

TOKSISITAS GLISEROL ATAU SUKROSA PADA SEL KHAMIR *Saccharomyces cerevisiae* YANG DISEMPAN PADA SUHU RENDAH BEKU

[Toxicity of Glycerol or Sucrose During Freezing and Thawing of Yeast
Saccharomyces cerevisiae Cell]

Heddy Julistiono

Balitbang Mikrobiologi, Puslit Biologi-LIPI

Jl. Ir. Juanda 18, Bogor 16122

ABSTRACT

The effect of cryoprotectants glycerol and sucrose on cell viability and fermentation rate of *Saccharomyces cerevisiae* after freezing (-30 °C) and Chawing (30 °C) were studied. Both freezing and thawing were done rapidly. The mortality of cells treated with low concentrations of cryoprotectants (2.5, 5, and 10 %) after 15 and 30 days of cryopreservation, was remarkably higher than that of control and higher concentration (20% and 40%). Glycerol or sucrose with concentration of 20 % and 40 % protected cells from severe mortality only after 90 days of cryopreservation. Fermentation rate of cells treated with 20 % or 40 % of the two cryoprotectants were higher than that of control after 60 and 90 days of cryopreservation. The data indicated that in certain circumstance cryoprotectant could be toxic for the cells during freezing and thawing. Since biomembrane is not permeable to sucrose, therefore we proposed that target of sucrose toxicity may be extracellular, whereas glycerol, which penetrate cells, targets of the toxicity may be both extracellular and intracellular domains. Interaction between cryoprotectant and cell membranes is discussed.

Kata kunci/key words: Kerusakan oleh suhu rendah/freezing injury, krioprotektan/cryoprotectant, kriopreservasi/cryopreservation, khamir/ *Saccharomyces cerevisiae*.

PENDAHULUAN

Satu aspek penting dalam industri fermentasi adalah menyimpan biak tanpa terjadi perubahan karakternya. Kemampuan sel khamir untuk melakukan fermentasi etanol atau pertumbuhan yang cepat dapat berubah atau menurun selama penyimpanan biak. Keadaan ini dapat dihindari dengan menciptakan kondisi penyimpanan yang baik sehingga mutasi dan tingkat kematian sel yang tinggi tidak terjadi. Salah satu cara penyimpanan sel khamir adalah dengan suhu rendah yang dapat memperlambat reaksi sehingga memperlambat proses metabolisme. Sayangnya, suhu rendah beku atau tidak-beku dapat menyebabkan efek yang merusak sel.

Berbagai proses kerusakan fisiologi sel akibat suhu rendah beku telah dilaporkan. Sel dapat rusak akibat peristiwa fisik, yakni terbentuknya kristal es yang merobek membran sel. Mazur dan Schmidt (1968) menunjukkan bahwa pembekuan yang cepat dan pencairan yang lambat dapat

menyebabkan mortalitas yang tinggi pada khamir *Saccharomyces cerevisiae* akibat terbentuknya kristal es. Beberapa peneliti mengungkap mortalitas sel pada suhu rendah yang disebabkan oleh kejutan osmotik (Leibo, 1976; Meryman, 1971; Farrant 1973). Membran plasma juga dapat sebagai target utama dari kerusakan fisiologis pada sel yang disimpan pada suhu rendah, yakni berubahnya karakter semi-permeabilitas membran (Piracelli dan Pribor, 1972), perubahan aktivitas enzim membran (Takehara and Rowe, 1971), transisi fase (Crowe, *et al.*, 1984; Strauss, *et al.*, 1986) dan membran mengalami fusi (Anchordoguy *et al.*, 1987). Gliserol dan sukrosa, diketahui dapat melindungi sel dari kerusakan-kerusakan akibat suhu rendah, atau disebut dengan krioprotektan/cryoprotectant (Doebler, 1966; Meryman, 1971; Sphehard *et al.*, 1976).

