

Isolasi dan Karakterisasi secara Morfologi dan Biokimia Khamir dari Limbah Kulit Nanas Madu (*Ananas comosus* L.) untuk Produksi Bioetanol

Galih Pertiwi Akbar¹, Endang Kusdiyantini¹ dan Wijanarka¹

¹Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto, SH Tembalang, Semarang, Indonesia
E-mail: kusdiyantini@yahoo.com

ABSTRAK

Khamir adalah kelompok mikroorganisme yang mudah dijumpai pada produk fermentasi, tanah, air, jaringan tanaman, daun, bunga dan buah-buahan. Bioetanol merupakan salah satu energi alternatif yang dihasilkan oleh khamir melalui fermentasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi khamir secara morfologi dan biokimia khamir dari limbah kulit nanas madu untuk produksi bioetanol. Isolasi dilakukan dengan menggunakan media PDAY + kloramfenikol. Karakterisasi morfologi dilakukan dengan mengamati morfologi koloni, sel dan reproduksi aseksual khamir. Karakterisasi biokimia yang dilakukan antara lain uji asimilasi karbon dan nitrogen, uji hidrolisis urea, uji hidrolisis protein, uji produksi asam dari glukosa, uji toleransi glukosa tinggi, uji toleransi etanol dan analisis kadar bioetanol hasil fermentasi oleh isolat khamir. Dari proses isolasi didapatkan 6 isolat khamir, dimana isolat Ep-1 dan Ep-2 mirip dengan *Wickerhamia* sp., Ep-3 dan Ed-3 mirip dengan *Zygosaccharomyces* sp. serta isolat Ed-1 dan Ed-2 mirip dengan *Saccharomyces* sp. Karakteristik yang dimiliki isolat khamir yakni menunjukkan kemampuan dalam asimilasi beberapa sumber karbon dan amonium sulfat; mampu menghidrolisis protein; beberapa mampu memproduksi asam; tidak bisa menghidrolisis urea; toleran terhadap konsentrasi glukosa 40%, 50% dan 60%; toleran terhadap etanol 5%, 10% dan 15%; serta mampu memproduksi bioetanol. Isolat Ep-1 diketahui paling berpotensi untuk produksi etanol karena toleran terhadap konsentrasi glukosa 60% dan etanol 15% serta kadar bioetanol yang diproduksi yakni 12,00%..

Kata Kunci: khamir, limbah kulit nanas madu, karakterisasi, bioetanol

ABSTRACT

Yeast is a group of microorganisms that are easily found in fermented products, soil, water, plant tissues, leaves, flowers and fruits. Bioethanol is one of the alternative energy produced by yeast through fermentation. This study aims to isolate and characterize yeast morphologically and biochemically yeast from honey pineapple skin waste for bioethanol production. Isolation was carried out using PDAY + chloramphenicol media. Morphological characterization were carried out by observing colony morphology, cell and yeast asexual reproduction. Biochemical characterization included carbon and nitrogen assimilation, urea hydrolysis test, protein hydrolysis test, glucose acid production test, high glucose tolerance test, ethanol tolerance test and production and analysis of fermented bioethanol levels by yeast isolates. From the isolation process found 6 yeast isolates, where isolates Ep-1 and Ep-2 are similar to *Wickerhamia* sp., Ep-3 and Ed-3 similar to *Zygosaccharomyces* sp. and isolates Ed-1 and Ed-2 are similar to *Saccharomyces* sp. Characteristics possessed by yeast isolates showed the ability to assimilate several sources of carbon and ammonium sulfate; able to hydrolyze proteins; some are able to produce acid; cannot hydrolyze urea; tolerant to glucose concentrations of 40%, 50% and 60%; tolerant to ethanol 5%, 10% and 15%; and able to produce bioethanol. Ep-1 isolates are known to have the most potential for ethanol production because they are tolerant to 60% glucose concentration and 15% ethanol and the level of bioethanol produced is 12.00%.

Key words : yeast, honey pineapple skin waste, characterization, bioethanol

1. Pendahuluan

Yeast atau sering disebut khamir dalam Bahasa Indonesia, adalah salah satu organismae dalam kelompok mikroorganisme yang banyak tersebar di alam. Kelompok

mikroorganisme ini bisa ditemukan di udara, akuatik, dan terestrial. Selain itu juga bisa ditemukan sebagai parasit, saprofit maupun endofit pada daun, bunga, buah yang sudah matang, biji-bijian, jamur, eksudat, serangga,

kotoran dan tanah. Habitat yang disukai oleh khamir adalah pada jaringan tanaman, daun, bunga, buah-buahan, produk fermentasi, tanah dan air.

Pemanfaatan khamir dalam bidang industri sudah berlangsung cukup lama. Hal ini dikarenakan khamir memiliki potensi yang membantu berbagai proses pembuatan produk industri, seperti industri makanan, minuman, pengolahan limbah, pembuatan bahan kimia, dan masih banyak lagi yang lain (Nasir, *et al.*, 2017). Pemanfaatan khamir tetap mengembangkan metode standar untuk sampling mikroba, deteksi dan enumerasi yang bertujuan untuk kontrol kualitas dan keamanan produk yang dihasilkan (Boundy & Mills, 2006).

Keberhasilan pemanfaatan khamir dalam produk industri ditentukan oleh kualitas dari khamir tersebut. Oleh karena itu, perlu dicari spesies yang mempunyai kemampuan atau toleransi tinggi terhadap suatu kondisi yang biasa terjadi dalam proses industri. Isolasi dalam bidang ilmu biologi terutama mikrobiologi merupakan salah satu tahapan penting yang harus dilakukan apabila ingin mendapatkan kultur murni berkualitas dari suatu mikroorganisme. Hal ini dikarenakan isolasi merupakan kegiatan memindahkan suatu mikroorganisme dari lingkungan asalnya untuk diperoleh isolat murni. Setelah proses isolasi, selanjutnya isolat murni dapat dikarakterisasi untuk diketahui bagaimana sifat-sifat dan manfaat yang dimiliki oleh mikroorganisme tersebut. Karakterisasi sendiri dapat meliputi karakterisasi morfologi, fisiologi maupun biokimia.

