

## **Isolasi dan Identifikasi Morfologi serta Biokimia Khamir Hasil Isolasi dari Buah Tomat (*Lycopersicum esculentum*) yang Berpotensi menghasilkan Bioetanol**

### **Isolation and Identification of Morphology and Biochemistry Isolation Yeast Result from Tomato Fruit (*Lycopersicum esculentum* Mill.) Potentially to Produce Bioethanol**

**Yesti Tri Anggrayeni, Wijanarka dan Endang Kusdiyantini**

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro  
Jl. Prof Soedharto, SH, Tembalang, Semarang 50275  
yestitria@gmail.com, wijanarka1810@gmail.com, kusdiyantini@yahoo.com.

#### **Abstract**

Bioethanol can be obtained from the fermentation process by using microorganisms such as yeast. One of the factors that affect height low bioethanol is a kind of yeast, and therefore the isolation and identification of yeast need to be done in order to obtain isolates potentially producing bioethanol. Yeast can be found in various environments, especially rich sugar substrate. Yeast usually living in fruits like tomatoes. This research aims to isolation and identifies yeast from tomatoes and the growth of yeast isolates at 50% glucose concentration test. The method of isolation was performed by streak method with the four scratch quadrant technique on YGP solid media. Identification of macroscopic and microscopic morphology in colonies and cell of yeast. Biochemical identification of the growth in liquid media, the fermentation of sugars test (glucose, galactose, sucrose, maltose, lactose), as well as the growth of yeast, isolates in 50% glucose medium. Determination of bioethanol content is done by distillation process and the measured weight with a pycnometer. The result from isolation yeast on tomato fruits obtained nine isolates is Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6, Y7, Y8, Y9. Based on the identification of the morphology, biochemistry, as well as the growth of yeast isolates testing on 50% glucose concentrations of selected isolates Y2 alleged genus *Debaryomyces* sp. and is able producing ethanol of 8.7% v/v.

Keywords: *Bioethanol ; Fermentation ; Tomato (Lycopersicum esculentum* Mill.) ; *Yeast*

#### **Abstrak**

Bioetanol dapat diperoleh dari proses fermentasi dengan menggunakan bantuan mikroorganisme seperti khamir. Salah satu faktor yang mempengaruhi tinggi rendahnya produksi bioetanol adalah jenis khamirnya, untuk itu isolasi dan identifikasi khamir perlu dilakukan guna mengetahui isolat yang berpotensi memproduksi bioetanol. Khamir dapat ditemukan dari berbagai lingkungan terutama substrat yang kaya gula seperti pada buah-buahan salah satunya buah tomat. Penelitian ini bertujuan untuk isolasi dan identifikasi khamir dari buah tomat serta menguji pertumbuhan isolat khamir pada konsentrasi glukosa 50%. Metode isolasi dilakukan dengan teknik empat kuadran gores pada media YGP Agar. Identifikasi morfologi secara makroskopis dan mikroskopis dilakukan terhadap koloni dan sel khamir. Identifikasi biokimia melalui uji pertumbuhan media cair, uji fermentasi gula (glukosa, galaktosa, sukrosa, maltosa, laktosa), serta pertumbuhan isolat khamir pada media glukosa 50%. Penetapan kadar bioetanol dilakukan melalui proses destilasi serta diukur bobot jenisnya dengan piknometer. Hasil isolasi khamir dari buah tomat diperoleh sembilan isolat yaitu Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6, Y7, Y8, dan Y9. Berdasarkan identifikasi morfologi, biokimia, serta uji pertumbuhan isolat khamir pada konsentrasi glukosa 50% terpilih isolat Y2 yang diduga sebagai genus *Debaryomyces* sp. dan mampu menghasilkan bioetanol sebesar 8.7% v/v.

Kata Kunci: *Bioetanol ; Fermentasi ; Khamir ; Tomat (Lycopersicum esculentum* Mill.) ; *Khamir*

#### **PENDAHULUAN**

Kebutuhan permintaan pasar terhadap bahan bakar alternatif terus mengalami peningkatan, hal

ini dilatarbelakangi oleh menipisnya sumber energi fosil terutama minyak bumi. Indonesia termasuk dalam daftar 23 negara dengan konsumsi energi