Walaupun gliserol atau sukrosa dapat berperan sebagai *cryoprotectant*, keduanya justru dapat mengakibatkan kematian sel. Untuk hal ini,

Fahy (1986) menyebutnya sebagai "toksisitas dari krioprotektan". Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek gliserol atau sukrosa terhadap khamir *S. cerevisiae* yang disimpan dalam suhu rendah, yakni sifat krioprotektan atau sifat toksisitasnya.

BAHAN DAN CARA KERJA

Biak khamir

Khamir yang diuji dalam penelitian ini adalah *Saccharomyces cerevisiae* Epeville [rho+].

Pertumbuhan khamir.

Khamir ditumbuhkan pada gelas erlenmeyer 4 l secara "batch" yang mengandung 1,4 l media cair. Setiap 1,4 l media mengandung 140 g sukrosa, 70 g "yeast extract" (Difco), 70 g bactopectone (Dofco), 1,82 g KH_2PO_4 , 1,65 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,21 g MgSO_4 , 1,4 mg vitamin B₁ 0.034 mg biotin. Media dibuat dengan melarutkan sukrosa dalam 700 ml air pada erlenmeyer 4 l sedang larutan yang mengandung bahan lainnya (pH antara 4,5-5) disiapkan pada tabling terpisah. Kedua larutan disterilkan dengan autoklaf. Larutan kedua dimasukkan pada larutan pertama (sukrosa) ketika kultur akan dibiakkan. Suhu pertumbuhan 26 °C. Selama pertumbuhan, media dikocok dengan batang magnet, dan diberi aliran udara steril yang berguna untuk sintesis sterol. Untuk menghindari terjadinya buih, media diberi 1 ml minyak bunga matahari steril.

Penyimpanan khamir pada suhu rendah.

Setelah biak berumur 48 jam, khamir disentrifusa, kemudian dicuci dengan akuades. Setelah dicuci, biak disentrifusa kembali. Pelet diberi gliserol atau sukrosa untuk disimpan pada suhu 4°C atau -30°C. Volume gliserol dan sukrosa yang diberi adalah 1 volume pelet. Konsentrasi masing-masing krioprotektan tersebut adalah 0, 2,5, 5, 10, 20 dan 40%. Volume pelet diukur dengan menggunakan tabung sentrifusa yang bagian

bawahnya terdapat ukuran volume milimeter. Volume pelet dicatat setelah sentrifugasi 1500 g selama 10 menit.

Penyimpanan biak dari suhu kamar ke suhu rendah dilakukan secara langsung tanpa melalui penurunan suhu secara gradual. Pencairan dilakukan setelah 1, 7, 14, 30 60 dan 90 hari penyimpanan dengan menempatkan suspensi sel beku pada air dengan suhu 30 °C. Untuk mengetahui efek konsentrasi gliserol atau sukrosa terhadap viabilitas sel, pencairan dilakukan setelah 15 dan 30 hari penyimpanan.

Pengukuran viabilitas sel

Kematian sel ditentukan dengan metoda Funk and Kuliles (1958). Sebanyak 4,5 ml larutan biru metilen 2g/l ditambah 4,5 larutan penyangga pH 4,6. Larutan penyangga dibuat dengan mencampurkan 99,75 ml $\text{KH}(\text{PO}_4)$; 27,21 g/l dan 0,25ml KH_2PO_4 7,63 g/l. Untuk mengetahui sel mati, diperlakukan dengan mencampur 1 ml suspensi dan 9 ml larutan biru metilen. Sel yang berwarna biru dianggap sel mati.

Pengukuran laju fermentasi

Setelah pencairan kembali, suspensi sel disentrifusa dan dicuci dengan air. Pengukuran fermentasi dilakukan dengan respirometer Warbourg. Pelet yang telah dicuci diberi media pertumbuhan, dikocok selama 15-30 menit pada suhu 30 °C, sebelum laju fermentasinya diukur.

