



## Seminar Nasional Insinyur Profesional (SNIP)

Alamat Prosiding: [snip.eng.unila.ac.id](http://snip.eng.unila.ac.id)



### Pembenihan *Saccharomyces cerevisiae* pada unit fermentor benih menggunakan substrat kompleks secara batch homogen aerobik sebelum fermentasi etil alkohol

J Agustian <sup>a,\*</sup>, I Sukmana <sup>b</sup> dan Suharno <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Jurusan Teknik Kimia, Universitas Lampung, Jl. Prof. Soemantri Brojonegoro, Bandar Lampung 35145

<sup>b</sup> Program Profesi Insinyur Universitas Lampung, Jl. Prof. Soemantri Brojonegoro, Bandar Lampung 35145

#### INFORMASI ARTIKEL

Riwayat artikel:  
Masuk 10 Agustus 2023  
Diterima 10 September 2023

Kata kunci:  
*Saccharomyces cerevisiae*  
Fermentor benih  
Pembenihan ragi  
Glukosa

#### ABSTRAK

Pembenihan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dengan cermat sebelum produksi etanol secara fermentasi dilakukan agar tersedia bibit dalam jumlah memadai yang dilaksanakan didalam unit fermentor benih. Karena zat glukosa tersedia di Lampung, maka diperlukan untuk mempelajari pembenihan *S. cerevisiae* menggunakan bahan lokal tersebut sebagai makanannya. Pembenihan secara aerobik dilakukan dengan cukup baik dimana OD yang cukup tinggi (sebesar 3,38) diperoleh setelah 10 jam operasi tangki fermentor benih. Penurunan kandungan glukosa ke konsentrasi < 1mG/mL dalam waktu 12 jam mengindikasikan keberhasilan pembenihan, yang diperkuat dengan perolehan berat kering sebesar 0,5 mG/mL setelah 10 jam. Suplai oksigen kedalam media pembenihan digunakan dengan aktif oleh mikroorganisme selama 10 jam awal pengoperasian tangki fermentor. Pelepasan karbon dioksida dan penyerapan senyawa nitrogen dapat diamati pada proses pembiakan ini.

#### 1. Pendahuluan

Etil alkohol adalah zat yang digunakan tidak hanya sebagai pelarut bahan kimia untuk konsumsi manusia seperti parfum, zat perasa, zat pewarna, dan obat-obatan, tetapi juga dalam solven dalam industri kimia dan bahan baku sintesis senyawa lainnya (Wikipedia, 2015). Zat ini telah digunakan sebagai bahan bakar kendaraan (Larsen dkk, 2009; Gnansounou dan Dariat, 2005). Ia dapat dibuat melalui proses sintesis kimia atau fermentasi bahan karbohidrat. Pada proses fermentasi, karbohidrat harus dikonversi terlebih dahulu menjadi gula reduksi secara enzimatis atau hidrolisis asam yang dilanjutkan dengan fermentasi mikrobial gula reduksi menjadi etanol. Beragam karbohidrat yang dapat diperbaharui digunakan untuk memproduksinya seperti dari minyak mineral, gula, dan pati, dimana pati adalah bahan baku yang murah (Wikipedia, 2015). Limbah pertanian misalnya jerami (padi, gandum, jagung) dan ampas tebu dapat juga digunakan sebagai penghasil etanol (Sarkar dkk, 2012; Tesfaw dan Assefa, 2014). Selain itu, biomassa lignoselulosa dapat dimanfaatkan untuk produksi etanol (Rimayem dan Ricke, 2012). Proses fermentasi dilaksanakan setelah tersedianya glukosa atau gula reduksi.