tertinggi di dunia, berdasarkan data yang dikeluarkan oleh organisasi nirlaba Amerika Serikat atau ACEEE (*American Council for An Energy-Efficient Economy*) Indonesia berada di urutan ke-18 dalam 23 kelompok negara yang terkait tingkat efisiensi energi (Direktorat Jenderal Energi Baru Terbarukan dan Konservasi Energi, 2017). Salah satu energi alternatif yang mudah dibuat dan mampu mengganti energi tak terbarukan adalah bioetanol. Bioetanol merupakan etanol (etil alkohol) yang proses produksinya menggunakan bahan baku alami dan proses biologis dengan bantuan mikroorganisme seperti khamir serta dibuat dari substrat yang mengandung karbohidrat (gula, pati atau selulosa) melalui proses fermentasi. Khamir dapat tumbuh diberbagai lingkungan terutama substrat yang kaya gula seperti pada buah-buahan salah satunya buah tomat (*Lycopersicon esculentum*). Salah satu faktor yang mempengaruhi tinggi rendahnya produksi bioetanol adalah jenis khamirnya, untuk itu isolasi dan identifikasi khamir perlu dilakukan guna mengetahui isolat khamir yang berpotensi memproduksi bioetanol. Penelitian ini bertujuan untuk isolasi dan identifikasi khamir dari buah tomat serta menguji pertumbuhan isolat khamir pada konsentrasi glukosa 50%. Identifikasi morfologis secara mikroskopis terhadap sel khamir sedangkan makroskopis meliputi bentuk koloni, warna, elevasi, tekstur, dan tepi serta identifikasi biokimia meliputi uji pertumbuhan isolat khamir pada media YGP (*Yeast Glucose Peptone*) cair, uji fermentasi gula (glukosa, galaktosa, sukrosa, maltosa, laktosa) dan uji pertumbuhan isolat khamir pada konsentrasi glukosa 50 %.

## **BAHAN DAN METODE**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret-Mei 2018 di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Sains dan Matematika serta Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Semarang.

### **Isolasi Khamir dari Buah Tomat**

Buah tomat sebanyak 150 g digiling menggunakan blender dengan penambahan 60 mL air, kemudian disaring menggunakan saringan dan dilakukan pengenceran bertingkat. Ekstrak buah tomat yang diperoleh dari pengenceran  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  diambil 1 mL dan dituang pada medium YGP Agar yang telah ditambah kloramfenikol sebagai antibiotik untuk mencegah tumbuhnya

bakteri, kemudian dilakukan inkubasi selama 48 jam pada suhu  $28^{\circ}\text{C}$ . Koloni yang tumbuh, selanjutnya dimurnikan dengan cara digores di medium Agar miring pada tabung reaksi (Barnet *et al.*, 2000).

### **Identifikasi Morfologi**

Pengamatan makroskopis koloni khamir meliputi bentuk koloni, warna, elevasi, tekstur, dan tepi.

Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan pewarna *methylene blue* pada media YGP Agar. Pewarnaan *methylene blue* ini dilakukan untuk membedakan antara koloni khamir atau bakteri dan pewarnaan *malachite green* dan safranin untuk melihat askospora pada media gorodkowa Agar. Isolat khamir pada medium agar miring yang berumur 48 jam diambil 1 ose, kemudian digores pada gelas benda dan diberi cairan zat warna *malachite green* 0,5%, kemudian dipanaskan dengan uap air selama 5 menit, setelah gelas obyek cukup dingin, gelas obyek dibilas dengan air mengalir selama 30 detik dengan hati-hati, selanjutnya, *smear yeast* ditetesi safranin 0.5% selama 30 detik. Gelas benda ditutup dengan kaca penutup dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 40X. Askospora dewasa akan berwarna hijau, sedangkan sel vegetatif akan tampak merah (Kreger, 1987).

### **Identifikasi Biokimia**

#### **Uji Pertumbuhan pada Media Cair**

Satu ose isolat yeast diinokulasi pada medium *Yeast Glucose Peptone* (YGP). Inkubasi suhu  $28^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam, dan diamati keberadaan cincin, pelikel pada permukaan media, serta endapan pada dasar media (sedimen) (Nurhariyati dkk, 2004).

#### **Uji Fermentasi Gula**

Satu ose isolat yeast diinokulasikan pada medium gula (glukosa, galaktosa, sukrosa, maltosa, dan laktosa), diinkubasi pada suhu  $28^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam. Hasil positif ditandai dengan adanya perubahan warna media dari merah menjadi orange kemerahan hingga kuning. Warna merah menandakan asam, dan warna kuning menandakan basa. Ada tidaknya gelembung di dalam tabung durham menandai  $\text{CO}_2$  hasil fermentasi (Harley dan Presscott, 2002).

### **Pertumbuhan pada Konsentrasi Glukosa 50 %**

Satu ose isolat yeast diinokulasi dengan cara digores kedalam medium yang digunakan untuk pertumbuhan khamir yang berpotensi menghasilkan bioetanol dengan komposisi 0.3 g *yeast extract*, 0.3 g *malt extract*, 0.5 g *peptone*, 50 g glukosa, 0.5 g kloramfenikol, 0.1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.04 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dilarutkan dalam 100 mL akuades, selanjutnya diinkubasi selama 48 jam suhu 28°C (Kurtzman dan Fell, 1998).