HASIL

Efek berbagai konsentrasi gliserol dan sukrosa terhadap mortalitas sel khamir selama proses pembekuan dan pencairan disajikan pada Gambar 1 dan Gambar 2. Gambar 1 menunjukkan mortalitas khamir setelah 15 hari pembekuan; sedang Gambar 2 menunjukkan hal serupa setelah 30 hari. Hasil penelitian menunjukkan tidak adanya efek protektan gliserol atau sukrosa bagi sel khamir yang disimpan dalam suhu -30 °C selama 15 hari

atau 30 hari, kemudian dicairkan kembali (*freezing and thawing*). Pada proses tersebut, mortalitas sel yang diperlakukan dengan gliserol atau sukrosa dengan konsentrasi 2,5%, 5%, 10%, 20% dan 40 % lebih tinggi dari kontrol (sel tanpa perlakuan krioprotektan). Toksisitas kedua krioprotektan tersebut tinggi pada konsentrasi rendah (2,5-10 %).

Pengaruh krioprotektan 20% dan 40% terhadap mortalitas sel khamir selama beberapa hari penyimpanan beku masing-masing tertera pada Gambar 3 dan Gambar 4. Untuk setiap perlakuan, pembekuan dan pencairan mempunyai efek mematikan sel seketika. Sejak hari pertama penyimpanan beku sel yang diperlakukan dengan gliserol atau sukrosa 20% atau 40% mengakibatkan mortalitas sel yang jauh lebih tinggi dari pada mortalitas sel tanpa perlakuan. Gliserol 20% mengakibatkan mortalitas sel yang lebih rendah dibanding dengan gliserol 40%; namun tidak demikian halnya dengan sukrosa. Meskipun kedua krioprotektan mengakibatkan mortalitas sel, kenaikannya selama penyimpanan terjadi dengan perlahan-lahan. Sebaliknya, kenaikan mortalitas sel yang disimpan tanpa krioprotektan stabil pada hanya sampai pada 60 hari penyimpanan. Setelah 90 hari penyimpanan, mortalitas sel yang tidak diperlakukan dengan krioprotektan naik drastis melampaui mortalitas sel yang diberi krioprotektan.

Pengaruh gliserol atau sukrosa pada laju fermentasi sel hidup selama penyimpanan beku dan pencairan kembali disajikan pada Gambar 5 dan Gambar 6. Sampai pada 30 hari penyimpanan beku, gliserol atau sukrosa menurunkan laju fermentasi sel. Setelah 60 dan 90 hari penyimpanan, laju fermentasi sel yang diperlakukan dengan kedua krioprotektan lebih tinggi dari pada *sel yang* tidak diberi krioprotektan. Untuk hal tersebut, sukrosa 40% memiliki sifat krioprotektif yang paling tinggi.

PEMBAHASAN

Mortalitas sel khamir *S. cerevisiae* Eppeville yang secara langsung dari suhu kamar

(26°C) ke suhu -30°C menjadi meningkat jika sel tersebut diperlakukan dengan gliserol atau sukrosa. Sifat toksik kedua krioprotektan tersebut tinggi pada konsentrasi yang rendah. Mengingat sifat membran sel yang tidak permeabel terhadap sukrosa (Meryman, 1971), peran krioprotektor tersebut mungkin lebih pada ekstraselular dari pada intraselular. Bagian sel yang terlibat kontak dengan bagian luar adalah membran sel yang berfungsi sebagai barrier selektif. Oleh karena hal itu, interaksi antara krioprotektan dan membran sel menjadi perhatian utama dalam hal memahami proses krioproteksi. Anggapan ini telah dikemukakan juga dalam penelitian yang dilakukan oleh Pribor (1975); pada khamir dijelaskan Mazur (1970). Berdasarkan data bahwa kematian sel diperparah oleh konsentrasi gliserol yang rendah, diduga terdapat juga interaksi antara gliserol dan membran sel. Naiknya konsentrasi gliserol atau sukrosa diikuti dengan turunnya efek toksik. Hal ini menunjukkan adanya sifat proteksi dan destruksi pada gliserol atau sukrosa, yang dapat muncul sesuai kondisi pembekuan dan pencairan. Hal yang menjadi pertanyaan adalah mekanisme toksisitas dan proteksinya terhadap sel pada pembekuan-pencairan. Mengenai rusaknya membran sel yang disebabkan oleh krioprotektan, Duzgunes (1984) menunjukkan bahwa dalam kondisi tertentu krioprotektan dapat memacu terjadinya fusi antar membran sel. Kemudian, Dalgliesh (1972) menunjukkan bahwa lapis ganda fosfolipida yang terdapat dalam campuran gliserol-air atau etilen glikol-air mengalami perubahan fase akibat interdigitasi gugus karboksil pada domain hidrofob. Atas dasar data empiris tersebut, Dalgliesh menganggap bahwa krioprotektan dapat menjadikan membran biologi sensitif terhadap proses pembekuan-pencairan. Meskipun demikian ditunjukkannya juga bahwa integritas membran biologi tetap stabil pada suhu beku jika terdapat dalam krioprotektan gula. Strauss *et al.* (1986) menyimpulkan bahwa gula yang berikatan dengan

