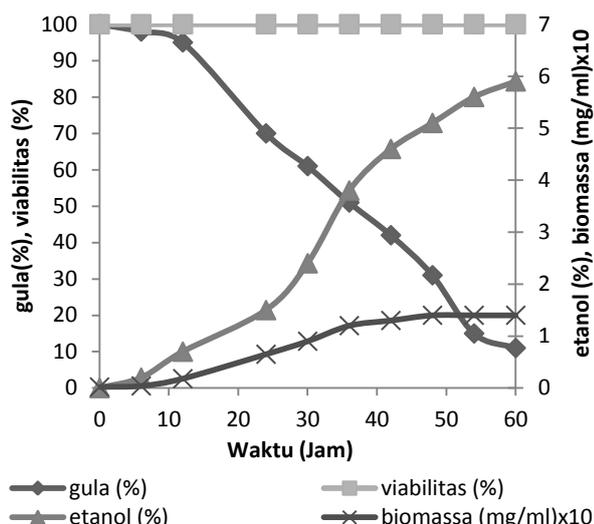


Gambar 3. Pola pertumbuhan dan produksi etanol pada proses fermentasi menggunakan *S. cerevisiae* dengan media galaktosa 3 g/L dan urea 10 g/L

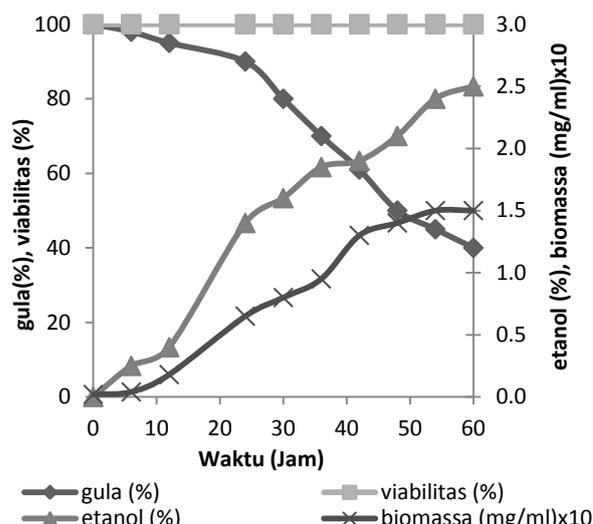
kasein. Terlihat pada Gambar 3 pertumbuhan biomassa dan produktivitas etanol lebih kecil dibandingkan pepton dan kasein. Demikian juga dengan viabilitas sel mikroba juga mengalami penurunan dari waktu ke waktu hingga mencapai 50% sampai dengan akhir fermentasi. Dibandingkan dengan media pepton dan kasein kecepatan konsumsi gula dengan media urea masih rendah, hal ini berakibat juga pada pertumbuhan biomassa yang tertinggal.

Pada percobaan selanjutnya dilakukan penambahan konsentrasi galaktosa menjadi 20 g/L dengan kombinasi sumber nitrogen seperti dalam perlakuan sebelumnya. Gambar 4 menunjukkan hasil fermentasi menggunakan konsentrasi galaktosa 20 g/L dan kasein 10 g/L.

Gambar 4 terlihat bahwa penambahan konsentrasi galaktosa dapat memperbaiki pertumbuhan *yeast* serta meningkatkan produktivitas etanol. Terlihat produktivitas etanol meningkat menjadi 6% (v/v) dan pertumbuhan biomassa mencapai 15 mg/mL. Jika dibandingkan dengan Gambar 1 konsentrasi galaktosa 3 g/L dengan sumber nitrogen yang sama, produktivitas etanol hanya mencapai 0,7% dan pertumbuhan sel mencapai 8 mg/mL. Penambahan konsentrasi galaktosa 20 g/L terlihat tidak mengakibatkan penurunan kadar etanol seperti yang terjadi pada



Gambar 4. Pola pertumbuhan dan produksi etanol pada proses fermentasi menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* dengan media galaktosa 20 g/L dan kasein 10 g/L



