

KARAKTER METABOLISME ETANOL PADA *MONASCUS* SP. MM YANG BERSIFAT TAHAN TERHADAP ETANOL KONSENTRASI TINGGI

METABOLICSM CHARACTER OF ETHANOL OF *MONASCUS* SP. MM TOLERANT TO ETHANOL AT HIGH CONCENTRATION

Nandang Suharna dan Heddy Julistiono

Balitbang Mikrobiologi, Puslitbang Biologi-LIPI

ABSTRACT

A study was carried out to know ethanol metabolism character of *Monascus* sp. MM, which is tolerant to ethanol at high concentration. Previously inoculum of the fungus were prepared as disk agar after grown on tap water agar medium for two weeks. Each inoculum was then inoculated into media containing 40% of ethanol as sole carbon source, or 20 % of glucose and amonium (1 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$) or 20 % of glucose and nitrate (1 g/l KNO_3). The cultures were incubated at 30°C. After 0, 1, 5, 6, and 8 days of incubation, supernatants were harvested for analyzing ethanol and acetic acid contents by using gas chromatography. The weight measurement of fungal mass was done by means of weighing of dry weight of the fungal mass. The dry weight was achieved by drying the fungal mass at 105 °C for 3 hours. The results showed that the fungus could grow well in 40% of ethanol medium as increase of 0.02 g the fungal mass after eight days of incubation, and ethanol concentration decreased to 22%. In this culture, acetic acid was not detected. After 3 days of incubation, 1.02 % of ethanol was detected in medium containing glucose and amonium. Ethanol (0.16 %) could be detected in medium containing glucose and nitrate at 5 days of incubation. The data indicated that the *Monascus* sp. MM had a capability of degrading ethanol and growing at high concentration of ethanol. Therefore, this strain may be useful for analyzing defense mechanism against ethanol toxicity.

Key words : *Monascus* sp. MM, ethanol metabolism, ethanol tolerance

ABSTRAK

Sebuah studi telah dilakukan untuk mengetahui karakter metabolisme etanol pada *Monascus* sp. MM, yang toleran terhadap etanol konsentrasi tinggi. Terlebih dahulu inokulum jamur dipersiapkan sebagai agar cakram setelah ditumbuhkan pada media agar air keran selama dua minggu. Inokulum ini kemudian diinokulasikan pada media yang mengandung etanol 40% sebagai sumber karbon tunggal, atau media campuran glukosa 20% dan amonium (1 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$) atau media campuran glukosa 20% dan nitrat (1 g/l KNO_3). Biakan diinkubasikan pada suhu 30 °C. Setelah 0, 1, 5, 6, and 8 hari masa inkubation, supernatan dipanen untuk analisis kandungan etanol and asam asetat dengan menggunakan kromatografi gas. Pengukuran berat massa jamur dilakukan dengan cara menimbang berat keringnya. Berat kering tersebut diperoleh dengan pengeringan massa jamur pada suhu 105 °C selama 3 jam. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa jamurnya dapat tumbuh dengan baik pada medium etanol 40% yang diperlihatkan dengan penambahan massa jamur sebanyak 0.02 g setelah delapan hari masa inkubasi, dan konsentrasi etanol menurun menjadi 22%. Pada

biakan ini asam asetat tidak terdeteksi. Setelah 3 hari inkubasi, terdeteksi sebesar 1,02% pada media campuran yang mengandung glukosa dan amonium. Demikian pula etanol dapat terdeteksi sebesar 0,16% pada medium yang campuran glukosa dan nitrat sejak hari ke 5 masa inkubasi. Berdasarkan penelitian ini menunjukkan bahwa *Monascus* sp. MM memiliki kemampuan untuk mendegradasi dan tumbuh pada konsentrasi etanol yang tinggi. Oleh karena itu, jamur ini mungkin dapat berguna dalam menganalisis mekanisme pertahanan terhadap toksisitas etanol.

