

**JURNAL REVIEW: PENINGKATAN RENDEMEN PADA PRODUKSI ETANOL
BERBAHAN GLUKOSA DENGAN PENGEMBANGAN *STRAIN SACCHAROMYCES
CEREVISIAE* DENGAN UV-MUTAGENESIS**

**The Potential Cultivation of Banana (Study Case In Distric Wonosalam) Regency
Jombang**

M.Nur Ghoyatul Amin dan Untung Murdiyatmo

Magister Bioteknologi Agroindustri, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya
Jl. Veteran - Malang 65145
Email : ghoyatul.amin@yahoo.co.id

ABSTRAK

Peningkatan karbondioksida didunia menyebabkan meningkatnya penggunaan minyakbumi dan bahan bakar fosil sebagai energy utama untuk berbagai jenis kegiatan dapat dikurangi dengan menggunakan energy terbarukan. Bioetanol merupakan salah satu energy potensial untuk menggantikan penggunaan bahan bakar fosil. Saat ini, banyak tantangan untuk mengembangkan bioetanol sebagai energy terbarukan utama. Tantangan adalah bagaimana mengoptimalkan factor produksi, salah satunya adalah penggunaan *Saccharomyces cerevisiae* dengan kemampuan tinggi untuk mengubah glukosa menjadi etanol. UV-mutagenesis dipekerjakan untuk meningkatkan kemampuan *Saccharomyces cerevisiae* sebagai starter untuk produksi etanol. Banyak penelitian menunjukkan bahwa mutan *Saccharomyces cerevisiae* memiliki kemampuan lebih untuk mengkonversi glukosa menjadi etanol, hal ini menyebabkan mutan memiliki karakteristik khusus seperti toleransi tinggi thermo, kemampuan tinggi untuk transportasi protein dalam membran, dan toleransi toksin, yang dipengaruhi oleh pertukaran nukleotida melalui urutan DNA.

Kata kunci :etanol, *Saccharomyces cerevisiae*, UV, Mutagenesis

ABSTRACT

The Increasing of carbon dioxide in the world caused increasing the use of petroleum and fossil fuel as main energy for many kinds of activity could be decreased by using renewable energy. Bioethanol is one of potential energy to substitute the use of fossil fuel. Currently, many challenges to develop the bioethanol as the main renewable energy. The Challenges was how to optimize the production factor, one of them is the use of *Saccharomyces cerevisiae* with high capability for converting the glucose to ethanol. The UV - mutagenesis was employed to improve the capability of *Saccharomyces cerevisiae*as starter for ethanol production. Many research show that the mutan*Saccharomyces cerevisiae*has more capability for converting glucose to ethanol, it caused the mutant has special characteristic such as high thermo tolerance, high capability for protein transport in membrane, and toxin tolerance, its was affected by the exchange of nucleotide through DNA sequence.

Keywords : Ethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, UV, Mutagenesis

PENDAHULUAN

Pertumbuhan ekonomi dan populasi disertai berbagai aktivitasnya akan meningkatkan kebutuhan energi hampir diseluruh sektor ekonomi. Data kementerianESDM menyebutkan, sepanjang tahun 2010 realisasi konsumsi premium sebesar 23 juta kl atau 7 persen di atas kuota, realisasi solar 12.8 juta kl atau 14 persen di atas kuota, dan minyak tanah 2.4 juta kl atau 37 persen di bawah kuota. Seiring dengan peningkatan penggunaan bahan bakar minyak di Indonesia oleh berbagai aktivitas seperti transportasi, industry dan rumah tangga akan berpotensi meningkatkan kadar karbondioksida di lingkungan. Berdasarkan data *Environmental Modeling and Assessment* (1999) kadar karbondioksida di lingkungan pada tahun 2000 mencapai 380 ppm. Melihat permasalahan tersebut tentu harus dicari solusi untuk menekan ketergantungan sector ekonomi terhadap bahan bakar minyak. Solusi tersebut adalah mensubtitusi penggunaan bahan bakar minyak (fosil) dengan bahan bakar yang dapat diperbarui (*renewable*) dan ramah lingkungan dengan potensi sumber bahan baku yang tinggi. Potensi tersebut ada pada penggunaan biofuel. Berdasarkan roadmap biofuel pada perencanaan pengelolaan energi nasional. Indonesia menargetkan mampu menyubtitusi bahan bakar bensin oleh bioetanol sebanyak 2%, 3%, dan 5% masing-masing pada tahun 2010, 2015 dan 2025. Oleh karena itu, untuk menindaklanjuti target tersebut telah banyak biofuel yang dikembangkan sebagai subtitusi bahan bakar minyak yakni biodiesel dan bioetanol.

