

Peranan Ion Logam Kobalt Terhadap Kinerja Fermentasi dan Toleransi Cekaman Lingkungan Sel Ragi *Saccharomyces cerevisiae*

Saadah D. Rachman, Nadia Maulida, Agus Safari, Nenden I. Anggraeni, Muhammad Fadhilillah, Safri Ishmayana*

Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Jln. Raya Bandung-Sumedang km. 21, Jatinangor, 45363 Sumedang

*Penulis korespondensi: ishmayana@unpad.ac.id

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v7.n3.26266>

Abstrak: Semakin menipisnya ketersediaan bahan bakar fosil mendorong dikembangkannya energi alternatif, salah satunya adalah bioetanol. Selama proses fermentasi bioetanol, ragi *Saccharomyces cerevisiae* dapat terpapar berbagai cekaman lingkungan yang dapat memberikan dampak negatif bagi sel ragi. Salah satu upaya untuk meningkatkan toleransi sel ragi adalah dengan menambahkan ion logam kedalam media fermentasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suplementasi ion kobalt terhadap kinerja fermentasi, toleransi sel ragi terhadap cekaman lingkungan, dan terhadap morfologi sel ragi. Metode penelitian meliputi proses fermentasi yang dilaksanakan selama 120 jam dalam media yeast nitrogen base dengan 10% b/v glukosa sebagai sumber karbon dan variasi penambahan konsentrasi ion kobalt. Sampling dilakukan tiap 6 jam sekali pada 24 jam pertama dan tiap 12 jam sekali sampai jam ke-120. Kurva pertumbuhan ditentukan dengan mengukur OD_{600 nm} sedangkan viabilitas sel ditentukan dengan pewarnaan metilen violet. Kadar glukosa dalam media fermentasi diukur dengan metode kalium ferisianida basa sedangkan kadar etanol ditentukan dengan metode enzimatik menggunakan alkohol dehidrogenase. Selain itu dilakukan penentuan ukuran sel serta tingkat toleransi sel terhadap cekaman lingkungan. Etanol paling tinggi diperoleh sebesar 2,58% pada media yang disuplementasi 40 ppm ion kobalt, lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol yang menghasilkan bioetanol sebesar 2,20%. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ion kobalt tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kinerja fermentasi sel ragi, toleransi sel ragi dalam menghadapi cekaman lingkungan dan terhadap diameter sel.

Kata kunci: ion logam kobalt, cekaman lingkungan, *Saccharomyces cerevisiae*, etanol

Abstract: Depletion of fossil fuel encourage the development of alternative energy source, including bioethanol. During the fermentation process, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* can be exposed to various environmental stress factors that can give negative impact on the yeast cell. One of the efforts to increase yeast stress tolerance is by supplementation of metal ions to the fermentation media. The present study was aimed to investigate the effect of cobalt ion on fermentation performance, yeast stress tolerance and cell morphology. The fermentation experiment was performed for 120 hours in yeast nitrogen base media with 10% w/v glucose as carbon source and varying cobalt ion concentration. Sampling were performed every 6 hours for the first 24 hours, and 12 hours for the rest of fermentation. Growth curve were made by measuring optical density of the cell at 600 nm while viability of the cell was determined by methylene violet staining. Glucose level was determined using alkaline ferricyanide method, while ethanol was determined by alcohol dehydrogenase assay. Furthermore, the morphology of the cell was determined by measuring the cell diameter and stress tolerance were examined by exposing the cell to various environmental stress factors. The highest ethanol concentration was 2.58%, obtained when the fermentation media was supplemented with 40 ppm cobalt ion. This was slightly higher compared to control media which achieved 2.20% ethanol. The result of the present study indicate that cobalt ion did not give any significant effect on fermentation performance, stress tolerance and cell diameter.

Keywords: cobalt ion, environmental stress, *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol

PENDAHULUAN

Meningkatnya emisi gas rumah kaca serta menipisnya ketersediaan bahan bakar fosil,

menimbulkan kekhawatiran besar sehingga banyak dilakukan penelitian mengenai produksi bahan bakar yang dapat digunakan sebagai pengganti bahan bakar

fosil. Bioetanol telah dipandang sebagai sumber energi alternatif yang menjanjikan, karena sifatnya yang dapat diperbarui serta ramah lingkungan (Harun *et al.* 2010; Taloria *et al.* 2012).

Di industri, bioetanol dibuat dari gula melalui proses fermentasi, yang dilakukan oleh mikroorganisme (Liao *et al.* 2010). Beberapa mikroorganisme telah digunakan dalam produksi etanol, misalnya bakteri dan ragi. Namun, ragi *Saccharomyces cerevisiae* telah terbukti lebih baik dibandingkan bakteri, karena toleransinya yang lebih baik terhadap etanol sebagai produk akhir dan terhadap senyawa lain yang ada dalam hidrolisat. Selain itu *S. cerevisiae* juga memiliki produktivitas etanol yang tinggi dan dapat digunakan untuk fermentasi gula heksosa termasuk glukosa, mannosa, dan galaktosa. Karena sifatnya tersebut, membuat *S. cerevisiae* digunakan secara luas untuk produksi etanol dalam skala industri (Zhao *et al.* 2007; Matsushika *et al.* 2009; Taloria *et al.* 2012). *S. cerevisiae* pada kondisi anaerob dapat memfermentasi glukosa menjadi etanol secara efisien (Benjaphokee *et al.*, 2012).

Selama proses fermentasi, sel ragi dapat terpapar banyak faktor cekaman yang dapat memberikan efek yang merugikan terhadap produksi bioetanol. Faktor cekaman tersebut misalnya seperti suhu yang tinggi, konsentrasi etanol yang tinggi, dan inhibitor toksik yang juga dapat berpengaruh terhadap viabilitas dan efisiensi sel ragi untuk memproduksi bioetanol (Siderus & Mager 2003). Cekaman etanol dapat menurunkan aktivitas metabolik sel dan transport pelarut diantara membran plasma dengan meningkatkan fluiditas membran sedangkan cekaman panas meningkatkan fase lag dan mempengaruhi fungsi membran (Kumari & Pramanik 2012).

Sampai saat ini, strategi yang berbeda telah dikembangkan untuk meningkatkan toleransi etanol dari sel ragi, termasuk pengembangan strain toleran etanol dengan teknik rekayasa genetika dan suplementasi media fermentasi ataupun kombinasi keduanya (Krause *et al.* 2007; Takagi *et al.* 2005; Ji *et al.* 2008) seperti proses optimisasi. Suplementasi dengan ion logam telah dilaporkan merupakan metode yang efektif (Xue *et al.* 2008; Rachman *et al.* 2018; Zhao & Bai 2009).

Ion logam dapat berpengaruh terhadap pertumbuhan ragi dan proses metabolik selama fermentasi dengan mempengaruhi beberapa parameter penting seperti laju konversi gula menjadi etanol dan viabilitas sel. Kalium, magnesium, kalsium, dan seng merupakan nutrisi kationik yang berperan dalam memengaruhi struktur dasar dan fungsional pada sel ragi (Walker 2004).

Ion kobalt berperan sebagai unsur kelumit yang berfungsi sebagai kobaltamin dan koenzim pada fungsi seluler sel (Walker 2004). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Xue *et al.* (2008) suplementasi ion kobalt dengan konsentrasi maksimum sebesar 0,02 g/L dalam media fermentasi

S. cerevisiae terbukti dapat meningkatkan produksi etanol sebesar 25%.

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai efek yang diberikan dari suplementasi ion logam kobalt terhadap kinerja fermentasi bioetanol, dan peranannya terhadap kemampuan sel ragi untuk beradaptasi terhadap cekaman lingkungan sehingga dapat meningkatkan hasil produksi etanolnya.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak ragi, pepton, ammonium sulfat, magnesium sulfat heptahidrat, kalsium klorida, asam borat, niasin, mangan sulfat, pirodoksine HCl, seng sulfat, tiamin HCl, kalsium D pantotenat, feri klorida, natrium molibdat dihidrat, riboflavin, asam p-amino benzoate, kalium iodida, asam folat, biotin, DL-metionin, DL-triptofan, L-histidin, inositol, glukosa, alkohol dehidrogenase, NAD⁺, tetra natrium pirofosfat, semikarbazida HCl, glisin, air suling, dan etanol.