Etanol merupakan salah satu senyawa yang cukup banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang. Meningkatnya permintaan untuk etanol untuk berbagai keperluan industri seperti sumber energi alternatif, pelarut industri, agen pembersih dan pengawet (Belal, *et al.*, 2014), telah mengharuskan peningkatan produksi alkohol pada jenis ini. Produksi etanol biasanya dicapai melalui sintesis kimia substrat petrokimia dan konversi karbohidrat oleh mikroba yang ada dalam produk pertanian (Brooks, 2008). Penurunan cadangan yang terus berlanjut dan persaingan kebutuhan industri dengan stok petrokimia, mulai muncul penekanan global dalam produksi etanol melalui proses fermentasi (González-Hernández, *et al.*, 2012).

Buah nanas adalah salah satu buah yang banyak dibudidayakan di daerah tropis maupun subtropis. Di Jawa Tengah, nanas madu diperoleh dari Desa Belik, Kecamatan Belik, Kabupaten Pemalang. Nanas madu Belik yang menjadi komoditas unggulan Jawa Tengah, diketahui tumbuh dengan baik di Desa Belik yang berpasir (Istianah, 2017). Penggunaan limbah kulit nanas madu pada penelitian ini dikarenakan adanya sifat beda dari nanas madu dibanding nanas lainnya. Menurut USDA (2018) kandungan gula yang terdapat pada nanas madu lebih tinggi dan kandungan airnya lebih sedikit dibanding jenis nanas yang lain.

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Ali & Khan (2014) dapat diketahui bahwa pada kulit buah anggur yang di isolasi terdapat khamir yang bisa digunakan dalam proses fermentasi untuk menghasilkan etanol. Penelitian yang dilakukan oleh Nasir, *et al.* (2017) juga menunjukkan bahwa terdapat khamir *Saccharomyces cerevisiae* pada buah nanas yang juga bisa memproduksi bioetanol. Hal ini tidak menutup kemungkinan pada kulit buah nanas madu juga terdapat khamir yang juga bisa digunakan dalam industri produksi etanol. Pada penelitian yang dilakukan oleh Setyawati & Rahman (2010) diketahui bahwa kulit nanas yang di fermentasi bisa digunakan sebagai substrat fermentasi dengan penambahan *Saccharomyces cerevisiae* selama 10 hari. Namun, belum banyak penelitian yang membahas tentang khamir dari limbah kulit nanas madu dari Desa Belik, Pemalang, Jawa Tengah yang berpotensi untuk memproduksi bioetanol. Berdasarkan latar belakang tersebut, pada penelitian dilakukan isolasi dan karakterisasi morfologi biokimia khamir dari limbah kulit nanas madu (*Ananas comosus L.*) serta menganalisis karakter dan potensi isolat khamir untuk produksi bioetanol serta pengembangannya lebih lanjut di masa yang akan datang.

2. Bahan dan Metode

2.1. Bahan penelitian dan media

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah limbah kulit nanas madu (*Ananas comosus L.*); medium: *Potato Dextrose Agar*, *Malt Extract Agar*, *Malt Extract Broth 5%*, *Yeast Extract Peptone Dextrose Agar*, *Yeast*

Extract Peptone Dextrose Broth, Yeast Extract Peptone Glucose Broth, Custer's Chalk Agar, Christensen's Urea Agar, agar susu skim 30%; etanol 70%; NaOCl 0,5%; NaCl 0.89%; antibiotik kloramfenikol; *yeast extract* 1%; pepton 2%; glukosa 2%; galaktosa 2%; dekstroza 2%; sukrosa 2%; maltosa 2%; dan fruktosa 2%.

2.2. Isolasi Sampel dari Limbah Kulit Nanas Madu (*Ananas comosus* L.)

Isolasi khamir dilakukan dengan maserasi menggunakan kulit buah nanas madu (5 g) yang di desinfektan dengan etanol 70% selama 30 detik dan larutan NaOCl 0,5% selama 2 menit. Selanjutnya di bilas sebanyak 3x menggunakan air mengalir. Potongan kulit buah dihaluskan menggunakan mortar dan pestle serta kedalamnya ditambahkan 10 mL NaCl 0,89%. Ekstrak kulit nanas kemudian diencerkan hingga 10^{-4} dan disebar pada cawan petri yang berisi medium PDA (*Potato Dextrose Agar*) dengan ditambah ekstrak *yeast* 1% sebanyak 5 g/L dan 150 mg/L (150 ppm) klorampenikol (PDAY + Cl) (Cagno *et al.*, 2010). Potongan epidermis buah nanas madu juga diinokulasikan di atas permukaan media PDAY + Cl. Seluruh cawan petri lalu di inkubasi selama 48 jam menggunakan suhu 25°C. Khamir lalu di purifikasi dengan menggunakan media *Yeast Extract Pepton Dextrose Agar* (YEPDA) (Nasir *et al.*, 2016) dan ditumbuhkan dalam medium selektif untuk *screening* selanjutnya (Cagno *et al.*, 2010; Tikka *et al.*, 2013).

2.3. Karakterisasi Morfologis

Strain khamir terisolasi diidentifikasi dengan mempelajari karakteristik morfologi seperti yang dijelaskan oleh Kurtzman *et al.* (2011) serta Ali dan Khan (2014) yakni pemeriksaan warna, bentuk, tekstur, elevasi dan permukaan koloni khamir. Inokulasi dalam tabung steril berisi medium selektif digunakan untuk karakterisasi khamir. Strain terisolasi diinokulasikan ke dalam medium MEA (*Malt Extract Agar*) dan klorampenikol 200 ppm (Tille, 2015). Strain yang sudah diinokulasikan kemudian diinkubasi pada suhu 25°C selama 2 hari. Selanjutnya strain diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40x dan 100x. Reproduksi

aseksual dan pembentukan askospora oleh isolat khamir diamati dengan menumbuhkan strain ke medium *Malt Extract Broth* 5% dan di inkubasi pada suhu 25°C selama 6 hari. Setelah 6 hari, sel diamati secara mikroskopis menggunakan perbesaran 40x dan 100x untuk melihat reproduksi aseksual dan pembentukan askospora oleh isolat (Kurtzman *et al.*, 2011; Cagno, *et al.*, 2010).