Glukosa merupakan bahan utama yang digunakan pada proses pembuatan bioetanol. Proses tersebut dilakukan dengan menggunakan berbagai macam mikroba, seperti *Saccharomyces cerevicia* (Liu dan Shen 2007), *Zymomonas mobilis* (Jongsomchai 2011), *pichia pastoris*. *Saccharomyces cerevisiae* paling banyak digunakan dan sangat ekstensif pada

proses produksi bioetanol. Sifat fisiologis dari *Saccharomyces cerevisiae*, menjadi faktor yang berpengaruh terhadap efisiensi pada produksi etanol, sifat fisiologi menentukan kemampuan *Saccharomyces cerevisiae* dalam mensintesis enzim yang dapat memecah glukosa, menjadi etanol. Sehingga, identifikasi dari sifat fisiologi ini dapat menjadi referensi untuk meningkatkan kemampuan *Saccharomyces cerevisiae* dalam produksi etanol. Peningkatan ini dapat dilakukan dengan mutagenesis, salah satunya adalah dengan radiasi ultraviolet. Metode ini sudah banyak digunakan di industri enzim dalam meningkatkan rendemen dengan progress yang baik (Li 2009).

DEFINISI UV MUTAGENESIS

Mutagenesis merupakan suatu metode untuk merubah sifat fisiologi suatu organisme, dengan cara mengubah susunan nukleotida penyusun rantai DNA, yang mengandung informasi genetik. Mutagenesis dapat terjadi secara directed maupun random. Mutagenesis secara direct berlaku jika urutan basa nitrogen yang akan dimutasi diketahui sebelumnya dan terkontrol, sedangkan untuk mutasi random, perubahan rantai DNA setelah mutagenesis baru dapat diketahui. Menurut Ikehata dan Ono (2011), Randomize mutagenesis dapat dilakukan dengan cara radiasi menggunakan sinar ultraviolet (UV), dengan radiasi UV maka akan merusak rantai DNA dan urutan dari basa nitrogen, sehingga akan memacu terbentuknya cilobutana pirimidin dimer (CPD). Studi kasusnya dapat membuktikan pada rantai DNA yang telah terbentuk cilobutana pirimidin dimer (di dalamnya mengandung nukleotida sitosin) akan mengalami deaminasi, maka sitosin akan berubah menjadi urasil, rantai ini dinamakan sebagai *damage DNA* yang dapat dipolimerisasi oleh DNA polimerase η , proses ini dinamakan (error-free), dimana urasil (U) akan dipasangkan dengan adenin (A), di dalam DNA tidak ada nukleotida urasil, sehingga DNA

polimerase melakukan mekanisme *nucleotide excision repair*, dengan mekanisme tersebut dapat merubah nukleotida, dari awalnya C menjadi U (damage) dan diperbaiki menjadi T melalui *mismatch repair*, sehingga perubahannya akhir adalah (C- T) Penelitian Li (2009) membuktikan dengan UV mutagenesis, urutan basa nitrogen pada DNA endoglucanase *T.viride* pada urutan ke 50 berubah dari C menjadi T, dimana dengan perubahan tersebut dapat mengubah asam amino yang diekspresikan dari semula alanin menjadi valin, sehingga secara otomatis akan merubah karakteristik dan kemampuan dari *T.viride*. The UV waveleghth was plotted 280 nm – 320 nm. (Choi *et al.* 2005).