### **Produksi Bioetanol Preparasi Inokulum**

Starter yang akan digunakan dibuat terlebih dahulu dengan cara sebanyak: 0.3 g *yeast extract*, 0.3 g *malt extract*, 0.5 g *peptone*, 2 g glukosa, 0.1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.04 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dilarutkan dalam 100 mL akuades. Kultur murni pada agar miring diambil sebanyak 1 ose diinokulasikan pada erlenmeyer berisi 100 mL media kemudian diinkubasi pada suhu 28°C kecepatan agitasi 120 rpm dengan *rotary shaker* sampai kepadatan sel  $10^7$  sel/mL. Jumlah sel dihitung dengan menggunakan hemositometer (Fawole dan Oso, 2004).

### **Kondisi Pertumbuhan dan Produksi Bioetanol**

Starter sebanyak 50 mL diinokulasikan pada 450 mL medium fermentasi dengan komposisi: 1.35 g *yeast extract*, 1.35 g *malt extract*, 2.25 g *peptone*, 9 g glukosa, 0.45 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.18 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.9 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dilarutkan dalam 450 mL akuades selanjutnya diinkubasi dengan *rotary shaker* selama 96 jam suhu 28°C. Setiap 24 jam sekali diambil sampel dan diukur pertumbuhannya dengan berat kering dan gula reduksi dengan metode DNS (Amalia, 2014).

### **Pertumbuhan Khamir berdasarkan Berat Kering Sel**

Pertumbuhan sel ditentukan dengan mengukur berat kering dari biomassa sel. Pengukuran berat kering isolat khamir menggunakan metode Scragg (1991), berat tabung kosong ditimbang, sampel sebanyak 1.5 mL dimasukkan *eppendorf* kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipisahkan, kemudian pelet dicuci dengan akuades 1,5 mL dan disentrifugasi kembali. Pelet yang didapatkan dikeringkan dalam oven pada

suhu 90°C selama 20 jam atau sampai mendapatkan berat konstan, kemudian *eppendorf* berisi sel kering ditimbang. Berat kering sel (X) dapat dihitung sebagai berikut

$$X(g/L) = \frac{\text{berat tabung berisi sel kering (g)} - \text{berat tabung kosong (g)}}{\text{volume sampel (mL)}} \times 10^3$$

### **Penentuan Gula Pereduksi dengan Metode DNS**

Penentuan kadar gula reduksi diukur dengan metode DNS dan ditentukan menggunakan rumus yang diperoleh berdasarkan persamaan regresi kurva standar glukosa dengan konsentrasi 0.2-0.8 mg/mL. Sebanyak 1 mL sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi. Sebanyak 1 mL sampel dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambah dengan 2 mL akuades dan 1 mL DNS. Larutan dipanaskan dalam penangas air selama 5 menit. Larutan dihomogenisasi dan diukur absorbansinya pada 540 nm (Miller, 1959).

### **Pengukuran Kadar Bioetanol**

Hasil fermentasi didestilasi menggunakan desilator dengan suhu 80°C. Desilat diukur bobot jenisnya menggunakan piknometer. Penetapan kadar etanol berdasarkan tabel daftar bobot jenis dan kadar etanol berdasarkan tabel daftar bobot jenis dan kadar etanol dalam Farmakope Indonesia. Penetapan bobot jenis berdasarkan rumus :

$$\text{Bobot Jenis} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0}$$

Keterangan:

$W_2$  = Bobot piknometer yang berisi desilat

$W_1$  = Bobot piknometer + air suling

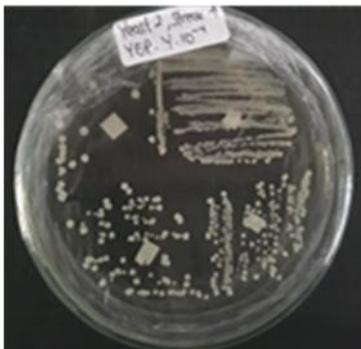
$W_0$  = Bobot piknometer kosong

## HASIL DAN PEMBAHASAN

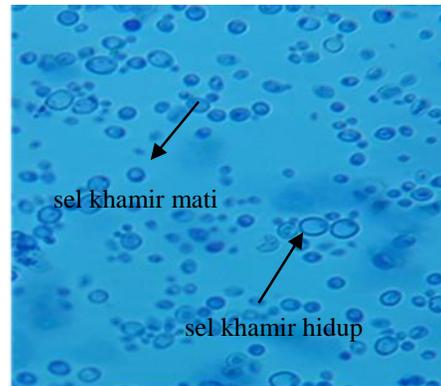
Tabel 1. Karakteristik makroskopis koloni khamir hasil isolasi buah tomat

