

# Karakterisasi morfologi, biokimia, dan uji enzimatis isolat khamir buah apel (*Malus domestica* Borkh.) yang berpotensi menghasilkan bioetanol

Morphological, biochemical and enzymatic characterization of yeast isolates from apple fruits (*Malus domestica* Borkh.) that potentially to produce bioethanol

Hilmi Fadhl<sup>1</sup>, Endang Kusdiyantini<sup>1,2\*</sup>, Nurhayati<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Program Studi Biologi, Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro  
Jl. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang, Semarang 50275 Indonesia

<sup>2</sup>Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro  
Jl. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang, Semarang 50275 Indonesia

## ABSTRAK

Bioetanol merupakan salah satu produk yang dapat dihasilkan dari fermentasi mikroorganisme seperti khamir. Jenis khamir yang dapat menghasilkan bioetanol masih terbatas pada jenis khamir tertentu, seperti *Saccharomyces cerevisiae*, sehingga isolasi dan karakterisasi khamir perlu dilakukan untuk mendapatkan jenis khamir menghasilkan bioetanol. Khamir dapat tumbuh pada substrat kaya akan gula seperti pada buah-buahan, salah satunya buah apel. Uji enzimatis khamir dapat menunjukkan kemampuan khamir dalam memanfaatkan beberapa substrat. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi, karakterisasi, dan uji enzimatis khamir dari buah apel (*Malus domestica*). Isolasi dilakukan dengan menggunakan metode *spread plate* pada medium PDA. Pengamatan morfologi dilakukan secara makroskopis (bentuk, warna, elevasi, tepi, tekstur koloni) dan mikroskopis (bentuk, *budding*, ukuran sel). Pertumbuhan isolat khamir dilakukan pada temperatur 6, 28 dan 37°C serta pertumbuhan pada media dengan 50% glukosa. Karakterisasi biokimia dilakukan dengan uji fermentasi sumber karbon (glukosa, maltosa, sukrosa, laktosa), dan uji urease. Uji enzimatis khamir meliputi uji amilase, uji protease, uji lipase, dan uji selulase. Kadar bioetanol diukur dengan metode piknometer. Hasil isolasi khamir dari buah apel diperoleh 3 isolat yaitu K1, K2, dan K3, dengan ukuran sel berturut-turut 3,74 µm, 3,79 µm dan 3,41 µm. Hasil uji enzimatis secara kualitatif menunjukkan adanya aktivitas enzim amilase pada khamir dengan adanya zona hambat disekitar koloni. Berdasarkan karakterisasi morfologi dan biokimia terpilih isolat K2 yang diduga sebagai genus *Pichia sp.* dan mampu menghasilkan bioetanol sebesar 5,6% (v/v).

**Kata kunci:** khamir, karakteristik, uji enzimatis, apel, bioetanol

## ABSTRACT

Bioethanol can be produced by the fermentation using microorganisms such as yeast. The type of yeast that can produce bioethanol is still limited to certain yeast types such as *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and characterization of yeast need to be done to determine yeast isolates capable of producing bioethanol. Yeast can grow on a substrate that is rich in sugar as in the apple fruit. Enzymatic tests can support the ability to use on various substrates. This study aims to isolation, characterization, and enzymatic tests of yeast from apple that potential to produce bioethanol based on morphological and biochemical tests. The isolation method is done by using spread plates on PDA media. Morphological tests are carried out by making macroscopic (form, color, elevation, margin, the texture of colonies) and microscopic (form, budding, size of cells) observations of colonies and yeast cells. The growth was carried out on PDA at 6, 28, 37°C, and also 50% glucose observed, Carbohydrate fermentation test (glucose, maltose, sucrose, lactose), and urease were used to the biochemicals characterization. Enzymatic tests were using amylase test, protease test, lipase test, and cellulase test. The bioethanol was measured by pycnometer method. The results of yeast isolation from apples were obtained 3 isolates, namely K1, K2, K3 with cell size 3,74 µm, 3,79 µm, and 3,41 µm respectively. Enzymatic test results showed that the presence of amylase enzyme activity in yeast. Based on morphological and biochemical characterization, K2 isolate was selected as genus *Pichia sp.* and able to produce bioethanol by 5.6% (v / v).

**Keywords:** yeast, characterization, enzymatic test, apple, bioethanol.

---

\*Penulis korespondensi:

E-mail: kusdiyantini@yahoo.com

## 1. Pendahuluan

Bahan bakar minyak yang ada di Indonesia saat ini diperkirakan jumlahnya semakin terbatas. Menurut SKK Migas tahun 2017 bahwa cadangan minyak di Indonesia saat ini hanya cukup untuk 11 tahun ke depan. Energi alternatif seperti etanol dapat dijadikan solusi untuk mengatasi masalah tersebut. Etanol dapat dibuat melalui proses fermentasi dari mikroorganisme yang disebut bioetanol.(Soulemani *et al.*, 2017).

Khamir merupakan mikroorganisme uniseluler yang dapat hidup dalam rentang wilayah yang cukup luas. Menurut Barth *et al.*, (2010) khamir dapat hidup pada lingkungan yang ekstrem dan memiliki bahan organik tinggi. Penelitian tentang khamir di Indonesia banyak dilakukan dengan cara eksplorasi. Hal ini diyakini karena banyak peneliti yang beranggapan bahwa masih banyak spesies khamir yang belum diketahui di alam dibandingkan dengan yang telah diketahui (Jumiyati *et al.*, 2012). Penelitian mengenai keragaman khamir tanah telah banyak dilakukan oleh para peneliti sebelumnya yang telah mengisolasi khamir dari berbagai variasi tipe ekosistem tanah seperti daerah antartika, gurun, dan hutan subtropika. Akan tetapi belum banyak peneliti yang melaporkan keragaman khamir yang hidup di tanah tropis (Kanti, 2004).

Khamir penghasil bioetanol dapat ditemukan pada daerah dengan bahan organik yang tinggi. Bahan berorganik tinggi dapat ditemukan pada tanah maupun tumbuhan. Salah satu bahan yang memiliki kandungan organik adalah buah apel. Buah apel memiliki kandungan gula seperti glukosa dan fruktosa yang tinggi sehingga memungkinkan banyak khamir yang tumbuh pada lingkungan tersebut. Menurut Nurfitriani (2017) bahwa buah apel memiliki kandungan air, kalori, protein, lemak, karbohidrat, kalsium, fosfor, besi, natrium, potassium, vitamin A, vitamin B1, vitamin B2, vitamin C, dan niasin. Kandungan glukosa yang terkandung pada apel dapat dimanfaatkan oleh khamir sebagai sumber karbon serta akan difermentasi menjadi etanol. Khamir yang terdapat dalam buah apel dapat diperoleh dengan cara isolasi.