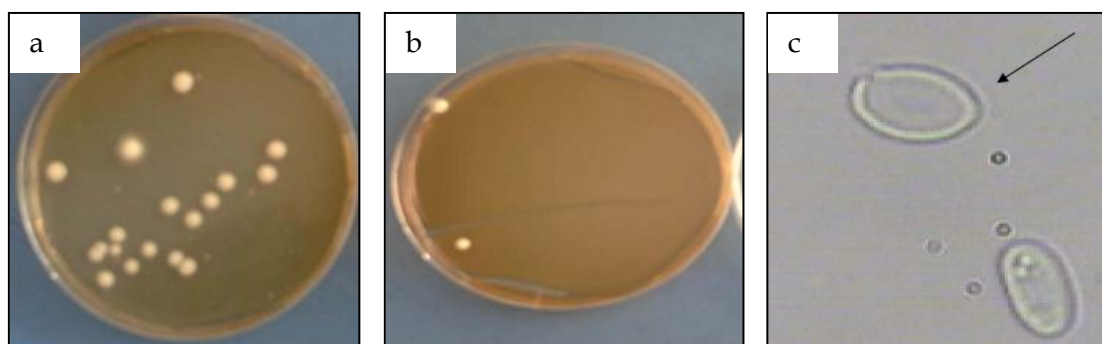
METODE UV- MUTAGENESIS DAN MUTAN ASSAY

Metode ini pertama kali dilakukan dengan cara menyiapkan kultur murni *Saccharomyces cerevisiae* yang diperoleh dari media YPG (terdiri dari 4 % glukosa, 2 % pepton, 1 % ekstrak yeast), yang diinkubasi selama 18 jam, kemudian dipanen dengan sentrifugasi (4000 rpm ; 10 menit). Kultur ditempatkan pada media YPGA (YPG + agar), kemudian diradiasi dengan ultraviolet dengan panjang gelombang UVB (280 -320) nm, setelah

diradiasi ditempatkan pada lingkungan yang gelap selama 3 hari, setelah itu discreening diambil sel yang toleran terhadap UV , kemudian dicoba pada media fermentasi etanol yang mengandung glukosa, untuk melihat kemampuan mutan *Saccharomyces cerevisiae* dalam memproduksi etanol.

KARAKTERISTIK MUTAN *Saccharomyces cerevisiae*

Menurut Petrea (2008), setelah *wild Saccharomyces cerevisiae* diradiasi dengan ultraviolet dengan panjang gelombang 254 nm selama 50 detik, dapat merusak sel *Saccharomyces cerevisiae*, sehingga *Saccharomyces cerevisiae* berpotensi mengalami letal (Gambar 1). pada penelitiannya mengungkapkan bahwa efek dari matinya *Saccharomyces cerevisiae* disebabkan karena mutasi rantai DNA, destruksi membran sel dan organel – organelnya. Namun, pada penelitiannya membuktikan bahwa ada *Saccharomyces cerevisiae* yang masih bertahan hidup dengan radiasi UV (Gambar 2), dan inilah yang dipilih sebagai UV – mutan *Saccharomyces cerevisiae* yang dapat diuji kemampuannya sebagai starter pada produksi etanol menggunakan media yang mengandung glukosa.