Kata kunci : *Monascus* sp. MM, metabolisme etanol, toleransi etanol

PENDAHULUAN

Jenis-jenis *Monascus* lebih dikenal sebagai jamur penting dalam produksi makanan-makanan fermentasi Asia, terutama Cina, Filipina, Jepang, Thailand, dan Indonesia (Steinkraus, 1983). Produk-produk tersebut terutama adalah beras merah (ang-kak), *red wine*, *rice wine*, *kaoliang brandy*, keju kacang kedelai dan pigmen-pigmen pewarna makanan (Hawksworth and Pitt, 1983; Steinkraus, 1983). Setidaknya banyak anggota dari jamur ini dikenal sebagai tipe jamur dengan habitat yang bersifat osmofilik yang seringkali diisolasi dari bahan-bahan pangan atau substrat-substrat lain yang memiliki aktivitas air yang rendah, walaupun dua jenis *Monascus* yaitu *M. pallens* dan *M. sanguineus* tidak atau sedikit menunjukkan pertumbuhannya pada media dengan aktivitas air yang rendah (Cannon *et al.*, 1995).

Berdasarkan hasil pengerjaan isolasi yang telah dilakukan diketahui ada jamur-jamur *Monascus* yang berada dalam keadaan tunggal, tanpa kehadiran mikroba lain, yang tumbuh dengan baik pada beberapa spesimen binatang yang diawetkan di dalam alkohol 70% (Suharna, 1998). Namun dari enam jenis *Monascus* yang dikenal yaitu *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. ruber* (Hawksworth and Pitt, 1983), *M. floridanus* (Barnard and Cannon, 1987), *M. sanguineus*, dan *M. pallens* (Cannon *et al.*, 1995), sejauh informasi yang di dapat, tidak satupun ditemukan atau diisolasi dari alkohol. Walaupun Barnard and Cannon (1987) menemukan bahwa *M. floridanus* yang diisolasi dari akar pohon Pinus diperoleh sewaktu dilakukan pengerjaan sterilisasi dengan alkohol 95% dan dibakar dahulu sebelum penanaman pada media agar, bahkan hasil isolasi meningkat 5-10 kali lipat daripada tanpa cara ini, *Monascus* yang diisolasi dari spesimen binatang yang diawetkan di dalam alkohol 70% tersebut ternyata memiliki karakter-karakter kultural dan morfologis yang berbeda dengan *M. floridanus* maupun kelima jenis *Monascus* yang lain (Suharna, 1998). Dari data yang diperoleh, diperkirakan ada jamur-jamur *Monascus* yang diisolasi tersebut bukan termasuk keenam jenis *Monascus* yang dikenal.

Hal yang juga menarik untuk diselidiki lebih lanjut adalah aspek-aspek fisiologi dari jamur *Monascus* yang tahan terhadap etanol konsentrasi tinggi. Diketahui bahwa hanya strain *Monascus* sp. MM yang dapat tumbuh pada spesimen udang yang diawetkan dengan alkohol 70%. Namun demikian, kemampuan jamur tersebut mendegradasi etanol dengan kadar tinggi belum diketahui. Pada suhu kamar, khamir *Saccharomyces cerevisiae* galur industrio D1 dan D2 berhenti tumbuh pada etanol 20 % dan mati sekitar 2 jam kemudian (data tidak dipublikasi). Penelitian ini dilakukan untuk memastikan adanya sifat respirofermentasi pada *Monascus* sp. MM dengan etanol kadar tinggi (40%) atau glukosa sebagai sumber karbon. Sebagai pembanding, dilakukan penelitian yang sama terhadap *M. purpureus* NGK yang bukan berasal dari habitat etanol.

BAHAN DAN CARA KERJA

Jamur. *Monascus* sp. MM dan *M. purpureus* NGK diperoleh dari koleksi Balitbang Mikrobiologi, Puslitbang Biologi-LIPI. Isolat pertama merupakan hasil isolasi dari salah satu spesimen binatang yang diawetkan dalam alkohol 70%.

Media untuk mengetahui degradasi etanol. Untuk mengetahui adanya aktivitas degradasi etanol oleh *Monascus* sp. MM dibuat media dengan etanol sebagai sumber karbon tunggal dengan kadar 40%. Dalam 1 liter media mengandung KH_2PO_4 1,0 g.; KNO_3 1,0 g; KCl 0,5 g. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g.

Produksi etanol dan asam asetat.