Gambar 5. Pola pertumbuhan dan produksi etanol pada proses fermentasi menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* dengan media galaktosa 20 g/L dan pepton 10 g/L

media galaktosa 3 g/L. Hal ini menunjukkan bahwa proses metabolisme sel sepenuhnya menggunakan gula yang tersedia dalam media dan tidak menghidrolisis etanol yang merupakan produk fermentasi. Terlihat pada akhir fermentasi konsentrasi gula yang masih tersisa sebesar 11%. Setelah jam ke-36 kecepatan pertumbuhan biomassa menurun, hal ini disebabkan karena pada fase tersebut sel mulai memasuki fase stasioner, pada saat itu produksi etanol meningkat tajam. Kecepatan konsumsi gula tetap tinggi disebabkan karena adanya konversi gula menjadi etanol. Pola yang sama terjadi pada media galaktosa 20 g/L dengan kombinasi pepton 10 g/L. Gambar 5 menunjukkan hasil fermentasi menggunakan konsentrasi galaktosa 20 g/L dan pepton 10 g/L.

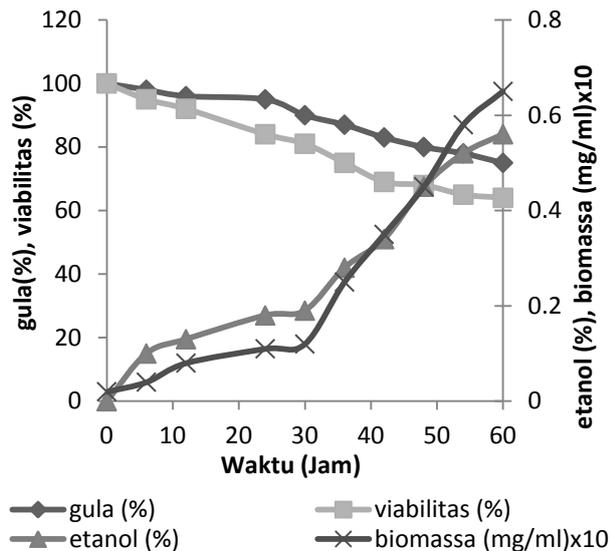
Dari Gambar 5, terlihat bahwa produktivitas tertinggi etanol pada fermentasi menggunakan media galaktosa 20 g/L dan pepton 10 g/L mencapai 2,5% (v/v), namun demikian dibandingkan dengan media sumber nitrogen kasein masih terlihat lebih rendah.

Dibandingkan dengan media galaktosa 3 g/L dengan sumber nitrogen yang sama (Gambar 2) ternyata media galaktosa 20 g/L masih jauh lebih tinggi. Penambahan konsentrasi galaktosa ini mampu memperbaiki produktivitas etanol dan pertumbuhan sel. Gambar 5 terlihat tidak terjadi penggunaan

etanol sebagai sumber karbon seperti halnya yang terjadi pada Gambar 2. Kecepatan konsumsi gula terlihat lebih lambat jika dibandingkan dengan media kasein, terlihat pada akhir fermentasi konsentrasi gula sisa sebesar 40%. Namun demikian pada akhir fermentasi, pertumbuhan sel dengan media pepton terlihat lebih tinggi dibandingkan dengan media kasein. Dugaan awal bahwa ada kemungkinan konsumsi gula pada media pepton lebih banyak terkonversi menjadi biomassa jika dibandingkan dengan media kasein, hal ini menunjukkan bahwa media kasein memberikan pengaruh lebih kuat untuk memproduksi etanol dibandingkan dengan media pepton.

Berbeda halnya dengan media dengan penambahan konsentrasi galaktosa 20 g/L dengan kombinasi urea 10 g/L. Hasil fermentasi menggunakan konsentrasi galaktosa 20 g/L yang dikombinasikan dengan urea 10 g/L disajikan pada Gambar 6.

Pertumbuhan biomassa dan produksi etanol masih tertinggal jauh dibandingkan dengan dua sumber nitrogen lainnya. Viabilitas sel terlihat mengalami penurunan, kecepatan konsumsi gula masih lambat. Terlihat pada akhir fermentasi viabilitas sel sebesar 64% dan konsentrasi gula sisa sebesar 75%, yang artinya ada sebagian besar gula yang tidak dapat dimetabolisme, sehingga pertumbuhan sel, biomassa, dan viabilitas sel berkurang, yang pada akhirnya



Gambar 6. Pola pertumbuhan dan produksi etanol pada proses fermentasi menggunakan *S. cerevisiae* dengan media galaktosa 20 g/L yang dikombinasikan dengan urea 10 g/L

produktivitas etanol menjadi berkurang. Namun demikian jika dibandingkan dengan media galaktosa 3 g/L dengan sumber nitrogen yang sama maka masih terjadi sedikit peningkatan. Dari pola pertumbuhan biomassa dan produksi etanol terlihat tidak mengalami kekurangan sumber karbon, justru terjadi keterlambatan metabolisme sel. Dari data tersebut di atas menunjukkan bahwa sumber nitrogen urea kurang baik untuk pertumbuhan *S. cerevisiae* dan produksi etanol dibandingkan dengan kasein maupun pepton.