Gambar 1. a. Sebelum mengalami UV-Mutagenesis, b. Setelah mengalami mutagenesis (nampak yang hidup hanya dua sel), c Membran sel yang terdestruksi akibat UV-mutagenesis (Sumber : Petrea (2008))

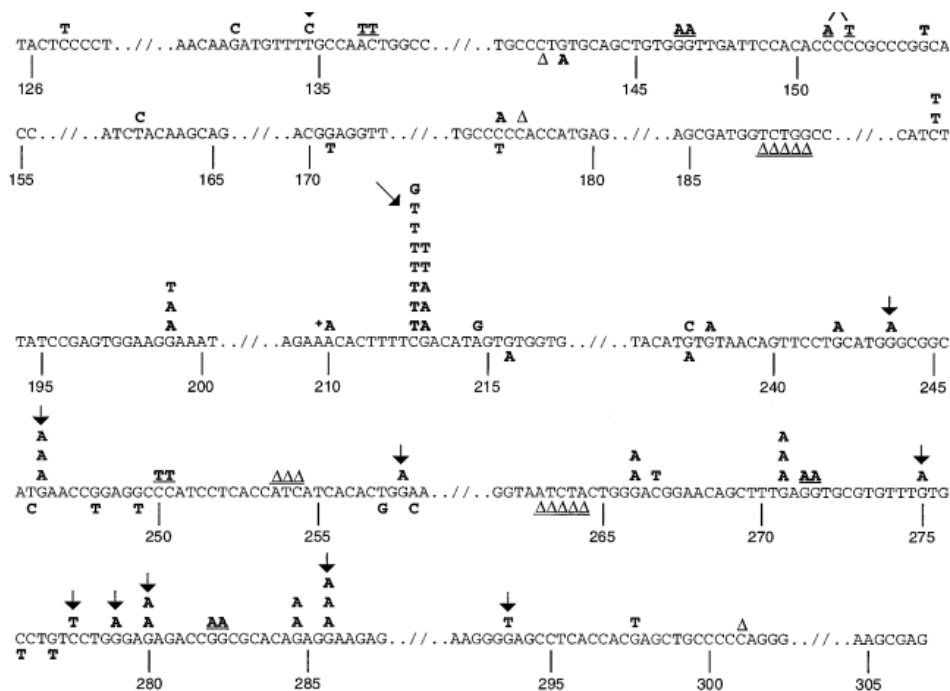
Penelitian Jin (2005), membuktikan bahwa *Saccharomyces cerevisiae* yang diradiasi dengan ultraviolet dapat menghasilkan strain

Saccharomyces cerevisiae yang memiliki sifat *thermotolerance*, hal ini dibuktikan dengan uji perbandingan *thermtolerance activity* antara wild dan mutan

Saccharomyces cerevisiae, dimana pada saat diinkubasi pada media GYP pada suhu 37 °C dan 53°C menunjukkan bahwa prosentase mutan *Saccharomyces cerevisiae* yang hidup lebih tinggi dari pada wild *Saccharomyces cerevisiae*. Sifat *thermotolerance* yang dimiliki oleh mutan *Saccharomyces cerevisiae* disebabkan karena produksi *shock protein* (Lindquist dan Kim 1996), membran ATPase (Perier *et al.* 1995), dan threhalose (Singer dan Lindquist 1998).

Mutasi secara UV induksi dapat mengubah urutan basa nitrogen pada DNA sequence, hal ini terbukti pada penelitian Moshinsky dan Wogan (1997), bahwa

pada urutan tertentu nukleotida akan berubah, dan ini yang menyebabkan kareakteristik *Saccharomyces cerevisiae* juga akan berubah, perubahan urutan nukleotida pada sequence DNA *Saccharomyces cerevisiae* merupakan perubahan pada genotipnya, secara otomatis perubahan genotip akan diikuti dengan perubahan fenotipnya. Berikut merupakan hasil sequencing mutan *Saccharomyces cerevisiae*



Gambar 2. Hasil sequencing mutan *Saccharomyces cerevisiae* yang diradiasi dengan sinar UVP, perubahan nukleotida hasil radiasi UV berada diatas sequence wild *Saccharomyces cerevisiae* (Sumber : Moshinsky, Wogan (1997)).