Pengaruh nitrat terhadap fermentasi etanol. Untuk mengetahui adanya produksi etanol dan asam asetat pada media glukosa yang mengandung nitrat oleh *Monascus* sp. MM, maka dibuat media dengan komposisi sebagai berikut KH_2PO_4 1,0 g.; KNO_3 1,0; KCl 0,5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g.; glukosa 200 g; air suling steril ditambahkan sehingga tercapai volume 1 l.

Pengaruh amonium terhadap fermentasi etanol. Untuk mengetahui adanya pengaruh amonium terhadap produksi etanol atau asam asetat maka dibuat media yang mengandung : $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 1,0 g; KCl 0,5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; glukosa 200 g; air suling steril ditambahkan sehingga tercapai volume 1 l

Inokulum dan pertumbuhan. Inokulum dipersiapkan dengan cara menanamkan biak *Monascus* sp. MM pada media agar air keran. Setelah tumbuh, inokulum dibuat dengan cara membuat cetakan berbentuk cakram berdiameter 10 mm yang kemudian diinokulasikan

pada media cair sebanyak 20 ml. Sterilisasi dengan menggunakan autoklaf dilakukan suhu 121°C selama 15 menit. Sedangkan sterilisasi dengan menggunakan oven dilakukan pada 160°C selama 2 jam. Untuk pembuatan media beralkohol, penambahan etanol dilakukan setelah sterilisasi dilakukan. Inkubasi untuk semua biakan dilakukan pada suhu kamar.

Deteksi etanol dan asam asetat. Sampel dari setiap kultur diambil supernatannya. Kemudian dianalisis etanol dan asam asetat menggunakan kromatografi gas Shimadzu 14B dengan kolom Porapak Q dan detektor FID. Standar etanol dan asam asetat yang terkandung dengan yang digunakan adalah 10% v/v. Tekanan udara 50 kPa, tekanan hidrogen 70 kPa, tekanan eluen 400 kPa. Suhu injektor 190°C, suhu detektor 200°C, dan suhu kolom 170°C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kemampuan Degradasi etanol pada media etanol 40%.

Kemampuan jamur dalam mendegradasi etanol dapat dilihat pada tabel 1. Dari tabel tersebut terlihat bahwa sampai hari ke 8, tidak ditemui penurunan kadar etanol dalam media yang ditumbuhi *M. purpureus*. Sedang pada media yang ditumbuhi *Monascus* sp. MM, kandungan etanolnya turun hampir separuhnya, yakni dari 40% menjadi 22%. Untuk meyakinkan bahwa pengurangan kadar etanol bukan dari penguapan biasa, diukur pula etanol dari media yang mengandung etanol 40 % tanpa jamur. Pada hari ke 8, tidak ditemui penurunan kadar etanol (data tidak diperlihatkan). Hal ini berarti bahwa penurunan kadar etanol tersebut akibat aktivitas jamur *Monascus* sp. MM.

Tabel 1. Degradasi etanol pada media etanol 40%

Jamur	Kandungan etanol (%) pada media		
	0 hari	1 hari	8 hari
<i>Monascus purpureus</i> NGK	40	40	40
<i>Monascus</i> sp. MM	40	40	22

Paralel dengan kemampuan menurunkan kadar etanol dalam media, maka berat total kering jamur *Monascus* sp. MM juga bertambah sebanyak 0,1 g dalam 8 hari, sedangkan *M. purpureus* tidak bertambah (Tabel 2).

Tabel 2. Pertumbuhan jamur pada media etanol 40%

Jamur	Pertambahan berat kering (g)	
	0 hari	8 hari
<i>Monascus purpureus</i> NGK	0.00	0.00
<i>Monascus</i> sp. MM	0.00	0.01

Dari kedua tabel tersebut dapat ditunjukkan bahwa jamur *Monascus* sp. MM tahan terhadap etanol 40 % dan dapat menggunakannya sebagai satu-satunya sumber karbon untuk energi serta pertumbuhan biomasnya.