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulkas 4°C (LG-Expresscool), inkubator, mikropipet, tabung mikrosentrifugasi, timbangan analitis digital (Mettler-Toledo), freezer -20°C (Modena), mikroskop, spektrofotometer UV-Vis, mini automated cell counter ORFLO[®] Moxi Z[™], dan alat-alat gelas yang biasa digunakan dalam laboratorium penelitian kimia.

Galur Ragi dan Pemeliharaan

Ragi yang akan digunakan adalah *S. cerevisiae* galur A12 yang merupakan hibrid dari A/ Prof. Robert P. Learmonth dari University of Southern Queensland, Australia.

Ragi ditumbuhkan pada agar miring dengan media YEP yang mengandung (b/v) 0,5% bacteriological pepton, 0,3% natrium sulfat, 0,3% monokalium sulfat, 1% glukosa dan 1,5% agar. Agar miring disimpan pada suhu 4°C dan ditumbuhkan kembali setiap 6 bulan sekali.

Media Pertumbuhan dan Kondisi Kultur Starter

Kultur starter dibuat dengan mengambil satu sampai dua ose kultur starter dari agar miring dan diinokulasi dalam media inokulum. Media YNB ini ditumbuhkan selama ~18 jam pada suhu ruang dengan pengocokan dengan kecepatan 180 rpm. Rasio ukuran labu Erlenmeyer terhadap volume kultur yaitu 4:1 untuk menjaga ketercukupan oksigen terlarut. Kultur starter digunakan untuk menginokulasi media produksi dengan jumlah sel hidup sebanyak ~10⁶ sel hidup/mL.

Tabel 1. Komposisi media YNB dalam 1 liter (Ishmayana *et al.* 2015a).

Bahan	Massa (mg)	Bahan	Massa (mg)
Ammonium Sulfat	5000	Mangan sulfat	0,4
Monokalium sulfat	1000	Piridoksin HCl	0,4
Magnesium sulfat	500	Seng sulfat	0,4
Natrium klorida	100	Tiamin HCl	0,4
L-histidin monohidroklorida	10	Kalsium D-pentotenat	0,4
DL-metionin	20	Besi klorida	0,2
DL-triptofan	20	Natrium molibdat dihidrat	0,2
Inositol	2	Riboflavin	0,2
Asam Borat	0,5	Asam p-amino benzoate	0,2
Niasin	0,4	Kalium Iodida	0,2
Biotin	0,002	Tembaga Sulfat	0,04
Asam folat	0,002		

Kondisi Eksperimen dan Sampling

Kondisi eksperimen dilakukan dalam media YNB yang diketahui komposisinya secara pasti dengan komposisi yang ditunjukkan pada Tabel 1 mengandung 10% glukosa. Untuk mengetahui pengaruh suplementasi ion logam pada proses fermentasi, ke dalam media eksperimen yang berada di dalam labu Erlenmeyer steril ditambahkan ion logam kobalt variasi konsentrasi sebesar 0, 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm. Dibandingkan dengan kontrol tanpa adanya penambahan logam kobalt. Fermentasi berjalan selama 5 hari. Sampling dilakukan dengan selang waktu 6 jam sekali untuk 24 jam pertama dan selanjutnya tiap 12 jam sekali. Kemudian ditentukan grafik pertumbuhan, jumlah sel hidup, persentase sel hidup, viabilitas sel, kadar glukosa dan kadar etanol dari setiap sampel yang diambil.

Penentuan Kurva Pertumbuhan

Pertumbuhan ragi ditentukan dengan mengukur kerapatan optis pada panjang gelombang 600 nm ($OD_{600\text{ nm}}$) menggunakan spektrofotometer. Sampel dapat diencerkan jika diperlukan dengan menggunakan air suling.

Penentuan Jumlah Sel Hidup

Jumlah sel hidup ditentukan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400× dengan bantuan hemasitometer. Untuk membedakan sel hidup dan sel mati, sel diwarnai dengan menggunakan pewarnaan metilen violet (0,01% (b/v) dalam 2% larutan natrium sitrat) dan diamati di bawah mikroskop. Metilen violet menembus membran sel ragi, tetapi sel yang mati tidak dapat

memetabolisme metilen biru. Sel yang masih hidup dapat memetabolisme metilen violet sehingga tidak akan berwarna (Smart *et al.* 1999).

Penentuan Kadar Glukosa

Kadar glukosa ditentukan dengan menggunakan metode kalium ferisianida basa (Walker *et al.* 1996). Sebanyak 0,2 mL sampel ditambahkan 0,6 mL reagen ferisianida basa (0,35 g kalium ferrosianida dalam 100 mL larutan natrium karbonat 2% (b/v)). Larutan dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit lalu didinginkan pada suhu kamar dan ditambahkan air suling sebanyak 4 mL. Serapan larutan ditentukan pada panjang gelombang 420 nm. Larutan standar glukosa dibuat dengan konsentrasi 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1,0 mg/L. konsentrasi sampel ditentukan dengan memplotkan serapan sampel pada kurva baku.

Penentuan Kadar Etanol

Kadar etanol ditentukan dengan metode enzimatis menggunakan enzim alkohol dehidrogenase (Ishmayana *et al.* 2015b). Sebanyak 25 μ L, sampel diambil dan ditambahkan dengan 1,25 mL buffer semikarbazida dan diaduk. Kemudian ke dalamnya ditambahkan 25 μ L larutan reagen NAD^+ , dan dikocok kembali. Terakhir ditambahkan sebanyak 5 μ L larutan alkohol dehidrogenase dan dikocok kembali. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 25 menit. Setelah diinkubasi, serapan ditentukan pada panjang gelombang 340 nm setelah alat spektrofotometer di nol kan dengan akuades. Larutan standar etanol dibuat dengan konsentrasi 0,01; 0,02; 0,04; dan 0,05% (v/v). konsentrasi sampel

ditentukan dengan memplotkan serapan sampel pada kurva baku.

Penentuan Ukuran Sel

Penentuan ukuran sel pada jam ke-24 dilakukan dengan menggunakan mini automated cell counter ORFLO® MoxiZ™, sampel diencerkan terlebih dahulu.

Toleransi Sel Terhadap Etanol

Penentuan toleransi sel terhadap cekaman lingkungan dilakukan dengan metode yang dijelaskan oleh (García *et al.* 1997) dengan beberapa modifikasi. Kultur sel dari media 24 jam diambil dan diencerkan sampai nilai OD mencapai 0,1 dan ditetapkan sebagai jam ke 0 untuk uji toleransi dalam media YNB dengan tanpa ion logam yang diujikan dengan konsentrasi glukosa awal 2% w/v. Masing-masing media kemudian diatur agar mencapai:

- 1,5 M sorbitol (27% w/v) untuk cekaman hiperosmotik
- 7% v/v etanol untuk cekaman etanol
- 67 mM asam asetat untuk cekaman asam lemah
- 4 mM hidrogen peroksida untuk cekaman oksidatif

Kultur sel kemudian ditumbuhkan pada suhu ruang dan kecepatan pengocokan 180 rpm selama 24 jam. Nilai OD kemudian ditentukan dan nilai sel

yang bertahan hidup dihitung sebagai persentase nilai OD yang dicapai pada kultur kontrol yang ditumbuhkan pada media normal tanpa adanya faktor cekaman.

