

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Fermentasi etanol

Etanol merupakan salah satu produk hasil fermentasi dari bahan yang mengandung gula sederhana, pati, atau bahan berserat lainnya. Bioproses etanol dapat diawali dengan pemecahan gula atau pati menjadi bentuk sederhana yang berlangsung dengan hidrolisis atau reaksi enzimatik (Azizah dkk., 2012). Etanol memiliki rumus kimia  $C_2H_5OH$  dan dikenal juga sebagai alkohol. Etanol dipakai sejak ratusan tahun lalu untuk meragikan gula menjadi arak sebagai minuman keras. Etanol juga dapat dimanfaatkan dalam bidang pengobatan, pangan, pembuatan kosmetik, dan bahan bakar (Sebayang, 2006).

Produksi etanol awalnya dilakukan dalam produksi minuman beralkohol, seperti anggur (*wine*). Produksi alkohol dalam *wine* sendiri telah dilakukan sejak 6000 tahun sebelum masehi (Hawusiwa dkk., 2015). Produksi etanol saat ini banyak dikembangkan untuk bahan bakar pengganti bahan bakar fosil, karena lebih mudah terbakar dan sisa pembakarannya lebih bersih (Singh dan Sharma, 2015).

Mikroorganisme yang paling umum dalam fermentasi alkohol adalah *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* merupakan organisme uniseluler dan umumnya membelah diri. Pada umumnya sel *S. cerevisiae* lebih besar daripada bakteri dengan ukuran beragam yaitu lebar antara 5-6 mikrometer

dan panjangnya lebih dari 6-8 mikrometer. *S. cerevisiae* biasanya memiliki bentuk sel bulat telur, oval, lonjong, atau memanjang dan tidak dilengkapi organ gerak, sehingga bersifat nonmotil, selain itu juga bersifat fakultatif anaerob (Sharma, 1989). Berikut adalah klasifikasi *S. cerevisiae* menurut Sharma (1989):

Kingdom	: Fungi
Filum	: Ascomycota
Kelas	: Hemiascomycetes
Ordo	: Endomycetales
Famili	: Saccharomycetaceae
Genus	: <i>Saccharomyces</i>
Spesies	: <i>S. cerevisiae</i>

Suatu biakan *S. cerevisiae* dapat diidentifikasi kemurninannya melalui beberapa cara. Beberapa diantaranya adalah identifikasi bentuk sel, bentuk koloni, keberadaan spora, dan sifat biokimianya. Uji tersebut antara lain adalah sebagai berikut:

1. Identifikasi Koloni: koloni tunggal *S. cerevisiae* yang tumbuh pada medium agar dapat diidentifikasi berdasarkan bentuk khasnya, yaitu berwarna putih, bentuk bulat, tekstur permukaan halus/rata, dan bila dilihat dari samping tampak cembung atau konveks (Campbell dan Duffus, 1988).
2. Pengecatan *methylene blue*: sel *S. cerevisiae* dapat diwarnai dan diidentifikasi pada pengamatan di bawah mikroskop. Cat *methylene blue* berfungsi untuk menwarnai sel dan mengetahui hidup atau matinya suatu biakan, karena biakan yang mati tidak memiliki membran sel yang

selektif, sehingga sitoplasma dapat terwarnai menjadi biru, sedangkan sel hidup yang memiliki membran selektif-*permeable* dapat menahan cat pada membran sel sehingga sitoplasma tidak berwarna. Cat yang digunakan juga dapat menunjukkan bentuk sel pada suatu biakan, dan pada *S. cerevisiae* berbentuk bulat lonjong atau oval (Campbell dan Duffus, 1988).

3. Pengecatan *Ziehl Neelsen*: pengecatan ini dilakukan untuk mengetahui sifat tahan asam suatu biakan, yaitu merah bila tahan asam dan biru bila tidak tahan asam. Cat pada pengecatan *Ziehl Neelsen* adalah sebagai berikut :

- a) Zn A (karbol fuksin): berfungsi sebagai cat utama (berwarna merah).
- b) Zn B (etanol) : berfungsi sebagai peluntur cat utama.
- c) Zn C (*methylen blue*): berfungsi sebagai larutan pembeding (berwarna biru).