2.4. Karakterisasi Biokimia

Uji Asimilasi pada Beberapa Sumber Karbon

Uji asimilasi dilakukan dengan menggunakan tabung reaksi yang didalamnya berisi tabung Durham. Pada setiap tabung terisi medium yang terdiri atas *yeast extract* 1%, pepton 2% dan sumber karbon 2%. Macam-macam sumber karbon yang digunakan antara lain glukosa, galaktosa, dekstroza, sukrosa, maltosa dan fruktosa. Selanjutnya, strain isolat sebanyak 1 mL diinokulasikan ke dalam tabung dan diinkubasi pada suhu 25°C sampai terbentuk gelembung gas dalam tabung atau maksimal selama 28 hari. Pertumbuhan pada masing-masing media uji dibandingkan dengan kontrol negatif yang terdiri dari media basal tanpa sumber karbon dengan mengamati turbiditasnya (Ali & Khan, 2014; Nasir *et al.*, 2017).

Uji Asimilasi Sumber Nitrogen pada Medium Agar

Isolat yang akan diuji disiapkan lalu diinokulasikan kedalam *Yeast Malt Extract Agar* (*Yeast extract* 1,7 g/L; *Malt extract* 1,7 g/L; amonium sulfat 5 g/L; dan agar 20 g/L). Strain diinkubasi pada suhu 30°C selama 4 hari. Jumlah pertumbuhan pada masing-masing media uji dibandingkan dengan kontrol negatif yang terdiri dari *Yeast Malt Extract Agar* tanpa amonium sulfat sebagai sumber nitrogen (Kanti, 2004).

Uji Toleransi terhadap Glukosa Tinggi

Strain isolat diinokulasikan ke dalam medium *Yeast Extract Peptone Glucose Broth* (YEPGB). Setiap tabung berisi 5 mL medium dengan konsentrasi glukosa 40% (m/v), 50% (m/v) dan 60% (m/v). Nilai kerapatan sel dihitung dengan

absorbansi pada panjang gelombang 600 nm menggunakan UV-Vis Spektrofotometer pada inkubasi 25°C selama 2 hari (Kurtzman *et al.*, 2011; Ali & Khan, 2014; Nasir *et al.*, 2017).

Produksi Asam dari Glukosa

Isolat yang sudah diperoleh kemudian diinokulasikan kedalam medium *Custer's Chalk Agar* yang sudah disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit. Medium tersebut terdiri atas glukosa 5%, 5 g CaCO₃, 5 g bubuk *yeast* ekstrak dan 20 g agar dan dilarutkan kedalam 1 liter akuades steril. Strain isolat diinkubasi pada suhu 25°C selama maksimal 2 minggu. Jika strain positif memproduksi asam, maka kapur akan terdegradasi dan akhirnya terlarut (Kurtzman *et al.*, 2011).

Hidrolisis Urea

Strain khamir hasil isolasi diinokulasikan kedalam medium *Christensen's Urea Broth* yang tersusun atas campuran 1 g pepton, 5 g NaCl, 2 g H₂PO₄, dan 12 µg fenol merah yang dilarutkan kedalam 1 L akuades steril dan pH 6,8. Sebanyak 4,5 mL larutan medium dipindahkan kedalam tabung uji dan disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit. Sebanyak 0,5 mL urea steril dengan kadar 20% ditambahkan ke masing-masing tabung. Strain diinkubasi pada suhu 25°C selama 4 hari dan dilakukan pengecekan setiap hari. Hasil positif dari uji ini adalah terbentuknya warna merah muda pada media didalam tabung, tetapi tidak pada tabung kontrol (Kurtzman *et al.*, 2011).

Uji Toleransi terhadap Etanol

Isolat khamir yang sudah diperoleh kemudian dikulturkan dalam erlenmeyer berisi medium *Yeast Extract Peptone Dextrose Broth* (YEPDB) yang mengandung alkohol 5%, 10%, dan 15%. Setelah inokulasi, sampel diinkubasi pada suhu 25°C selama 48 jam. Sampel diambil setiap 24 jam sekali untuk mengamati kerapatan optik dengan menggunakan UV-Vis Spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm (Ali & Khan, 2014; Nasir *et al.*, 2017).

Uji Protease (Hidrolisis Protein)

Uji protease dilakukan sesuai dengan protokol yang sudah dimodifikasi (Zhaochunhai, 2012) yakni menggunakan medium agar susu skim 30%. Sebanyak 30 g susu skim cair dan 20 g agar lalu kedalamnya ditambahkan akuades steril sehingga volume total menjadi 1 L. Pembentukan zona tranparan yang berada di sekitar isolat terinokulasi menunjukkan hasil positif adanya aktivitas protease oleh isolat strain.

Produksi dan Analisis Kadar Etanol menggunakan Piknometer

Isolat strain yang diketahui memiliki toleransi terbaik terhadap etanol dan glukosa tinggi digunakan untuk produksi bioetanol. Strain khamir kemudian diinokulasikan sebanyak 5 mL kedalam erlenmeyer berukuran 500ml yang berisi 200 ml medium *YEPGB (Yeast Extract Peptone Glucose Broth)*. Selanjutnya strain diinkubasi pada suhu 30°C selama 72 jam (Ali & Khan, 2014). Setiap 24 jam sekali, sampel diambil untuk diamati bioetanol yang diproduksi dan estimasi gula yang tersisa dengan metode DNS (*Dinitrosalicylic Acid*). Konsentrasi sel diketahui dengan mengukur kerapatan optik menggunakan UV-Vis Spektrofotometer pada absorbansi 600 nm (Yucel & Aksu, 2015).

Penentuan kadar bioetanol ditentukan berdasarkan kepadatan distilasi alkohol (massa jenis) pada 20°C dan dinyatakan dalam % (b/v) dengan menggunakan piknometer. Bioetanol hasil fermentasi di distilasi sebelum di ukur kadarnya. Piknometer dicuci dan dikeringkan kemudian ditimbang bersama penutupnya pada neraca analitik dengan ketelitian 0,01 g . Selanjutnya, akuades steril diisikan ke dalam piknometer sampai tanda batas dan ditimbang bersama penutupnya. Larutan bioetanol dari sampel dimasukkan ke dalam piknometer sampai tanda batas dan ditimbang bersama penutupnya. Menurut Hadeel *et al.*, 2011; Igwe *et al.*, 2012; Park, 2000 dalam (Woldu, *et al.*, 2015) gravitasi spesifik (berat jenis) sampel dihitung menggunakan rumus dibawah ini, kemudian di konversi

menjadi kadar etanol menggunakan tabel konversi etanol (v/v) :

$$\text{Gravitasi spesifik sampel} = \frac{(x_2 - x_1)}{(x_3 - x_1)}$$

Keterangan: X_1 = berat kosong piknometer, X_2 = berat piknometer + sampel, X_3 = berat piknometer + akuades steril.