Karakterisasi khamir merupakan suatu cara untuk mengidentifikasi khamir yang belum diketahui jenisnya. Identifikasi tersebut diantaranya meliputi uji morfologi dan uji biokimia (Kurtzman & Fell, 1998). Hasil yang didapatkan dari uji-uji yang dilakukan kemudian dibandingkan dengan referensi terpercaya seperti artikel pada jurnal bereputasi. Hasil tersebut juga akan mengetahui genus isolat yang telah didapatkan bahkan tingkat spesies jika memungkinkan. Tingkat spesies baru memungkinkan dipercaya apabila melewati uji genetik dari isolat tersebut.

Uji morfologi koloni dan sel khamir dilakukan dengan mengamati struktur makroskopis dan mikroskopis. Hasil uji makroskopis dan mikroskopis tersebut akan dibandingkan dengan jenis-jenis khamir yang telah diketahui spesiesnya. Namun, hasil ini masih belum kuat jika ditujukan untuk mengetahui tingkat genus maupun spesies. Tetapi uji morfologi ini dapat digunakan sebagai data untuk memperkirakan genus isolat yang belum diketahui melalui kemiripan morfologinya dengan spesies yang telah diketahui.

Uji biokimia khamir diperlukan untuk memperkuat hasil pada uji morfologi. Hasil yang didapatkan dari uji biokimia ini bisa menginterpretasikan isolat yang belum diketahui spesiesnya hingga ke tingkat genus. Hal tersebut dikarenakan setiap khamir memiliki ciri khas melakukan metabolisme biokimia dalam hidupnya. Jika hasil yang didapatkan sesuai dengan khamir yang telah diketahui genusnya maka khamir tersebut berhasil teridentifikasi.

Uji enzimatik merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui kemampuan khamir dalam menggunakan beberapa substrat. Setiap isolat khamir memiliki kemampuan yang berbeda dalam memanfaatkan berbagai macam substrat. Hal tersebut dikarenakan setiap jenis khamir memiliki enzim yang berbeda-beda. Hal tersebut juga menunjukkan bahwa khamir yang belum diketahui sifat enzimatiknya dapat diketahui sifatnya dan dimanfaatkan untuk meningkatkan penggunaan substrat sehingga hasil fermentasi dapat digunakan secara optimal.

Penelitian ini akan melakukan karakterisasi dan uji enzimatik isolat khamir hasil isolasi dari buah apel (*Malus domestica*) yang berpotensi menghasilkan bioetanol dengan uji morfologi dan biokimia. Penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan dan informasi hasil isolasi khamir serta kemampuan enzimatik khamir dari buah.

## 2. Metodologi

**Isolasi khamir dari buah apel.** Sebanyak 150 g buah apel di jus dan diambil ekstraknya dengan cara disaring. Hasil ekstrak kemudian didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang. Hasil ekstrak sebanyak 1 ml kemudian dilakukan pengenceran sampai  $10^{-6}$ . Medium isolasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium PDA dengan komposisi : 25 g kentang, 2 g dekstrosa, dan 2 g agar, 100 ml akuades, dan 0,05 g antibiotik kloramfenikol. Ekstrak buah apel yang telah diencerkan dalam  $10^{-4}$  sampai  $10^{-6}$  kemudian diambil masing masing sebanyak 100  $\mu$ l dan *spread plated* pada medium PDA dalam keadaan aseptis. Hasil *spread plated* pada medium PDA kemudian

diinkubasi selama 2 hari (48 jam) pada suhu 28 °C. Koloni yang tumbuh kemudian dimurnikan dengan cara digores kembali pada medium agar miring pada tabung reaksi (Okwulehie, 2010).

**Pengamatan morfologi koloni dan sel isolat khamir.** Koloni isolat khamir yang tumbuh pada inkubasi 48 jam dilakukan pengamatan koloni dan sel secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis yang meliputi tekstur, tepi, elevasi, warna, dan bentuk koloni. Pengamatan mikroskopis meliputi bentuk sel (bulat, oval, silinder, ovoid, sferikal, sferoid), *budding*, dan ukuran sel.

**Uji biokimia isolat khamir.** Uji biokimia meliputi uji pertumbuhan pada berbagai temperatur (6 °C, 28 °C, 37° C), uji fermentasi karbon, uji pertumbuhan pada 50% glukosa, dan uji urease. Uji pertumbuhan pada berbagai temperatur dilakukan pada medium PDA dengan waktu inkubasi 48 jam. Uji fermentasi karbon dilakukan pada medium basal (4,5 g/L yeast extract, 7,5 g/L pepton, 2% gula-gula uji ) dengan waktu inkubasi 48 jam. Uji pertumbuhan pada 50 % glukosa dilakukan pada medium PDA yang telah ditambahkan 50 % glukosa dengan waktu inkubasi 48 jam. Uji urease dilakukan pada medium CUB (1 g/L pepton, 5 g/L NaCl, 2 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 ml/L larutan urea 20%) dengan waktu inkubasi 48 jam (Kurtzman & Fell, 1998).

**Uji enzimatis isolat khamir.** Uji enzimatis yang dilakukan meliputi uji amilase, lipase, protease, dan selulase. Uji amilase dilakukan pada medium PDA yang ditambahkan dengan 0,2 % amilum dengan waktu inkubasi 48 jam. Hasil inkubasi uji amilase kemudian diteteskan dengan larutan iodine (Freire *et al.*, 2017). Uji lipase dilakukan pada medium PDA yang ditambahkan dengan 0,2 % olive oil dengan waktu inkubasi 48 jam (Ayadi *et al.*, 2018). Uji protease dilakukan pada medium skim milk agar (10 % skim milk powder, 2% agar) dengan waktu inkubasi 48 jam (Budak *et al.*, 2016). Uji selulase dilakukan pada medium CMC agar (1% CMC agar) dengan waktu inkubasi 48 jam. Hasil inkubasi uji selulase kemudian dituangkan dengan larutan *congo red* 0,1 % selama 20 menit dan dibilas dengan larutan NaCl 1M selama 15 menit (Adelabu *et al.*, 2019).

**Produksi bioetanol.** Inokulum dibuat dalam medium PDB (250 g/L kentang, 20 g/L dekstrosa) sebanyak 100 ml yang telah diinokulasikan 1 ose isolat khamir. Medium kemudian diinkubasi selama 21 jam hingga didapatkan kerapatan sel 10<sup>7</sup> (Fawole & Oso, 2007). Hasil inkubasi inokulum kemudian dimasukkan sebanyak 10 % kedalam medium fermentasi PDB dengan volume 500 ml. Medium fermentasi kemudian diinkubasi selama 4 hari (Amalia, 2014). Hasil inkubasi kemudian didestilasi dengan suhu 80 °C. Hasil destilat kemudian dihitung bobot jenisnya menggunakan piknometer. Hasil perhitungan bobot jenis kemudian dibandingkan dengan tabel kadar etanol pada buku Farmakope Indonesia.(Susilo dkk., 2017).