Kemampuan fermentasi pada jamur *Monascus* sp. MM dapat dilihat pada Tabel 3. Dari data tersebut terlihat bahwa jamur dapat melakukan fermentasi dengan menghasilkan etanol jika pada media terdapat glukosa. Seperti yang terlihat pada tabel, efektivitas fermentasi mungkin lebih baik jika sebagai sumber nitrogennya adalah amonium.

Pada media yang mengandung etanol atau glukosa yang ditumbuhi kedua jenis jamur tersebut tidak ditemukan asam asetat (Tabel 4). Dari data ini terlihat bahwa metabolisme etanol oleh jamur *Monascus* sp. MM tidak terjadi akumulasi asetat. Akumulasi asetat dapat menggambarkan adanya akumulasi asetaldehida (Jones, 1989). Dari review tentang mekanisme ketahanan sel terhadap etanol yang dijabarkan oleh Jones (1989) disimpulkan bahwa akumulasi asetaldehida merupakan satu mekanisme berhentinya metabolisme fungsional pada khamir yang menggunakan etanol karena aktivitas metabolik berhenti pada etanol berkadar 60 g/l sedang akumulasi esetaldehida tidak berhenti sampai etanol sebanyak 160 g/l. Tidak ditemukannya asetat pada biak *Monascus* sp. MM mungkin berhubungan dengan mekanisme metabolisme asetaldehida. Beberapa jalur metabolisme asetaldehida sudah diketahui, namun jalur alternatif yang melibatkan asetaldehida oksidase (E.C. 1.2.3.1) : aldehida + H₂O + O₂ + superoksida dapat menyebabkan keracunan.

Produksi etanol dan asam asetat (%) oleh *Monascus* sp. MM

Tabel 3. Produksi etanol (%) oleh *Monascus* sp. MM

Medium	Kandungan etanol (%) pada media					
	0 hari	1 hari	3 hari	5 hari	6 hari	11 hari
Glukosa+Nitrat	TT	TT	TT	0.16	0.21	0.28
Glukosa + Amonium	TT	0.57	1.02	*	*	*

Keterangan : TT = Tidak Terdeteksi, * = Tidak diamati

Tabel 4. Produksi asam asetat oleh *Monascus* sp. MM

Medium	Kandungan etanol (%) pada media					
	0 hari	1 hari	3 hari	5 hari	6 hari	11 hari
Etanol	TT	TT	TT	TT	TT	TT
Glukosa+Nitrat	TT	TT	TT	TT	TT	TT
Glukosa + Amonium	TT	TT	TT	TT	TT	TT

Keterangan : TT = Tidak Terdeteksi

Kemampuan tumbuh *Monascus* sp. MM pada spesimen yang diawetkan dengan etanol 70% mungkin berkaitan dengan karakter metabolisme etanol jamur tersebut yang mampu tumbuh dan memetabolisasi etanol 40%. Selain menggunakan etanol, jamur ini juga dapat memproduksi etanol. Hal ini menunjukkan bahwa jamur mempunyai isoenzim alkohol dehidrogenase (ADH), paling tidak ada 2: ADH oksidatif dan ADH fermentatif. Pada kondisi oksidatif, keseimbangan bergeser pada produksi asetaldehida dan NADH. Konsumsi etanol menyebabkan turunnya rasio NAD/NADH yang mengakibatkan terganggunya berbagai proses metabolisme (Jones, 1989). Sifat respirofermentatif dilaporkan terjadi pada *M. purpureus* (Chen and Johns, 1994). Jika media mengandung maltose dan amonium, etanol yang terbentuk tidak turun kadarnya walaupun maltose telah habis dan glukosa tersisa. Jika sumber karbon adalah glukosa dan sumber nitrogen adalah amonium, etanol yang terbentuk maksimum kemudian turun lagi sampai tidak terdeteksi seiring dengan habisnya sumber karbon. Pada khamir *S. cerevisiae*, sudah lama diketahui bahwa sifat fermentasi akan berakhir dan berganti respirasi etanol jika sumber karbon fermentabel seperti glukosa habis de Winde *et al.*, (1997).