Pada *S. cerevisiae*, sel tidak tahan asam, sehingga akan berwarna biru pada dinding sel setelah pengecatan, selain itu juga terdapat spora pada sel *S. cerevisiae*. Spora tersebut juga tidak tahan asam sehingga pada pengecatan akan tampak warna biru pada spora di dalam sel (Maneval, 1936).

4. Uji biokimia: uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan biakan dalam mencerna atau memfermentasi beberapa jenis gula. Gula yang umum digunakan untuk menguji *S. cerevisiae* adalah glukosa, sukrosa,

dan laktosa. Hasil dinyatakan positif fermentasi bila terdapat perubahan pH menjadi asam dan terdapat gas CO<sub>2</sub> atau gelembung (Campbell dan Duffus, 1988)..

Khamir *Saccharomyces cerevisiae* mampu mengubah gula menjadi etanol karena memiliki enzim invertase dan zimase yang dapat digunakan untuk mengkonversi gula dari golongan monosakarida maupun disakarida. Enzim invertase memecah gula disakarida menjadi monosakarida, dilanjutkan oleh enzim zimase mengubah monosakarida menjadi etanol dan CO<sub>2</sub>. Khamir ini tidak mampu mengkonversi galaktosa menjadi etanol, tetapi bekerja lebih baik pada substrat dengan kandungan glukosa (Judoamidjojo dkk., 1992).

Menurut Azizah dkk. (2012), produksi etanol umumnya dilakukan oleh khamir *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* ini memiliki beberapa kelebihan daripada mikroorganisme penghasil etanol yang lain, di antaranya adalah:

1. Tingkat adaptasi tinggi terhadap lingkungan pertumbuhan, sehingga mudah untuk dilakukan kontrol pertumbuhan.
2. Toleransi terhadap kadar alkohol tinggi, sehingga fermentasi tetap dapat berjalan karena khamir tidak mati akibat kandungan alkohol.
3. Mudah didapat karena tingkat produksi sel yang tinggi dengan memanfaatkan sifatnya yang mudah tumbuh.
4. Mampu menghasilkan alkohol cukup tinggi, yaitu 18-20% (v/v).

Proses produksi alkohol atau *wine* oleh *Saccharomyces cerevisiae* dipengaruhi oleh beberapa faktor. Beberapa diantaranya adalah kondisi substrat, lama fermentasi, suhu fermentasi, pH fermentasi, dan keberadaan oksigen. Pengaruh hal-hal tersebut adalah sebagai berikut:

1. Substrat fermentasi.

Substrat fermentasi etanol harus dibuat dari bahan yang mengandung gula atau karbohidrat lainnya sebagai sumber energi (Kunaepah, 2008).

2. Lama fermentasi.

Lama fermentasi dalam bioproses etanol optimal adalah 3 hari, setelah 3 hari kadar alkohol justru berkurang karena alkohol akan dikonversi menjadi senyawa lain, misalnya ester (Sari dkk., 2008).

3. Suhu fermentasi.

Suhu fermentasi optimal yaitu 30-35°C dengan suhu terendah 20°C dan suhu tertinggi 35°C, karena suhu yang terlalu rendah akan memperlambat fermentasi dan suhu yang terlalu tinggi menyebabkan kematian khamir (Kumalasari, 2011).

