

Produksi dan Penetapan Kadar β -glukan dari Tiga Galur *Saccharomyces cerevisiae* dalam Media Mengandung Molase

KUSMIATI¹, SWASONO R.TAMAT^{2*}, S. NUSWANTARA¹, NITA ISNAINI³

¹Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI, Cibinong, Bogor 16911

²Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka, BATAN, Kawasan Puspipetek, Serpong, Banten 15310

³Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Srengseng Sawah, Jakarta 12640

Diterima 18 Desember 2006, Disetujui 6 Februari 2007

Abstract: Beta-glucan extracted from the cell membrane of *Saccharomyces cerevisiae* has been used as food and medical ingredients. Molase as a waste-product of the cane-sugar industry, containing 4-9% of glucose and other nutrients, has been investigated to substitute glucose in the YPG fermentation media of *Saccharomyces cerevisiae*, and to improve the yield of β -glucan by three strains of *Saccharomyces cerevisiae* (RTA, RN4, and SC). Beta-glucan and protein concentration were determined by spectrophotometric method at λ 490 nm and 750 nm respectively. The results showed that molase can be used as glucose-substitute in the YPG media for the production of β -glucan by three strains of *Saccharomyces cerevisiae*. The best yield for each strain was as follows: RTA strain in a media containing molase (8% v/v glucose equivalent) produced 61,79% w/w of β -glucan; RN4 strain in a media containing molase (1% v/v glucose equivalent) produced 98,42% w/w of β -glucan; SC strain in a media containing molase (2% v/v glucose equivalent) produced 56,48% w/w of β -glucan. One-way Anova followed by the Tukey-Bonferroni test indicated that molase can be used as substitute of glucose source in the YPG fermentation media, and significantly increased the β -glucan yield by all the three strains of *Saccharomyces cerevisiae*, as well as reducing the protein contents. The highest β -glucan yield (98,42% w/w) was attained by the RN4 strain in a media containing molase (1% v/v glucose equivalent) with a protein impurity of only 10,53% w/w, while the RN4 and RTA strains produced a higher β -glucan yield than that of the SC strain.

Keywords: beta-glucan, *Saccharomyces cerevisiae*, RTA, RN4, and SC strains, molase

PENDAHULUAN

Sektor industri hingga kini mengandalkan kebutuhan polisakarida pada bahan yang berasal dari tanaman atau alga. Bahan seperti pati, alginat, gom arab dan sebagainya, dimanfaatkan secara luas di bidang industri makanan dan obat-obatan. Bahan ini walaupun sangat dibutuhkan, namun suplainya di dalam negeri tidak terjamin dan kualitasnya belum distandarisasi⁽¹⁾.

Beberapa tipe polisakarida mempunyai sifat yang unik berbentuk homopolisakarida, yaitu polisakarida yang tersusun dari satu jenis gula, seperti dekstran dan β -glukan, banyak terdapat dalam mikroba dan telah dimanfaatkan oleh industri makanan dan obat⁽²⁾.

Beta glukan adalah bentuk polisakarida yang sukar dicerna, banyak terkandung dalam bahan alam

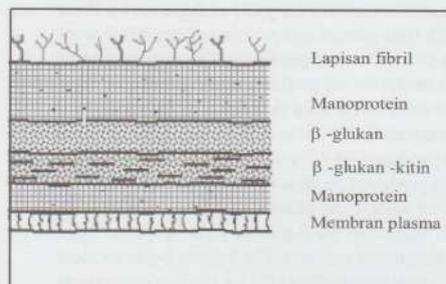
seperti *serealia*, termasuk *oats* dan *barley*, dalam jamur, alga, bakteri, dan khamir⁽³⁾. Beta glukan yang diperoleh dari dinding sel khamir diketahui memberikan efek terapi yang efektif dengan efek samping ringan, dan bahkan aman digunakan dan dikonsumsi⁽⁴⁾.

Berbagai penelitian telah melaporkan manfaat β -glukan yaitu sebagai: antiseptik, antioksidan, *antiaging*, aktivator sistem kekebalan tubuh, proteksi terhadap radiasi, antiinflamasi, antikoolesterol, anti-diabetes, dan sebagainya. Sedangkan di bidang industri makanan tercatat bahwa sejak tahun 1989 β -glukan telah dipasarkan di Taiwan, Korea, dan Jepang sebagai penstabil makanan dan penambah rasa, bahkan di Jepang telah dibuat menjadi daging sintesis bagi para vegetarian karena bentuk gelnya yang memiliki viskositas tinggi (>600 g/cm² dalam 2% suspensi)^(3,4). Diketahui kemudian bahwa β -glukan dapat menyebabkan reaksi alergi dan inflamasi karena adanya protein dari ragi serta kontaminan lain yang terkandung di dalamnya⁽⁵⁾.

* Penulis korespondensi, Hp.08129695600,
e-mail: swasonotamat@gmail.com

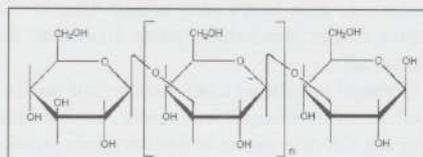
Pertumbuhan dan metabolisme khamir di dalam media memerlukan nutrisi yang mengandung unsur makro terdiri dari karbon, nitrogen, dan oksigen, dan unsur mikro terdiri dari vitamin, mineral, dan lain-lain^(1,6). Sebagai sumber karbon di dalam media biasanya digunakan glukosa.

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) merupakan jenis khamir yang diketahui dapat mensintesis β -glukan pada dinding selnya. Struktur dinding sel *S. cerevisiae* yang ditunjukkan Gambar 1, mengandung protein yang terikat dengan gula sebagai glikoprotein dan manoprotein, serta mengandung manan, kitin dan polisakarida jenis β -1,3-glukan dan β -1,6-glukan yang berfungsi memperkuat struktur sel dan sebagai cadangan makanan⁽⁷⁾.