KESIMPULAN

Dari hasil percobaan yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut; pada konsentrasi galaktosa 20 g/L mampu memperbaiki produktivitas etanol dan pertumbuhan *S. cerevisiae*. Komposisi media galaktosa 20 g/L yang dikombinasikan dengan kasein 10 g/L menghasilkan produktivitas etanol tertinggi sebesar 6% (v/v). Media dengan konsentrasi galaktosa 20 g/L yang dikombinasikan dengan pepton 10 g/L menghasilkan etanol 2,5% (v/v), dan media dengan konsentrasi galaktosa 20 g/L dikombinasikan dengan urea 10 g/L menghasilkan etanol 0,58% (v/v). Media dengan konsentrasi galaktosa 3 g/L menunjukkan produktivitas etanol tidak lebih dari 0,7% (v/v).

DAFTAR PUSTAKA

- Arshad M, Ahmed S, Zia MA, Rajoka MI (2014) Kinetics and thermodynamics of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* MLD10 using molasses. *Appl Biochem Biotechnol* 172:2455-64
- Cristi Y (1999) Fermentation (industrial): Basic considerations. In *Encyclopedia of Food Microbiology*. Robinson R, Batt C and Patel P, editor, Academic Press. Pp. 663-674
- Deesuth O, Laopaiboon P, Jaisil P, Laopaiboon L (2012) Optimization of Nitrogen and Metal Ions Supplementation for Very High Gravity Bioethanol Fermentation from Sweet Sorghum Juice Using an Orthogonal Array Design. *Energies* 5:3178-3197
- Duvnjak Z, Houle C, Mok KL (1987) Production of ethanol and biomass from various carbohydrates by *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnol Lett* 9:343-6
- Fadel M, Keera AA, Mouafi FE, Kahil T (2013) High Level Ethanol from Sugar Cane Molasses by a New Thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* Strain in Industrial Scale. *Biotechnol Res Int* 2013:1-6
- Fernandez J, Wright JD, Hartline D, Quispe C, Madayiputhiya N, Wilson RA (2012) Principles of Carbon Catabolite Repression in the Rice Blast Fungus: Tps1, Nmr1-3, and a MATE-Family Pump Regulate Glucose Metabolism during Infection. *PLoS Genet* 8:e1002673
- Gendy NSE, Madian HR, Amr SSA (2013) Design and Optimization of a Process for Sugarcane Molasses Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* Using Response Surface Methodology. *Int J Microbiol* 2013:1-9
- Kim JH, Ryu J, Huh IY, Hong SK, Kang HA, Chang YK (2014) Ethanol production from galactose by a newly isolated *Saccharomyces cerevisiae* KL17. *Bioprocess Biosyst Eng* 37:1871-1878
- Magasanik B, Kaiser CA (2002) Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290:1-18
- Miranda MJ, Oliveira JE, Batistote M, Ernandes JR (2012) Evaluation of Brazilian ethanol production yeasts for

- maltose fermentation in media containing structurally complex nitrogen sources. *J Inst Brew* 118:82–88
- Schnierda T, Bauer FF, Divol B, Van Rensburg E, Gorgens JF (2014) Optimization of carbon and nitrogen medium components for biomass production using non-Saccharomyces wine yeasts. *Letts Appl Microbiol* 58:478-85
- Stanbury PF, Whitaker A (1984) *Principles of Fermentation Technology*. Pergamon Press. OxfordOX3 OBX. England.
- Wang K, Mao Z, Zhang C, Zhang J, Zhang H, Tang L (2012) Influence of nitrogen sources on ethanol fermentation in an integrated ethanol-methane fermentation system. *Bioresour Technol* 120:206-11