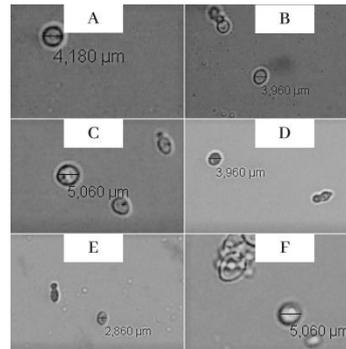
3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Isolasi dan Karakterisasi Morfologi Khamir dari Limbah Kulit Nanas Madu (*Ananas comosus* L.)

Berdasarkan hasil isolasi, diperoleh 6 isolat khamir dari kulit nanas madu (*Ananas comosus* L.) yaitu, isolat Ep-1, Ep-2, Ep-3, Ed-1, Ed-2, dan Ed-3. Karakterisasi dilakukan berdasarkan pengamatan morfologi koloni khamir secara makroskopik dan mikroskopik. Selain itu, juga didasarkan pada uji biokimia yang meliputi uji asimilasi karbon, asimilasi nitrogen, hidrolisis urea, hidrolisis protein, produksi asam dari glukosa, toleransi glukosa tinggi, toleransi etanol dan produksi etanol dari fermentasi serta analisis kadar etanolnya. Keenam isolat yang diperoleh secara epifit dan edofit memiliki kenampakan makroskopik dan mikroskopik yang hampir serupa. Isolat memiliki ciri-ciri berwarna putih hingga krem, tepian bergelombang, permukaan rata mencembung, berbentuk bulat hingga oval dan permukaan berkilau. Karakteristik morfologi dari masing-masing isolat dapat di lihat pada Tabell.

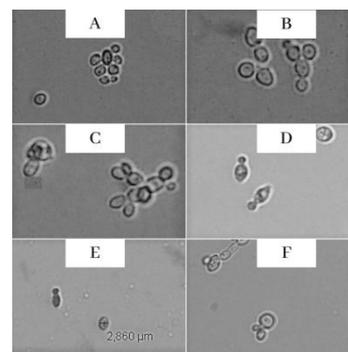
Tabel 1: Karakteristik Morfologi Isolat Khamir

Isolat Khamir	Warna Koloni	Elevasi	Permukaan	Tepian
Ep-1	Putih kekuningan	Cembung	Halus, mengkilap	Rata
Ep-2	Putih kekuningan	Cembung	Halus, mengkilap	Rata
Ep-3	Putih keruh	Tidak Rata	Halus	Bergelombang
Ed-1	Putih krem	Cembung	Halus, mengkilap	Rata
Ed-2	Putih krem	Cembung	Halus, mengkilap	Rata
Ed-3	Putih keruh	Datar	Halus	Bergelombang



Gambar 1 : Morfologi Sel Isolat Khamir (A) Ed-1, (B) Ed-2, (C) Ed-3, (D) Ep-1, (E) Ep-2, dan (F) Ep-3 pada perbesaran mikroskop 400x

Ujimorfologi yang telah dilakukan, menunjukkan bahwa seluruh isolat memiliki reproduksi aseksual dengan cara membentuk tunas (*budding cells*). Keenam isolat tidak memiliki struktur hifa dan tidak berfragmentasi. Jenis tunas (*budding*) yang dimiliki oleh ke-enam isolat khamir yakni tunas bipolar pada dasar yang lebaran tunas multilateral Kurtzman *et al.* (2011). Ukuran sel khamir yang di isolasi dari limbah kulit nanas madu rata-rata tidak lebih dari 6 µm, dengan ukuran paling besarnya yakni 5.090 µm, seperti yang terlihat pada Gambar 4.2.



Gambar 2 : Reproduksi aseksual masing-masing isolat khamir (A) Ed-1, (B) Ed-2, (C) Ed-3, (D) Ep-1, (E) Ep-2, dan (F) Ep-3 pada perbesaran mikroskop 400x

Berdasarkan karakterisasi morfologi yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa isolat khamir Ep-1 dan Ep-2 memiliki kemiripan dengan khamir *Wickerhamia* sp. yang selnya berbentuk oval hingga bulat telur dan bereproduksi secara aseksual dengan membentuk tunas bipolar. Hal ini seperti yang

dijelaskan oleh Kurtzman *et al.* (1998 dan 2011) bahwa *Wickerhamia* sp. Merupakan khamir berberentuk bulat berwarna putih kekuningan, sedikit pucat dan permukaan halus mengkilap. Ujung selnya tumpul berbentuk oval atau berbentuk seperti pin bowling dengan reproduksi aseksual membentuk tunas bipolar.

Isolat Ep-3 dan Ed-3 diketahui memiliki kemiripan dengan khamir dari kelompok *Zygosaccharomyces* sp. yang memiliki sel berbentuk oval atau bulat dengan tepian bergelombang serta berkembang biak dengan membentuk tunas multilateral. Menurut Kurtzman *et al.* (1998 dan 2011) khamir dari kelompok ini berbentuk bulat dengan warna putih keruh dan selnya berbentuk oval hingga bulat. *Zygosaccharomyces* sp. bereproduksi dengan membentuk tunas multilateral ketika ditumbuhkan dalam medium cair.

Berdasarkan karakterisasi morfologisnya, isolat Ed-1 dan Ed-2 diketahui memiliki kemiripan dengan khamir dari kelompok *Saccharomyces* sp. yang berbentuk bulat, permukaan halus dengan elevasi datar hingga cembung dan berwarna putih krem. Kedua isolat tersebut juga Kurtzman *et al.* (1998 dan 2011) menjelaskan bahwa khamir dari kelompok *Saccharomyces* sp. selnya berbentuk bulat (*globose*) dengan koloni berwarna putih hingga krem cerah dan elevasinya datar hingga cembung.

Uji asimilasi sumber karbon dilakukan dengan menggunakan 6 jenis sumber karbon yakni glukosa, fruktosa, galaktosa, sukrosa, dekstrosa dan maltosa. Glukosa, fruktosa dan dekstrosa merupakan sumber karbon yang bisa diasimilasi oleh ke-6 isolat khamir (Tabel 4.2). Glukosa merupakan jenis karbon paling umum yang bisa di asimilasi oleh khamir (Bolotin & Fukuhara, 2010). Hal serupa juga terjadi pada penelitian yang dilakukan oleh Patil (2006) dan Nasir, *et al.*, (2017). Fruktosa bisa diasimilasi oleh khamir terisolasi karena pada nanas madu terdapat kandungan fruktosa yang membedakannya dengan nanas pada umumnya (USDA, 2018), sehingga ini menjadi salah satu ciri khas khamir yang di isolasi dari limbah kulit nanas madu.