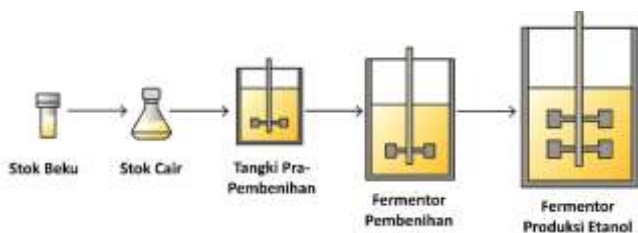
Mikroorganisme yang sering digunakan dalam fermentasi adalah ragi *Saccharomyces cerevisiae* (Patrascu dkk, 2009; Glabe dan Zacchi, 2002) karena banyak dijumpai dan bekerja sangat baik pada substrat hidrolisat lignoselulosa (Olsson dan Hahn-Hägerdal 1993). Jenis ragi *Schizosaccharomyces pombe* dapat juga digunakan yang memiliki toleransi tinggi terhadap tekanan osmotik larutan (Patrascu dkk, 2009). Mikroorganisme *Zymomonas mobilis* mengubah glukosa menjadi etanol dengan baik, sehingga dapat menjadi alternatif pengganti *S. cerevisiae*, tetapi variannya tidak banyak (Patrascu dkk, 2009; Gunasekaran dan Raj, 1999; Lawford dan Rousseau, 1998). Goncalvez dkk (2013) merangkum mikroorganisme lain seperti *Kluyveromyces marxianus*, *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, *Clostridium thermocellum*, dan *Clostridium thermosaccharolyticum* yang dapat memfermentasi selulosa. Modifikasi genetik terhadap *S. cerevisiae* (Walfridsson 1996; Tonn dkk, 1997), *Z. mobilis* (Lawford dkk, 1997) dan *E. coli* (Ingram, 1997) meningkatkan kemampuan Mikroorganisme dalam fermentasi lignoselulosa. Mikroorganisme rekombinan lain seperti *E. coli* K011, *E. coli* SL40, *E. coli* FBR3, *Zymomonas* CP4 (pZB5) dan *Saccharomyces* 1400 (pLNH32) mengubah campuran gula dan hidrolisat batang jagung (Dien dkk, 1997; Dien dkk, 1999; Dien dkk, 2000; Dien dkk, 2001; Dien dkk, 2002). Rodmui dkk (2008)

\*J Agustian.

E-mail: [joni.agustian@eng.unila.ac.id](mailto:joni.agustian@eng.unila.ac.id)

menggunakan *S. cerevisiae* dan *Candida tropicalis* untuk memproduksi etanol dari campuran glukosa dan xylosa. Thongdumy dkk (2014) memfermentasi hidrolisat limbah makanan dengan memanfaatkan mikroorganisme *Zymomonas mobilis* dan *Candida shehatae*.

Adaptasi dan pembiakan awal mikroorganisme sebelum proses fermentasi etanol harus dilakukan agar bibit mikroorganisme yang telah dibiakan di laboratorium tersedia dalam jumlah yang memadai untuk memulai proses fermentasi. Adaptasi dan pembiakan awal dilaksanakan didalam unit fermentor benih yang berukuran maksimum 10% volume (Qureshi dkk, 2015) unit fermentor produksi (**Gambar 1**). Karena pentingnya unit fermentor benih ini dalam membiakan inokulum mikroorganisme, ianya harus dioperasikan dengan cermat agar kegagalan pembenihan dan terhambatnya produksi etanol dapat dihindari.



**Gambar 1.** Diagram skematik aliran mikroorganisme untuk pembentukan etanol

Banyak media berbasis glukosa digunakan untuk pembenihan ragi *S. cerevisiae* (Qureshi dkk, 2015). Mengingat, glukosa dari pati dihasilkan di Provinsi Lampung, maka diinginkan untuk mempelajari proses pembenihan *S. cerevisiae* dengan menggunakan bahan lokal sebagai makanan utama mikroorganisme.

## 2. Metodologi

### 2.1 Persiapan bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak ragi (Merck), ekstrak malt (Merck), pepton, glukosa dan ragi *Saccharomyces cerevisiae*.

### 2.2 Peralatan pendukung

Peralatan gelas (cawan petri, gelas ukur, tabung reaksi, pipet, Erlenmeyer), 6 L batch fermentor, DO-meter, reflowflux S glucose analyzer, oven, mikroskop, staining apparatus, spectrometer, glass vials.