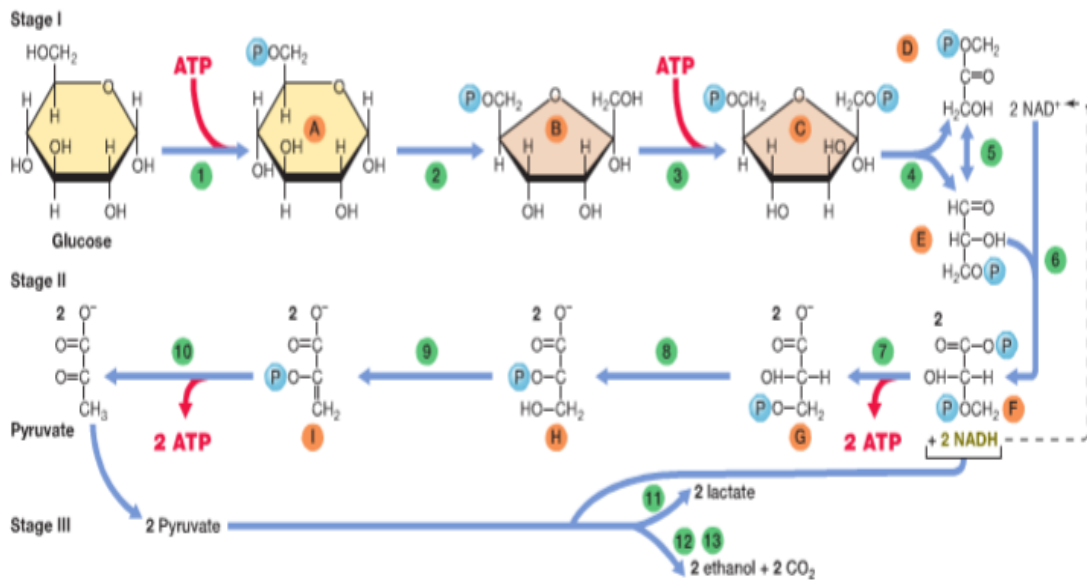
4. pH fermentasi.

Derajat keasaman optimal yaitu pH 3,5-6,5 karena dalam kondisi basa khamir tidak dapat tumbuh dan fermentasi tidak terjadi (Roukas, 1994).

5. Kandungan oksigen.

Khamir membutuhkan oksigen (aerob) saat pembuatan *starter*, tetapi tidak membutuhkan oksigen (anaerob) saat proses fermentasi.

Etanol dibentuk melalui *reaksi Embden Meyerhof Parnas (EMP)* atau jalur glikolisis. Glikolisis yang terjadi secara anaerobik akan menghasilkan piruvat yang akan dioksidasi oleh enzim alkohol dehydrogenase. Reaksi tersebut dapat dilihat seperti pada Gambar 1



Gambar 1. Jalur bioproses etanol pada jalur glikolisis  
(Sumber: Madigan dkk., 2012).

**Keterangan:** Biosintesis etanol terjadi di jalur *Embden Meyerhof Parnas (EMP)* atau glikolisis. Biosintesis pada awalnya dimulai dengan pengubahan glukosa menjadi 6-fruktosa dan dipecah menjadi gliseraldehid 3-fosfat (G3P) (Tahap 1), kemudian G3P dipecah untuk menghasilkan NADH dan piruvat (Tahap 2), dan pada akhirnya piruvat dioksidasi oleh alkohol dehidrogenase menjadi alkohol (Madigan dkk., 2012).

Pembentukan alkohol atau etanol dipengaruhi oleh beberapa gen. salah satunya adalah gen pengatur transport asam amino seperti gen *GAP1*, *BAP2*, *BAP3*, *MMP1*, dan *MMP1*. Gen lain yang berpengaruh adalah gen pembentuk enzim dekarboksilase seperti gen *PDC1*, *PDC5*, *PDC6*, *THI3*, dan *ARO10*. Namun, gen yang paling berpengaruh adalah gen pembentuk enzim alkohol dehidrogenase, yaitu gen *ADH1* (Barbosa dkk., 2015),