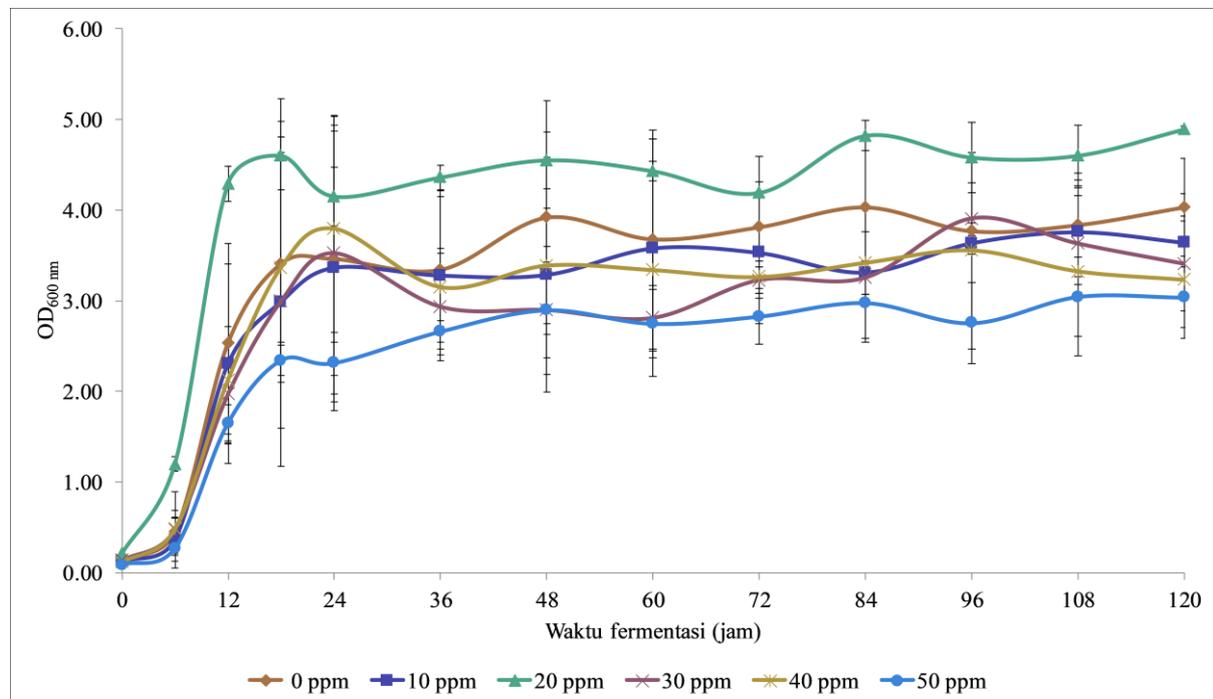
Uji Statistika

Pengujian statistika dengan Anova satu arah dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak Minitab 15. Jika ditemukan adanya perbedaan nyata, dilakukan uji lanjut Tukey. Tingkat kepercayaan yang digunakan adalah 95%.

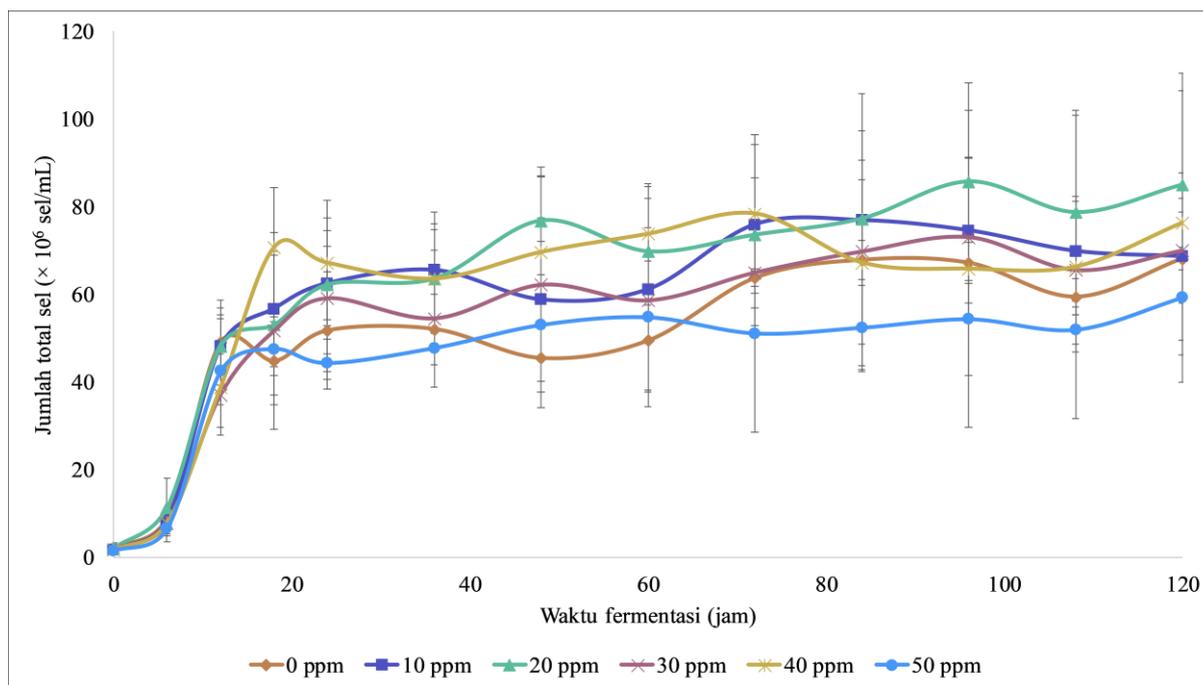
HASIL DAN PEMBAHASAN

Peranan Suplementasi Ion Kobalt Terhadap Pertumbuhan Sel Ragi

Gambar 1 menunjukkan kurva pertumbuhan sel ragi *S. cerevisiae* yang ditumbuhkan dalam media fermentasi yang disuplementasi oleh ion logam kobalt dengan variasi konsentrasi sebesar 0, 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm. Dari gambar tersebut dapat dilihat bahwa pada 6 jam pertama fermentasi sel ragi akan mengalami fase adaptasi karena pertumbuhan sel berlangsung secara lambat. Selanjutnya pada jam ke-6 sampai jam ke-24 sel ragi akan mengalami fase eksponensial dimana sel akan mengalami pertambahan jumlah sel yang signifikan. Pada jam ke-24 sampai jam ke-120 sel mengalami fase stasioner yang ditandai dengan kurva yang cenderung datar, hal ini terjadi karena laju pertumbuhan sel sama dengan laju kematian sel.



Gambar 1. Kerapatan optis (OD_{600nm}) *S. cerevisiae* pada variasi konsentrasi ion logam kobalt pada media YNB dengan glukosa 10% (b/v). Data merupakan nilai rata-rata dari tiga kali eksperimen.



Gambar 2. Jumlah total sel *S. cerevisiae* dalam media YNB dengan glukosa 10% (b/v) dengan variasi konsentrasi ion kobalt 0 ppm; 10 ppm; 20 ppm; 30 ppm; 40 ppm; dan 50 ppm. Data merupakan hasil rata-rata dari tiga kali eksperimen.