### 2.3 Prosedur Eksperimen

Media fermentasi disiapkan dalam flask dengan melarutkan 6-gram ekstrak ragi, 1-gram ekstrak malt, 10-gram pepton dan 40-gram glukosa dalam 1 liter air distilat. Pilot fermentor batch disiapkan dengan volume bahan total 5 L. Inokulum disiapkan sebanyak 200 mL dari kultur mikroorganisme berumur 3 hari yang ditumbuhkan pada media dengan pH 5,8 dan suhu 28°C dan kecepatan aerasi 1 v/v/m. 20 mL sampel fermentor diambil pada jangka waktu tertentu untuk dianalisis nilai densitas optis (interval: 0,5-1 jam), berat kering sel, konsentrasi glukosa, CO<sub>2</sub> dalam gas buang, oksigen terlarut, dan kandungan nitrogen.

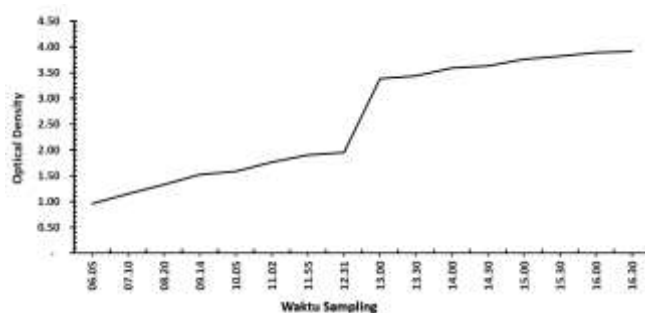
## 3. Hasil dan pembahasan

Pembenihan kultur mikroorganisme *S. cerevisiae* dimulai pada pukul 03.00 pagi. Untuk mengetahui keberhasilan

pembenihan pada tangki benih, beberapa observasi dilakukan dengan pengambilan sampel secara periodik. Hasil observasi tersebut diuraikan seperti dibawah ini.

### 3.1 Pertumbuhan Ragi

Hasil pembenihan ragi *S. cerevisiae* diuraikan pada **Gambar 2**. Setelah 3 jam inokulasi, densitas optis (OD) sel sel yang diperoleh adalah 0,957. Dalam 10 jam pembenihan, densitas optis berhasil ditingkatkan menjadi lebih dari 3,5 kali lipat jumlah awal, yaitu: 3,38. Peningkatan yang rendah (< 20%) didapatkan ketika observasi peningkatan pembenihan dilanjutkan > 10 jam yang mengindikasikan bahwa waktu pembenihan optimum yang dapat digunakan adalah 10 jam saja.

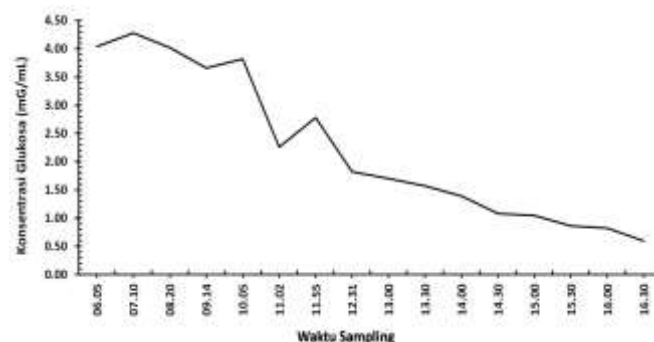


**Gambar 2.** Pertumbuhan benih ragi selama periode pembenihan

Hasil yang diperoleh dalam eksperimen adalah cukup baik. Sebagai pembanding, Sun dkk (2016) menggunakan OD benih mikroorganisme sekitar 3 untuk digunakan pada fermentor utama, yang setelah 16 jam proses pembenihan, yang digunakan dalam produksi protein rekombinan. Lu dkk (2015) mencapai OD optimum 2,7 setelah pembenihan mikroorganisme *E.coli* TB1 selama 19 jam.