Kemampuan *Monascus* sp. MM menggunakan etanol dengan kadar yang ekstrim menimbulkan pertanyaan tentang mekanisme pertahanannya. Pada sel hati sebagian besar etanol dimetabolisasi oleh ADH oksidatif; sebagian kecil oleh MEOS (Microsomal Ethanol-Oxidizing System); dan lebih kecil lagi oleh katalase (Lieber, 1982). Sifat yang serupa juga ditemui di berbagai jenis sel termasuk mikroalga *Euglena gracilis* (Julistiono and Briand, 1992). Kerusakan sel oleh etanol karena superoksid terbentuk, dapat dihindari oleh enzim Superoksid Dismutase (SOD) dan katalase (Costa, *et al.*, 1997). Selain berkaitan dengan masalah jalur metabolisme, komposisi lipida membran diperkirakan berperan dalam sistem detoksifikasi etanol. Sel dengan ratio asam lemak tak jenuh dan jenuh rendah (1,8 -0,8) diperkirakan tahan terhadap etanol sedang rasio tinggi (4 sampai 4, 6) adalah rentan (Jones, 1989).

KESIMPULAN

Monascus sp. MM dapat memproduksi etanol (fermentasi) dan menggunakan etanol 40% sebagai sebagai satu-satunya sumber karbon (respirasi). Kenyataan bahwa *Monascus* sp. MM tahan terhadap etanol kadar tinggi, maka jamur ini dapat berguna untuk memahami proses mekanisme detoksifikasi sel terhadap etanol dan dapat diterapkan untuk kepentingan bioteknologi. Data hasil penelitian ini adalah bersifat pendahuluan. Untuk memahami proses yang lebih dalam, faktor-faktor antara lain karakter enzim ADH, MEOS, SOD, katalase, jalur metabolisme, dan komposisi asam lemak membran sel merupakan prioritas untuk dikaji.

DAFTAR PUSTAKA

- Barnard, E.L. and P.F. Cannon. 1987. A new species of *Monascus* from pine tissues in florida. *Mycologia* 79 (3): 479 - 484
- Cannon, P.F., S.K. Abdullah and B.A. Abbas. 1995. Two new species of *Monascus* from Iraq, with a key to known species of the genus. *Mycol. Res.* 99: 659 - 662
- Costa, V., M.A. Amorim, E. Reis, A. Quintanilha, and P. Moradas-Ferreira. 1997. Mitochondrial superoksid dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in post diauxic phase. *Microbiology.* 143: 1649-1656.
- Chen, M-H and Johns, M.R. 1994. Effect of carbon source on ethanol and pigment production. *Enzyme Microb. Technol.* 16:584-590.
- de Winde, H.J., Thevelein, J.M., Winderick, J. 1997. From feast to famine : Adaptation to nutrient depletion in yeast. S.Hohmann and W.H. Mager (Eds). *Yeast stress respons.* Landes Bioscience. USA. p 7-51.
- Julistiono, H and J. Briand. 1992. Microsomal Ethanol-oxidizing System in *Euglena gracilis*. Similarities between *Euglena* and mammalian cell systems. *Comp. Biochem. Physiol.* 102B: 747-755.
- Hawksworth, D.L and J.I. Pitt. 1983. A New Taxonomy for *Monascus* Species. *Australian Journal of Botany* 31 (1):51-62
- Lieber, C.S. 1982. *Medical disorder of Alcoholism.* Pathogenesis and Treatment. W.B. Saunders, Philadelphia, P.A.
- Jones, R.P. 1989. Biological Principles for the effects of ethanol. *Enzyme Microb. Technol.* 11:130-153.
- Steinkraus, K.H. (Eds). 1983. *Handbook of Indigenous Fermented Foods.* Marcel Dekker, Inc. New York p.: 547-553

Suharna, N. 1998. Studi Keberadaan Jamur Pada Beberapa Spesimen Binatang Yang Diawetkan dalam Alkohol. Dipresentasikan pada Seminar Nasional Tahunan VI Perhimpunan Alumni dari Jepang (PERSADA) yang diselenggarakan oleh PERSADA Cabang Bogor pada tanggal 15 Desember 1998 di Bogor

Suharna, N. dan R.D. Rahayu. 1999. Studi Efektivitas Alkohol dan Campurannya Dengan Formalin Sebagai Bahan Pengawet Spesimen Binatang Untuk Udang. *in Publish.*