Menurut Bolotin & Fukuhara (2010); Boundy & Mills (2012), sumber karbon yang dapat diasimilasi oleh khamir sangat bervariasi tergantung pada spesiesnya. Variasi ini

diperoleh berdasarkan preferensi masing-masing isolat terhadap sumber karbon yang berkorelasi langsung dengan struktur sekuen terkode heksokinase (Patil, 2006). Khamir yang hidup di alam membutuhkan sumber karbon dan energi dalam bentuk molekul sederhana hasil dari perombakan senyawa organik oleh jamur dan bakteri (Kanti & Latupapua, 2001).

Fermentasi glukosa yang dilakukan dengan menggunakan media yang sama dengan uji asimilasi terhadap sumber karbon berupa glukosa. White & Zainasheff (2010) menjelaskan bahwa *proses fermentasi glukosa oleh khamir dilakukan dengan mengubah gula (sumber karbon) menjadi alkohol, karbon dioksida, dan senyawa lainnya yang mempengaruhi rasa makanan dan minuman ataupun produk fermentasi lainnya. Khamir melakukan ini untuk menghasilkan energi dan mendapatkan bahan untuk bereproduksi. Hal ini serupa dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Bajaj, et al., (2001), Patil (2006), Brooks (2008) dan Nasir, et al., (2017).*

Uji asimilasi nitrogen dengan penambahan ammonium sulfat pada media uji mengasilkan respon positif oleh ke-6 isolat. Hal ini ditandai dengan ke-6 isolat dapat tumbuh pada media uji pada waktu inkubasi baru berlangsung selama 24 jam, sama seperti yang terjadi pada media kontrol tanpa penambahan ammonium sulfat. Hasil yang sama juga didapatkan oleh Ruriani, et al., (2012) dan Nasir, *et al.*, (2017).

Karakterisasi biokimia berupa uji aktivitas urease oleh isolat khamir menghasilkan respon negatif dari ke-6 isolat. Hal ini ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna pada media uji Christensen's Urea Broth yang seharusnya menjadi merah muda (Kurtzman *et al.*, 2011), dengan warna awal media berupa oranye. Respon negatif ini menunjukkan bahwa tidak ada enzim urease yang dihasilkan oleh ke-6 isolat khamir. Enzim urease merupakan enzim yang berperan dalam proses hidrolisis urea.

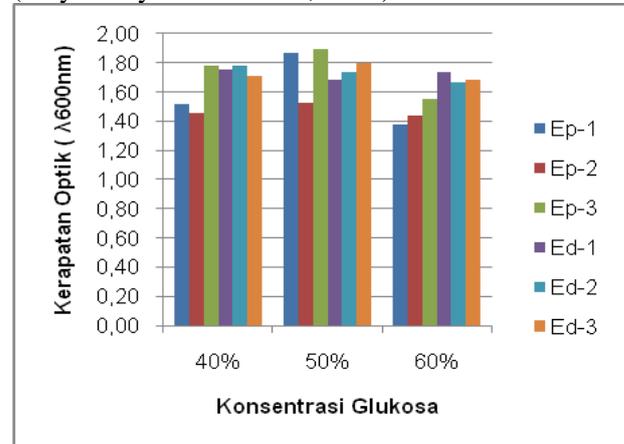
Uji hidrolisis protein (protease) menggunakan ke-6 isolat khamir menghasilkan respon positif dari isolat Ep-1, Ep-2, Ep-3 dan Ed-2, sedangkan pada isolat Ed-1 dan Ed-3 menghasilkan respon +D (positive delay). Hidrolisis protein adalah proses penguraian protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana (asam-asam amino) baik oleh enzim, basa maupun asam (Jaziri, A. *et al.*, 2017).

Protease dari mikroorganisme telah menarik banyak perhatian dalam dekade terakhir karena potensi bioteknologi mereka dalam berbagai proses industri seperti industri deterjen, tekstil, kulit, susu dan sediaan farmasi. Enzim proteolitik dari mikroorganisme adalah sumber yang lebih disukai dalam aplikasi industri enzim karena keuntungan teknis dan ekonomi (Saran *et al.*, 2007). Protease yang dihasilkan oleh mikroorganisme merupakan salah satu kelompok terbesar dari enzim industri dan menyumbang sekitar 60% dari total penjualan enzim di dunia (Zambare *et al.*, 2011).

Protein dari kelompok jamur termasuk khamir, telah menarik perhatian bioteknologi karena kelompok ini dapat tumbuh pada substrat biaya rendah dan mengeluarkan sejumlah besar enzim ke dalam medium biakan yang dapat mempermudah proses hilir di bidang industri (Anitha dan Palanivelu, 2013). Hasil positif dengan terbentuknya zona bening pada media uji menandakan terdapat aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh isolat khamir yang sudah di isolasi dari kulit nanas madu. Buah nanas madu seperti yang diketahui mengandung enzim bromelin (tergolong enzim protease) yang mampu menghidrolisis protein menjadi unit sederhananya yakni asam amino (Purwaningsih, 2017). Hal ini serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Patil (2006) dan Nasir, *et al.*, (2017).

Uji produksi asam dari glukosa menggunakan media Custer's Chalk Agar yang didalamnya terdapat endapan kapur (CaCO_3). Hasil positif dari uji ini adalah zat kapur akan terlarut dan media menjadi berwarna bening (Kurtzman *et al.*, 2011). Isolat khamir yang ditumbuhkan pada media ini memberikan respon yang hampir sama, tidak ada yang bisa mengubah keseluruhan media menjadi bening. Media uji yang diberi isolat Ed-1, Ed-3 dan Ep-1 tidak mengalami perubahan sehingga masih terdapat endapan kapur didalamnya. Pada media uji yang ditumbuhi isolat Ed-2, Ep-2 dan Ep-3 terdapat sedikit area yang berubah menjadi bening tetapi dalam waktu inkubasi lebih dari 7 hari. Hal ini menandakan ke-3 isolat ini menghasilkan asam, karena bisa mendegradasi zat kapur didalamnya. Namun, dalam jumlah yang sangat sedikit, sehingga disebut dengan respon lemah atau weak (W). Adanya produksi senyawa asam dalam media bisa mempengaruhi pertumbuhan khamir (Berry, *et al.*, 2012). Produksi asam pada media ini memiliki keterbatasan dalam

taksonomi. Namun, produksi asam cukup lemah di beberapa strain. Beberapa khamir yang menghasilkan asam sitrat, seperti beberapa spesies *Candida* memberikan reaksi positif yang lemah dalam uji ini (Satyanarayana & Kunze, 2009).