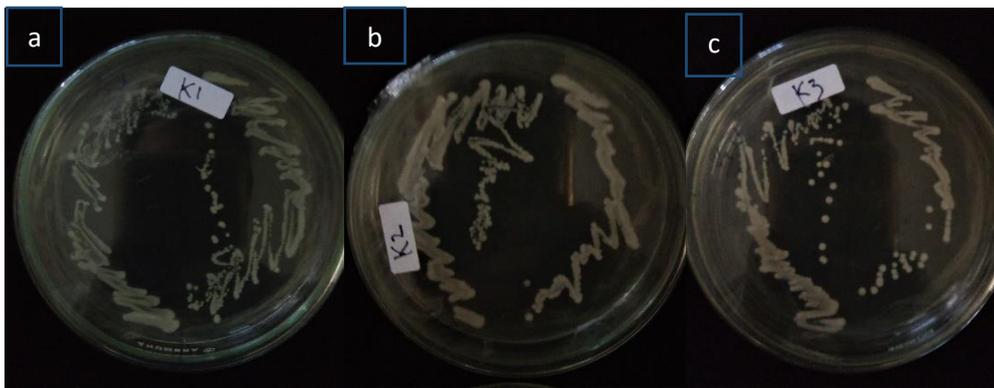
$$\text{Bobot Jenis} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0}$$

Keterangan : W<sub>2</sub> = Bobot piknometer yang berisi destilat  
 W<sub>1</sub> = Bobot piknometer + air suling  
 W<sub>0</sub> = Bobot piknometer kosong

### 3. Hasil dan Pembahasan

#### 3.1 Isolasi dan Karakterisasi Morfologi Khamir dari Buah Apel (*Malus domestica*)

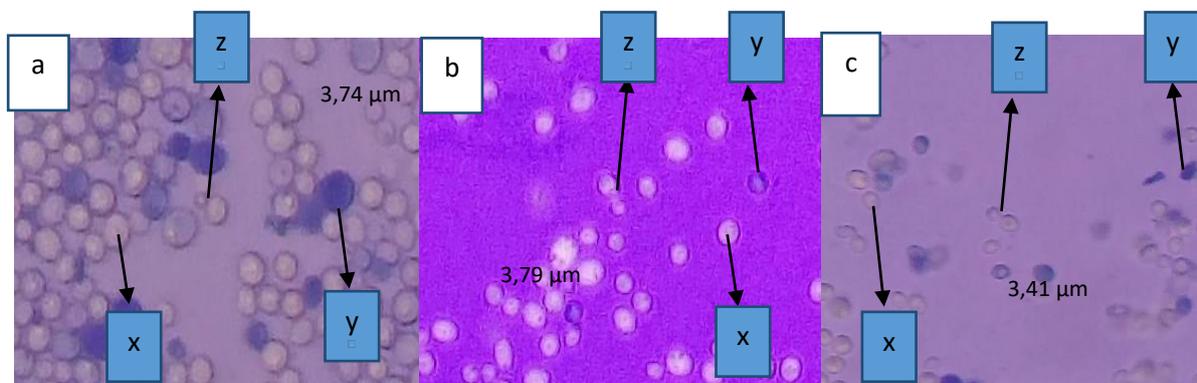
Hasil isolasi diperoleh 3 isolat khamir yakni K1, K2, dan K3 (Gambar 1). Ciri-ciri morfologi koloni menunjukkan bahwa K1 memiliki warna putih susu, tepi koloni tidak rata, elevasi rata, bentuk koloni tidak teratur, dan tekstur *butyrous*. Isolat K2 memiliki ciri koloni warna putih susu, tepi rata, elevasi raised, bentuk bulat, dan tekstur *butyrous*. Isolat K3 memiliki ciri koloni yang sama dengan isolat K2 dalam hal warna, tepi, elevasi, bentuk, dan tekstur (Tabel 1).



Gambar 1. Morfologi koloni isolate khamir K1 (a), K2 (b), dan K3 (c)

Menurut Kurtzman & Fell (1998) bahwa morfologi makroskopis khamir dapat diamati dari tekstur, warna, elevasi, bentuk, dan tepi koloni. Tekstur terdiri atas cair atau kental, *butyrous* (krim), *friable* (rapuh), dan *membranous* (berselaput). Bentuk koloni khamir dapat berupa bulat, *irregular*, *filamentous*, dan *rhizoid*. Warna koloni khamir dapat berupa warna kuning, oranye, dan merah serta warna krem dan putih yang dimiliki oleh kebanyakan khamir. Elevasi khamir dapat berupa *flat* (datar), *raised* (sedikit menonjol), *convex* (cembung), dan *umbonate* (bentuk cembung namun ditengah lebih menonjol). Tepi koloni khamir dapat berupa *entire* (rata), *undulate* (bergelombang), dan *filiform* (tidak rata). Setiap khamir memiliki karakteristik koloni masing masing dalam hal tepi, elevasi, warna, bentuk, dan tekstur sehingga dapat dibedakan antara jenis khamir satu dengan yang lainnya.

Pengamatan morfologi mikroskopis (Gambar 2.) dilakukan dengan cara melakukan perwarnaan pada sel khamir menggunakan metilen biru.



Gambar 2. Morfologi sel isolat khamir pada inkubasi 2 hari. K1 (a), K2 (b), dan K3 (c), perbesaran 400x.

Keterangan : x : sel khamir yang hidup berwarna bening, y : sel khamir yang mati berwarna biru,  
z : budding sel khamir.

Berdasarkan pengamatan mikroskopis maka morfologi sel memiliki kesamaan diantara ketiga isolat khamir. Bentuk sel dari ketiga isolat khamir yakni bulat. Ukuran yang dimiliki oleh ketiga isolat khamir untuk K1 sebesar 3,74 µm, K2 sebesar 3,79 µm, dan K3 sebesar 3,41 µm (Tabel 1). Reproduksi vegetatif ketiga isolat membentuk *budding*. Khamir yang terwarnai oleh zat metilen biru menunjukkan kematian pada sel khamir sedangkan yang tidak terwarnai masih hidup. Menurut Shen *et al.*, (2014) bahwa hal ini menunjukkan terjadinya oksidasi pada sel khamir yang telah mati oleh zat metilen biru karena membran yang dimiliki oleh khamir yang telah mati tidak lagi bersifat semi permeabel. Khamir yang hidup dapat mereduksi zat metilen biru karena membran sel khamir masih aktif atau bersifat semi permeabel dalam mereduksi zat metilen biru sehingga sel tidak mampu terwarnai.