Isolat	Makroskopis Koloni					
	Bentuk	Warna	Elevasi	Tekstur	Tepi	
Y1	Bulat	putih krem	timbul	<i>butyrous</i>	rata	
Y2	Bulat	putih krem	timbul	<i>butyrous</i>	tidak beraturan	
Y3	Bulat	putih susu	timbul	<i>butyrous</i>	rata	
Y4	Bulat	putih susu	timbul	<i>butyrous</i>	tidak beraturan	
Y5	Bulat	putih gading	timbul	<i>butyrous</i>	rata	
Y6	Bulat	putih krem	timbul	<i>butyrous</i>	rata	
Y7	Bulat	putih krem	datar	<i>butyrous</i>	tidak beraturan	
Y8	Bulat	putih susu	timbul	<i>butyrous</i>	rata	
Y9	Bulat	putih krem	datar	<i>butyrous</i>	tidak beraturan	

Hasil isolasi dari buah tomat berdasarkan karakteristik makroskopis koloni khamir (Tabel 1.) dan karakteristik mikroskopis sel khamir (Tabel 2.). Berdasarkan identifikasi morfologi, biokimia dan uji pertumbuhan isolat khamir pada konsentrasi glukosa 50% terpilih isolat Y2 yang berpotensi untuk memproduksi bioetanol. Isolat khamir Y2 mempunyai karakteristik makroskopis bentuk koloni bulat, berwarna putih krem, elevasi timbul, tekstur *butyrous*, tepi tidak beraturan (Gambar 1.).

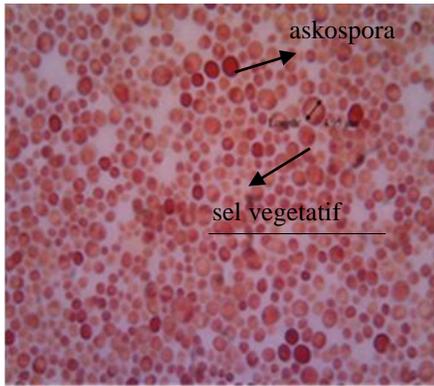


Gambar 1. Morfologi koloni khamir isolat Y2 pada media YGP Agar, inkubasi 48 jam.



Gambar 2. Morfologi sel khamir isolat Y2 dengan pewarnaan *methylene blue* (40x10), pada media YGP Agar, inkubasi 48 jam

Gambar 2. menunjukkan perbedaan warna antara sel khamir yang mati dan sel khamir hidup hal ini dipengaruhi adanya sifat membran sel yang selektif permeabel dan memiliki kemampuan reduksi-oksidasi, menurut Vairo (2009) sel khamir yang mati membran selnya tidak memiliki sifat selektif permeabel, sehingga *methylene blue* dapat masuk kedalam sel dan tidak memiliki kemampuan untuk mereduksi *methylene blue* sehingga menyebabkan sel tetap berwarna biru, sedangkan sel khamir yang hidup dapat menahan *methylene blue* dan memiliki kemampuan untuk mereduksi *methylene blue* sehingga sel khamir yang hidup berwarna transparan atau bening.



Gambar 3. Reproduksi sel seksual isolat Y2 pewarnaan *malachite green* dan safranin (40x10) pada media gorodkowa Agar, inkubasi 7 hari

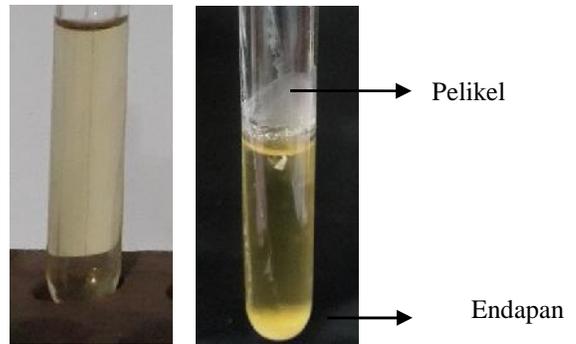
Gambar 3. menunjukkan terbentuknya askospora berbentuk bulat didalam kantung askus sebagai bentuk reproduksi seksual sel khamir dengan ukuran sel 4.95  $\mu\text{m}$ , selnya berwarna lebih gelap dibandingkan sel lainnya menurut Edward *et al.*, (1948) pewarnaan *malachite green* digunakan sebagai pewarna utama akan berikatan pada permukaan askospora sedangkan safranin digunakan sebagai zat warna lawan yang akan memberikan warna merah pada bagian sel selain askospora. Produksi askospora diiringi dengan media khusus sporulasi seperti gorodkowa Agar dengan waktu inkubasi 7-14 hari.