### 3.2 Konsentrasi Glukosa

Perkembangan ragi dapat juga diketahui dari kondisi substrat glukosa. **Gambar 3** memperlihatkan perubahan konsentrasi substrat selama observasi. Fluktuasi konsentrasi glukosa diamati selama proses tersebut. Sampel awal proses pembenihan mengunjukan bahwa konsentasi glukosa adalah sekitar 4 mg/mL. Konsentrasi glukosa < 1 mg/mL diperoleh setelah proses pembenihan dioperasikan selama 12 jam. Reduksi kadar glukosa selama proses pembenihan mengindikasikan penggunaan substrat oleh mikoorganisme dalam pembiakannya.

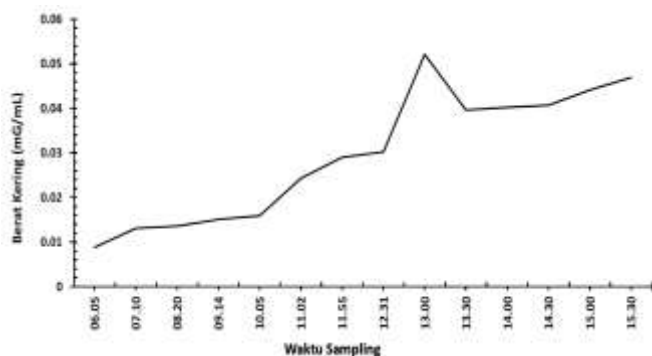


**Gambar 3.** Perubahan konsentrasi glukosa selama observasi

### 3.3 Berat Kering

Justifikasi keberhasilan pembenihan dilanjutkan dengan mengamati jumlah berat kering mikroorganisme. Secara teori,

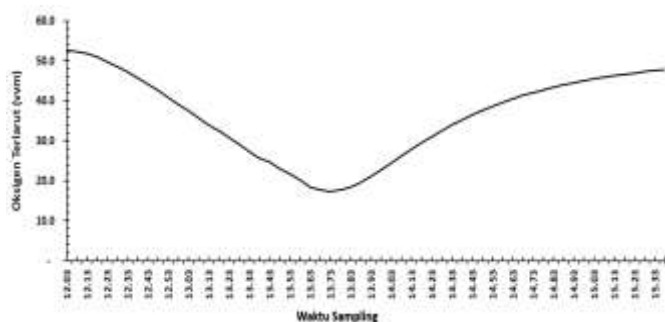
pertumbuhan mikroorganisme mengakibatkan pertambahan berat keringnya. 3 jam setelah inokulasi ragi, berat kering yang diperoleh adalah sekitar 0,01 mg/mL yang kemudian meningkat 4-5 kali lipat setelah 10 jam pembedihan yang mengindikasikan keberhasilan pembedihan mikroorganisme *S. cerevisiae* di tangki benih dengan media glukosa (**Gambar 4**). Peningkatan pertumbuhan yang lambat diamati setelah 10 jam masa pembedihan. Janet dkk (2013) memperoleh kenaikan berat sel *Aspergillus niger* yang tinggi (0,41 mg/mL) setelah 7 hari fermentasi.



**Gambar 4.** Peningkatan berat kering mikroorganisme

### 3.4 Konsentrasi Oksigen

Observasi kadar oksigen dengan DO-meter selama masa pembedihan ditunjukkan dalam **Gambar 5**. Pertumbuhan mikroorganisme diindikasikan dengan penurunan kandungan oksigen yang disuplai secara konstan didalam larutan media. Dapat diketahui bahwa konsentrasi oksigen cenderung turun yang mengindikasikan penggunaan oksigen oleh ragi. Setelah 10 jam pembedihan, konsentrasi oksigen cenderung meningkat kembali. Peningkatan ini menandakan bahwa mikroorganisme mulai berkurang mengkonsumsi oksigen untuk pertumbuhannya yang berarti bahwa laju pembedihan yang rendah pada kondisi ini.