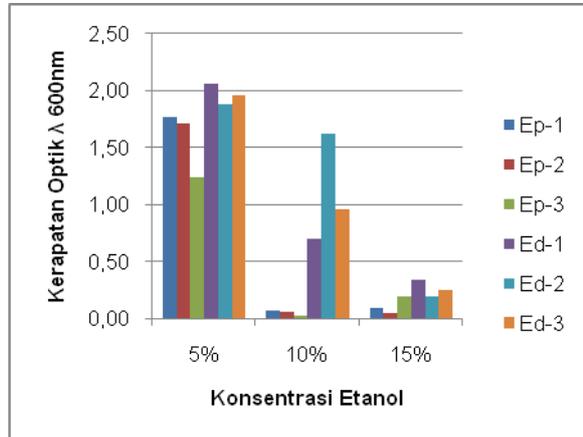


Gambar 3 : Nilai Kerapatan Optik Khamir (48 jam) pada Uji Toleransi terhadap Glukosa Tinggi di ukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada λ 600 nm

Tingkat toleransi glukosa tinggi (*High Osmotic Pressure*) yang dimiliki oleh isolat khamir terisolasi yakni pada konsentrasi glukosa 60%. Dimana pada konsentrasi tersebut nilai kerapatan optik yang diukur dengan Spektrofotometer-UV Vis (λ 600 nm) memiliki nilai terkecil dibandingkan dengan konsentrasi glukosa yang lain. Konsentrasi glukosa optimum bagi isolat khamir terisolasi adalah pada 50%, ditunjukkan dengan nilai kerapatan optik paling besar dibanding konsentrasi glukosa yang lain, yakni isolat Ep-1, Ep-2, Ep-3 dan Ed-3. Isolat Ed-1 bersifat fluktuatif karena masih bisa tumbuh hingga konsentrasi 60%, sedangkan isolat Ed-2 nilai kerapatan optik terbesar dihasilkan pada konsentrasi 40% yang menandakan konsentrasi glukosa optimumnya pada 40%. Hal serupa juga terjadi pada penelitian yang dilakukan oleh Patil (2006) dan Nasir, *et al.*, (2017).

Perbedaan penelitian sebelumnya dengan penelitian ini adalah pada konsentrasi glukosa yang digunakan. Pada penelitian ini, konsentrasi glukosa yang digunakan lebih tinggi. Penggunaan konsentrasi glukosa yang lebih tinggi dikarenakan untuk mengetahui batas toleransi khamir terhadap glukosa. Pada umumnya, kandungan glukosa yang tinggi pada awal fermentasi bisa meningkatkan kadar

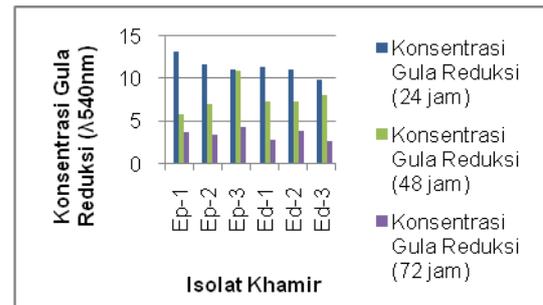
dan jumlah bioetanol selama fermentasi (Tikka, *et al.*, 2013). Kemampuan isolat khamir untuk tumbuh pada konsentrasi glukosa hingga 60% menjadi salah satu karakteristik khas khamir yang di isolasi dari limbah kulit nanas madu.



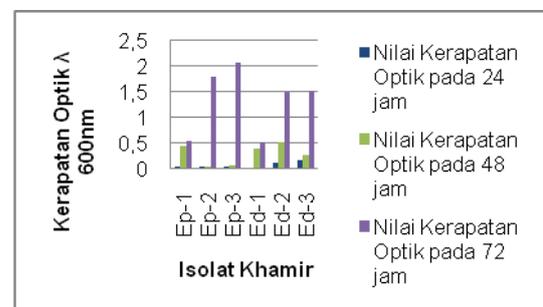
Gambar 4 : Nilai Kerapatan Optik Khamir (48 jam) pada Uji Toleransi terhadap Glukosa Tinggi di ukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada λ 600 nm

Nilai kerapatan optik khamir pada uji toleransi etanol di ukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dengan λ 600 nm. Konsentrasi etanol yang menghasilkan nilai kerapatan optik isolat khamir terbesar adalah pada etanol 5%. Hal ini menandakan konsentrasi optimum isolat khamir yang di isolasi dari limbah kulit nanas madu adalah pada 5%. Semakin besar konsentrasi etanol, nilai kerapatan optik khamir semakin menurun (Ali & Khan, 2014). Nilai kerapatan optik menandakan jumlah sel yang tumbuh pada media uji dan berkaitan erat dengan proses fermentasi yang dilakukan oleh sel khamir.

Isolat yang mengalami penurunan nilai kerapatan optik dari konsentrasi etanol 5-15% adalah Ep-2, Ed-1, Ed-2 dan Ed-3, sehingga diketahui bahwa isolat tersebut optimum tumbuh pada konsentrasi etanol 5%. Isolat Ep-1 dan Ep-3 nilai kerapatan optiknya fluktuatif (mengalami penurunan dan kenaikan). Hasilnya menunjukkan bahwa isolat khamir tumbuh dengan baik pada konsentrasi etanol 5-10%. Kapasitas toleransi etanol didasarkan pada kandungan asam lemak tak jenuh dan *heat shock protein* (hsp) yang diproduksi oleh sel khamir. Temuan serupa juga dilaporkan oleh Bajaj *et al.*, (2001) dan Patil (2006).