Gambar 1. Struktur dinding sel *Saccharomyces cerevisiae*⁽⁷⁾.

Beta-1,3-glukan (Gambar 2) dan β -1,6-glukan banyak terkandung pada dinding sel *S. cerevisiae*. Beta glukan yang diekstraksi dari khamir diketahui menghasilkan β -glukan yang lebih murni karena mengandung sedikit sekali protein dan kontaminan lain^(3,4).



Gambar 2. Rumus bangun β -1,3-glukan⁽⁸⁾.

Ada bermacam-macam β -glukan dengan aktivitas yang berbeda, namun yang paling aktif adalah β -1,3-glukan (*curdlan*) yang berasal dari dinding sel *S. cerevisiae*^(3,4,5).

Molase adalah hasil samping industri gula tebu, merupakan sisa sirup yang masih banyak mengandung glukosa, mineral, protein dan vitamin yang sangat dibutuhkan dalam proses fermentasi. Kandungan glukosa yang cukup tinggi (4-9%) dalam mo-

Tabel 1. Komposisi kandungan molase

Komposisi	Kisaran (%)	Rata-rata (%)
Air	17 - 25	20
Sukrosa	30 - 40	35
Glukosa	4 - 9	7
Fruktosa	5 - 12	9
Pereduksi lain	1 - 5	3
Karbohidrat lain	2 - 5	4
Abu	7 - 15	12
Komponen nitrogen	2 - 6	4,5
Komponen non nitrogen	2 - 8	5
Lilin, sterol, fosfolipid	0,1 - 1	0,4

lase, menjadi dasar pemikiran untuk dimanfaatkan sebagai sumber karbon pengganti glukosa dalam media fermentasi⁽⁸⁾. Komposisi kandungan molase yang lebih rinci dapat dilihat pada Tabel 1.

Pada penelitian ini dilakukan produksi β -glukan dari *S. cerevisiae* galur: RN4, RTA, SC dengan menggunakan media fermentasi yang mengandung variasi kadar molase pengganti glukosa, yang difermentasikan selama enam hari, kemudian β -glukan diekstraksi dan diisolasi dari kultur sel. Beta glukan yang diperoleh ditetapkan kadarnya sebagai glukosa melalui hidrolisis dan reaksi warna dengan fenol-sulfat serta spektrofotometri cahaya tampak pada λ 490 nm. Kandungan protein dalam β -glukan ditentukan dengan metode Lowry spektrofotometri cahaya tampak pada λ 750 nm.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Khamir yang digunakan adalah *S. cerevisiae* galur RN4, RTA, dan SC koleksi Laboratorium Biopolimer Puslit Bioteknologi LIPI, Cibinong. Tetes tebu atau molase yang digunakan berasal dari PT. Jawa Manis Rafinasi, Cilegon, Banten, glukosa (Merck); kaldu pepton (Oxoid); ekstrak ragi (Oxoid); agar (Oxoid); *bovine serum albumin* (Sigma); natrium hidroksida (Merck); folin ciocalteu's (Sigma); fenol (Merck); asam sulfat pekat (Merck); asam asetat (Merck); etanol (Merck); larutan pereaksi D terdiri dari: 50 ml larutan natrium bikarbonat 2% b/v; 1 ml larutan tembaga sulfat 1% b/v; 1 ml larutan natrium kalium tartrat 2% b/v.

Spektrofotometer ultraviolet dan cahaya tampak (Shimadzu 160); otoklaf vertikal (TA 360); *shaker* (KS 250 Basic); penangas air (GRANT); mikropipet 1000 μ l, 200 μ l dan 10 μ l (Socorex); neraca

analitik (Sartorius); sentrifus (JOUAN-MR-18); inkubator (IS 600 Yamato); *laminar air flow*; *vortex* (Ikamag).

Karakterisasi morfologi sel *Saccharomyces cerevisiae* galur RTA, RN4, dan SC. Diambil 1 ose biakan dari masing-masing galur *S. cerevisiae*, kemudian diteteskan pada kaca preparat yang telah ditetesi air, difiksasi dengan pemanasan. Selanjutnya diberi pewarna biru metilen atau safranin, didiamkan selama 5 menit hingga zat warna terserap sempurna, lalu dibilas dengan akuades, dan dikeringkan di antara kertas saring. Diamati morfologi sel masing-masing galur *S. cerevisiae* tersebut dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.

Penetapan kandungan glukosa dalam molase. Penetapan ini dilakukan untuk mengetahui kadar glukosa dalam molase yang digunakan, dan selanjutnya molase digunakan sebagai pengganti glukosa yang biasa digunakan dalam media YPG⁽⁷⁾. Kadar glukosa tersebut digunakan untuk menghitung jumlah molase ekivalen glukosa yang akan digunakan dalam variasi media fermentasi *S. cerevisiae*. Penetapan kadar dilakukan dengan metode Fenol-Sulfat Spektrofotometri cahaya tampak pada λ 490 nm.

Baku pembanding glukosa. Larutan baku pembanding glukosa 1000 bpj (stok) dibuat dari 25 mg glukosa yang ditimbang seksama, dilarutkan dengan air dalam labu tentukur 25 ml. Kemudian dilakukan pengenceran sedemikian sehingga diperoleh konsentrasi glukosa baku pembanding sebesar: 10 bpj, 20 bpj, 40 bpj, 80 bpj, 100 bpj, 150 bpj, 200 bpj dan 300 bpj. Sampel molase yang akan dianalisis diencerkan dengan akuades sedemikian sehingga diperoleh larutan molase dengan pengenceran 100x, 1000x, 2000x, 5000x, dan 10000x.