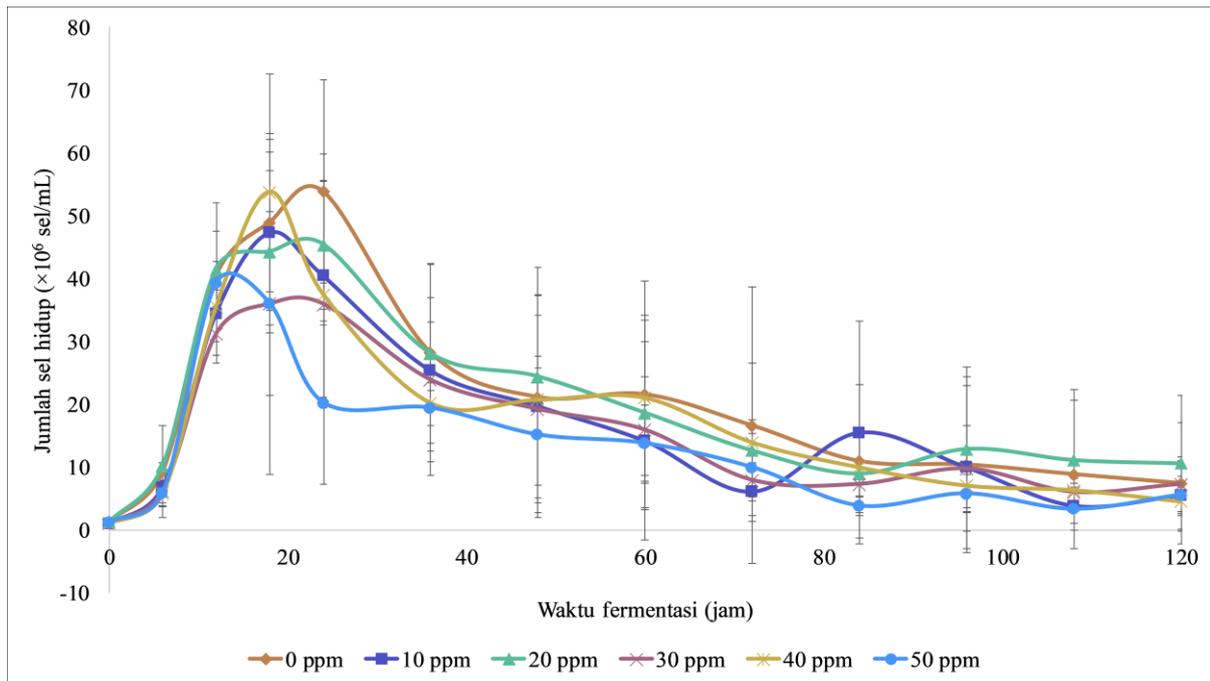
Pada Gambar 1 dapat dilihat bahwa dengan suplementasi ion kobalt sebesar 20 ppm diperoleh nilai OD_{600nm} yang paling tinggi dibandingkan dengan kontrol dan media dengan suplementasi ion logam kobalt variasi lainnya. Nilai OD_{600nm} yang diperoleh pada media dengan suplementasi ion kobalt 20 ppm sebesar 4,89 dan OD_{600nm} media kontrol sebesar 4,03, sedangkan suplementasi ion kobalt sebesar 50 ppm menunjukkan nilai OD_{600nm} yang paling rendah dibandingkan yang lainnya yaitu sebesar 3,04 sehingga diperkirakan bahwa penambahan ion kobalt sebesar 50 ppm dapat menghambat pertumbuhan sel ragi *S. cerevisiae*. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Hosiner *et al.* (2014), dimana ion kobalt memiliki nilai EC_{50} sebesar 400 μM atau sekitar 50 ppm. Nilai EC_{50} ini ditentukan sebagai konsentrasi dari ion kobalt yang dapat menghambat pertumbuhan sel ragi sebesar 50% jika dibandingkan terhadap kontrol.

Pada suplementasi ion kobalt sebesar 20 ppm, sel ragi menunjukkan peningkatan nilai OD_{600nm} pada jam ke-6 atau pada saat fase eksponensial. Hal ini menunjukkan bahwa sel ragi yang tumbuh pada media dengan suplementasi ion kobalt sebesar 20 ppm dapat tumbuh dan membelah lebih cepat. Kemudian dilakukan analisis *analysis of variance* (Anova) bertujuan untuk menguji kesesuaian hasil yang diperoleh sesuai dengan data menggunakan software MINITAB 15 dengan tingkat kepercayaan 95%. Penilaian kesesuaian suatu data yang analisis ini dilihat dari nilai p . Nilai p merupakan suatu probabilitas yang mengukur kesesuaian hasil.

Apabila nilai $p \leq 0,05$ maka data yang dimiliki mempunyai pengaruh yang signifikan terhadap hasil. Namun, apabila nilai $p \geq 0,05$ maka data yang dimiliki tidak mempunyai pengaruh yang signifikan terhadap hasil. Suplementasi ion kobalt tidak menunjukkan hasil yang signifikan karena nilai p yang diperoleh sebesar 0,085.

Selanjutnya, jumlah total sel (Gambar 2) ditentukan untuk melihat kesesuaian dengan grafik pertumbuhan OD_{600nm} (Gambar 1). Nilai OD_{600nm} mewakili jumlah total sel yang diukur dari kekeruhan media. Baik grafik pertumbuhan berdasarkan OD_{600nm} maupun jumlah total sel menunjukkan pola grafik yang sama. Pertumbuhan sel ragi *S. cerevisiae* paling tinggi berada dalam media yang disuplementasi ion kobalt sebesar 20 ppm yaitu mencapai $8,49 \times 10^7$ sel/mL pada jam ke-120 dibandingkan dengan kontrol yang mencapai $6,81 \times 10^7$ sel/mL. Selain itu juga suplementasi ion kobalt konsentrasi 50 ppm menunjukkan nilai total sel yang paling rendah yaitu sebesar $5,93 \times 10^7$ sel/mL, akan tetapi pemberian masing-masing konsentrasi ion kobalt tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Hasil ini sesuai dengan penelitian Xue *et al.* (2008), dimana suplementasi ion kobalt kedalam media fermentasi tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap berat kering sel ragi. Berat kering sel tanpa penambahan ion kobalt sebesar 3,33 g/L dan dengan penambahan ion kobalt sebanyak 0,02 g/L diperoleh berat kering sel sebesar 3,58 g/L.

Selain itu juga dilakukan perhitungan sel hidup dan sel mati untuk menentukan viabilitas sel selama



Gambar 3. Jumlah sel hidup *S. cerevisiae* dalam media YNB dengan glukosa 10% (b/v) dan variasi konsentrasi ion kobalt 0 ppm; 10 ppm; 20 ppm; 30 ppm; 40 ppm; dan 50 ppm. Data merupakan hasil rata-rata dari tiga kali eksperimen

proses fermentasi. Viabilitas sel ragi adalah istilah yang digunakan untuk mengukur jumlah sel hidup atau kemampuan sel untuk tumbuh dan bereproduksi serta berinteraksi dengan lingkungannya (Smart et al. 1999). Viabilitas sel dianggap sebagai parameter penting untuk menentukan kinerja fermentasi. Kultur ragi dengan viabilitas yang tinggi diharapkan memiliki kinerja fermentasi yang lebih baik karena jumlah sel aktifnya yang lebih tinggi (Rachman et al., 2018).