Tabel 2. Karakteristik mikroskopis koloni khamir hasil isolasi buah tomat

Isolat	Bentuk Sel	Ukuran Sel	Reproduksi Sel Seksual
Y1	bulat	3.90 $\mu\text{m}$	askospora
Y2	bulat	4.95 $\mu\text{m}$	askospora
Y3	bulat	5.09 $\mu\text{m}$	askospora
Y4	oval	2.70 $\mu\text{m}$	askospora
Y5	bulat	3.22 $\mu\text{m}$	askospora
Y6	oval	2.41 $\mu\text{m}$	askospora
Y7	oval	3.67 $\mu\text{m}$	askospora
Y8	oval	2.60 $\mu\text{m}$	askospora
Y9	bulat	2.76 $\mu\text{m}$	askospora

Berdasarkan Tabel 2. Isolat khamir dari buah tomat memiliki bentuk sel dan ukuran yang bervariasi. Ukuran khamir sangat bervariasi, biasanya diameter khamir berukuran 2-5  $\mu\text{m}$  meskipun ada beberapa khamir bisa mencapai diameter lebih dari 40  $\mu\text{m}$ , biasanya berukuran 5-10 kali lebih besar dari sel bakteri (Walker *et al.*, 2002).

Uji biokimia yang dilakukan dalam penelitian ini adalah uji pertumbuhan pada media YGP cair dan uji fermentasi berbagai jenis gula (glukosa, galaktosa, sukrosa, maltosa, dan laktosa). Berdasarkan isolat terpilih yaitu isolat Y2, maka isolat Y2 diidentifikasi melalui uji pertumbuhan media cair (Gambar 4.)



Gambar 4. Pertumbuhan isolat Y2 pada media YGP cair hasil isolasi buah tomat

Keterangan : + : Terdapat endapan berwarna putih dan ada (sedikit/tipis pelikel).  
++ : Banyak/tebal pelikel.

Gambar 4. menunjukkan terlihat adanya kekeruhan pada media serta terbentuknya endapan berwarna putih didasar tabung dan tebalnya pelikel berwarna kekuningan yang berada dipermukaan media. Hal ini dipengaruhi oleh berbagai produksi asam organik dari hasil metabolisme sel khamir dengan media pertumbuhan khamir pada YGP cair.

Tabel 3. Uji pertumbuhan media cair hasil isolasi buah tomat

Isolat	Endapan	Pelikel
Y1	+	+
Y2	+	++
Y3	+	+
Y4	+	+
Y5	+	+
Y6	+	++
Y7	+	+
Y8	+	+
Y9	+	++

Keterangan : ++ : pertumbuhan cepat  
+ : pertumbuhan lambat

Tabel 3. Menunjukkan keseluruhan isolat khamir mampu membentuk endapan serta banyak sedikitnya *pellicle* dipengaruhi dengan kemampuan isolat khamir dalam memproduksi CO<sub>2</sub> sebagai bentuk pertumbuhannya dalam kondisi anaerob, menurut Fleischmann dan Sripuntanagoon (2011) adanya pelikel berbentuk cincin dan berwarna kekuningan diatas permukaan media, hal ini menunjukkan adanya khamir permukaan (*top yeast*) yaitu khamir yang tumbuh secara menggerombol dan melepaskan CO<sub>2</sub> dengan cepat sehingga menyebabkan sel terapung pada permukaan, selain itu terbentuknya endapan menunjukkan khamir dasar (*bottom yeast*) yaitu khamir yang tidak tumbuh menggerombol, pertumbuhannya terhambat, dan memproduksi CO<sub>2</sub> secara lambat sehingga sel-sel mengumpul pada dasar tabung.

Tabel 4. Hasil uji fermentasi gula hasil isolasi buah tomat

Isolat	Warna					Adanya Gas				
	G	Gal	S	M	L	G	Gal	S	M	L
Y1	+	+	+	+	-	+	+	++	-	-
Y2	+	+	+	+	-	++	-	++	-	-
Y3	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
Y4	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
Y5	+	+	+	+	-	-	++	-	+	-
Y6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Y7	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
Y8	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Y9	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-

Keterangan:

+ : Ada (terjadi perubahan warna dari merah menjadi orange kemerahan hingga kuning dan muncul gas).  
++ : Banyak gas  
- : Tidak terjadi perubahan warna dan tidak muncul gas.