Cara penetapan. Masing-masing sejumlah 1000 μ l larutan baku pembanding glukosa dan molase hasil pengenceran tersebut diatas ditambah 0,5 ml fenol 5%, dikocok homogen, ditambah 2,5 ml H₂SO₄ pekat, didiamkan selama 10 menit, dikocok homogen lalu dipanaskan di atas penangas air mendidih selama 15 menit dan didinginkan. Masing-masing larutan hasil reaksi diukur serapannya secara spektrofotometri cahaya tampak pada λ 490 nm, dan dibuat kurva baku pembanding dan persamaan garis regresinya.

Dengan cara yang sama, kadar glukosa dalam masing-masing larutan molase diukur dan dihitung menggunakan persamaan garis regresi kurva baku glukosa.

Regenerasi dan pertumbuhan *S. Cerevisiae*. Sebelum dapat digunakan untuk penelitian produksi β -glukan, *S. cerevisiae* harus diregenerasi dan

ditumbuhkan dalam media yang sesuai, sehingga diperoleh biakan yang segar. Media regenerasi yang digunakan adalah media YPG padat dengan komposisi: ekstrak ragi 1% b/v; kaldu pepton 2% b/v; glukosa 2% b/v dan agar 2% b/v, yang dilarutkan dalam akuades sampai 100,0 ml dan dipanaskan hingga mendidih, lalu dibagi ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 4,0 ml kemudian disterilkan di otoklaf pada 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

Sejumlah satu ose *S. cerevisiae* dari kultur stok masing-masing galur dimasukkan ke media regenerasi secara aseptis kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam dengan agitasi 150 rpm.

Media pertumbuhan yang digunakan adalah media YPG cair (YPG padat tanpa agar) yang dilarutkan dengan 20 ml akuades di dalam Erlenmeyer kemudian disterilkan di otoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

Satu ose *S. cerevisiae* dari masing-masing media regenerasi tersebut diatas secara aseptis diinokulasikan ke dalam media pertumbuhan, diinkubasikan dalam shaker inkubator pada suhu kamar selama 48 jam dengan agitasi 150 rpm.

Produksi β -glukan dalam media fermentasi⁽⁹⁾. Produksi β -glukan dilakukan dalam media fermentasi YP cair dengan perlakuan berbagai konsentrasi molase ekivalen glukosa, yaitu: ekstrak ragi 1 % b/v, kaldu pepton 2% b/v dan molase ekivalen glukosa 1%, 2%, 4%, 6%, atau 8% v/v, dilarutkan dengan akuades sampai volume 100,0 ml, dan disterilkan di otoklaf pada 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit.

Sejumlah 1 ml kultur *S. cerevisiae* dalam media pertumbuhan tersebut diatas dimasukkan ke dalam 100,0 ml media fermentasi secara aseptis, dan difermentasi dalam shaker inkubator dengan kecepatan agitasi 150 rpm pada suhu kamar selama enam hari. Produksi β -glukan juga dilakukan dalam media pertumbuhan YPG cair seperti diatas sebagai kontrol.

Ekstraksi β -glukan⁽¹⁰⁾. Setelah kultur sel diatas difermentasi dan diinkubasi selama 6 hari, kemudian β -glukan (*crude*) diekstraksi dari masing-masing perlakuan ketiga galur *S. cerevisiae*. Kultur disentrifus pada 10.000 rpm (25°C) selama 30 menit, kemudian supernatan dibuang, dan residu biomassa ditambah 30 ml NaOH 0,75 M, lalu dipanaskan dalam penangas air 75°C selama 6 jam. Campuran disentrifus kembali pada 10.000 rpm (25°C) selama 30 menit, dan supernatan dibuang.

Residu biomassa dicuci dengan 30 ml asam asetat 0,5 M dan disentrifus pada 10.000 rpm (25°C)

selama 30 menit dan kemudian supernatan dibuang. Pencucian dengan asam asetat tersebut dilakukan tiga kali. Residu biomassa dicuci lagi dengan 20,0 ml akuades kemudian disentrifus pada 5.000 rpm selama 10 menit; perlakuan pencucian dengan akuades dilakukan dua kali. Residu biomassa yang telah dicuci ditambah 20,0 ml etanol lalu disentrifus pada 5000 rpm selama 10 menit, menghasilkan β -glukan (*crude*) yang masih basah.

Perhitungan bobot kering β -glukan (*crude*). Biomassa hasil ekstraksi dikeringkan di oven pada suhu 45°C selama lebih kurang 2 hari kemudian ditimbang bobotnya, menghasilkan bobot kering β -glukan (*crude*) dari masing-masing perlakuan media fermentasi *S. cerevisiae* galur RTA, RN4, dan SC.

Pembuatan larutan uji β -glukan. Masing-masing β -glukan (*crude*) kering yang berasal dari berbagai perlakuan media fermentasi, ditimbang seksama, kemudian masing-masing ditambah 4 ml natrium hidroksida 1 N hingga larut. Sejumlah volume tertentu larutan uji ini digunakan untuk analisis kadar β -glukan ekivalen glukosa dan sejumlah volume tertentu untuk analisis protein.

Volume larutan uji yang digunakan disesuaikan agar serapan pada spektrofotometri cahaya tampak selalu diantara 0,2 dan 0,8. Dengan demikian Faktor pengenceran (Fp) larutan kontrol maupun larutan uji mungkin berbeda satu dari yang lain.

Penetapan kadar β -glukan dengan metode Fenol-Sulfat^(2,11,12,13,14). Kadar β -glukan ditetapkan sebagai glukosa dengan cara memecah (hidrolisis) β -glukan menjadi monomer D-glukosa, kemudian ditetapkan kadar glukosanya.