gugus polar dari fosfatidilkholin, yang mungkin berbentuk ikatan hidrogen, dapat menjamin stabilnya membran. Kemampuan berbagai senyawa dalam menghindari terjadinya fusi liposom dalam stres pembekuan-pencairan telah dikaji oleh Anchordoguy *et al.* (1987). Gliserol, DMSO (dimetil sulfoksida), prolin, betain, sarkosin dapat menghindari fusi membran biologi hanya jika konsentrasinya lebih tinggi dari 1 M. Kelompok peneliti ini menggunakan europium untuk membuktikan mekanisme interaksi antar senyawa ini dengan fosfolipida. Europium yang dikenal dapat berikatan dengan grup fosfat menjadikan fusi liposom pada pembekuan-pencairan secara maksimal. Efek ini dihambat secara progresif oleh sukrosa, trehalose, atau gliserol. Atas dasar hal itu, mereka menyimpulkan bahwa ketiga senyawa tersebut dapat berkompetisi dengan europium untuk berikatan dengan bagian polar dari fosfolipida, tempat terdapatnya gugus fosfat. Tetapi, efek ini tidak dihambat oleh prolin, betain, atau sarkosin. Senyawa tersebut tidak bereaksi dengan bagian fosfolipida. Substitusi rantai polar pada bagian hidrofob dari prolin atau sarkosin menghilangkan sifat proteksinya. Dengan demikian, mereka menganggap bahwa senyawa ini bereaksi dengan gugus karboksilat dari lapis ganda lipida. Beberapa data dari para peneliti tersebut di atas, memiliki kemiripan dengan hasil penelitian ini; yaitu bahwa efek dari berbagai konsentrasi gliserol, betain, DMSO terhadap fusi liposom identik dengan efek berbagai konsentrasi gliserol atau sukrosa terhadap mortalitas khamir selama kriokonservasi karena konsentrasi yang rendah dapat menyebabkan fusi liposom. Dengan naiknya konsentrasi senyawa tersebut fusi liposom terhindari. Mekanisma yang serupa mungkin dapat sebagai interpretasi fenomena data penelitian ini. Gliserol atau sukrosa mungkin bereaksi dengan membran sel khamir selama pembekuan-pencairan.

Dari data ini diperoleh kesimpulan bahwa konsentrasi 20% dan 40% merupakan kadar gliserol

atau sukrosa yang tepat untuk melindungi sel khamir dari destruksi selama pembekuan-pencairan. Oleh karena itu, untuk penelitian efek krioprotektan ini, dipilih konsentrasi 20% dan 40%.