Tabel 1. Morfologi isolat khamir hasil isolasi dari buah apel (*Malus domestica*)

No.	Isolat khamir	Makroskopis					Mikroskopis	
		Warna	Tepi	Elevasi	Bentuk	Tekstur	Bentuk	Ukuran Sel ( $\mu\text{m}$ )
1.	K1	Putih Susu	Tidak rata	Rata	Bulat	<i>Butyrous</i>	Bulat	3,74
2.	K2	Putih Susu	Rata	<i>Raised</i>	Bulat	<i>Butyrous</i>	Bulat	3,79
3.	K3	Putih Susu	Rata	<i>Raised</i>	Bulat	<i>Butyrous</i>	Bulat	3,41

### 3.2 Karakterisasi Biokimia Hasil Isolasi dari Buah Apel

Hasil karakterisasi biokimia isolat khamir untuk uji pertumbuhan pada berbagai temperatur ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji pertumbuhan pada berbagai temperatur

Isolat Khamir	Suhu ( $^{\circ}\text{C}$ )		
	6	28	37
K1	-	+	+
K2	-	+	+
K3	-	+	+

Keterangan : + = isolat tumbuh - = isolat tidak tumbuh

Hasil uji menunjukkan bahwa pada suhu  $28^{\circ}\text{C}$  dan  $37^{\circ}\text{C}$  isolat K1, K2, dan K3 dapat tumbuh dengan baik. Berdasarkan kemampuan tumbuh pada suhu tersebut menunjukkan bahwa isolat khamir tersebut bersifat mesofil yakni mampu hidup pada suhu  $20-37^{\circ}\text{C}$ . Pertumbuhan khamir pada suhu  $6^{\circ}\text{C}$  menunjukkan hasil yang negatif ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan ketiga isolat khamir. Berdasarkan ketidakmampuan tumbuh pada suhu  $6^{\circ}\text{C}$  maka ketiga khamir tersebut bukan termasuk sifat psikrofil yakni khamir yang mampu tumbuh pada suhu dibawah  $20^{\circ}\text{C}$ . Menurut Kurtzman & Fell (1998) bahwa uji pertumbuhan merupakan salah satu uji untuk mengidentifikasi jenis khamir. Umumnya khamir dapat hidup pada suhu  $20-28^{\circ}\text{C}$ . Beberapa khamir tertentu ada yang mampu hidup dalam kondisi ekstrim yakni dibawah suhu  $15^{\circ}\text{C}$  dan juga pada suhu tertentu seperti 30 sampai  $37^{\circ}\text{C}$ . Kemampuan hidup khamir yang berbeda dalam berbagai suhu menunjukkan perbedaan genus maupun spesies.

Tabel 3. Hasil uji pertumbuhan isolate khamir pada 50 % Glukosa

Isolat khamir	Hasil uji
K1	+
K2	+
K3	+

Keterangan : + = isolat tumbuh , - = isolat tidak tumbuh

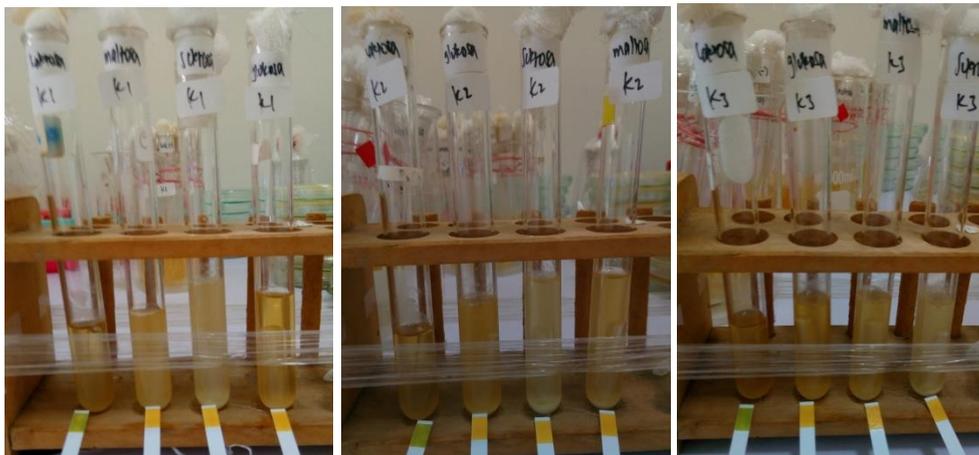
Hasil uji (Tabel 3) menunjukkan bahwa ketiga isolat khamir mampu tumbuh pada medium 50% glukosa. Menurut Kurtzman & Fell (1998) bahwa uji pertumbuhan pada 50% glukosa merupakan salah satu uji untuk mengidentifikasi khamir. Khamir pada umumnya mampu hidup dengan konsentrasi glukosa hingga 40%. Beberapa spesies khamir ada yang mampu hidup dengan konsentrasi glukosa 50% sampai 70%. Khamir diharapkan dapat diaplikasikan pada lingkungan dengan konsentrasi glukosa yang tinggi maka khamir tersebut akan resisten ketika di uji pada media dengan konsentrasi yang tinggi. Menurut Xu *et al.*, (2014) 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 sehingga dapat beradaptasi dengan konsentrasi gula yang tinggi.

Tabel 4. Hasil uji fermentasi sumber karbon isolat khamir

Isolat khamir	Glukosa	Maltosa	Sukrosa	Laktosa
K1	+	+	+	-
K2	+	+	+	-
K3	+	+	+	-

Keterangan : + = terjadi pembentukan asam dan produksi gas  
 - = tidak terbentuk asam maupun gas

Hasil uji fermentasi karbon menunjukkan bahwa ketiga isolat khamir positif memiliki kemampuan dalam fermentasi sumber karbon dari glukosa, sukrosa, dan maltosa. (Tabel 4). Hal ini ditunjukkan dengan adanya gas yang terbentuk pada tabung durham dan terjadi produksi asam dengan adanya perubahan pH yang dapat terlihat dari perubahan warna pH stick dari hijau (netral) ke kuning (asam). Hasil uji menggunakan sumber karbon laktosa menunjukkan hasil negatif dengan ditandai tidak adanya produksi gas pada tabung durham dan tidak mengalami perubahan pH menjadi asam. (Gambar 3). Menurut Kurtzman & Fell (1998) bahwa uji fermentasi karbon merupakan uji identifikasi khamir dengan melihat aktivitas fermentasi yang dialami oleh khamir. Fermentasi ditandai dengan adanya produksi gas karbondioksida dan asam organik. Gas karbondioksida dihasilkan dengan adanya proses respirasi khamir saat fermentasi. Gas karbondioksida dapat terlihat dalam tabung durham.