Masing-masing larutan uji diambil sejumlah volume tertentu dan ditambah akuades sehingga total volume 1,0 ml. Perlakuan selanjutnya sama dengan penetapan kadar glukosa dalam molase. Hasil pengukuran serapan diekstrapolasi ke persamaan garis regresi baku glukosa untuk memperoleh kadar glukosa dalam larutan uji yang diukur. Dengan memperhitungkan faktor pengenceran pada setiap larutan uji dan bobot kering β -glukan (*crude*), maka kadar β -glukan ekivalen glukosa dalam masing-masing larutan uji dapat ditetapkan.

Penetapan kadar protein^(2,13,14,15,16). Penetapan kadar protein dilakukan dengan pertimbangan bahwa protein bersama β -glukan dalam bentuk kompleks yang sukar dipisahkan merupakan struktur utama penyusun dinding sel. Penetapan kadar protein dilakukan dengan metode Lowry-spektrofotometri.

Baku pembanding protein. Dibuat kurva baku pembanding protein menggunakan *bovine serum albumin* (BSA) sebagai berikut: sejumlah 10 mg

BSA ditimbang saksama dalam labu tentukur 10 ml, dilarutkan dengan akuades sampai tanda sehingga diperoleh larutan stok 1000 bpj. Kemudian dilakukan pengenceran dengan akuades, sehingga didapat konsentrasi larutan baku pembanding BSA sebesar 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360 bpj.

Sejumlah 0,5 ml larutan baku BSA tersebut ditambah 0,5 ml larutan natrium hidroksida 1 N, dididihkan selama 20 menit dan didinginkan. Masing-masing larutan kemudian ditambah 2,5 ml larutan D, dikocok homogen, didiamkan selama 10 menit, ditambah 0,5 ml larutan folin C, dikocok homogen lalu didiamkan selama 30 menit. Masing-masing larutan kemudian diukur serapannya secara spektrofotometri cahaya tampak pada λ 750 nm, dibuat kurva baku dan persamaan garis regresinya.

Penetapan kadar protein. Sejumlah larutan uji β -glukan yang diperlukan ditambah akuades sehingga volume menjadi 0,5 ml, ditambah 0,5 ml larutan natrium hidroksida 1 N. Selanjutnya dilakukan reaksi yang sama seperti pada baku pembanding BSA, kemudian kadar protein dalam β -glukan diukur dan dihitung menggunakan persamaan garis regresi kurva baku protein. Dengan memperhitungkan faktor pengenceran pada setiap larutan sampel dan bobot kering β -glukan (*crude*), maka kadar protein dalam larutan uji dapat ditetapkan.

Uji presisi dan uji perolehan kembali. Uji presisi metode fenol-sulfat-spektrofotometri cahaya tampak dilakukan dengan cara pengukuran lima kali dalam satu seri baku pembanding glukosa konsentrasi 60 bpj, sedangkan uji presisi metode Lowry-spektrofotometri cahaya tampak dilakukan dengan cara pengukuran lima kali dalam satu seri baku pembanding BSA konsentrasi 300 bpj, kemudian dihitung nilai rata-rata, simpangan baku, dan simpangan baku relatif (koefisien variasi).

Uji perolehan kembali kadar glukosa dilakukan pada zat uji β -glukan (*crude*) kering yang berasal dari isolat RTA dalam media mengandung molase 8%. Uji perolehan kembali dilakukan dengan penambahan sejumlah 25% dan 50% baku pembanding glukosa, sedangkan uji perolehan kembali protein dilakukan dengan penambahan sejumlah 25% dan 50% baku pembanding *bovine serum albumin* ke dalam zat uji β -glukan (*crude*) kering, kemudian dilakukan penetapan kadar β -glukan.

Analisis data. Dari percobaan menggunakan tiga galur *S. cerevisiae* dengan perlakuan berbagai kadar molase, dilakukan analisis hubungan antara perlakuan molase pada media dengan hasil bobot kering β -glukan (*crude*), kadar β -glukan, dan kadar protein, menggunakan rancangan acak faktorial,

dengan program SPSS. Data yang diperoleh diperiksa homogenitas variannya kemudian dianalisis menggunakan metode statistik ANOVA satu arah. Dan bila hipotesis ditolak, berarti ada perbedaan yang bermakna, $F_{uji} > F_{tabel}$ atau $\alpha > 0,01$, maka uji dilanjutkan dengan uji Tukey-Bonferroni untuk menunjukkan letak perbedaan yang bermakna.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi *Saccharomyces cerevisiae*. Hasil pewarnaan sel *S.cerevisiae* dan pengamatan morfologi dibawah mikroskop dengan perbesaran 100 kali disajikan dalam Gambar 3. Morfologi sel masing-masing galur sesuai dengan karakter morfologi sel dalam koleksi Laboratorium Bioteknologi LIPI.

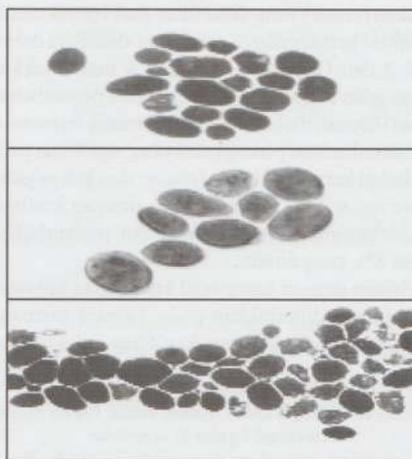
Sel khamir dapat berbentuk bulat, oval, silinder, bulat panjang dengan salah satu ujungnya runcing (*ogival*), segitiga melengkung (*triangular*), bentuk botol atau lemon. Dalam kultur yang sama, ukuran dan bentuk sel khamir mungkin berbeda karena pengaruh umur sel dan kondisi lingkungan selama pertumbuhan^(7,17).