### **B. Pengembangan Galur *Saccharomyces cerevisiae***

Produksi etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* saat ini memiliki banyak kekurangan atau kendala, seperti hasil etanol yang tidak terlalu tinggi (5-30%) sehingga sulit didapatkan etanol pada jumlah banyak dalam waktu yang singkat seperti pada tahun 2015 yang hanya dihasilkan 500 ribu kiloliter sehingga tidak dapat memenuhi permintaan yaitu 3 juta kiloliter/tahun (Kemenprin, 2016). Optimalisasi produksi etanol terus dilakukan, umumnya dengan rekayasa bioreaktor atau sering disebut *fermentation engineering*, namun hal tersebut tetap memiliki batasan karena produksi etanol ditentukan oleh produktivitas mikroorganisme fermentor, seperti *Saccharomyces cerevisiae*. Oleh karena itu, dibutuhkan *Saccharomyces cerevisiae* yang dapat memproduksi lebih banyak etanol. Pengembangan galur dilakukan untuk memperoleh galur *Saccharomyces cerevisiae* yang dapat memproduksi etanol lebih banyak daripada *Saccharomyces cerevisiae wild-type* atau galur lain yang sering digunakan saat ini (Singh dan Sharma, 2015).

Pengembangan galur *Saccharomyces cerevisiae* dapat dilakukan dengan cara yang berbeda-beda. Cara yang digunakan dapat dilakukan secara kompleks maupun sederhana. Menurut Steensels dkk (2014) beberapa cara pengembangan galur *S. cerevisiae* adalah sebagai berikut:

1. Hibridisasi seksual

Khamir seperti *Saccharomyces cerevisiae* dapat melakukan reproduksi seksual dengan cara sporulasi. Hibridisasi seksual dilakukan untuk mendapatkan khamir dengan sifat gabungan dari khamir parental yang dipilih.

2. Fusi protoplas

Sama seperti hibridisasi seksual namun dapat dilakukan dengan parental yang tidak mungkin mendapat keturunan dengan cara sporulasi. Fusi protoplas dilakukan dengan mendegradasi dinding sel kedua parental dan menggabungkan kedua sel secara paksa. Sel yang digabung tersebut dapat hidup dan memiliki sifat dari kedua parental.

3. Rekayasa evolusi (*Evolutionary Engineering*)

Rekayasa evolusi merupakan cara terbaru dalam pengembangan atau rekayasa genetik, seperti pada pengembangan galur *Saccharomyces cerevisiae*. Metode ini menggabungkan beberapa metode rekayasa genetika untuk mendapatkan suatu spesies baru dengan sifat yang diinginkan, sehingga metode ini sering disebut evolusi terarah (*Directed Evolution*). Namun cara ini masih sangat baru, rumit, dan mahal.



#### 4. Mutagenesis

Mutagenesis merupakan cara pengembangan galur mikroorganisme seperti *Saccharomyces cerevisiae* yang cepat dan sederhana namun bersifat acak. Mutagenesis dapat dilakukan dengan menggunakan cara fisika seperti radiasi sinar UV dan dengan cara paparan senyawa kimia seperti *Ethylmethanosulfonate* (EMS), Methylnitrosoguanidine (MNNG), dan Dithiotritol. Senyawa kimia yang dapat memutasi disebut mutagen.

Pada penelitian ini akan dilakukan pengembangan galur dengan prinsip mutagenesis kimiawi, yaitu memaparkan senyawa kimia untuk memperoleh organisme yang memiliki sifat baru atau berbeda dengan sebelumnya. Senyawa yang dapat memutasi suatu makhluk hidup disebut sebagai mutagen. Menurut Najafi dan Pezeshki (2013), mutagen dapat dibagi berdasarkan sifatnya sebagai berikut:

1. Senyawa yang dapat memodifikasi basa pada DNA sehingga dapat menyerupai basa lain. Sebagai contoh adalah senyawa pengalkilasi dapat mengubah basa sitosin menjadi urasil yang dapat berpasangan dengan adenine, sehingga pasangan semula C-G dapat berubah menjadi T-A. Contoh senyawa tersebut adalah Etilmethanosulfonate (EMS) dan nitrosoguanidin (NG).
2. Mutagen yang dapat menginduksi perubahan formasi, seperti delesi dan insersi. Senyawa tersebut meliputi proflavin dan etidium bromida.