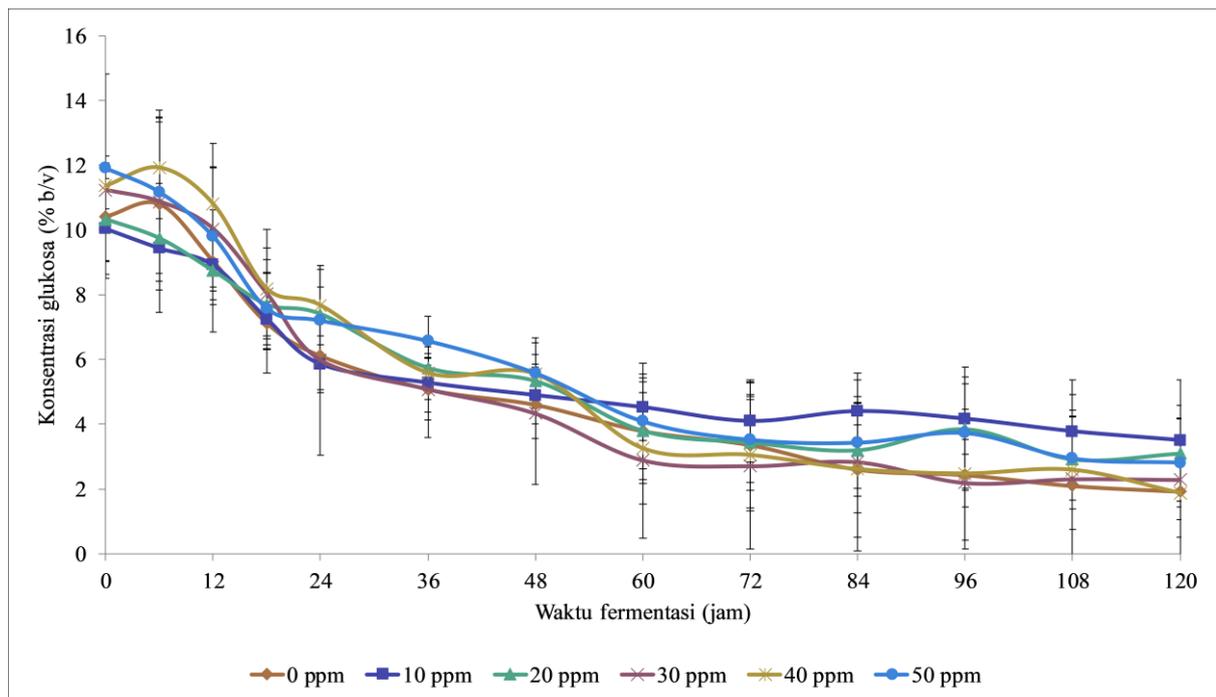
Jumlah sel viabel ditunjukkan pada Gambar 3. Pada jam ke-0 jumlah sel viabel masih rendah karena pada awal proses fermentasi sel ragi mengalami fase lag atau fase adaptasi dengan lingkungannya sehingga jumlah sel ragi yang hidup masih sedikit. Kemudian mulai jam ke-6 sampai jam ke-24 jumlah sel viabel ragi akan meningkat dengan cepat karena pada tahap ini merupakan fase eksponensial dari sel ragi sehingga sel ragi akan tumbuh dengan pesat. Setelah jam ke-24 jumlah sel viabel mulai turun menunjukkan adanya fase kematian, kecuali untuk sel yang disuplementasi dengan 50 ppm ion logam kobalt yang mengalami fase kematian lebih awal yaitu pada jam ke-18. Sel yang ditumbuhkan pada media fermentasi dengan suplementasi ion kobalt sebesar 50 ppm juga menunjukkan nilai viabilitas sel paling rendah selama proses fermentasi dibandingkan dengan variasi konsentrasi lainnya, hal ini menunjukkan bahwa suplementasi ion kobalt sebesar 50 ppm dapat menghambat viabilitas sel ragi. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Hosiner et al. (2014) yang membuktikan bahwa nilai EC_{50}

dari ion kobalt sebesar 400 μ M atau sekitar 50 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa selain dapat menurunkan jumlah total sel ragi, suplementasi ion kobalt sebesar 50 ppm juga dapat menurunkan jumlah sel hidup pada ragi.

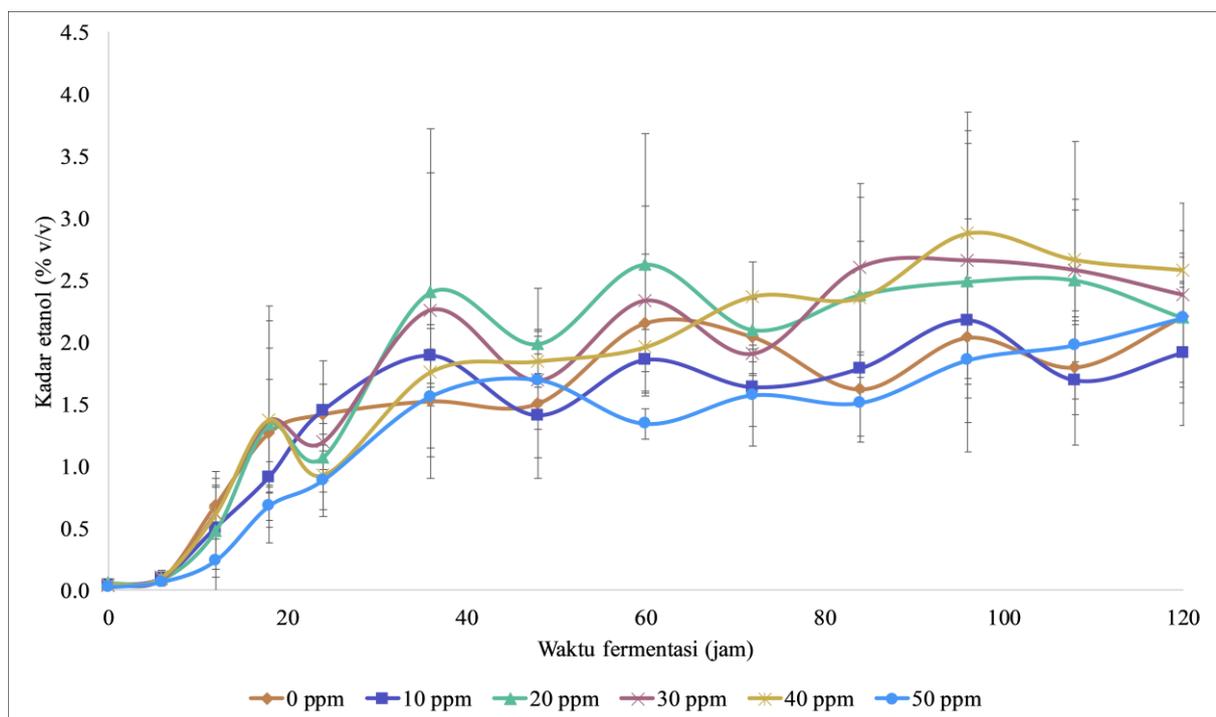
Pengaruh Suplementasi Ion Kobalt Terhadap Kinetika Fermentasi

Glukosa dalam proses fermentasi berperan sebagai sumber karbon yang digunakan sebagai sumber energi bagi sel ragi. Pada awal fermentasi, ditambahkan 10% b/v glukosa dan seiring dengan berjalannya proses fermentasi maka glukosa tersebut akan diubah menjadi etanol, tetapi tidak semua glukosa yang berkurang selama proses fermentasi akan diubah menjadi produk berupa etanol. Banyak faktor yang akan mempengaruhi perolehan etanol selama proses fermentasi diantaranya adalah konsentrasi inokulum, pH, nutrisi, dan lamanya fermentasi (Liu & Shen, 2008).

Gambar 4 menunjukkan bahwa pada jam ke-0 kadar glukosa sekitar 10% (b/v), kemudian seiring dengan berlangsungnya proses fermentasi maka kadar glukosa akan terus menurun sampai jam ke-120. Dari data yang diperoleh, suplementasi ion logam kobalt sebesar 40 ppm menghasilkan data konsumsi glukosa yang paling tinggi yaitu sebesar 9,34% selama proses fermentasi 120 jam dibandingkan dengan kontrol dan suplementasi variasi konsentrasi lainnya. Hasil Anova dengan tingkat kepercayaan 95% didapatkan $p = 0,644$ sehingga dapat disimpulkan bahwa suplementasi ion



Gambar 4. Konsumsi glukosa oleh *S. cerevisiae* dalam media YNB dengan glukosa 10% (b/v) dan variasi konsentrasi ion kobalt 0 ppm; 10 ppm; 20 ppm; 30 ppm; 40 ppm; dan 50 ppm. Data merupakan hasil rata-rata dari tiga kali eksperimen



Gambar 5. Produksi etanol oleh *S. cerevisiae* dalam media YNB dengan glukosa 10% (b/v) dan variasi konsentrasi ion kobalt 0 ppm; 10 ppm; 20 ppm; 30 ppm; 40 ppm; dan 50 ppm. Data merupakan hasil rata-rata dari tiga kali eksperimen.

kobalt tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap konsumsi glukosa selama fermentasi.