Kadar glukosa dalam molase. Penentuan kadar glukosa dalam molase pengenceran 5000x dengan metode fenol-sulfat-spektrofotometri pada λ 490 nm menunjukkan serapan 0,2-0,8. Sedangkan molase pengenceran 100x, 1000x dan 2000x menghasilkan larutan yang masih pekat dan serapannya pada cahaya tampak tidak dapat diukur. Pengukuran menunjukkan bahwa kadar glukosa dalam molase yang diencerkan 5000x ekuivalen dengan serapan cahaya tampak sebesar 0,514 atau kadar 159,95 bpj. Maka kadar glukosa dalam molase sebelum pengenceran adalah 799750 bpj atau 79,9750 g/100 ml (atau 79,975%).

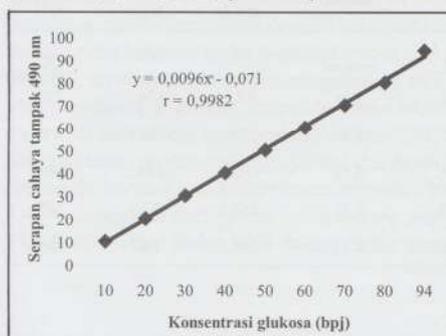
Selanjutnya kadar glukosa ini digunakan sebagai dasar dalam menghitung volume molase yang akan ditambahkan ke dalam media fermentasi YP (100 ml), sehingga untuk penambahan molase ekuivalen dengan 2% glukosa digunakan 2,5 ml molase ditambahkan ke dalam 97,5 ml media YP. Untuk selanjutnya di dalam naskah, yang dimaksud dengan penambahan molase 1%, 2%, 4%, 6%, atau 8% adalah penambahan molase yang mengandung kadar 1%, 2%, 4%, 6%, atau 8% glukosa.

Kurva kalibrasi glukosa dan protein. Kurva kalibrasi larutan glukosa dengan metode Fenol-Sulfat dan diukur secara spektrofotometri pada λ 490 nm menghasilkan persamaan garis regresi $y = 0,0096x + 0,071$, dan koefisien korelasi $r = 0,9982$ menunjukkan bahwa ada hubungan linier yang baik antara konsentrasi glukosa dan serapan cahaya tampak pada λ 490 nm, ditunjukkan dalam Gambar 4.

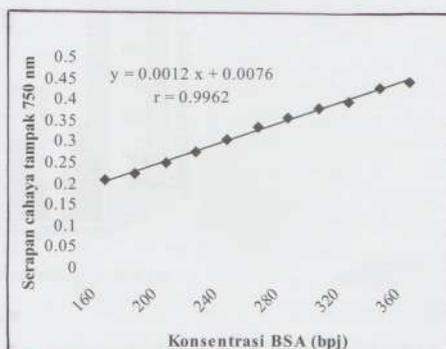
Kurva kalibrasi larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan metode Lowry-spektrofotometri pada λ 750 nm menghasilkan persamaan garis regresi $y = 0,0012x + 0,0076$ dan koefisien korelasi



Gambar 3. Morfologi dan pewarnaan sel *S. cerevisiae*. a) galur RTA, b) RN4, dan c) galur SC, perbesaran 1000x.



Gambar 4. Kurva baku glukosa menggunakan metode Fenol-Sulfat-Spektrofotometri cahaya tampak pada λ 490 nm.



Gambar 5. Kurva baku protein menggunakan metode Lowry-Spektrofotometri cahaya tampak λ 750 nm.

$r=0,9962$ menunjukkan bahwa ada hubungan linier yang baik antara konsentrasi BSA dengan serapan cahaya tampak pada λ 750 nm (Gambar 5).

Hasil bobot kering β -glukan (*crude*) dari *S. cerevisiae* galur RTA, RN4, dan SC. Bobot kering β -glukan (*crude*) yang dihasilkan dari 100 ml media fermentasi ketiga galur *S. cerevisiae* disajikan dalam Tabel 2 dan Gambar 6. Gambar 6 menunjukkan dengan jelas bahwa dengan perlakuan penambahan molase (kecuali molase 1%) dalam media fermentasi dapat memberikan peningkatan yang signifikan pada hasil bobot kering β -glukan (*crude*) dari ketiga galur *S. cerevisiae* bila dibandingkan dengan kontrol, bahkan sampai dengan perlakuan penambahan molase 8% yang diteliti.

Molase dengan komposisi kandungan senyawa sebagaimana ditunjukkan pada Tabel 1 memang diharapkan dapat menggantikan fungsi glukosa da-

lam media YPG yang telah umum digunakan, dan bahkan dapat meningkatkan rendemen produksi β -glukan.

Khamir secara umum diketahui tahan terhadap tekanan osmose tinggi karena biasanya terdapat dalam bahan yang berkadar gula atau garam yang tinggi⁽⁷⁾. Kebanyakan khamir tergolong mesofilik dapat tumbuh baik pada kondisi aerobik maupun anaerobik, dan toleran terhadap kondisi asam.

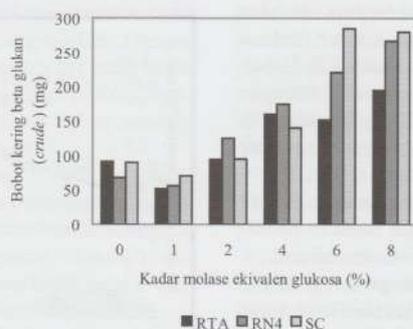
Namun sumber pustaka yang lain menyebutkan bahwa faktor-faktor lingkungan seperti suhu, pH, konsentrasi oksigen terlarut, komposisi nutrisi, dan kadar air diketahui mempengaruhi proses pertumbuhan khamir^(7,17). *S. cerevisiae* telah diketahui dapat tumbuh baik dalam media yang mengandung D-glukosa dengan konsentrasi 50-100 mM pada kondisi aerobik dan sangat sedikit dipengaruhi oleh perubahan pH^(7,10,11,15).

Uji Anova satu arah dilanjutkan dengan uji Tukey-Bonferroni menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna ($\alpha=0,01$) pada hasil bobot kering β -glukan (*crude*) untuk tiap perlakuan media dengan penambahan molase 4%, 6%, dan 8% dengan kontrol.