**Gambar 5.** Variasi konsentrasi oksigen

### 3.5 Kadar CO<sub>2</sub> dan Nitrogen

Selama proses pembedihan secara aerobik, pasokan oksigen digunakan oleh ragi untuk mengubah glukosa menjadi senyawa CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O. Observasi terbentuknya gas karbon dioksida diperlihatkan pada **Tabel 1**. Observasi pada jam pembedihan ke-9 dan ke-10 menunjukkan hasil positif, yaitu adanya pelepasan gas CO<sub>2</sub> didalam media pembedihan sebesar 1,45-1,50 vvm yang mengindikasikan penggunaan umpan glukosa untuk perkembangan ragi.

**Tabel 1.** Observasi kadar CO<sub>2</sub> didalam media pembedihan

Jam	vvm
12.08	1,50
13.45	1,45

Senyawa nitrogen untuk pertumbuhan *S. cerevisiae* dipasok oleh ekstrak ragi dan malt. Konsumsi senyawa nitrogen diperlihatkan pada **Tabel 2**. Aktivitas pertumbuhan Mikroorganisme menghasilkan kadar nitrogen menjadi pada akhir masa pembedihan.

**Tabel 2.** Kadar nitrogen didalam media pembedihan

Sampel	OD
Awal	0,014
Jam ke-3	0,010
Akhir	0

## 4. Kesimpulan

Pembiakan ragi *S. cerevisiae* pada tangki fermentor pembedihan secara aerobik dengan substrat kompleks berhasil dilakukan dengan cukup baik. OD ragi yang cukup tinggi sebesar 3,38 diperoleh setelah 10 jam. Observasi kandungan glukosa mengindikasikan mikroorganisme mengkonsumsi glukosa sampai dengan konsentrasi < 1mG/mL dalam waktu 12 jam saja. Berat kering ragi yang diperoleh adalah sebesar 0,5 mG/mL setelah 10 jam pembedihan. Aerasi yang disuplai digunakan dengan baik oleh mikroorganisme dimana penggunaan aktif kandungan oksigen dalam media pembedihan berlangsung dalam jangka waktu 10 jam sejak mulainya proses pembedihan. Pelepasan karbon dioksida dan penyerapan senyawa nitrogen dapat diamati pada proses pembiakan ini.

## Daftar pustaka

- Dien, B. S., Hespell, R. B., Ingram, L. O., Bothast, R. J. (1997) Conversion of corn milling fibrous coproducts into ethanol by recombinant *Escherichia coli* strains K011 and SL 40. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 13, 619-625.
- Dien, B. S., Iten, L. B., Bothast, R. J. (1999) Conversion of corn fiber to ethanol by recombinant *E. coli*, *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*, 22, 575-581.
- Dien, B. S., Nichols, N. N., Bothast, R. J. (2001), Recombinant *Escherichia coli* engineered for production of L-lactic acid from hexose and pentose sugars, *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*, 27, 259-264.
- Dien, B. S., Nichols, N. N., Bothast, R. J. (2002), Fermentation of sugar mixtures using *Escherichia coli* catabolite repression mutants engineered for production of L-lactic acid. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*, 29, 221-227.
- Dien, B. S., Nichols, N. N., O'Bryan, P. J., Bothast, R. J. (2000), Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 84-86, 181-196.
- Galbe, M., Zacchi, G. (2002), A review of the production of ethanol from softwood, *Applied Microbiology Biotechnology*, 59, 618-628.
- Gnansounou, E., Dauriat, A., (2005), Ethanol fuel from biomass: a review, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64, 809-821.
- Gonçalves, F. A., Sanjinez-Argandona, E. J., Fonseca, G. G. (2013), Cellulosic ethanol and its co-products from different substrates, pretreatments, microorganisms and bioprocesses: A review, *Natural Science*, 5(5), 624-630.