G : Glukosa  
Gal : Galaktosa.  
S : Sukrosa.  
M : Maltosa.  
L : Laktosa.

Adanya perubahan warna media dari merah menjadi orange kemerahan hingga kuning terjadi akibat pemanfaatan gula sebagai sumber karbon mampu menghasilkan asam yang menurunkan pH medium dengan disertai atau tidak disertai pembentukan gas. Hal ini akan mengakibatkan kondisi anaerob dan terjadi proses fermentasi serta munculnya gas terjadi karena adanya proses fermentasi gula menjadi etanol dan melepaskan CO<sub>2</sub> (bersifat fermentatif), menurut Kreger (1987) umumnya kemampuan menghasilkan asam terutama dimiliki oleh spesies yang mempunyai kemampuan fermentasi yang kuat. Khamir dengan kemampuan fermentasi yang lemah biasanya memiliki kemampuan menghasilkan asam yang lemah atau bahkan tidak dapat menghasilkan asam. Mahon *et al.*, (2011) produk akhir fermentasi gula adalah asam atau asam dengan gas.

Identifikasi genus dilakukan setelah uji morfologi dan uji biokimia. Isolat Y1, Y2, Y3, Y9 mempunyai kemiripan dengan genus *Debaryomyces* sp., hal ini ditandai sebagai bentuk pertumbuhannya dalam kondisi anaerob fakultatif yaitu mampu tumbuh dengan atau tanpa O<sub>2</sub>, sehingga dalam kondisi anaerob jenis khamir ini menggunakan reaksi fermentasi untuk mendapatkan energi dan salah satu dari isolat tersebut yaitu isolat Y2, memiliki karakteristik

sebagai khamir osmofolik yaitu mampu tumbuh pada tekanan osmotik yang tinggi sehingga diharapkan dalam keadaan stress lingkungan (kadar gula berlebih) isolat tersebut mampu untuk tetap hidup dan berpotensi untuk memproduksi bioetanol, sedangkan isolat Y4, Y5, Y6, Y7, Y8 mirip dengan genus *Pichia* sp., menurut Kurtzman dan Piskur (2006) genus *Debaryomyces* sp. dan *Pichia* sp. memiliki ciri sel berbentuk bulat hingga oval, reproduksi seksual menghasilkan askospora, membentuk cincin pelikel dan endapan pada media cair serta berpotensi menghasilkan etanol karena mempunyai kemampuan untuk memfermentasi berbagai jenis gula.

Tabel 5. Uji pertumbuhan glukosa 50% hasil isolasi buah tomat

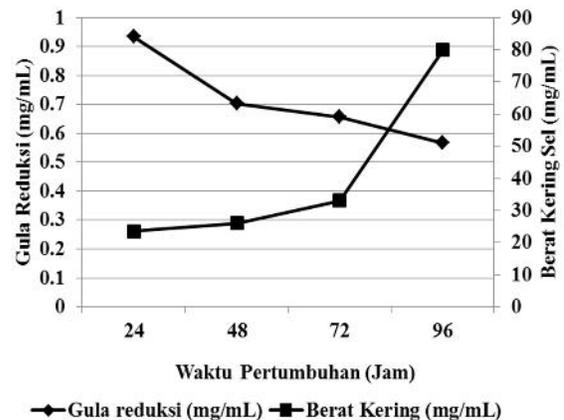
Isolat	Pertumbuhan 24-48 jam
Y1	+
Y2	++
Y3	+
Y4	++
Y5	+
Y6	+
Y7	+
Y8	+
Y9	++

Keterangan: ++ : pertumbuhan cepat  
+ : pertumbuhan lambat

Tabel 5. menunjukkan isolat Y1, Y3, Y5, Y6, Y7, Y8 pertumbuhannya sedikit lambat, dikarenakan isolat tersebut kurang toleran dalam larutan yang berkadar gula tinggi. Hal ini dipengaruhi dengan tekanan osmotik yang tinggi sehingga menyebabkan air dari dalam sel khamir keluar ke larutan gula, kemudian sel kekurangan air dan pertumbuhannya menjadi terhambat atau bahkan mengalami plasmolisis sedangkan isolat Y2, Y4, Y9 pertumbuhannya lebih cepat, hal ini terjadi karena sel khamir lebih toleran (tahan stress) terhadap kondisi lingkungan dengan kadar gula tinggi. Jenis-jenis khamir tersebut biasanya bersifat osmofilik yaitu mampu tumbuh cepat pada kadar gula tinggi. Hal tersebut membuktikan setiap isolat mempunyai karakteristik pertumbuhan yang berbeda-beda, menurut Deak (2006) *didalam* Rosa dan Peter (2006) khamir osmofilik dapat tumbuh

pada bahan pangan dengan aktivitas air rendah karena memiliki kemampuan dalam melakukan osmoregulasi dengan cara menyeimbangkan tekanan larutan didalam dan diluar sel (*compatible solute*) sehingga dapat beradaptasi dilingkungan dengan kadar gula tinggi. beradaptasi dilingkungan dengan kadar gula tinggi.