Gambar 3. Hasil uji fermentasi sumber karbon isolate khamir K1, K2, K3.

Menurut Yalcin *et al.*, (2010) bahwa asam organik dapat terbentuk saat fermentasi oleh khamir dikarenakan proses fermentasi melibatkan proses metabolisme energi yang akan menghasilkan beberapa asam organik seperti asam sitrat, isositrat, dan sebagainya. Produksi asam dapat terlihat dengan berubahnya indikator pH dari netral menjadi asam dengan pH stick. Isolat khamir yang mampu melakukan fermentasi dengan menghasilkan asam dan gas menunjukkan khamir tersebut bersifat heterofermentatif. Menurut Basso *et al.*, (2013) bahwa heterofermentatif merupakan proses fermentasi dimana gula seperti glukosa mampu terfermentasi sehingga menghasilkan CO<sub>2</sub>, etanol, dan asam asetat. Reaksi oksidasi glukosa akan dibentuk piruvat melalui glikolisis kemudian piruvat diubah menjadi asetaldehid oleh enzim piruvat dekarboksilase. Asetaldehid kemudian teroksidasi menjadi etanol dan asam asetat.

Uji selanjutnya adalah uji urease. Uji urease merupakan salah satu uji biokimia khamir yang digunakan untuk mengetahui aktifitas enzim urease yang dimiliki oleh khamir. Uji urease merupakan karakter yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi jenis khamir.

Tabel 5. Hasil Uji Urease

Isolat khamir	Hasil uji
K1	-
K2	-
K3	-

Keterangan : + = terjadi perubahan pH lebih basa  
- = pH tetap netral

Uji urease menunjukkan hasil negatif yang ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan pH medium menjadi lebih basa yang ditandai dengan tidak berubahnya warna pH stick dari warna hijau menjadi biru. (Tabel 5). Berdasarkan uji tersebut bahwa ketiga isolat khamir tersebut tidak memiliki enzim urease. Menurut Kurtzman & Fell (1998) bahwa uji urease untuk mengidentifikasi khamir dikatakan positif yakni terjadinya perubahan pH medium dari netral menjadi basa. Konsep dasar adanya aktivitas enzim urease adalah proses katalisis urea menjadi amonia. Urea merupakan zat yang bersifat netral dan amonia bersifat basa.

Hasil uji morfologi dan biokimia kemudian digunakan untuk mengkarakterisasi genus isolate, menggunakan metode deskriptif kualitatif berdasarkan buku *The Yeast : A Taxonomic Study*. Tabel 6 menunjukkan perbandingan hasil uji isolate khamir dengan isolat yang telah diketahui genusnya.

Tabel 6. Perbandingan Isolat K1, K2, dan K3 dengan *Pichia sp.*

	Isolat			<i>Pichia sp.</i>
	K1	K2	K3	
Bentuk sel	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat hingga Oval
Ukuran sel ( $\mu\text{m}$ )	3,74	3,79	3,41	1,9 – 6,1
Reproduksi vegetatif	<i>Budding</i>	<i>Budding</i>	<i>Budding</i>	<i>Budding</i>
Bentuk koloni	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat
Warna	Putih susu	Putih susu	Putih susu	Putih hingga krem
Elevasi	Datar	Raised	Raised	Datar hingga <i>raised</i>
Tekstur	<i>Butyrous</i>	<i>Butyrous</i>	<i>Butyrous</i>	<i>Butyrous</i>
Tepi	Tidak rata	Rata	Rata	Rata hingga bergelombang
Suhu ( $^{\circ}\text{C}$ )	25-37	25-37	25-37	25-37
Konsentrasi Glukosa 50%	+	+	+	+
Urease	-	-	-	-
Fermentasi karbon *	+	+	+	+

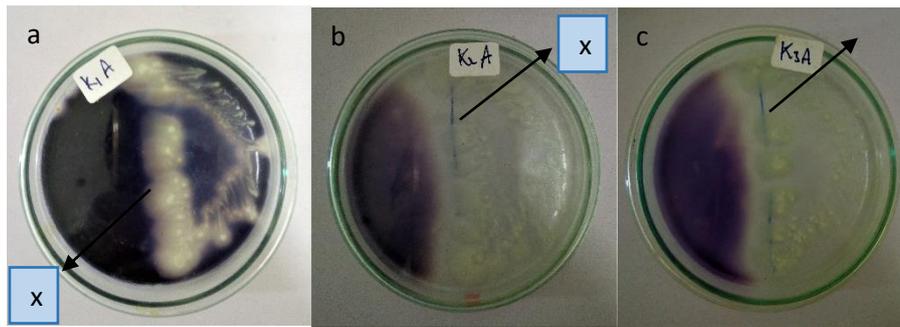
Keterangan : \* (mampu memfermentasi jenis gula glukosa, maltosa, dan sukrosa)

Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa isolat K1, K2, dan K3 diduga mirip dengan genus *Pichia sp.* Menurut Kurtzman & Fell (1998) bahwa *Pichia sp.* merupakan salah satu genus dari khamir yang memiliki karakteristik diantaranya bentuk sel bulat hingga oval, reproduksi aseksual membentuk budding, ukuran sel dari 1,9 – 6,1  $\mu\text{m}$ , bentuk koloni bulat, warna putih hingga krem, elevasi datar hingga *raised*, tekstur *butyrous*, tepian rata hingga bergelombang, tumbuh pada suhu 25 – 37 $^{\circ}\text{C}$ , hidup pada konsentrasi glukosa 50%, tidak mampu menghasilkan enzim urease, dan mampu menfermentasi karbon berupa gula glukosa, maltosa, dan sukrosa. Karakter yang sama telah dipublikasi oleh Juhnveica *et al.*, (2011) bahwa genus *Pichia* merupakan salah satu mikroba khamir yang dominan merusak buah apel.