Gliserol bersifat toksik yang ditandai dengan rendahnya kemampuan fermentasi khamir yang diperlakukan dengan gliserol 40% sejak hari pertama penyimpanan, dibanding dengan kemampuan fermentasi khamir tanpa gliserol (kontrol). Namun, untuk penyimpanan yang lama, gliserol dapat mempertahankan kemampuan fermentasi. Penelitian terhadap butir darah merah manusia menunjukkan bahwa gliserol merupakan agensia yang paling toksik jika hal itu berhubungan dengan efek osmotik selama proses pembekuan (Rail *et al.*, 1978). Rammner (1967) mengungkap rusaknya enzim katalase dan peroksidase oleh krioprotektan DMSO pada proses pembekuan-pencairan. Sedang suhu rendah dapat menimbulkan superoksida yang bersifat racun (Ma *et al.*, 1998). Enzim katalase dan peroksidase merupakan enzim yang berguna untuk melindungi kerusakan sel akibat superoksid. Dengan demikian, target toksisitas gliserol, dapat pada bagian intraselular. Jika dosisnya rendah, toksisitas beberapa krioprotektan yang dapat masuk pada sel yakni etilen glikol, metanol dan DMSO terhadap enzim laktat dehidrogenase juga ditunjukkan oleh Santarius dan Franks (1998).

Berbeda dengan gliserol, sukrosa yang tidak dapat masuk dalam sel kemungkinan tidak merusak enzim-enzim intraselular secara langsung. Hal ini didukung oleh data bahwa kemampuan fermentasi sel yang disimpan pada suhu beku selama 60-90 hari dan diperlakukan dengan sukrosa, lebih tinggi dari pada sel yang diperlakukan dengan gliserol (Gambar 5 dan Gambar 6).

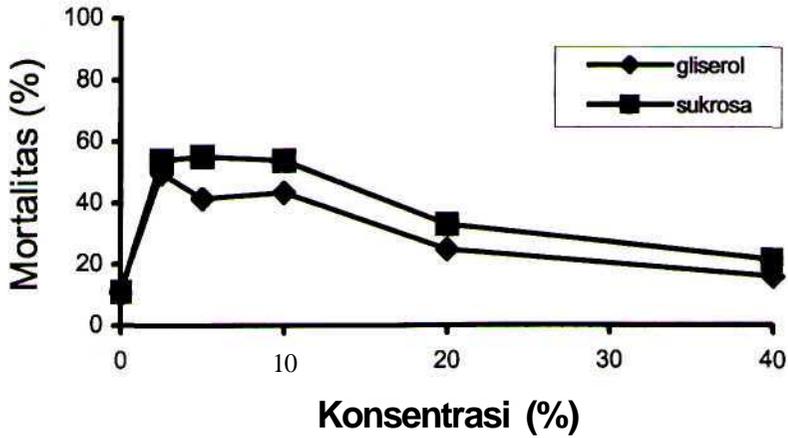
KESIMPULAN

Dari penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa gliserol atau sukrosa, pelindung sel dari

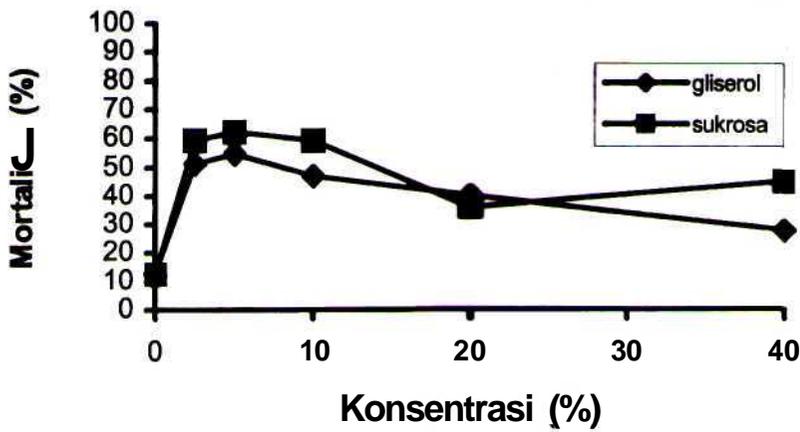
kerusakan akibat pembekuan (krioprotektan) pada suhu - 30 °C secara cepat dan pencairan secara cepat dapat merusak sel khamir *S. cerevisiae* Eppeville [rho+]. Krioprotektan bersifat toksik terutama pada konsentrasi yang rendah (2,5 - 10 %). Target kerusakan sel oleh krioprotektan ini mungkin pada membran plasma dan/atau pada bagian intraselular. Gliserol yang dapat masuk pada sel diduga dapat merusak membran plasma atau makromolekul intraselular. Sedang sukrosa yang tidak dapat masuk sel, diduga mengacau dinamika membran plasma. Saat kerusakan, yakni pembekuan, pencairan atau pasca pencairan belum diketahui. Pada dosis tinggi (40%), kedua protektan ini menunjukkan sifat proteksinya selama pembekuan-pencairan.