3. Mutagen yang hanya menyerang sel yang tumbuh atau membelah. Senyawa tersebut terdiri dari analog gugus basa seperti bromourasil yang merupakan analog timin dan adenin.

Pada beberapa penelitian sebelumnya, telah digunakan beberapa mutagen untuk pengembangan galur *Saccharomyces cerevisiae*. Mutagenesis yang digunakan dapat dibagi menjadi dua, yaitu fisik dan kimia. Beberapa contohnya adalah sebagai berikut:

1. Mutagen fisik : mutagenesis menggunakan sinar ultraviolet atau UV telah dilakukan dan didapatkan *S. cerevisiae* yang memproduksi alkohol lebih banyak daripada galur liar (Talaria dkk., 2012). Namun, mutagenesis menggunakan radiasi gelombang mikro menghasilkan *S. cerevisiae* yang memproduksi alkohol lebih sedikit daripada galur liar (Singh dan Sharma, 2015).
2. Mutagen kimia : mutagenesis menggunakan senyawa seperti ethylmetanosulfonat (EMS) dan dithiotritol didapatkan *S. cerevisiae* yang memproduksi alkohol lebih banyak daripada galur liar (Singh dan Sharma, 2015; dan Hemmati dkk., 2012). Namun, mutagenesis menggunakan 5-bromouracil, Acriflavin, Allythiourea, dan Acridine menghasilkan *S. cerevisiae* yang memproduksi alkohol lebih sedikit daripada galur liar (Singh dan Sharma, 2015).

Menurut Singh dan Sharma (2015), beberapa mutagen yang digunakan pada penelitiannya menghasilkan mutan yang hasil etanolnya

lebih sedikit daripada galur liar. Hal tersebut dinyatakan oleh Singh dan Sharma (2015) sebagai mutasi yang merugikan. Menurut Hemmati dkk., (2012), peningkatan produksi alkohol oleh mutan disebabkan oleh perubahan struktur protein membrane sel pada sel *S. cerevisiae*, sehingga meningkatkan respon stress yang berujung pada peningkatan produksi alkohol sebagai bentuk respon terhadap stres.

### C. Jahe sebagai Mutagen

Jahe merupakan komoditas rimpang yang banyak dibudidayakan di Indonesia. Jahe banyak dibudidayakan karena banyak dimanfaatkan mulai dari bumbu masakan sampai sebagai obat. Jahe sendiri memiliki khasiat sebagai obat masuk angin dan obat sakit perut. Hal ini didukung dengan adanya kandungan antioksidan seperti gingerol dan kurkumin yang berkhasiat sebagai antioksidan (Setyaningrum dan Saparinto, 2013). Menurut Setyaningrum dan Saparinto (2013), klasifikasi jahe adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Ordo	: Zingiberales
Famili	: Zingiberaceae
Genus	: <i>Zingiber</i>
Spesies	: <i>Zingiber officinale</i>

Jahe mengandung banyak senyawa fenolik selain gingerol, seperti shogaol, curcumin, zingerone, dan lain-lain. Jenis fenol pada jahe dapat diukur menggunakan HPLC. Kandungan jahe yang dianalisis menggunakan

*High Performance Liquid Chromatography* yang dilakukan oleh Hasan dkk (2012) dapat dilihat pada Tabel 1.

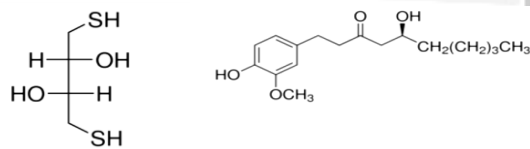
Tabel 1. Kandungan pada jahe yang dianalisis menggunakan HPLC

Sekuens	Komponen	Waktu Retensi	% area puncak (ekstrak methanol)	% area puncak (ekstrak heksana)
1	Gingerol	1,38	25	23
2	Zingerone	2,68	9	6
3	$\beta$ -bisabolene	3,61	4	5
4	$\alpha$ -farnesene	4,29	11	7
5	Shogaol	5,28	18	25
6	$\beta$ -sesquiphellandrene	6,62	9	13
7	$\alpha$ -curcumin	7,19	14	0