### 3.3 Uji Enzimatis

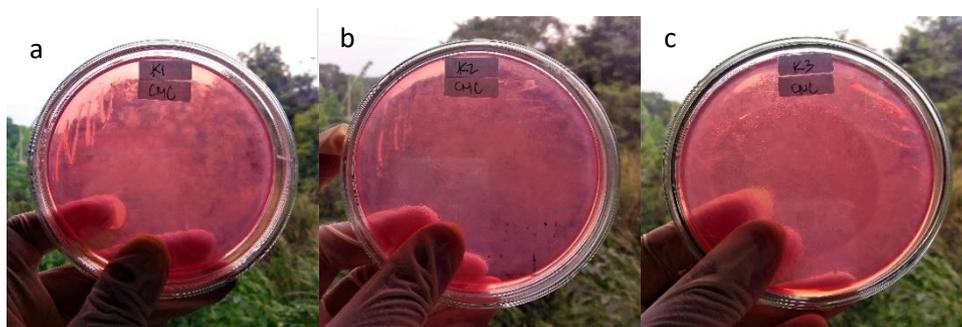
Uji enzimatis khamir merupakan uji untuk melihat aktivitas khamir dalam menggunakan substrat karena adanya peran enzim yang dimiliki. Uji enzimatis yang dilakukan yakni diantaranya uji amilase, lipase, protease, dan

selulase. Uji-uji tersebut dilakukan secara kualitatif dengan melihat perubahan media uji yang telah diinokulasikan oleh isolat khamir.



Gambar 4. Hasil uji enzimatis amilase isolat khamir, K1 (a), K2 (b), dan K3 (c)  
Keterangan : x = zona bening karena adanya aktivitas amilase

Hasil uji amilase (Gambar 4) pada ketiga isolat khamir menunjukkan hasil positif memiliki aktifitas enzim amilase. Aktivitas amilase ditandai dengan adanya zona bening disekitar koloni khamir. Aktivitas enzim amilase paling besar dari ketiga isolat khamir tersebut yaitu isolat K2. Hal tersebut ditunjukkan dengan adanya zona bening lebih besar dibandingkan dengan isolat khamir lainnya. Menurut Freire *et al.*, (2017) bahwa uji amilase ditandai hasil positifnya dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni khamir. Amilum yang terdapat dalam media mengalami degradasi oleh enzim amilase yang dimiliki oleh khamir sehingga pewarna iodine yang mewarnai amilum dari biru kemudian menjadi bening. Menurut Nwokocha & Ogunmola (2014) amilum akan terwarnai oleh iodine dikarenakan amilum terdiri atas kandungan amilosa dan amilopektin. Amilosa akan bereaksi dengan zat iodine menjadi warna biru. Amilopektin akan bereaksi dengan zat iodine menjadi warna violet. Amilum akan mengalami perubahan warna menjadi bening apabila mengalami degradasi akibat aktivitas enzim amilase. Enzim amilase yang dimiliki oleh ketiga isolat khamir dapat dimanfaatkan untuk mengubah substrat yang mengandung amilum menjadi produk seperti bioetanol. Menurut Carrasco *et al.*, (2016) bahwa enzim amilase yang dimiliki khamir dapat dioptimalkan untuk menghasilkan produk bioetanol dengan memanfaatkan substrat yang mengandung amilum. Uji selanjutnya adalah uji selulase. Uji selulase merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui adanya aktivitas enzim selulase yang dimiliki oleh khamir. Hasil uji selulase dapat dilihat pada Gambar 5 sebagai berikut:

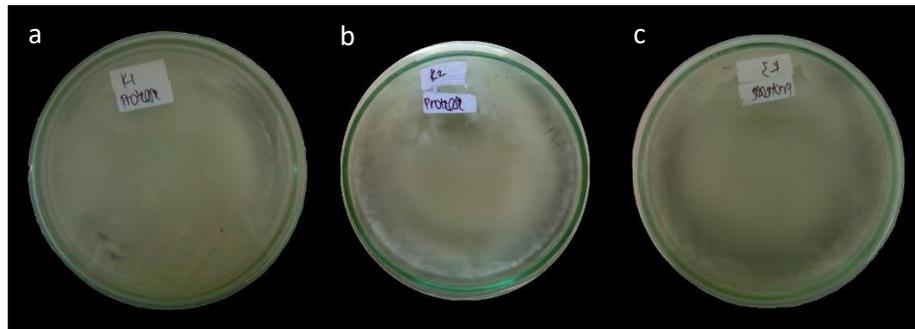


Gambar 5. Hasil uji enzimatis selulase isolat K1 (a), K2 (b), dan K3 (c)

Hasil uji selulase (Gambar 5) pada isolat khamir yang didapatkan yakni tidak ada yang memiliki aktivitas enzim selulase. Hal tersebut ditandai dengan tidak adanya zona bening disekitar koloni. Menurut Adelabu *et al.*, (2019) aktivitas enzim selulase dapat dilihat secara kualitatif yang ditandai dengan adanya zona bening yang berada disekitar koloni. Menurut Mangunwardoyo *et al.*, (2011) bahwa enzim selulase akan menghidrolisis selulosa dengan memutus ikatan  $\beta$ -1,4 glikosidik. Menurut Missa *et al.*, (2016) bahwa ikatan  $\beta$ -1,4 glikosidik dapat terdeteksi oleh congo red. Ikatan tersebut apabila terputus maka congo red tidak mampu bereaksi sehingga memunculkan warna bening hasil hidrolisis ikatan  $\beta$ -1,4 glikosidik oleh aktivitas enzim selulase. Adanya aktivitas enzim selulase yang

dimiliki khamir dapat dimanfaatkan untuk mengubah substrat yang mengandung selulosa menjadi produk seperti bioetanol. Menurut Carrasco *et al.*, (2016) bahwa enzim selulase yang dimiliki khamir dapat digunakan untuk menghasilkan beberapa produk dalam industri pangan, bioetanol, dan bioremediasi lingkungan.

Uji selanjutnya adalah uji protease. Uji protease merupakan uji untuk mengetahui adanya aktivitas enzim protease yang dimiliki khamir.



Gambar 6. Hasil uji enzimatis protease isolate khamir, K1 (a), K2 (b), dan K3 (c)

Hasil uji protease (Gambar 6) menunjukkan hasil negatif pada ketiga isolat khamir yang ditandai dengan tidak adanya zona bening yang terdapat disekitar koloni. Koloni khamir dari ketiga isolat tersebut juga terhambat pertumbuhannya dalam medium uji dibandingkan tumbuh pada medium PDA. Hal tersebut dikarenakan ketiga isolat khamir tidak mampu memanfaatkan nutrisi dengan baik dalam medium uji protease yakni skim milk agar. Menurut Budak *et al.*, (2016) bahwa khamir yang memiliki aktivitas enzim protease ditandai dengan adanya zona bening disekitar koloni. Khamir tersebut dapat memanfaatkan dengan baik nutrisi yang terkandung seperti gula laktosa dan protein yang terdapat dalam medium skim milk agar. Protein yang terdapat dalam medium uji protease mampu di hidrolisis oleh enzim protease menjadi asam amino sehingga dapat mendukung pertumbuhan sel khamir. Adanya aktivitas enzim protease pada khamir dapat dimanfaatkan menjadi produk yang bermanfaat. Menurut Chaud *et al.*, (2016) bahwa enzim protease yang dihasilkan khamir dapat digunakan dalam bidang industri pangan, farmasi, dan pengolahan limbah.