DAFTAR PUSTAKA

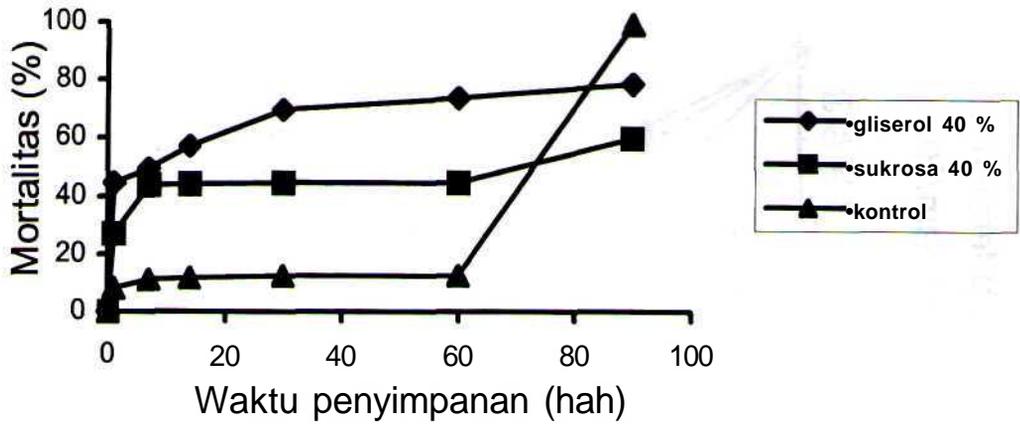
- Anchordoguy TJ, Rudolph AN, Carpenter JF, and Crowe JH. 1987.** Modes of Interaction of Cryoprotectants with Membran Phospholipids during Freezing. *Cryobiology* 24,323-334.
- Crowe JH, Crowe LM, and Chapman D. 1984.** Preservation of Membranes in Anhydrobiotic Organism: The Role of Trehalox. *Science* 223, 701-703.
- Dalgliesh. R.J. 1972.** Changes in Hemolysis of Mammalian Erythrocytes by Rapid Freezing and Thawing by Mechanical Stress During their Permeation with Glycerol. *Cryobiology* 9, 277-282.
- Doebler, GF. 1966.** Cryoprotective Compounds. Review and Discussion of Structure and Function. *Cryobiology* 21,2-11.
- Duzgunes N.1984.** Dehydration and Phase Transition in Membrane Fusion. *Cryobiology* 21, 695-696.
- Fahy GM. 1986.** The Relevance of Cryoprotectant "toxicity" to Crybiology. *Cryobiology* 23, 1-13.
- Farrant J. 1973.** The Effect of Salt or Various Cryoprotective Agent on Frog Sciatic Nerves. *Cryobiology* 23, 1-13
- Leibo SP. 1976.** Freezing Damage of Bovine Erythrocyte: Simulation using Glycerol Concentration Changes at Subzero Temperatures. *Cryobiology* 13, 387-598.
- Ma E-P, Liu X-Z, Liu M-DY, Han, Lui X and Wu ZrZ. 1998.** The Effect of Superoxide Dismutase on the Recovery of Human Bone Marrow Hemopoietic Stem Cells Stored at 4 °C. *Cryobiology* 37, 372-375.
- Mazur P. 1970.** Cryobiology: The Freezing of Biological System. *Science* (Washington D.C) 168, 939-940.
- Mazur P and Schmidt JJ. 1968.** Interaction of Cooling Velocity, Temperature, and Warming Velocity on The Survival of Frozen and Thawed Yeast. *Cryobiology*. 1:1-7
- Meryman HT. 1971.** Cryoprotective Agents. *Cryobiology* 8, 173-183.
- Piracelli J and Pribor DB. 1972.** Alteration of Semipermeability Properties of Red Cell by Slow Freezing. *Cryobiology* 9, 320-324.
- Pribor DB. 1975.** Biological Interaction Between Cell Membrane and Glycerol or DMSO. *Cryobiology* 12, 309-320.
- Rail WF, P Mazur, and H Souza. 1978.** Physical-Chemical Basis of Protection of Slowly Frozen Human Erythrocytes by Glycerol. *Biophysic Journal* 23,101-120.
- Rammler DH. 1967.** The Effect of DMSO on Several Enzyme Systems. *Annual of New York Academic Science* 141, 291-120.
- Santarius KA and F Franks. 1998.** Crypreservation of Lactate Dehydrogenase: Interactions amongs Various Cryoprotectants. *Cryo-Letters* 19, 37-48.
- Strauss G, Schurternberger P, and Hauser H. 1986.** The Interaction of Saccharides with Lipid Bilayer Vesicle: Stabilization During Freezing-Thawing and Freeze-Drying. *Biochimica et Biophysca Ada* 858, 169-180.
- Takehara I and Rowe AW. 1971.** Increase in ATPase Activity in Cell Red Membrane as Function of Freezing Regimen. *Cryobiology* 8, 559-565.