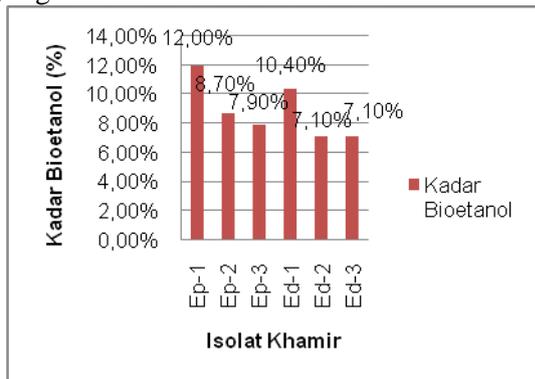
Gambar 5 : Nilai konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan oleh isolat khamir terisolasi selama proses fermentasi di ukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada λ 540 nm



Gambar 6 : Nilai kerapatan optik khamir terisolasi selama proses fermentasi yang di ukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada λ 600 nm

Produksi bioetanol dari khamir yang di isolasi dari limbah kulit nanas madu dilakukan dengan menggunakan media *Yeast Extract Pepton Glucose Broth* dan kadar bioetanol di ukur menggunakan piknometer. Setiap 24 jam sekali, dilakukan pengukuran nilai kerapatan optik sel khamir dan konsentrasi gula reduksi masing-masing isolat. Dari hasil pengukuran tersebut diketahui bahwa semakin lama waktu fermentasi, nilai kerapatan optik sel akan meningkat (Ali & Khan, 2014; Nasir, *et al.*, 2017). Namun, kadar gula reduksi yang dihasilkan semakin menurun dari 24 jam-72 jam. Hal ini menandakan pada awal fermentasi, glukosa yang merupakan sumber karbon digunakan sebagai penyedia energi utama oleh isolat khamir untuk melakukan proses pertumbuhan dan perkembangan sel. Sehingga pada awal fermentasi banyak glukosa yang tereduksi. Namun, seiring berjalannya waktu, konsentrasi gula reduksi semakin menurun. Hal ini dikarenakan jumlah glukosa dalam media juga semakin menurun, sehingga

mempengaruhi nilai konsentrasi gula reduksi yang dimanfaatkan oleh isolat khamir.



Gambar 7. Kadar Bioetanol yang dihasilkan oleh masing-masing isolat khamir terisolasi melalui Fermentasi dalam media *YEPGB*

Pengukuran kadar bioetanol yang dihasilkan melalui fermentasi oleh isolat khamir dari limbah kulit nanas madu dilakukan dengan menggunakan piknometer. Prinsip kerja piknometer adalah pengukuran kadar suatu larutan dengan membandingkan massa jenis larutan dengan massa jenis aquades atau air murni. Nilai massa jenis larutan tersebut kemudian dikonversikan ke tabel konversi massa jenis etanol sehingga diketahui kadar bioetanol tersebut.

Kadar bioetanol tertinggi dihasilkan oleh isolat Ep-1 yakni 12,00%, sedangkan kadar etanol terendah dihasilkan oleh isolat Ed-2 dan Ed-3 yaitu 7,10%. Pada penelitian menggunakan khamir dari buah nanas yang dilakukan oleh Nasir *et al.*, (2016), dapat diketahui bahwa kadar bioetanol yang dihasilkan berkisar antara 4% hingga 7,5%. Pada penelitian ini, kadar bioetanol yang dihasilkan lebih tinggi karena nanas yang digunakan adalah nanas madu. Dimana buah ini memiliki kandungan sukrosa dan fruktosa lebih banyak dibanding dengan nanas pada umumnya.

Bioetanol adalah salah satu parameter penting untuk menguji efisiensi pemanfaatan isolat khamir (Patil, 2006). Sebagian besar isolat menghasilkan bioetanol dalam kisaran 7,1 hingga 12,00 %. Sharma *et al.*, (2007) telah melaporkan bahwa bioetanol maksimum dapat diproduksi mulai 48 jam waktu inkubasi. Hasil yang sama juga diperoleh dari penelitian yang dilakukan oleh Belal *et al.*, (2014) dan Nasir *et al.*, (2017), yang melaporkan bahwa konsentrasi etanol maksimum diperoleh setelah 72 jam. Produksi

bioetanol meningkat secara bertahap sampai hari ketiga dan setelah itu menurun.

Toleransi terhadap konsentrasi gula dan etanol yang lebih tinggi digunakan untuk menghasilkan jumlah etanol yang cukup besar. Selain itu toleransinya erhadap konsentrasi etanol juga menjadi kriteria lain yang diperlukan untuk memilih khamir sebagai kandidat untuk produksi industri bioetanol (Hacking *et al.*, 1984 dan Rose, 1976 dalam Brooks 2008).. Adanya variasi dalam produksi bioetanol oleh isolat khamir yang berbeda mungkin dikarenakan oleh tingkat pemanfaatan gula mereka dalam medium fermentasi yang ditunjukkan oleh nilai konsentrasi gula reduksi dan batas toleransi etanol yang sudah diujikan sebelumnya. Hasil ini mirip dengan penelitian yang dilakukan oleh Patil (2006) dan Nasir, *et al.*, (2017). Berdasarkan parameter diatas, dapat diketahui bahwa isolat khamir Ep-1 yang di isolasi dari limbah kulit nanas madu ditemukan efisien dalam proses fermentasi dan dapat dimanfaatkan untuk produksi bioetanol.

5. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa hasil dari isolasi didapatkan 6 isolat dimana isolat Ep-1 dan Ep-2 mirip dengan *Wickerhamia* sp., Ep-3 dan Ed-3 mirip dengan *Zygosaccharomyces* sp. serta isolat Ed-1 dan Ed-2 mirip dengan *Saccharomyces* sp. Isolat Ep-1 diketahui paling berpotensi untuk produksi etanol karena toleran terhadap konsentrasi glukosa 60% dan etanol 15% serta kadar bioetanol yang diproduksi yakni 12,00%.

Daftar Pustaka

- Ali, M. N. & Khan, M. M., 2014. Screening, Identification and Characterization of Alcohol Tolerant Potential Bioethanol Producing Yeast. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 2(1), pp. 316-324.
- Al-Tameme, H. J., Hameed, I. H., Idan, S. A. & Hadi, M. Y., 2015. Biochemical Analysis of *Origanum vulgare* Seeds by Fourier-Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, VII(9), pp. 221-237.