Grafik konsumsi glukosa menunjukkan grafik yang semakin menurun seiring dengan berjalannya

waktu fermentasi, tetapi pada Gambar 5 yang menunjukkan grafik produksi etanol dapat dilihat bahwa grafiknya cenderung meningkat. Hal ini menunjukkan bahwa glukosa yang berkurang selama

Tabel 2. Parameter kinetika fermentasi ragi dalam media YNB dengan variasi konsentrasi ion logam kobalt 0 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm dan 50 ppm. Data merupakan rata-rata tiga kali eksperimen.

Konsentrasi Co ²⁺ (ppm)	μ_{\max} (Jam ⁻¹)	Q _s (mg mL ⁻¹ Jam ⁻¹)	Q _p (mg mL ⁻¹ Jam ⁻¹)	Y _{p/s} (mg mg ⁻¹)
0	0,311 ± 0,017 ^a	0,709 ± 0,277 ^a	0,142 ± 0,045 ^a	0,213 ± 0,060 ^a
10	0,324 ± 0,06 ^a	0,539 ± 0,269 ^a	0,123 ± 0,038 ^a	0,302 ± 0,221 ^a
20	0,236 ± 0,015 ^a	0,704 ± 0,285 ^a	0,141 ± 0,034 ^a	0,251 ± 0,192 ^a
30	0,317 ± 0,031 ^a	0,841 ± 0,172 ^a	0,154 ± 0,048 ^a	0,189 ± 0,066 ^a
40	0,281 ± 0,038 ^a	0,885 ± 0,152 ^a	0,167 ± 0,005 ^a	0,192 ± 0,034 ^a
50	0,307 ± 0,034 ^a	0,608 ± 0,420 ^a	0,143 ± 0,016 ^a	0,308 ± 0,159 ^a

μ_{\max} = Laju pertumbuhan sel
 Q_p = Laju produksi etanol
 Q_s = Laju konsumsi substrat
 Y_{p/s} = Efisiensi pembentukan produk

proses fermentasi tidak semuanya diubah menjadi etanol dikarenakan sebagian glukosa yang digunakan untuk memperbanyak jumlah sel. Kadar etanol kemudian dihitung dan hasilnya menunjukkan bahwa suplementasi ion kobalt sebesar 40 ppm menghasilkan etanol paling tinggi yaitu sebesar 2,58% v/v, dibandingkan dengan media kontrol yang memperoleh hasil sebesar 2,20% v/v hal ini sejalan dengan konsumsi glukosa dimana pada suplementasi kobalt konsentrasi 40 ppm juga diperoleh data konsumsi glukosa yang paling tinggi. Selanjutnya data perolehan etanol diuji dengan Anova dengan tingkat kepercayaan sebesar 95% dan diperoleh nilai $p = 0,850$, hal ini menunjukkan suplementasi ion kobalt dengan variasi konsentrasi tidak memberikan pengaruh signifikan terhadap perolehan etanol.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Xue et al. (2008), suplementasi ion kobalt pada media pertumbuhan sel ragi berdampak terhadap meningkatnya produksi etanol sebesar 24,5%. Perolehan etanol tanpa suplementasi ion kobalt didapatkan sebesar 32,1 g/L dan setelah disuplementasi oleh ion kobalt sebanyak 0,02 g/l meningkat menjadi 40,0 g/l, sedangkan pada penelitian ini suplementasi ion kobalt tidak memberikan pengaruh terhadap produktivitas bioetanol. Hal ini dapat terjadi karena galur ragi yang digunakan berbeda, setiap strain memiliki karakteristik tertentu sehingga kondisi pertumbuhan yang sama belum tentu memberikan hasil yang sama.

Selanjutnya dihitung nilai kinetika fermentasi yang meliputi empat parameter penilaian, yaitu μ_{\max} yang merupakan nilai laju pertumbuhan maksimum sel; Q_s yang merupakan nilai laju konsumsi glukosa; Q_p yang merupakan nilai laju pembentukan produk berupa etanol; dan Y_{p/s} yang merupakan efisiensi pembentukan etanol yang diperoleh dari laju konsumsi glukosa dibagi dengan laju pembentukan etanol. Nilai dari keempat parameter tersebut dapat

dilihat pada Tabel 2, masing-masing konsentrasi logam kobalt tidak memberikan perbedaan angka yang signifikan.

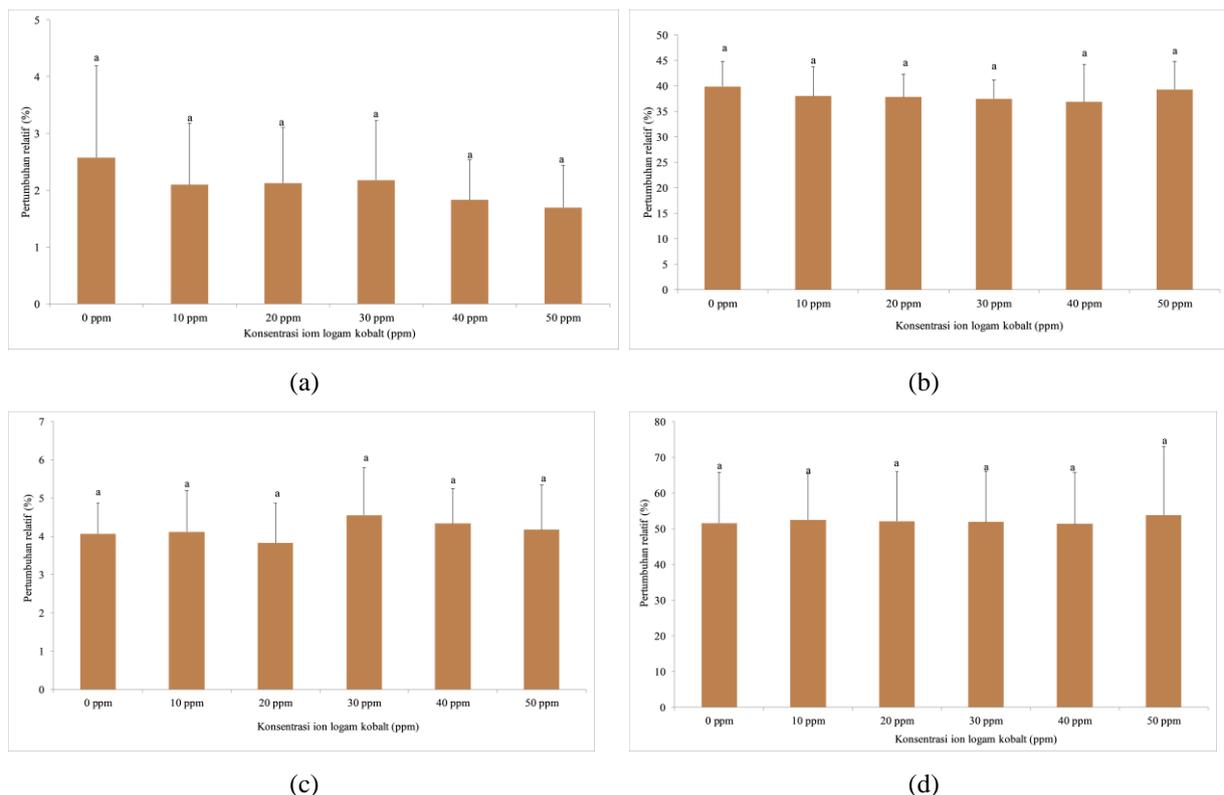
Pengaruh Suplementasi Ion Logam Kobalt terhadap Toleransi *S. cerevisiae* saat Terpapar Cekaman Lingkungan

Selama proses fermentasi, cekaman etanol dapat memberikan efek penghambatan terhadap *S. cerevisiae* secara kompleks sehingga menyebabkan fermentasi berjalan dengan lambat. Etanol dapat menghambat laju pertumbuhan ragi sehingga mempengaruhi viabilitas dan kemampuan sel ragi untuk melakukan fermentasi (Ansanay-Galeote et al. 2001).