Uji selanjutnya yang dilakukan yaitu uji lipase. Uji lipase merupakan suatu uji yang dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim lipase yang dimiliki oleh khamir.

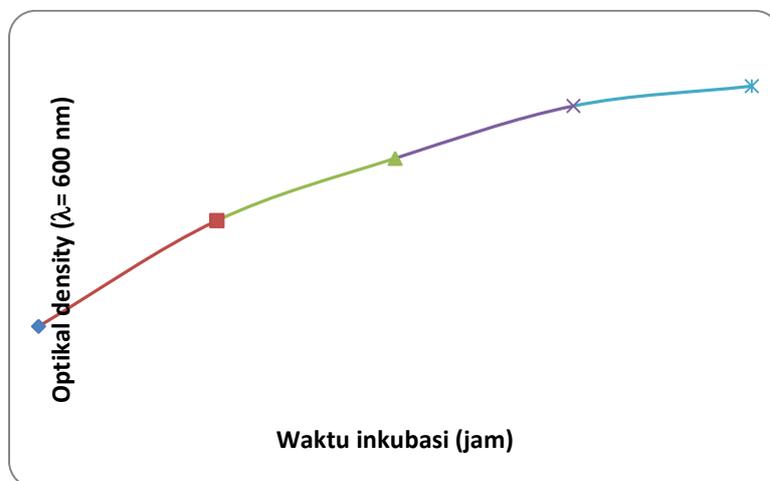


Gambar 7. Hasil uji enzimatis lipase isolate khamir, K1 (a), K2 (b), dan K3 (c)

Hasil uji lipase (Gambar 7) menunjukkan bahwa ketiga isolat khamir adalah negatif yang ditandai dengan tidak adanya zona bening yang terdapat disekitar koloni khamir. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga isolat khamir tersebut tidak memiliki enzim lipase. Menurut Ayadi *et al.*, (2018) bahwa khamir yang memiliki aktivitas enzim lipase akan ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar koloni khamir. Menurut Raj *et al.*, (2016) aktivitas enzim lipase dapat teramati dengan adanya zona bening disekitar koloni khamir. Zona bening tersebut diakibatkan karena adanya aktivitas hidrolisis enzim lipase pada lipid menjadi asam lemak dan gliserol yang terkandung dalam media. Adanya aktivitas enzim lipase pada khamir dapat dimanfaatkan untuk menggunakan substrat yang mengandung lipid

menjadi produk yang bermanfaat. Menurut Alami *et al.*, (2017) bahwa enzim lipase yang dimiliki khamir dapat digunakan dalam industri farmasi, pangan, dan biosurfaktan.

Hasil karakterisasi dengan uji morfologi dan biokimia menunjukkan bahwa isolat khamir K2 memiliki aktivitas lebih baik dalam memproduksi enzim amilase. Hal tersebut ditunjukkan dengan adanya zona bening yang lebih besar dibandingkan dengan isolat khamir lain. Oleh karena itu, isolat K2 dipilih dan diharapkan mampu menggunakan substrat gula dalam medium fermentasi dengan lebih baik. Isolat K2 selanjutnya akan dibuat kurva pertumbuhannya berdasarkan *Optical Density* (OD) dengan melihat nilai absorbansi pada spektrofotometer panjang gelombang 600 nm.



Gambar 8. Kurva pertumbuhan isolat khamir K2, Inkubasi 96 jam

Gambar 8 menunjukkan bahwa isolat K2 mengalami kenaikan pertumbuhan. Pertumbuhan pada jam ke 0 sampai ke 96 mengalami fase pertumbuhan yang cepat. Hal tersebut dikarenakan pertumbuhan khamir telah mencapai fase log. Menurut Alsuhaimeh *et al.*, (2012) bahwa fase log ditandai dengan peningkatan jumlah sel dan biomassa sel. Fase tersebut sedang terbentuk senyawa-senyawa penghasil metabolit primer seperti etanol.

Hasil pengukuran pertumbuhan yang telah diinterpretasikan dalam bentuk kurva pertumbuhan menunjukkan bahwa produksi bioetanol dapat dilakukan oleh isolat K2 dalam waktu 72 jam. Hal tersebut dikarenakan pertumbuhan khamir sedang dalam fase log yang berarti sedang diproduksi senyawa bioetanol. Menurut Stewart (2017) bahwa bioetanol dapat diproduksi oleh khamir saat fase log. Bioetanol merupakan salah satu senyawa metabolit primer. Metabolit primer merupakan senyawa yang dihasilkan ketika fase pertumbuhan berada pada fase log.

Hasil pengukuran bioetanol isolat K2 dengan menggunakan metode piknometrik mampu menghasilkan bioetanol sebesar 5,6% (v/v). Menurut Hartina *et al.*, (2014) bahwa substrat gula dalam medium pertumbuhan khamir tidak semua diubah menjadi etanol akan tetapi juga dimanfaatkan sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan sel, metabolisme intraseluler seperti sintesis enzim, DNA, dan sebagainya.

#### 4. Kesimpulan

Isolasi khamir yang dilakukan pada buah apel (*Malus domestica*) diperoleh 3 isolat yaitu K1, K2, dan K3. Berdasarkan hasil karakterisasi morfologi dan biokimia dari ketiga isolat maka dapat disimpulkan bahwa isolat khamir yang didapat diduga dengan genus *Pichia sp.* Ketiga isolat khamir dalam uji enzimatik hanya memiliki aktivitas enzim amilase. Isolat K2 terpilih sebagai isolat yang mampu memproduksi bioetanol sebesar 5,6 % (v/v) pada waktu fermentasi 72 jam.