Kadar β -glukan dan kadar protein dari *S. cerevisiae* galur RTA dalam 100 ml media fermentasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan media fermentasi dengan berbagai kadar molase menghasilkan kadar β -glukan tertinggi, yaitu 61,79%, diperoleh dari media mengandung molase 8%; dan kadar β -glukan terendah, yaitu 27,83%, diperoleh dari media mengandung molase 4%. Sedangkan kadar protein tertinggi, yaitu 18,11%, diperoleh dari media mengandung molase 1%; dan

Tabel 2. Hasil bobot kering β -glukan (*crude*) dari perlakuan berbagai kadar molase dalam 100 ml media fermentasi 3 galur *S. cerevisiae*

No	Penambahan molase	Bobot kering β -glukan (<i>crude</i>) (mg)		
		RTA	RN4	SC
1.	kontrol	91	67,5	90
2.	1 %	51,5	56	70
3.	2 %	94	125	95
4.	4 %	160	174,5	140
5.	6 %	151,5	220	285
6.	8 %	194,5	267	280



Gambar 6. Hubungan antara perlakuan berbagai kadar molase dengan hasil bobot kering β -glukan (*crude*) fermentasi *S. cerevisiae* galur RTA, RN4, dan SC.

Tabel 3. Hasil kadar β -glukan dari perlakuan berbagai kadar molase dalam 100 ml media fermentasi *S.cerevisiae* galur RTA

No	Penambahan molase	Serapan rata-rata \pm SD	Kadar glukosa rata-rata (bpj)	Kadar β -glukan (%)
1.	kontrol	0,58 \pm 0,01	53,55	42,06
2.	1%	0,33 \pm 0,01	26,91	37,33
3.	2%	0,55 \pm 0,01	49,52	37,34
4.	4%	0,67 \pm 0,01	62,41	27,83
5.	6%	0,81 \pm 0,02	77,30	53,07
6.	8%	0,88 \pm 0,01	84,13	61,79

kadar protein terendah, yaitu 8,45%, diperoleh dari media mengandung molase 8%. *S. cerevisiae* galur RTA dalam media kontrol menghasilkan β -glukan hanya 42,06% (Tabel 3 dan 4, dan Gambar 7).

Dengan demikian ditunjukkan bahwa *S. cerevisiae* galur RTA dapat tumbuh optimum dalam media mengandung molase 8%, sehingga menghasilkan peningkatan kadar β -glukan tertinggi, disertai kadar protein yang terendah, bila dibandingkan kontrol. Kadar β -glukan tidak dapat ditetapkan secara langsung, namun ditetapkan dan dinyatakan sebagai kadar glukosa. Untuk selanjutnya di dalam naskah yang dimaksud dengan kadar β -glukan x% adalah kadar β -glukan yang ekuivalen dengan kadar x% glukosa.

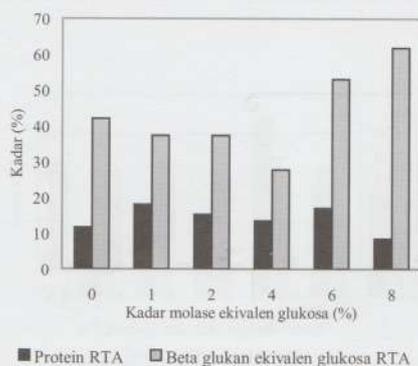
Kadar β -glukan meningkat dalam media mengandung molase 6% dan 8% kemungkinan

Tabel 4. Hasil kadar protein dalam β -glukan dari perlakuan berbagai kadar molase dalam 100 ml media fermentasi *S. cerevisiae* galur RTA

No	Penambahan molase	Serapan rata-rata \pm SD	Kadar rata-rata (bpj)	% protein
1.	kontrol	0,27 \pm 0	212,26	11,64
2.	1%	0,23 \pm 0,03	185,66	18,11
3.	2%	0,36 \pm 0,04	287,28	15,34
4.	4%	0,54 \pm 0,03	433,53	13,53
5.	6%	0,65 \pm 0,07	519,50	17,15
6.	8%	0,72 \pm 0,05	328,64	8,45

karena galur ini tidak terganggu dengan asam yang agak tinggi, dan dapat menggunakan glukosa dalam jumlah besar di dalam media sebagai sumber energi dan sebagai komponen utama pembentuk dinding sel⁽¹⁸⁾.

Kadar β -glukan dan kadar protein dari *S.cerevisiae* galur RN4 dalam 100 ml media fermentasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan media fermentasi dengan berbagai kadar molase menghasilkan kadar β -glukan tertinggi, yaitu 98,42%, diperoleh dari media mengandung molase 1%; dan kadar β -glukan terendah, yaitu 84,65%, diperoleh dari media mengandung molase 2%. Sedangkan kadar protein tertinggi, yaitu 11%, diperoleh dari media kontrol; dan kadar protein terendah, yaitu 5,43%, diperoleh dari media mengandung molase 2%. *S. cerevisiae* Galur RN4 dalam media kontrol



Gambar 7. Hubungan antara perlakuan berbagai kadar molase dalam media fermentasi *S. cerevisiae* galur RTA dengan hasil kadar β -glukan dan kadar protein.

Tabel 5. Hasil kadar β -glukan dari perlakuan berbagai kadar molase dalam 100 ml media fermentasi *S. cerevisiae* galur RN4

No	Penambahan molase	Serapan rata-rata \pm SD	Kadar glukosa rata-rata (bpi)	Kadar β -glukan (%)
1.	Kontrol	0,40 \pm 0	20,74	87,79
2.	1%	0,49 \pm 0,03	24,41	98,42
3.	2%	0,76 \pm 0,03	47,64	84,65
4.	4%	0,59 \pm 0,03	33,56	96,16
5.	6%	0,67 \pm 0,03	37,88	85,89
6.	8%	0,83 \pm 0,01	50,43	94,46

menghasilkan β -glukan hanya sebesar 87,79% dan protein 11%, ditunjukkan dalam Tabel 5 dan 6, dan Gambar 8. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *S. cerevisiae* galur RN4 tumbuh terbaik dalam media molase 1% dengan kadar β -glukan tertinggi dan protein lebih rendah dibandingkan kontrol.