Target utama pada sel ragi saat terpapar cekaman etanol adalah membran sel, protein hidrofobik dan hidrofilik serta retikulum endoplasma. Terpaparnya sel ragi oleh cekaman etanol akan menyebabkan peningkatan fluiditas membran dan berakibat pada penurunan integritas membran (Stanley et al. 2010). Saat sel ragi terpapar cekaman maka sel ragi akan merespon dengan melakukan pemrograman ulang terhadap aktivitas seluler supaya sel dapat bertahan pada kondisi cekaman, melindungi komponen esensial sel, dan memungkinkan dimulainya kembali aktivitas seluler selama proses pemulihan.

Pada penelitian ini, ingin mengetahui pengaruh penambahan logam kobalt variasi konsentrasi 0, 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm terhadap pertumbuhan sel ragi ketika terpapar cekaman etanol. Etanol ditambahkan ke dalam media fermentasi sebesar 7% (v/v) kemudian sel ragi ditumbuhkan selama 24 jam dengan kecepatan pengocokan 180 rpm. Selanjutnya, intensitas sel ragi diukur dengan spektrofotometer λ 600 nm dan dibandingkan dengan kontrol sehingga diperoleh nilai pertumbuhan relatifnya.

Gambar 6(a) menunjukkan pertumbuhan relatif sel ragi pada kondisi cekaman etanol 7% v/v dengan



Gambar 6. Pertumbuhan relatif (%) sel ragi *S. cerevisiae* terhadap konsentrasi ion logam kobalt yang diberikan pada kondisi cekaman (a) etanol (7% v/v) (b) hiperosmotik (27% b/v sorbitol), (c) asam lemah (67 mM asam asetat) dan (d) oksidatif (4 mM H₂O₂) pada fermentasi waktu 24 jam pada suhu 30° C.

suplementasi ion kobalt variasi konsentrasi. Dapat dilihat bahwa media tanpa suplementasi ion kobalt tidak memberikan nilai pertumbuhan relatif yang paling tinggi yaitu sebesar 2,5% dibandingkan dengan media yang disuplementasi ion kobalt variasi konsentrasi. Hasil Anova dengan software Minitab 15 dan diperoleh nilai $p = 0,935$ yang menunjukkan bahwa suplementasi ion kobalt tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap toleransi sel ragi dalam menghadapi cekaman etanol. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Xue et al. (2008) yang menunjukkan bahwa ion kobalt tidak memberikan pengaruh terhadap viabilitas sel ragi pada kondisi cekaman etanol. Hasil yang diperoleh dari media tanpa suplementasi ion logam kobalt yaitu sebesar 60,5% dan dengan suplementasi sebesar 62,4%.

Pada saat sel ragi terpapar cekaman etanol persentase pertumbuhan relatif sel hanya mencapai 2,5%, hal ini terjadi karena etanol dengan konsentrasi yang tinggi dapat menurunkan vitalitas sel dan menghambat pertumbuhan sel ragi sebagai akibat dari pengasaman sitosol.

Fermentasi dengan kondisi *very high gravity* (VHG) merupakan teknologi yang saat ini banyak digunakan pada industri pembuatan etanol sebagai bahan bakar alternatif. Kondisi fermentasi VHG diperoleh dengan cara menumbuhkan sel ragi pada media yang mengandung gula lebih dari 270 g/L

untuk menghasilkan lebih dari 15% etanol. Kelebihan fermentasi pada kondisi VHG adalah dapat mengurangi konsumsi air dan energi selama menjalankan proses fermentasi, selain itu juga dapat meningkatkan produktivitas dan konsentrasi etanol yang diperoleh (Zhao & Bai 2009).

Selain dapat memberikan beberapa keuntungan, metode VHG juga dapat menyebabkan kerugian bagi berlangsungnya proses fermentasi yaitu karena dapat menyebabkan sel ragi terpapar cekaman osmotik dan etanol. Tingginya glukosa yang ditambahkan sebagai prekursor akan membuat sel ragi mengalami cekaman hiperosmotik yang dapat menyebabkan ketidakseimbangan antara konsentrasi cairan intrasel dan ekstrasel sehingga dapat menurunkan viabilitas sel ragi (Attfield & Kletsas 2000).

Pada penelitian ini ingin mengetahui pengaruh penambahan sorbitol 27% (v/v) terhadap pertumbuhan sel ragi dengan dan tanpa suplementasi ion kobalt. Sorbitol ditambahkan kedalam media fermentasi sel ragi A12 sebesar 27% (v/v), sorbitol merupakan pemanis pengganti gula yang berasal dari buah-buahan. Sorbitol dimetabolisme secara lambat sehingga menyebabkan cekaman hiperosmotik.

Gambar 6(b) menunjukkan pertumbuhan relatif (%) terhadap variasi konsentrasi ion kobalt, nilai pertumbuhan relatif diperoleh dari absorbansi yang didapatkan ketika ditambahkan cekaman dibagi

absorbansi kontrol dikalikan dengan 100%. Dari gambar tersebut dapat dilihat bahwa persentase pertumbuhan relatif sel ragi selama terpapar cekaman hiperosmotik dengan atau tanpa suplementasi ion logam kobalt cenderung memiliki nilai yang sama yaitu sebesar ~40%. Hasil uji Anova diperoleh nilai $p = 0,981$, hal ini menunjukkan tidak adanya pengaruh signifikan suplementasi ion kobalt terhadap toleransi sel ragi terhadap cekaman osmotik.

Asam asetat merupakan agen inhibitor pada hidrolisat selulosa yang dapat memberikan dampak negatif bagi pertumbuhan sel dan produksi etanol oleh *S. cerevisiae*. Asam asetat menghambat penyerapan nutrisi oleh sel sehingga menyebabkan kekurangan energi dan penurunan aktivitas metabolik enzim (Ma et al., 2015).

Pada penelitian ini ingin diketahui pengaruh penambahan asam asetat sebagai asam lemah sebesar 67 mM terhadap pertumbuhan sel ragi dengan atau tanpa penambahan ion kobalt. Jika dibandingkan dengan jenis cekaman lainnya, cekaman asam asetat memiliki pengaruh yang cukup besar terhadap penurunan pertumbuhan relatif sel ragi. Kadar asam asetat dalam media sebesar 67 mM hanya mampu mencapai pertumbuhan relatif ~4%, hal ini terjadi karena asam asetat dapat menghambat penyerapan nutrisi oleh sel, menyebabkan menipisnya ketersediaan energi dan penurunan aktivitas metabolik enzim sehingga menghambat pertumbuhan sel ragi (Ma et al. 2015).

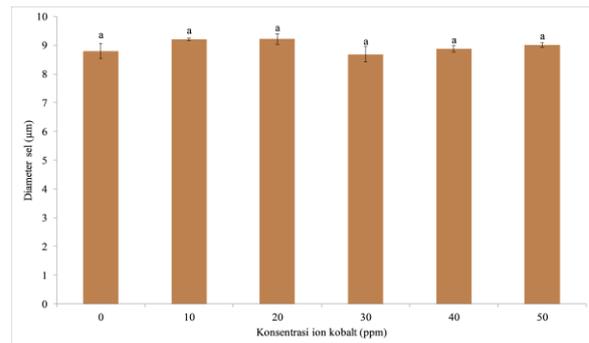
Gambar 6(c) menunjukkan grafik pertumbuhan relatif sel ragi pada kondisi cekaman asam asetat dengan atau tanpa penambahan ion kobalt. Dari grafik yang diperoleh dapat dilihat bahwa persentase pertumbuhan relatif yang paling tinggi dicapai dengan suplementasi ion kobalt sebesar 4,55% dibandingkan dengan kontrol yaitu sebesar 4,07%. Selanjutnya, hasil Anova menunjukkan nilai $p = 0,970$ yang menandakan bahwa suplementasi ion kobalt tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap toleransi sel ragi dalam menghadapi cekaman asam asetat.