Sumber : Hasan dkk (2012)

Jahe dipilih dalam penelitian ini karena telah terbukti mengandung 6-gingerol yang bersifat mutagenik pada *Salmonella typhimurium strain* TA 100 dan TA 1535 (Nagabhushan dkk, 1987). Hal ini disebabkan oleh cincin alifatik gingerol yang memiliki gugus hidroksil (Nakamura dan Yamamoto, 1983). Menurut Najafi dan Pezeshki (2013), kandungan gugus hidroksil tersebut dapat bersifat radikal dan dapat menyebabkan kerusakan oksidatif (stres oksidatif) pada DNA, yaitu dapat menyebabkan terjadinya salah pasang (transversi) pada DNA sehingga dapat terbentuk susunan DNA baru (berubah sifat). 6-gingerol sendiri juga telah terbukti bersifat genotoksik pada sel hepatoma G2 manusia pada pemberian kadar 20-80  $\mu$ M selama 40-60 menit, akibat stress oksidatif (Yang dkk., 2010).

Menurut Singh dan Sharma (2015), dithiotritol (DTT) memiliki sifat redoks kuat akibat kandungan sulfihidril yang dapat menyebabkan reaksi oksidasi-reduksi pada cincin DNA, sifat tersebut dapat menyebabkan stres oksidatif pada cincin DNA. Menurut Nakamura dan Yamamoto (1983), gingerol sendiri juga memiliki sifat redoks tersebut, padahal gingerol dikenal memiliki sifat antioksidan. Namun, gingerol pada konsentrasi tinggi akan dapat menyebabkan kerusakan oksidatif. Oleh karena itu, meskipun Dithitritol dan Gingerol memiliki struktur yang berbeda (Gambar 2), namun keduanya dapat menyebabkan mutasi secara stres oksidatif yang pada Dithiotritol disebabkan oleh adanya gugus sulfihidril dan pada Gingerol disebabkan oleh gugus hidroksil pada cincin alifatik.

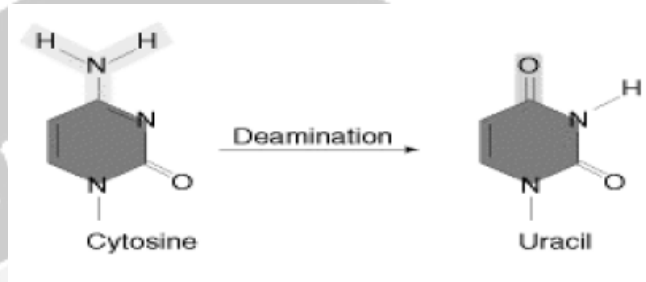


Gambar 2. Struktur Dithiotritol (kiri) dan Gingerol (kanan)  
(Sumber: Sigma-Aldrich, 2016).

**Keterangan:** Dithiotritol memiliki gugus sulfihidril (SH) sedangkan gingerol memiliki gugus hidroksil di cincin alifatiknya, keduanya dapat menyebabkan stres oksidatif pada rantai DNA (Singh dan Sharma, 2015; Nakamura dan Yamamoto, 1983)

Stres oksidatif tersebut dapat menyebabkan perubahan rangkaian basa DNA. Perubahan tersebut disebut juga dengan mekanisme substitusi nukleotida, terjadi perubahan satu basa nukleotida pada rangkaian DNA. Sebagai contoh adalah sitosin yang dapat teroksidasi dan kehilangan gugus

amino (deaminasi) sehingga berubah menjadi urasil yang dapat dilihat di Gambar 3 (Najafi dan Pezeshki, 2013).



Gambar 3. Deaminasi sitosin (Sumber: Najafi dan Pezeshki, 2013).