Namun demikian, uji statistik Anova satu arah menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna (dengan $\alpha=0,01$) antara media mengandung molase 1% dengan media kontrol dalam hal bobot kering β -glukan (*Crude*), serta kadar β -glukan dan kadar protein yang dihasilkan.

Kadar β -glukan dan kadar protein dari *S. cerevisiae* galur SC dalam 100 ml media fermentasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan media fermentasi dengan berbagai kadar molase menghasilkan kadar β -glukan tertinggi (56,48%) diperoleh dari media mengandung molase 2%; dan kadar β -glukan terendah (17,24%) diperoleh dari media mengandung molase 8%. Sedangkan

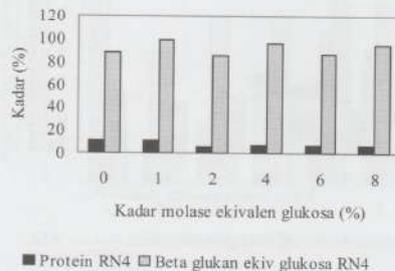
Tabel 6. Hasil kadar protein dalam β -glukan dari perlakuan berbagai kadar molase dalam 100 ml media fermentasi *S. cerevisiae* galur RN4

No	Penambahan molase	Serapan rata-rata \pm SD	Kadar rata-rata (bpi)	% protein
1.	Kontrol	0,35 \pm 0,01	185,80	11,00
2.	1%	0,35 \pm 0,01	187,97	10,53
3.	2%	0,40 \pm 0,01	213,17	5,49
4.	4%	0,56 \pm 0,01	299,33	6,87
5.	6%	0,39 \pm 0,01	207,48	6,30
6.	8%	0,47 \pm 0,01	247,21	6,18

kadar protein tertinggi (88,98%) diperoleh dari media mengandung molase 4%; dan kadar protein terendah (15,15%) diperoleh dari media kontrol. *S. cerevisiae* Galur SC dalam media kontrol menghasilkan β -glukan hanya sebesar 53,79% dan protein 15,15%, ditunjukkan dalam Tabel 7 dan 8, serta Gambar 9.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *S. cerevisiae* galur SC tumbuh terbaik dalam media molase 2% dengan kadar β -glukan tertinggi dibandingkan media kontrol, meskipun kadar protein yang dihasilkan sedikit lebih tinggi dibandingkan kontrol.

S. cerevisiae galur SC yang merupakan galur referensi dalam media mengandung molase 4% sampai 8%, memperlihatkan adanya peningkatan bobot kering β -glukan (*crude*), namun kadar β -glukan justru menunjukkan penurunan disertai peningkatan kadar protein yang tidak diinginkan. Fenomena ini belum dapat dijelaskan.



Gambar 8. Hubungan antara perlakuan berbagai kadar molase dalam media fermentasi *S. cerevisiae* galur RN4 dengan hasil kadar β -glukan dan kadar protein.

Tabel 7. Hasil kadar β -glukan dari perlakuan berbagai kadar molase dalam 100 ml media fermentasi *S.cerevisiae* galur SC

No	Penambahan molase	Serapan rata-rata \pm SD	Kadar rata-rata (bpj)	Kadar β -glukan (%)
1.	kontrol	0,38 \pm 0,01	19,15	53,79
2.	1%	0,43 \pm 0,01	22,81	55,69
3.	2%	0,55 \pm 0,02	31,93	56,48
4.	4%	0,39 \pm 0,02	21,56	38,86
5.	6%	0,38 \pm 0,03	21,76	19,03
6.	8%	0,39 \pm 0,01	19,39	17,24

Dari ketiga galur *S.cerevisiae* yang diteliti, terlihat bahwa perlakuan molase lebih besar dari 4% dalam media fermentasi *S. cerevisiae* galur RTA dan galur RN4, dapat memberikan pengaruh yang sangat baik dengan peningkatan rendemen produksi maupun konsentrasi β -glukan persatuan bobot kering β -glukan (*crude*), sekaligus menurunkan secara signifikan pembentukan komponen protein dalam struktur dinding sel *S. cerevisiae*.

Uji Anova satu arah dilanjutkan dengan uji Tukey-Bonferroni pada hubungan antara isolat (RTA, RN4 dan SC) terhadap hasil kadar β -glukan, didapat bahwa ada perbedaan yang bermakna ($\alpha=0,01$) pada kadar β -glukan untuk setiap isolat galur *S. cerevisiae*.

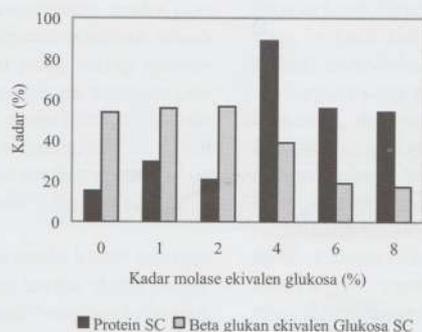
Di antara galur RN4 dan galur RTA, *S. cerevisiae* galur RN4 dapat dinyatakan sebagai pilihan terbaik bila ditinjau dari bobot kering β -glukan (*crude*) >250 mg, kadar β -glukan >90%, maupun kadar protein <10%, serta rasio kadar protein : kadar β -glukan dalam β -glukan (*crude*) lebih dari 9:1.