Cekaman oksidatif merupakan cekaman yang dipicu oleh adanya spesi oksigen yang reaktif seperti H_2O_2 , keberadaannya di dalam media fermentasi harus dihilangkan karena dapat menurunkan aktivitas sel ragi sehingga produksi bioetanol dapat berkurang.

Pertumbuhan relatif (%) sel ragi pada Gambar 6(d) menunjukkan bahwa suplementasi ion kobalt sebesar 50 ppm memperoleh nilai persentase pertumbuhan relatif yang paling tinggi yaitu sebesar 53,818% dibandingkan dengan variasi konsentrasi lainnya, tetapi pengaruh ini tidak signifikan karena Hasil uji Anova menunjukkan nilai $p = 1,000$ yang menunjukkan bahwa suplementasi ion kobalt tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap toleransi sel ragi dalam menghadapi cekaman oksidatif.

Pengaruh Suplementasi ion Kobalt terhadap Diameter Sel Ragi

Grafik ukuran sel ragi (Gambar 7) tidak menunjukkan pengaruh yang signifikan ketika diberi suplementasi ion logam kobalt. Hal ini dibuktikan dengan nilai p yang diperoleh hasil uji Anova dengan Minitab 15 ($P = 0,107$). Tetapi apabila dilihat dari nilai yang diperoleh dari masing-masing data, suplementasi ion logam kobalt dengan konsentrasi 10 dan 20 ppm memberikan nilai diameter dan volume sel ragi yang relatif lebih tinggi dibandingkan konsentrasi lainnya.



Gambar 7. Pengaruh suplementasi ion kobalt terhadap diameter sel.

Didapatkan rata-rata diameter sel untuk konsentrasi 0 ppm sebesar $8,799 \pm 0,264$, untuk konsentrasi 10 ppm mengalami kenaikan yaitu sebesar $9,200 \pm 0,044$, konsentrasi 20 ppm juga mengalami kenaikan yaitu sebesar $9,211 \pm 0,182$, sedangkan konsentrasi 30 dan 40 ppm mengalami penurunan yaitu sebesar $8,684 \pm 0,257$ dan $8,871 \pm 0,109$.

KESIMPULAN

Suplementasi ion kobalt tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kinerja fermentasi, daya tahan terhadap cekaman lingkungan dan ukuran sel ragi.

DAFTAR PUSTAKA

- Ansanay-Galeote, V., Blondin, B., Dequin, S. & Sablayrolles, J.M. (2001). Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*. 23(9): 677-681.
- Attfield, P.V. & Kletsas, S. (2000). Hyperosmotic stress response by strains of bakers' yeasts in high sugar concentration medium. *Letters in Applied Microbiology*. 31(4): 323-327.
- Benjaphokee, S., Hasegawa, D., Yokota, D., Asvarak, T., Auesukaree, C., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Boonchird, C., & Harashima, S. (2012). Highly efficient bioethanol production by a *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress tolerance to high temperature,

- acid and ethanol. *New Biotechnology*. 29(3): 379–386.
- García, M.J., Ríos, G., Ali, R., Bellés, J.M. & Serrano, R. (1997). Comparative physiology of salt tolerance in *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 143: 1125-1131.
- Harun, R., Danquah, M.K., & Forde, G.M. (2010). Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 85(2): 199–203.
- Hosiner, D., Gerber, S., Lichtenberg-Frate, H., Glaser, W., Schüller, C. & Klipp, E. (2014). Impact of acute metal stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*. 9(1): e83330.
- Ishmayana, S., Kennedy, U.J. & Learmonth, R.P. (2015a). Preliminary evidence of inositol supplementation effect on cell growth, viability and plasma membrane fluidity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Procedia Chemistry*. 17: 162–169.
- Ishmayana, S., Fadhlillah, M., Kristia, Y.Y., & Budiman, H. (2015b). Validation of a modified alcohol dehydrogenase assay for ethanol determination. *Current Chemistry Letters*. 4(2): 77–84.
- Ji, R., Yuan, X.-Z., Zeng, G.-M. & Liu, J. (2008). Effects of inositol addition and sodium chloride on cell viability, ethanol production and ethanol tolerance of *Pachysolen tannophilus*, *Journal of Agro-Environment Science*. 27(5): 2080-2085.
- Krause, E.L., Villa-García, M.J., Henry, S.A. & Walker, L.P. (2007). Determining the effects of inositol supplementation and the *opi1* mutation on ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Industrial Biotechnology*. 3(3): 260-268.
- Kumari, R. & Pramanik, K. (2012). Improvement of multiple stress tolerance in yeast strain by sequential mutagenesis for enhanced bioethanol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 114(6): 622–629.
- Liao, B., Hill, G.A. & Roesler, W.J. (2010). Amylolytic activity and fermentative ability of *Saccharomyces cerevisiae* strains that express barley α -amylase. *Biochemical Engineering Journal*. 53(1): 63–70.
- Liu, R. & Shen, F. (2008). Impacts of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* (CICC 1308). *Bioresource Technology*. 99(4): 847–854.
- Ma, M. & Liu, Z.L. (2010). Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87(3): 829–845.
- Matsushika, A., Inoue, H., Kodaki, T. & Sawayama, S. (2009). Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 84(1): 37–53.
- Rachman, S.D., Hidayat, R.W., Safari, A., & Ishmayana, S. (2018). A comparison of the fermentation performance and stress tolerance of baker's yeast cells grown in media with or without magnesium addition. *Research Journal of Chemistry and Environment*. 22(Special Issue 2): 124-128.
- Siderius, M., & Mager, W.H. (2003). Conditional response to stress in yeast. *Monatshefte für Chemie*. 134, 1433-44.
- Smart, K.A., Chambers, K.M., Lambert, I., Jenkins, C. & Smart, C.A. (1999). Use of methylene violet staining procedures to determine yeast viability and vitality. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 57(1): 18–23.
- Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P.J. & Stanley, G.A. (2010). The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*. 109(1): 13–24.
- Takagi, H., Takaoka, M., Kawaguchi, A. & Kubo, Y. (2005). Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied and Environmental Microbiology*. 71(12): 8656-8662.
- Taloria, D., Samanta, S., Das, S. & Pututunda, C. (2012). Increase in bioethanol production by random UV mutagenesis of *S. cerevisiae* and by addition of zinc ions in the alcohol production media. *APCBEE Procedia*. 2: 43–49.
- Walker, G.M., 2004. Metals in yeast fermentation processes. In Laskin, A.I., Bennett, J.W. & Gadd, G.M. (eds). *Advances in Applied Microbiology Vol. 54*. pp.197-230. Academic Press. California.
- Walker, J.A. & Harmon, D.L. (1996). Technical note: A simple, rapid assay for alpha-amylase in bovine pancreatic juice. *Journal of Animal Science*. 74: 658-62.
- Xue, C., Zhao, X.Q., Yuan, W.J. & Bai, F.W. (2008). Improving ethanol tolerance of a self-flocculating yeast by optimization of medium composition. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24(10): 2257–2261.
- Zhao, X.B., Wang, L. & Liu, D.H. (2007). Effect of several factors on peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*. 82(12): 1115-1121.
- Zhao, X.Q. & Bai, F.W. (2009). Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *Journal of Biotechnology*. 144(1): 23–30.