**Keterangan:** Oksidasi pada gugus amino sitosin dapat menghilangkan gugus amino (deaminasi) dan mengubah sitosin menjadi urasil (Najafi dan Pezeshki, 2013).

#### D. Ekstraksi Jahe

Gingerol dan Shogaol pada jahe dapat diekstrak menggunakan pelarut semi-polar seperti metanol. Pelarut metanol digunakan pada ekstraksi jahe karena sifat semi-polarnya dapat melarutkan kandungan polar maupun semi-polar pada jahe (Hasan dkk., 2012). Ekstrak metanol jahe juga sudah terbukti mengandung 6-gingerol pada jahe sebanyak 5,76% w/w, sedangkan ekstrak air jahe mengandung 6-gingerol sebanyak 4,58% w/w (Usman dkk., 2013). Oleh karena itu, metanol digunakan untuk mengekstrak kandungan fitokimia pada jahe.

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode soxhletasi karena dapat mengekstrak gingerol yang relatif tidak tahan panas. Soxhletasi juga dapat mengekstrak lebih banyak gingerol dan shogaol dengan pelarut yang sedikit.

Hasil soxhlet kemudian dipekatkan menggunakan *Rotary Evaporator* untuk memisahkan ekstrak dengan pelarut (Hasan dkk., 2012).

Hasil ekstraksi jahe kemudian diuji kandungan fitokimianya. Uji fitokimia akan dilakukan terhadap kandungan alkaloid, flavonoid, triterpenoid-steroid, tanin, dan saponin pada ekstrak. Uji fitokimia akan dilakukan menggunakan metode yang dilakukan oleh Bhargava dkk.(2012). Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan fitokimia pada ekstrak jahe, terutama kandungan gingerol yang merupakan golongan flavonoid (Sigma-Aldrich, 2016).

#### **E. *Pre-treatment* pada *Saccharomyces cerevisiae***

Ekstrak jahe yang sudah diperoleh kemudian dilarutkan menjadi beberapa konsentrasi, yaitu 5, 10, dan 15% mengikuti kadar ethylmetanosulfonat pada mutagenesis yang dilakukan oleh Hemmati dkk (2012). Larutan ekstrak kemudian digunakan pada *pre-treatment* bersama aquades dan minyak jahe 10% sebagai kontrol pembanding. Menurut Bode dan Dong (2011), minyak jahe mengandung oleoresin, yaitu kandungan senyawa volatil pada jahe yang berupa campuran senyawa flavonoid atau fenolik dengan terpenoid. Oleoresin pada jahe mengandung senyawa fenolik seperti shogaol dan gingerol, sehingga dapat digunakan sebagai pengganti gingerol untuk kontrol positif pada *pre-treatment*.

*Pre-treatment* dilakukan dengan menginkubasi biakan *Saccharomyces cerevisiae* berumur 24 jam pada larutan ekstrak selama 30 menit. Perbandingan ekstrak dengan biakan adalah 10:1, hal ini dilakukan untuk memaparkan biakan pada mutagen secara merata (Hemmati dkk., 2012).

Biakan kemudian dipisahkan dari larutan menggunakan sentrifugasi, sehingga biakan yang terendapkan dapat terpisah dari larutan. Biakan kemudian di *plating* pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) kemudian diinkubasi pada suhu 27°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh pada tiap perlakuan dihitung dan dibandingkan dengan jumlah koloni pada perlakuan kontrol negatif. Hal ini dilakukan untuk mengetahui tingkat mortalitas pada tiap perlakuan. Koloni pada perlakuan kontrol negatif dianggap sebagai populasi awal ( $P_0$ ), sedangkan koloni yang tumbuh pada perlakuan dianggap sebagai populasi hidup ( $P_1$ ), mortalitas koloni dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Mortalitas} = \frac{P_0 - P_1}{P_0} \times 100\%$$

(Hemmati dkk., 2012)