Perubahan pada basa ke 29 dan 155 nampak perubahan C –T, hal ini dikarenakan induksi ultraviolet, yang menyebabkan terbentuknya cilobutana pirimidin dimer, yang didalamnya mengandung nukleotida sitosin yang mengalami deaminasi sehingga akan berubah menjadi nukleotida timin. Sedangkan pada basa ke 291 mengalami perubahan dari G menjadi T, yang

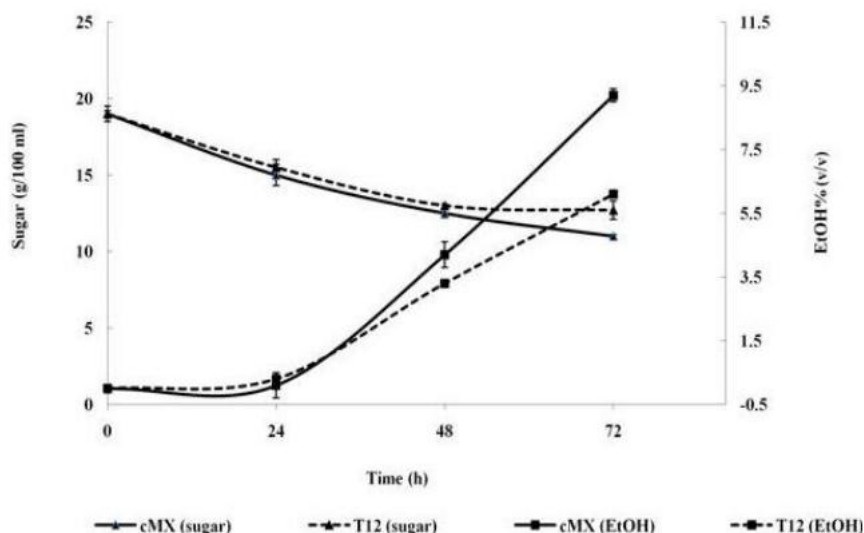
disebabkan oleh terbentuknya gugus hydroxyguanin yang diinduksi oleh sinar UV (Ikehata 2011).

**PRODUKSI ETANOL
 MENGGUNAKAN MUTAN
*Saccharomyces cerevisiae***

Peningkatan produktivitas pada produksi etanol berbahan glukosa dapat dilakukan dengan cara menggunakan

strain yang dimutagenesis dengan UV. Berdasarkan penelitian Bahareh dan Mehrdad (2011), pada produksi etanol berbahan glukosa yang diperoleh dari hidrolisa lignoselulosa secara kimia, yang difermentasi menggunakan wild dan mutant *Saccharomyces cerevisiae* menunjukkan hasil yang berbeda. Kadar etanol yang dihasilkan oleh mutant *Saccharomyces cerevisiae* cenderung lebih tinggi jika dibandingkan dengan wild *Saccharomyces cerevisiae*, dimana kemampuan dalam mengkonversi glukosa mutan *Saccharomyces cerevisiae* juga lebih baik.

Menurut Cardona dan Sanchez (2007), hidrolisa lignoselulosa secara kimia, menggunakan asam kuat, dapat menghasilkan toxin yang dapat menghambat enzim –enzim yang berperan dalam produksi etanol, diantaranya 5-hydroxymethyl furfural (HMF). Menurut Modig *et al.* (2002) HMF dapat menghambat kinerja alcohol dehydrogenase, piruvat dehydrogenase dan aldehyd dehydrogenase. Untuk itu agar HMF tidak menghambat produksi etanol, maka metode *induced mutagenesis* perlu dilakukan untuk mengembangkan strain yang toleran terhadap toksin tersebut (Saurer 2001).