- Gunasekaran, P., Raj, K. C. (1999), Ethanol fermentation technology *Zymomonas mobilis*. *Current Science*, 77, 56-68.
- Ingram, L. O., Lai, X., Moniruzzaman, M., Wood, B. E., York, S. W. (1997) Fuel ethanol production from lignocellulose using engineered bacteria, dalam: Saha, B. H., Woodward, J. (editors), *Fuel and chemicals from biomass. ACS Symposium Series 666*, American Chemical Society, Washington, D.C. pp 57-73.
- Itelima, J., Ogbonna, A., Pandukur, S., Egbere, J. Salami, A. (2013) Simultaneous Saccharification and Fermentation of Corn Cobs to Bio-Ethanol by Co-Culture of *Aspergillus Niger* and *Saccharomyces Cerevisiae*, *International Journal of Environmental Science and Development*, 4(2), 239-242.
- Larsen, U., Johansen, T., Schramm, J. (2009), Ethanol as a Fuel for Road Transportation, *Main Report*, Technical University of Denmark, Denmark.
- Lawford, H. G., Rousseau, J. D. (1998), Improving fermentation performance of recombinant *Zymomonas* in acetic acid-containing media, *Applied Biochemistry Biotechnology*, 70-72, 161-172.
- Lawford, H. G., Rousseau, J. D., McMillan, J. D. (1997), Optimization of seed production for a simultaneous saccharification cofermentation biomass-to-ethanol process using recombinant *Zymomonas*, *Applied Biochemistry Biotechnology*, 63-65, 269-286.
- Limayem, A., Ricke, S. C. (2012) Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects, *Progress in Energy and Combustion Science*, 38, 449-467.
- Lu, J., Song, Q., Ji, Z., Liu, X., Wang, T. Kang, Q. (2015) Fermentation optimization of maltose-binding protein fused to neutrophil-activating protein from *Escherichia coli* TB1, *Electronic Journal of Biotechnology*, 18, 281-285.
- Olsson, L., Hahn-Hägerdal, B. (1993), Fermentative performance of bacteria and yeasts in lignocellulose hydrolysates, *Process Biochemistry*, 28, 249-257.
- Patrascu, E., Rapeanu, G., Hopulele, T. (2009), Current approaches to efficient biotechnological production of ethanol, *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 4, 1-11.
- Qureshi, A. S., Zhang, J., Bao, J. (2015) Cellulosic Ethanol Fermentation Using *Saccharomyces cerevisiae* Seeds Cultured by Pretreated Corn Stover Material. *Applied Biochemistry Biotechnology*, January, 1-12.
- Rodmui, A., Kongkiattikajorn, J., Dandusitapun, Y. (2008) Optimization of Agitation Conditions for Maximum Ethanol Production by Coculture, *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 42, 285-293
- Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., Aikat, K. (2012) Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, 37, 19-27.
- Sun, W. W. Q., Pursell, E. J. (2016) HIGH-CELL DENSITY FED-BATCH FERMENTATION PROCESS FOR PRODUCING RECOMBINANT PROTEIN, U.S. Patent No. 9,279,000 B2.
- Tesfaw, A., Assefa, F. (2014) Current Trends in Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*: Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture, and Immobilization, *International Scholarly Research Notices*, Volume 2014, 1-14.
- Thongdumyu, P., Intrasungkha, N., O-Thong, S. (2014) Optimization of ethanol production from food waste hydrolysate by co-culture of *Zymomonas mobilis* and *Candida shehatae* under non-sterile condition, *African Journal of Biotechnology*, 13(7), 866-873.
- Tonn, S. T., Philippidis, G. P., Ho, N. W. Y., Chen, Z., Brainard, A., Lumpkin, R. E., Riley, C. J. (1997) Enhanced cofermentation of glucose and xylose by recombinant *Saccharomyces* yeast strains in batch and continuous operating modes. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 63-65, 243-25.
- Walfridsson, M. (1996) Xylose utilising recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. *PhD thesis*. Department of Applied Microbiology, Lund University, Sweden.
- Wikipedia (2015) Ethanol, dalam <http://en.wikipedia.org/wiki/Ethanol> diakses tanggal 28-02-2015.