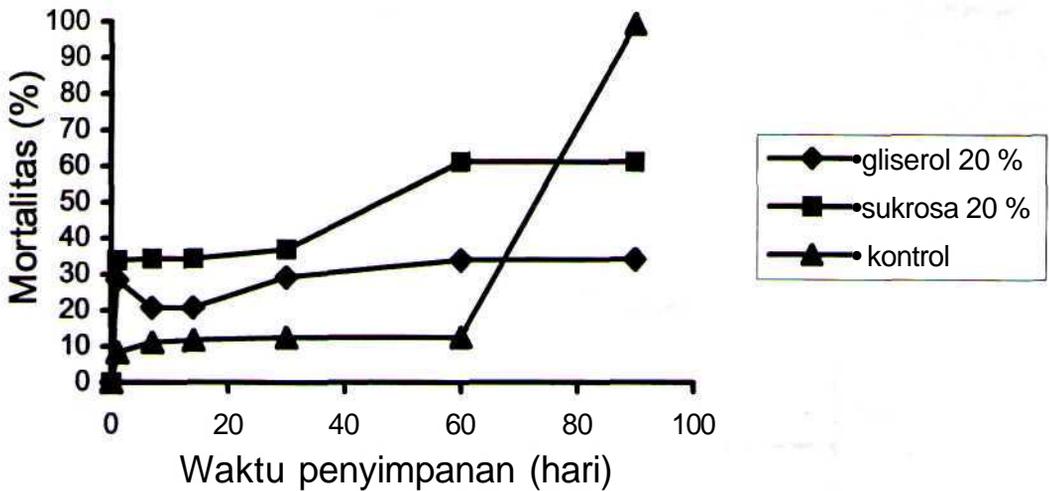
Gambar 1. Pengaruh gliserol atau sukrosa terhadap mortalilitas id *S. cerevisiae* setelah disimpan pada suhu 30 °C selama 15 hari.