**Daftar Pustaka**

- Adelabu, B. A., Kareem, S. O., Oluwafemi, F., & Adeogun, I. A. (2019). Bioconversion of Corn Straw to Ethanol by Cellulolytic Yeasts Immobilized in *Mucuna urens* Matrix. *Journal of King Saud University – Science*, 31, 136-141. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2017.07.005>.
- Alami, N. H., Nasihah, L., Umar, R. L. A., Kuswytasari, N. D., Zulaika, E., & Shovitri, M. (2017). Lipase Production in Lipolytic Yeast from Wonorejo Mangrove Area. *Proceeding of International Biology Conference*, 1854. <https://doi.org/10.1063/1.4985392>.
- Alsuhaim, H., Vojisavljevic, V., & Pirogova, E. (2012). Effects of Non-thermal Microwave Exposures on the Proliferation Rate of *Saccharomyces cerevisiae* Yeast. *IFMBE Proceeding*, 39, 48-51. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-29305-4\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-642-29305-4_14).
- Amalia, Y. (2014). Pembuatan Bioetanol dari Limbah Padat Sagu menggunakan Enzim Selulase dan Yeast *Saccharomyces cerevisiae* dengan Proses Simultaneous *Saccharification and Fermentation (SSF)* dengan Variasi Konsentrasi Substrat dan Volume Inokulum. *Skripsi*. Universitas Riau.
- Ayadi, I., Belghith, H., Gargouri, A., & Guerfali, M. (2018). Screening of New Oleaginous Yeasts for A Single Cell Oil Production, Hydrolytic Potential Exploitation and Agro-industrial by-Products Valorization. *Process Safety and Environmental Protection*, 119, 104-114. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.07.012>.
- Barth, M., Hankinson, T. R., Zhuang, H., & Breidt, F. (2010). Microbiological Spoilage of Fruits and Vegetables. *Food Microbiology and Food Safety*, 135-174. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1_6).
- Basso, T. O., Gomes, F. S., Lopes, M. L., Amorim, H. V., Eggleston, G., & Basso, L. C. (2013). Homo and Heterofermentative Lactobacilli Differently Affect Sugarcane-Based Fuel Ethanol Fermentation. *Anthonie Van Leeuwenhoek*, 105, 169-177. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0063-6>.
- Budak S. O., Wiebenga, A., Bron, P. A., & Vries, R. P. D. (2016). Protease and Lipase Activities of Fungal and Bacterial Strains Derived from an Artisanal Raw Ewe's Milk Cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 237, 17-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.007>.
- Carrasco, M., Villareal, P., Barahona, S., Alcaino, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2016). Screening and Characterization of Amylase and Cellulase Activities in Psychrotolerant Yeasts. *BMC Microbiology*, 16, 21. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0640-8>.
- Chaud, L. C. S., Lario, L. D., Bonugli Santos, R. C., Sette, L. D., Junior, A. P., & Felipe, M. G. (2016). Improvement in Extracellular Protease Production by The Marine Antarctic Yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. *New Biotechnology*, 33, 807-814. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.07.016>.
- Fawole, H. J., & Oso, B. A. (2007). *Laboratory Manual of Microbiology*. Spectrum Books Limited Spectrum. Nigeria. 1-48.
- Freire, A. L., Ramos, C. L., Souza, P. N. D. C., Cardoso, M. G. B., & Schwan, R. F. (2017). Nondairy Beverage Produced by Controlled Fermentation with Potential Probiotic Starter Cultures of Lactic Acid Bacteria and Yeast. *International Journal of Food Microbiology*, 248, 39-46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.011>.
- Hartina, F., Jannah, A., & Maunatin, A. (2014). Fermentasi Tetes Tebu dari Pabrik Gula Pagotan Madiun menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* untuk menghasilkan Bioetanol dengan Variasi pH dan Lama Fermentasi. *Alchemy*, 3(1), 93-100. <https://doi.org/10.18860/al.v0i0.2907>.
- Juhnevica, K., Skudra, G., & Skudra, L. (2011). Evaluation of Microbiological Contamination of Apple Fruit stored in A Modified Atmosphere. *Environmental and Experimental Biology*, 9, 53-59.
- Jumiyati, Bintari, S.H., & Mubarak, I. (2012). Isolasi dan Identifikasi Khamir secara Morfologi di Tanah Kebun Wisata Pendidikan Universitas Negeri Semarang. *Biosantifika*, 4 (2).
- Kanti, A. (2004). Identifikasi Jenis Khamir yang Diisolasi dari Tanah Gambut Taman Nasional Bukit Dua Belas, Jambi. *BioSMART*, 6(1), 10-14.
- Kurtzman, C.P., & Fell, J.W. (1998). *The Yeast, A Taxonomic Study*. Amsterdam : Elsevier.
- Mangunwardoyo, W., Aprilismulan., Oetari, A., & Sjamsuridzal, W. (2011). Screening Cellulose Activity of Yeast Isolated from Soil, Sediment, and Water River from Taman Nasional Gunung Halimun, West Java, Indonesia. *Malaysian Journal of Microbiology*, 7(4), 210-216.

- Missa, H., Susilowati, A., & Setyaningsih, R. (2016). Diversity and Phylogenetic Relationship of Cellulolytic Bacteria from the Feces of Bali Cattle in South Central Timor, East Nusa Tenggara, Indonesia. *Biodiversitas*, 17 (2), 614-619. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d170232>.
- Okwulehie, C. I., & Alfred, N. K. (2010). Fungi Associated with Deterioration of Sour Sop (*Annona muricata*. Linn) Fruits in Abia State, Nigeria. *African. J. of Microbiology Research*. <http://www.academicjournals.org/ajmr>.
- Raj, A., Baby, G., Dutta, S., Sarkar, A., & Rao, K. V. B. (2016). Isolation, Characterization and Antioxidant Activity of Lipase Enzyme Producing Yeast Isolated from Spoiled Sweet Sample. *Scholars Research Library*, 8(10), 129-135.
- Shen, L., Li, Y., Jiang, L., & Wang, X. (2014). Response of *Saccharomyces cerevisiae* to The Stimulation of Lipopolysaccharide. *PLoS One*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104428>.
- Stewart, G. G. (2017). The Production of Secondary Metabolites with Flavour Potential during Brewing and Distilling Wort Fermentation. *Fermentation*. 3, 1-28. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040063>.
- Suleimani S.S., Adiguzel A., and Nadaroglu H. 2017. Production of bioethanol by facultative anaerob bacteria. *Journal of The Institut of Brewing*. 123: 402-406.
- Susilo B., Sumarlan S.H., dan Nurirenia D.F. 2017. Pemurnian Bioetanol Menggunakan Proses Distilasi Dan Adsorpsi Dengan Penambahan Asam Sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) Pada Aktivasi Zeolit Alam Sebagai Adsorben. *Jurnal keteknikaan Pertanian Tropis dan Biosistem*. Vol.5 No 1, 19-26.
- Xu, X. L., Feng, G. L., Liu, H. W., Li, X. F., Zhao, G. L., & Xiao, X. L. (2014). Isolation, Identification and Control of Osmophilic Spoilage Yeast in Sweetened Condensed Milk. *Africal Journal of Microbiology Research*, 8(10), 1032-1039. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6203>.
- Yalcin, S. K., Bozdemir, M. T., & Ozbas, Z. Y. (2010). Citric Acid Production by Yeast: Fermentation Conditions, Process Optimization and Strain Improvement. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*.