Tabel 8. Hasil kadar protein dalam β -glukan dari perlakuan berbagai kadar molase dalam 100 ml media fermentasi *S.cerevisiae* galur SC

No	Penambahan molase	Serapan rata-rata \pm SD	Kadar rata-rata (bpj)	Protein %
1.	kontrol	0,52 \pm 0	272,73	15,15
2.	1%	0,68 \pm 0,05	386,59	29,46
3.	2%	0,84 \pm 0,09	399,38	20,78
4.	4%	0,45 \pm 0,02	248,71	88,98
5.	6%	0,60 \pm 0	317,44	55,71
6.	8%	0,55 \pm 0,01	303,70	54,16

Presisi dan perolehan kembali. Pengukuran lima kali dalam satu seri baku pembandingan glukosa konsentrasi 60 bpj menunjukkan simpangan baku sebesar 0,108 dan simpangan baku relatif (koefisien variasi) sebesar 0,17%, sehingga disimpulkan penetapan kadar glukosa dengan metode ini mempunyai presisi yang sangat baik. Pengukuran lima kali dalam satu seri baku pembandingan protein kadar protein konsentrasi 300 bpj menunjukkan simpangan baku sebesar 0,502 dan simpangan baku relatif (koefisien variasi) sebesar 0,17%, sehingga disimpulkan penetapan kadar protein dengan metode ini mempunyai presisi yang sangat baik.

Uji perolehan kembali kadar glukosa menggunakan metode fenol-sulfat didapatkan rata-rata perolehan kembali 94,5 \pm 0,01% pada penambahan glukosa 25%, dan rata-rata perolehan kembali 86,2 \pm 0,01% pada penambahan glukosa 50%. Kedua hasil uji perolehan kembali tersebut diatas menunjukkan akurasi yang baik, 80-120%⁽¹⁹⁾. Demikian pula penetapan kadar BSA menggunakan metode Lowry



Gambar 9. Hubungan antara perlakuan berbagai kadar molase dalam media fermentasi *S. cerevisiae* galur SC dengan hasil kadar β -glukan ekuivalen glukosa dan kadar protein.

menunjukkan rata-rata perolehan kembali $101,3 \pm 0,03\%$ pada penambahan BSA 25%, dan rata-rata perolehan kembali $83,5 \pm 1,4\%$ pada penambahan BSA 50%. Kedua hasil uji perolehan kembali tersebut diatas menunjukkan akurasi yang baik, 80-120%⁽¹⁹⁾.

SIMPULAN

Penggunaan molase (ekivalen 1% - 8% glukosa) dalam media fermentasi tiga galur *S. cerevisiae* dapat menggantikan fungsi glukosa, dan bahkan dapat meningkatkan produksi bobot kering β -glukan (*crude*) maupun kadar β -glukan.

Produksi β -glukan (*crude*) oleh *S. cerevisiae* galur lokal (RTA dan RN4) menunjukkan hasil lebih tinggi dari galur referensi (SC). Kadar β -glukan yang tertinggi pada galur RN4 sebesar 98,42% dengan protein 10,53% (molase 1%); pada galur RTA sebesar 61,79% dengan protein 8,45% (molase 8%); dan pada galur SC sebesar 56,48% dengan protein 20,78% (molase 2%).

DAFTAR PUSTAKA

- Rahman A. Teknologi fermentasi industrial I. Bogor: PAU pangan dan gizi IPB; 1989. hal. 69-86.
- Ian W Dawes. Biotechnology of microbial exopolysaccharides. New york: Cambridge University press; 1990. p. 1-11, 20-3, 38-42, 117-51.
- Young Lee. in. Korea research institute of bioscience and biotechnology. diambil: http://www.Willey-Vch.de/books/biopoly/pdf-vos/bpol_15006-135-144.pdf. diakses: 3 maret, 2004.
- Digital naturopath. diambil dari <http://www.Digitalnaturopath.com/treat/T151737.html>-24k. diakses 2 februari, 2004.
- Beta glukan. diambil dari <http://www.betaglukan.org/links.htm>. diakses 26 Desember, 2003.
- Ian WD, Sutherland. Microbial physiology. 2nd Edition. New York: Cambridge University Press; 1990. p. 32-53, 72-97.
- Barnet JA. Characteristic and identification yeast. New York: Cambridge University Press; 1990.
- Paturau MJ. By products of the cane sugar industry, an introduction utilization. London: Elsevier pub. com. Amsterdam; 1969. p. 33-53.
- Fardiaz D. Bahan kuliah mikrobiologi pangan. Bogor: Jurusan TPG Fateta IPB; 1992. hal. 140-51.
- Daw majin. biotech coop .daejon 305-600 pdf. korea. diakses: 3 November, 2004.
- Graeme WM. Yeast physiology and biotechnology. New York: John Wiley and Sons; 1992. p. 122-31.
- Suzanne NS, Editor. Introduction to the chemical analysis of food. London: Jones and Bartlett Publishers; 1994. p. 137-64.
- Poedjiadi Anna. Dasar-dasar biokimia. Jakarta: UI Press; 1994. hal. 8-50, 81-124.
- David HJ, Peck Hazel. Analytical biochemistry. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons Inc; 1993. p. 338-41, 408-11.
- Landercker-Elizabethmoore. Fundamentals of the fungi. 4th ed. New Jersey: Prentice Hall; 1992. p. 15-7.
- Copeland A Robert. Methods for Protein Analysis. New York: Chapman and Hall; 1994. p. 39-51.
- Tri Puspaningsih NY. Pembentukan sel ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) galur baru yang mampu mencerna pati secara langsung menjadi etanol melalui cloning gen amilase. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga; 1999. hal. 24-8.
- Rahman Anshori. Teknologi fermentasi industri II. Bogor: PAU Pangan dan Gizi IPB; 1989. hal. 6-13.
- The United States Pharmacopeia. 25th Ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention Inc; 2002. 2256-60.