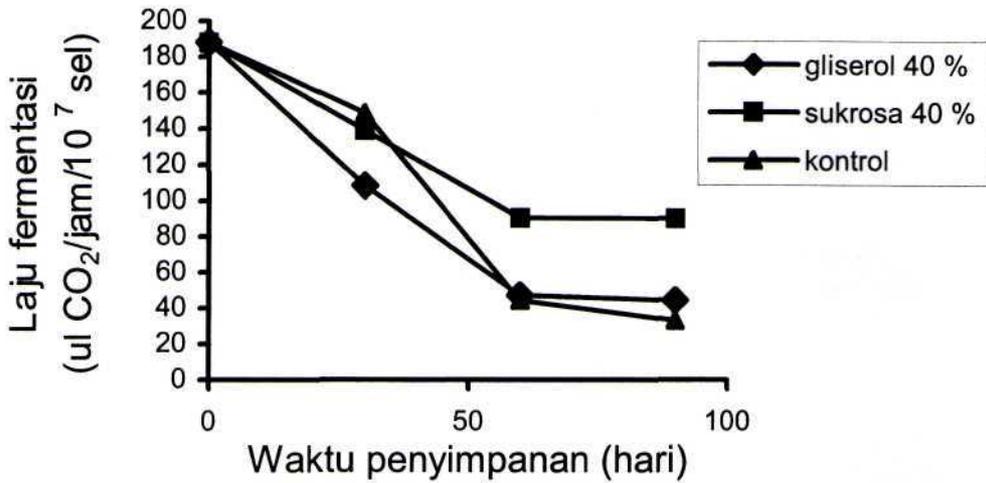
Gambar 2. Pengaruh gliserol atau sukrosa terhadap mortalilitas sel *S. cerevisiae* setelah disimpan pada suhu 30 °C selama 30 hari.



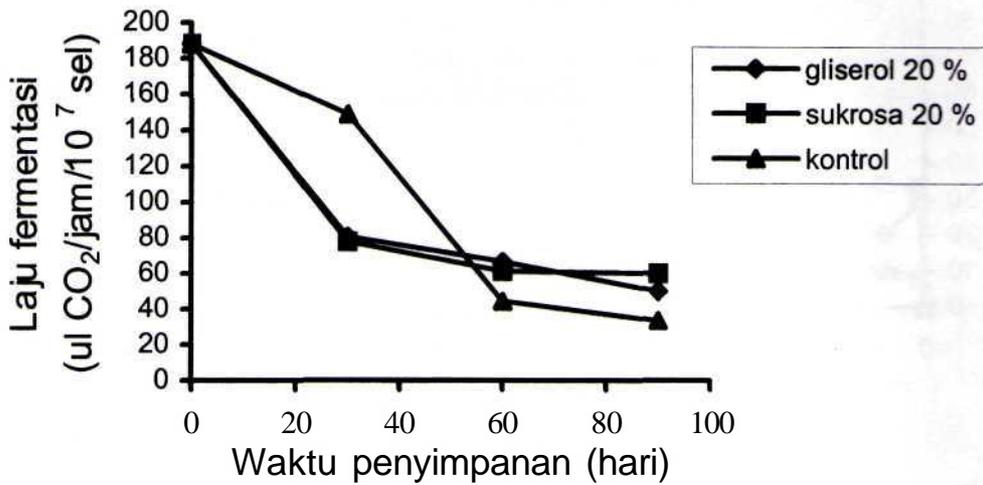
Gambar 3. Evolusi mortalitas sel *S. cerevisiae* yang disimpan pada suhu -30 °C diberi gliserol 20 % atau sukrosa 20 %.



Gambar 4. Evolusi mortalitas sel *S. cerevisiae* yang disimpan pada suhu -30 °C, diberi gliserol 40 % atau sukrosa 40 %.



Gambar 5. Evolusi laju fermentasi *S. cerevisiae* yang disimpan pada suhu -30 °C, diberi gliserol 20 % atau sukrosa 20 %.



Gambar 6. Evolusi laju fermentasi *S. cerevisiae* yang disimpan pada suhu -30 °C, diberi gliserol 40 % atau sukrosa 40 %.