Produksi bioetanol dilakukan melalui proses fermentasi dengan isolat khamir Y2. Isolat Y2 ini mampu menguraikan glukosa sebagai sumber karbon sehingga dapat digunakan untuk memproduksi etanol. Produksi bioetanol dipengaruhi juga oleh kondisi pertumbuhan dari isolat Y2. Kondisi pertumbuhan isolat Y2 dalam memfermentasi etanol dianalisis melalui kadar gula reduksi serta pertumbuhan biomassa sel.



Gambar 5. Berat kering sel dan gula reduksi dalam medium pertumbuhan isolat Y2, inkubasi 96 jam

Gambar 5. menunjukkan isolat Y2 pada jam ke-24 hingga jam ke-72 terjadi fase *late log* (pertumbuhan lambat) hal ini diketahui dengan adanya pertambahan jumlah sel yang lambat, pada jam ke-72 hingga jam 96 baru memasuki fase *log*, ditandai dengan meningkatnya jumlah sel karena adanya aktivitas pertumbuhan sel yang dilakukan isolat Y2. Pada fase ini, sel khamir sedang aktif membelah dengan cepat sehingga menyebabkan meningkatnya jumlah sel menjadi dua kali lipat. Fase pertumbuhan isolat Y2 hanya dilakukan sampai jam ke-96, setelah jam ke-96 kemungkinan fase pertumbuhan sel masih belum berhenti, hal ini dikarenakan populasi sel khamir masih akan

bertambah untuk mencapai fase log maksimum atau baru akan memasuki fase stasioner dengan pertumbuhan sel yang konstan.

Adanya penambahan inokulum pada media pertumbuhan bertujuan untuk mempersingkat atau meniadakan fase lag, karena pertumbuhan isolat Y2 pada jam ke-0 tidak dilakukan sehingga tidak mempunyai fase lag (adaptasi) dan massa sel, karena tidak adanya fase lag maka pertumbuhan sel langsung memasuki fase log. menurut Sukarminah dkk (2008) fase *late log* merupakan fase pada saat pertumbuhan sel tidak stabil, tetapi jumlah populasi masih naik karena jumlah sel yang tumbuh masih lebih banyak dari pada sel mati. Baronil *et al.*, (2018) fase log ditandai dengan peningkatan jumlah sel dan biomassa sel, pada fase ini terjadi kegiatan fisiologi sel yang menyebabkan terbentuknya senyawa penghasil metabolit primer seperti etanol.

Adanya kurva pertumbuhan dapat menentukan waktu yang optimal untuk starter. Umur starter isolat Y2 yang digunakan yaitu pada jam ke-96 hal ini disebabkan pertumbuhan isolat Y2 telah mencapai fase log, sehingga pada fase tersebut sudah dapat dilakukan pengukuran kadar bioetanol. Penambahan starter diharapkan mampu menghasilkan bioetanol dalam kadar yang tinggi, akan tetapi kadar etanol yang diperoleh dari hasil fermentasi selama 96 jam ini hanya mampu menghasilkan kadar bioetanol sebesar 8.7% v/v hal ini tergolong masih rendah dilihat dari sedikitnya nilai gula reduksi yang dimanfaatkan oleh isolat Y2, sehingga konsentrasi etanol yang dihasilkan juga rendah. Tinggi rendahnya kadar bioetanol dapat dilihat dari pertumbuhan isolat Y2 dan konsumsi gula selama fermentasi, tetapi selama proses fermentasi tidak semua gula dikonversi menjadi etanol, menurut Hartina dkk (2014) penurunan gula reduksi tidak hanya diubah oleh khamir menjadi etanol tetapi juga dimanfaatkan oleh khamir untuk pertumbuhan sel sebagai sumber karbon, tidak semua gula dimanfaatkan oleh khamir untuk pembuatan etanol akan tetapi ada sebagian gula yang digunakan untuk metabolisme intraseluler. Sari *et al.*, (2008) etanol merupakan salah satu produk senyawa yang dihasilkan pada fase log (eksponensial).