## F. Produksi Alkohol

Fermentasi atau produksi etanol dilakukan untuk membandingkan hasil produksi etanol dari *Saccharomyces cerevisiae* kontrol dan *Saccharomyces cerevisiae* yang diberi perlakuan *pre-treatment* (perlakuan



sebelum fermentasi) dengan ekstrak jahe, selain itu juga untuk melihat keberhasilan dari *pre-treatment*. Produksi etanol dilakukan dengan menggunakan medium molase. Molase dipilih karena mudah didapat dan memiliki kandungan gula sukrosa yang tinggi, yaitu antara 25-40%. Sukrosa sendiri merupakan gula disakarida, sehingga mudah dipecah dan mempermudah khamir dalam fermentasi (Rochani dkk., 2016).

Produksi etanol dilakukan pada medium molase 18% dengan masing-masing khamir selama 3 hari atau 72 jam. Molase yang digunakan adalah sebesar 18% karena menurut penelitian Rochani dkk (2016), molase 18% dapat difermentasi dan menghasilkan alkohol yang lebih tinggi daripada molase 16 dan 20%. Hasil etanol dari tiap khamir kemudian diukur pada jam ke-72 (Rochani dkk., 2016).

Selama 72 jam fermentasi, kadar gula pada substrat fermentasi diukur, pengukuran dilakukan menggunakan metode pengukuran gula reduksi. Pengukuran gula reduksi dilakukan karena pada substrat yang mengandung gula juga terkandung gula yang bersifat reduktif. Gula pereduksi ini dapat bereaksi dengan reagen Nelson sehingga dapat menimbulkan warna, intensitas warna tersebut dapat digunakan untuk mewakili konsentrasi gula reduksi yang dapat mewakili konsentrasi gula pada substrat (Buckee dan Hargitt, 1978).

Pengukuran gula reduksi juga dapat digunakan untuk mengetahui pola pertumbuhan *S. cerevisiae*. Menurut Buckee dan Hargitt (1978), *S. cerevisiae* pada jam ke-0 sampai jam ke-24 akan tumbuh dengan cepat, sehingga

mengonsumsi gula dalam jumlah banyak. Setelah 24 jam, pertumbuhan akan melambat dan konsumsi gula menurun. Hal tersebut terjadi karena jumlah sel tinggi sedangkan sumber gula sedikit, sehingga konsumsi gula dan pertumbuhan sel melambat.

Pengukuran kadar alkohol dilakukan menggunakan *gas chromatography* dan alhokolmeter. Hal ini dilakukan untuk membandingkan hasil dengan pembacaan alkohol oleh kedua alat. Kedua metode tersebut memiliki kelebihan dan kekurangan sebagai berikut :

1. Kromatografi gas : mengukur kadar alkohol berdasarkan gugus OH pada rantai etil alkohol. Kelebihan : pembacaan akurat dan spesifik, memerlukan sedikit sampel. Kekurangan : memerlukan kurva standar, alat penggunaan sedikit rumit, sehingga perlu pelatihan (Held, 2012).
2. Alkoholmeter atau hidrometer alkohol : mengukur kadar alkohol berdasarkan perbandingan berat jenis air dan alkohol. Kelebihan : alat tersedia dan dapat dibeli dengan harga terjangkau, penggunaan mudah, dan tidak memerlukan kurva standar. Kekurangan : pembacaan dapat terganggu bila terdapat bahan lain yang memiliki berat jenis berbeda dan dalam jumlah banyak, sehingga pembacaan kurang akurat (Held, 2012).

## G. Hipotesis

1. *Pre-treatment* pada *Saccharomyces cerevisiae* dengan ekstrak jahe akan mempengaruhi produksi alkohol. Alkohol yang diproduksi oleh *Saccharomyces cerevisiae* hasil *pre-treatment* akan lebih tinggi kurang lebih 1% daripada *S. cerevisiae* perlakuan kontrol.
2. *Pre-treatment* menggunakan jahe akan menyebabkan perubahan pada *S. cerevisiae*, sehingga diperoleh galur mutan yang produksi alkoholnya lebih tinggi.