- Anggita, R. D., 2017. SKRIPSI. *Studi Potensi Kulit Nanas Madu (Ananas comosus (L.) Merr.) sebagai Bahan Anti Browning Buah Apel Manalagi (Malus sylvestris Mill.)*, Bandar Lampung: Universitas Lampung.
- Berry, D. R., Russell, I. & Stewart, G. G., 2012. *Yeast Technology*. London: Springer Science & Business Media.
- Buzzini, P. & Margesin, R., 2013. *Cold-adapted Yeast: Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance*. Berlin: Springer Science and Bussines Media.
- Caballero, B., Fingles, P. M. & Toldra, F., 2016. *Encyclopedia of Food and Health*. Oxford: Academic Press of Elsevier.
- Erlita, Y., 2017. *Dinas Peternakan & Kesehatan Hewan Sumatera Barat*. [Online] Available at: <http://www.sumbarprov.go.id/details/news/10211> [Diakses 5 Januari 2018].
- Febriyanti, L. dan E. Rufita., 2011. SKRIPSI. *Pembuatan Bioetanol dari Limbah Kulit Nanas (Ananas comosus L. Merr) dengan Proses Enzimasi dan Fermentasi.*, Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh November.
- Feldmann, H., 2011. *Yeast : Molecular and Cell Biology*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Gava, C. A. T., de Castro, A. P., Pereira, C. A. & Fernandes-Junior, P. I., 2017. Isolation of Fruit Colonizer Yeasts and Screening Against Mango Decay Caused. *Biological Control*, November, pp. 1-10.
- González-Hernández, J. C., Pérez, E., Damíán, R. M. & Chávez-Parga, M. C., 2012. Isolation, Molecular, and Fermentative Characterization of A Yeast used in Ethanol Production during Mezcal Elaboration. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, September, XI(3), pp. 389-400.
- Hadeel, A. et al., 2011. Bioethanol Fuel Production from Rambutan Fruit Biomass as Reducing Agent of Global Warming and Greenhouse Gases. *African Journal of Biotechnology*, X(50), pp. 10157-10165.
- Hameed, I. H., Hamza, L. F. & Kamal, S. A., 2015. Analysis of Bioactive Chemical Compounds of *Aspergillus niger* by using Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Journal of Pharmacognosy and Photherapy*, VII(8), pp. 132-163.
- Ibrahim, W. et al., 2016. Penggunaan Kulit Nanas Fermentasi dalam Ransum yang Mengandung Gulma Berkhasiat Obat Terhadap Konsumsi Nutrient Ayam Broiler. *Agripet*, 16(2), pp. 76-82.
- Istianah, Nur. 2017. Evaporasi Multi-Tahap Menggunakan *Falling Film Evaporator (FFE)* untuk Meningkatkan Efisiensi Produk Konsentrat Nanas Madu. *Seminar Nasional & Teknologi Fakultas Teknik Universitas Muhammadiyah Jakarta*, No. 8, pp. 1-5.
- Karya Tani Mandiri, 2016. *Hasil Panen di Daerah Bandar Lampung*, Bandar Lampung: Pertanian.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W. & Boekhout, T., 2011. *The Yeast : A Taxonomic Study*. Fifth Edition penyunt. United States of America: Elsevier.
- Miguel, M. G. da C. P., Santos, Marinna R. R. M., Duarte, W. F., Almeida, E. G. de., Schwan, & Rosane F., 2012. Physico-chemical and Microbiological Characterization of Corn and Rice 'Calugi' Produced by Brazilian Amerindian People. *Food Research International*, Volume 49, pp. 524-532.
- Nasir, A., Rahman, S. S., Hossain, M. M. & Choudhury, N., 2017. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* from Pineapple and Orange and Study of Metal's Effectiveness of Ethanol Production. *European Journal of Microbiology and Immunology*, I(7), pp. 76-91.
- Nurhayati, 2013. Penampilan Ayam Pedaging yang Mengonsumsi Pakan Mengandung Kulit Nanas Disuplementasi dengan Yoghurt. *Agripet*, XIII(02), pp. 15-20.

- Pratiwi, D., Hasyim, A.I., & Affandi, M.I. 2016. Analisis Finansial dan Strategi Pengembangan Nanas Madu di Kabupaten Lampung Timur. *JIIA*. IV(1), pp. 15-21.
- Rainieri, S. & Zambonelli, C., 2009. Organism Associated with Acetic Acid Bacteria in Vinegar Production. Dalam: L. Solieri & P. Giudici, penyunt. *Vinegar of The World*. Italia: Springer, p. 72.
- Reed, G. & Nagodawithana, T. W., 2012. *Yeast Technology*. 2nd penyunt. New York: Springer Science & Business Media.
- Ruriani, E., Sunarti, T. C. & Meryadini, A., 2012. Yeast Isolation for Bioethanol Production. *HAYATI Journal of Biosciences*, September, XIX(3), pp. 145-149.
- Satyanaraya, T. & Kunze, G., 2009. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. New Delhi : Springer
- Setyawati, H dan N.A. Rahman., 2010. SKRIPSI. Bioetanol dari Kulit Nanas dengan Variasi Massa *Saccharomyces cerevisiae* dan Waktu Fermentasi. Malang: Institut Teknologi Nasional.
- Tikka, Chiranjeevi; Osuru, Hari Prasad; Atluri, Navya; Raghavulu, Praveen Chakravarthi Veera; Yellapu, Nanda Kumar; Mannur, Ismail Shaik; Prasad, Uppu Venkateswara; K., Narasimha Varma; Bhaskar, Matcha;, 2013. Isolation and Characterization of Ethanol Tolerant Yeast Strain. *Bioinformation*, IX(8), pp. 421-425.
- Tille, P. M., 2015. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. Missouri: Elsevier.
- White, C. & Zainasheff, J., 2010. *Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation*. Colorado: Brewer Publications.
- Woldu, A. R., Ashagrie, Y. N. & Tsigie, Y. A., 2015. Bioethanol Production from Avocado Seed Wastes Using *Saccharomyces cerevisiae*. *American Journal of Enviroment, Energy and Power Research*, III(1), pp. 1-9.
- Yucel, H. G. & Aksu, Z., 2015. Ethanol Fermentation Characteristics of *Pichia stipitis* Yeast from Sugar Beet Pulp Hydrolysate: Use of New Detoxification Methods. *FUEL*, Issue 158, pp. 793-799.
- Zhaochunhai, 2012. Isolation Characterization and Fermented Research of High Producing *Saccharomyces cerevisiae*. *Physic Procedia*, Volume 33, pp. 14-19.