## KESIMPULAN

Hasil isolasi khamir dari buah tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) diperoleh 9 isolat khamir terdiri dari isolat Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6, Y7, Y8, dan Y9. Berdasarkan identifikasi morfologi secara makroskopis dan mikroskopis serta uji biokimia maka isolat Y2 mempunyai kemiripan dengan genus *Debaryomyces* sp. Isolat Y2 mampu memproduksi etanol sebesar 8.7% v/v pada waktu fermentasi 96 jam.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amalia, Y. 2014. Pembuatan Bioetanol dari Limbah Padat Sagu menggunakan Enzim Selulase dan Yeast *Saccharomyces cerevisiae* dengan Proses *Simultaneous Sacharification and Fermentation* (SSF) dengan Variasi Konsentrasi Substrat dan Volume Inokulum. *Skripsi*. Universitas Riau. Pekanbaru
- Barnett, J.A., R.W. Payne & D. Yarrow, 2000. *Yeasts: Characteristics and identification*. Cambridge University Press, Cambridge: ix + 1139 hlm.
- Baronil M.D., S. Colombo & E. Martegani. 2018. Antagonism between *salicylate* and the cAMP signal controls yeast cell survival and growth recovery from quiescence. Dipartimento di Biologia, Università di Padova, Italy. *Microbial Cell Vol. 5 No. 7 pp: 344-356*.
- Deak .T. 2006. Environmental factors influencing yeast. Dalam: Rosa .C. dan .G. Peter (eds). 2006. *The yeast handbook: Biodiversity and ecophysiology of yeast*. Springer-Verlag. Berlin: 155-174.
- Edward .E.E, C.W. King, & James W. Bartholom. 1948. Differentiating Yeast Ascospores and Vegetative Cells. Ew: Nesbitt Fruit Products, Inc. Department Of Bacteriology, University Of Southern California. *Stain Technology, Vol. 94, 30*.
- Fawole, H.J. and B.A Oso. 2004. Laboratory Manual of Microbiology. Spectrum Books Limited Spectrum. *Nigeria*, pp: 1-48.
- Fleischmann .J. and E.M. Sripuntanagoon. 2011. Pellicle Associated Adherence Film above Incubation Broth Surface-An Inexpensive Adjunct to Recognizing *Candida krusei* in

- the laboratory: California. *BMC Research Notes* 2011, 4:74
- Harley and Prescott. 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology. Fifth Edition.* The McGraw–Hill Companies.
- Hartina .F., A. Jannah., A. Maunatin. 2014. Fermentasi Tetes Tebu dari Pabrik Gula Pagotan Madiun menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* untuk menghasilkan Bioetanol dengan Variasi pH dan lama Fermentasi. *Alchemy* 3(1): pp.93-100.
- Kreger-van Rij, and J.W. Fell 1987. *The Yeast: A Taxonomic Study.* Amsterdam: Elsevier Science Publisher B. V.
- Kurtzman C.P. and J.W. Fell. 1998. *The Yeast A Taxonomy Study.* New York: Elvesier.
- Kurtzman C.P. and Piskur, J. 2006. Taxonomy and Phylogenetic Diversity among The Yeasts in Comparative Genomics: Using Fungi as Models eds Sunnerhagen, P dan Piskur. *J. Springer. Berlin. p. 29 dan 46.*
- Mahon .C.R. ,D.C. Lehman, and G. Manuselis. 2011. *Textbook of diagnostic microbiology, 4th ed.* Philadelphia: W. B. Saunders Co.
- Miller, G.C. 1959. Use of the Dinitrosalicylic Acid Reagent for the Determination of Reducing sugar. *Analitical Chemists.* 31:420-428.
- Nurhariyati T. 2004. Keanekaragaman Khamir Pendegradasi Minyak Hasil Isolasi dari Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya. *Berk. Penel. Hayati, Vol. 9:* 87-91
- Sari .I.M., Noverita dan Yulneriwarni. 2008. Pemanfaatan jerami padi dan alang-alang dalam fermentasi etanol menggunakan kapang *Trichoderma viride* dan khamir *Saccharomyces cerevisiae.* *Vis Vitalis.*5(2):55-62.
- Sukarminah, E., D.M.Sumanti., dan Hanidah. 2008. *Mikrobiologi Pangan.* Buku Ajar Kulah Jurusan Teknologi Industri Pangan. FTIP. UNPAD. Jatinangor.
- Vairo L.R.M. 2009. Methylen Blue Solution for Staining Dead Yeast Cells. UK: *Journal Stain Technology Vol. 36 pp.*329-330.
- Walker .K., .H. Skelton, .K. Smith. 2002. "Cutaneous lesions showing giant yeast forms of *Blastomyces dermatitidis*". *Journal of Cutaneous Pathology* 29 (10):616–618.