Gambar 3. Rate konsumsi gula dan produksi etanol mutan (cMX) dan wild (T12) *Saccharomyces cerevisiae* (Sumber : BaharehdanMehrdad(2011))

Penelitian Jin *et al.* (2005), juga membuktikan bahwa mutan *Saccharomyces cerevisiae* memiliki produktivitas yang tinggi jika dibandingkan dengan wild *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* yang di mutasi dengan UV dapat meningkatkan yeast thermostability, dikarenakan mutant *Saccharomyces cerevisiae* dapat menghasilkan *shock protein* (Lindquist dan Kim 1996), membran ATPase (Perier *et al.* 1995), dan threhalose (Singer dan Lindquist 1998). Sehingga *Saccharomyces cerevisiae* dapat bekerja dengan baik pada suhu tinggi

(40°C). Riset tersebut dikembangkan karena produksi etanol pada saat musim panas dengan suhu ruangan yang tinggi di negara Cina. Berdasarkan uji *Western Blot* mutan *Saccharomyces cerevisiae* dapat mengekspresikan gen menjadi protein Hsp70p lebih tinggi dibandingkan dengan wild *Saccharomyces cerevisiae*. Hsp70p ini yang berperan dalam renaturasi protein yang telah mengalami denaturasi akibat dari *heat shock* dan memfasilitasi transpor protein pada membran sel *Saccharomyces cerevisiae*.

KESIMPULAN DAN SARAN

Mutagenesis dapat mengubah karakteristik dari *Saccharomyces cerevisiae*, baik secara fenotip dan genotipnya, secara fenotip dapat dilihat tingkat kemampuannya dalam mengkonversi glukosa menjadi etanol yang lebih tinggi dibandingkan dengan wild *Saccharomyces cerevisiae* dengan substrat yang mengandung toksin, mampu memproduksi etanol pada suhu fermentasi yang tinggi (>40°C) jika dibandingkan dengan wild *Saccharomyces cerevisiae*, perbedaan karakteristik antara wild dan mutan *Saccharomyces cerevisiae* disebabkan oleh perbedaan urutan nukleotida pada DNANYa, dimana pada mutan *Saccharomyces cerevisiae* mengalami perubahan pada beberapa nukleotidanya, akibat dari terbentuknya cilobutana pirimidin dimer, yang diikuti dengan deaminasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Bahareh RZ, Mehrdad A. 2011. Increasing the bioethanol yield in the presence of furfural via mutation of a native strain of *Saccharomyces cerevisiae*. African Journal of Microbiology Research. 5 : 651 – 656.
- Cardona CA, Sanchez OJ (2007). Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. Bioresour. Technol. 98: 2415-2457.
- Ikehata H, Ono T. 2011. The mechanism of UV mutagenesis. J.Radiated Res. 52 : 115 – 125.
- Jin C, Han N, Wu X, Pan J, Zeng Y, Zhu M. 2005. Isolation and characterization of a highly thermo tolerant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Annals of Microbiology. 55 : 57 – 61
- Jongsomchai C, Triped J, Jakoen J, Laopaiboon P. 2011. ethanol production from sweet sorghum stem juice by *Zymomonas mobilis* TISTR 548 in batch and fed-batch fermentations.
- Lindquist S, Kim G . 1996. Heat shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. Proc.Natl. Acad. Sci. 93 : 5301 – 5306
- Liu R, Shen F. 2007. Impacts of main factors of bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cereviceae* (CICC 1308). Bioresource Technology 99 : 847-854.
- Li XH *et al.* 2009. Impact of cellulose production of the *Trichoderma viride* mutated by microwave and ultraviolet. Microbiological research.
- Moshinsky DJ, Wogan GN. 1997. UV-induced mutagenesis of human p53 in a vector replicated in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl. Acad. Sci. 94 : 2266 - 2271
- Perier F, Radeke CM, Raab-Graham KF, Vandenberg CA. 1995. Expression of a putative ATPase suppresses the growth defect of a yeast potassium transport mutant.
- Petrea L. 2008. Characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained by UV mutagenesis. Innovative Romanian Food Biotechnology. 2 : 40 – 47.
- Sauer U (2001). Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 73: 129–169.
- Singer MA, Lindquist S. 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Trend in Biotechnology 16 : 460 - 468