

Uji Potensi Fermentasi Etanol Beberapa Yeast yang Diisolasi dari Daerah Malang, Jawa Timur dengan Metode SDN (Soil Drive Nutrient)

Sabrina FIRRAR Rahmana, Sri Nurhatika dan Anton Muhibuddin
Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)
Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia
e-mail: nurhatika@bio.its.ac.id

Abstrak— Eksplorasi *yeast* sebagai agen *biofermentor* masih sangat kurang padahal *yeast* memiliki potensi yang amat baik dalam mengubah glukosa menjadi etanol. *Yeast* tanah merupakan salah satu jenis *yeast* yang berpotensi tinggi sebagai agen *biofermentor*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi isolat *yeast* tanah yang telah diisolasi menggunakan metode SDN (Soil Drive Nutrient) dari Malang, Jawa Timur dan untuk mengetahui konsentrasi glukosa terbaik dalam memproduksi etanol. Konsentrasi glukosa yang digunakan ialah 10%, 15% dan 20%. Terdapat 5 isolat *yeast* yang akan digunakan yaitu *Candida* sp. 1., *Candida* sp.2., *Lindnera*, *Kloeckera* sp dan *Debaryomyces* sp. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa isolat yang berpotensi dalam memproduksi etanol ialah *Kloeckera* sp. dan *Debaryomyces* sp.. Pada isolat *Kloeckera* sp. optimum dalam menghasilkan etanol pada konsentrasi glukosa 20% yakni sebesar 30,75% pada jam ke-72. Sedangkan isolat *Debaryomyces* sp. mampu menghasilkan etanol secara optimum pada konsentrasi glukosa 15% yakni sebesar 22,95% pada jam ke 24-48.

Kata Kunci—etanol, fermentasi, glukosa, *yeast* tanah

I. PENDAHULUAN

INDONESIA memiliki luas wilayah yang mencapai 6.400 km dan terdiri atas 18.108 pulau [1], sehingga biodiversitas flora, fauna dan mikroorganisme juga melimpah. Keberadaan mikroorganisme di alam sangat melimpah yang meliputi wilayah daratan atau tanah, perairan dan udara. Salah satunya ialah *yeast* yang dikenal memiliki rentang ekologi cukup luas dan mampu hidup pada daerah ekstrim [2] dan umumnya ditemukan pada lingkungan organik tinggi [3]. Isolasi dan identifikasi dari total perkiraan keanekaragaman *yeast* di dunia baru dilakukan sekitar 1% [4]. Diantara 89 genera *yeast* yang pernah terdaftar dalam monograf *yeast*, sebanyak 37 genera atau 42% ditemukan di Indonesia [5].

Penelitian tentang *yeast* banyak dilakukan dalam bentuk eksplorasi dari berbagai ekosistem di Indonesia. Hal ini diyakini bahwa jumlah *yeast* di alam jauh lebih tinggi dibandingkan *yeast* yang telah diketahui selama ini [6]. Penelitian mengenai keragaman *yeast* tanah telah banyak dilakukan oleh beberapa peneliti sebelumnya yang telah mengisolasi *yeast* dari berbagai variasi tipe ekosistem tanah, seperti daerah antartika, gurun dan hutan subtropika. Akan tetapi, belum banyak peneliti yang melaporkan keragaman *yeast* yang hidup pada tanah di daerah tropis [7]. Hal inilah yang mendasari dilakukan penelitian mengenai keragaman

yeast di daerah tropis dan agar segera diketahui kemampuan *yeast* sebagai agen *biofermentor*.

Berdasarkan penelitian dan eksplorasi *yeast* tanah pada wilayah Kota Malang, Jawa Timur yang telah dilakukan oleh [8] sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengeraahui potensi isolate *yeast* tanah yang telah diisolasi menggunakan metode SDN (*Soil Drive Nutrient*) dalam memfermentasi etanol serta untuk mengetahui konsentrasi gula terbaik dalam memproduksi etanol.

II. METODOLOGI

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2016 sampai dengan Mei 2016 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi serta Laboratorium Botani, Jurusan Biologi; dan Laboratorium Mikroorganisme Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS).

B. Subkultur Isolat Yeast

Isolat *yeast* yang diujikan dalam penelitian ini adalah isolat *yeast* koleksi Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya Malang. Medium YMEA steril dituangkan ke dalam tabung reaksi sebanyak \pm 5 ml. Tabung reaksi tersebut diletakkan pada posisi miring dan didinginkan sampai medium memadat, kemudian disimpan pada suhu ruang. Selanjutnya, 5 isolat *yeast* diinokulasikan pada medium YMEA *slant* menggunakan jarum ose dan diinkubasi selama 2-4 hari pada suhu ruang. Keberhasilan subkultur ditandai dengan tumbuhnya isolat *yeast* pada medium YMEA.

C. Uji Konfirmasi Yeast (Makroskopis dan Mikroskopis)

Pengamatan karakter makroskopis dilihat berdasarkan kenampakan koloni yang tumbuh pada medium YMEA yang meliputi; warna koloni, bentuk tepi koloni, elevasi, permukaan koloni dan tekstur koloni [3].

1. Tekstur koloni: *mucoïd*, *fluid* atau *viscous*, *butyrous*, *friable*, atau *membranous*
2. Warna: putih, kuning, oranye, pink dan merah
3. Margin: *smooth*, *entire*, *undulating*, *lobed*, *eroded*, atau *fringed* dengan filament
4. Elevasi: *flat* atau *raised*

5. Permukaan: *glistening* atau *dull, smooth, rough, sectored, folded, ridged,* atau *hirsute*.

Pengamatan karakter mikroskopis dilakukan dengan menggunakan mikroskop dan pewarnaan laktofenol. Pewarnaan laktofenol digunakan untuk melihat karakteristik reproduksi generatif seperti pembentukan askospora, teliospora, dan basidiospora. Selain itu juga untuk melihat reproduksi vegetatif sel *yeast* yang meliputi pembentukan budding dengan tipe multipolar, bipolar, unipolar dan fusi, pembentukan spora aseksual meliputi arthospora, blastospora, dan clamydiospora. Pengamatan mikroskopis lainnya yaitu meliputi bentuk filamen, bentuk sel, ukuran sel, ada tidaknya pembentukan pseudohifa. Pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan cara membuat preparat biakan di atas kaca objek yang telah diwarnai dengan laktofenol, kemudian ditutup dengan cover glass dan ditetesi minyak imersi. Setelah itu dilihat karakter selnya pada mikroskop dengan perbesaran 400x dan 1000x. Untuk pengamatan dengan perbesaran 400x tidak perlu ditambahkan minyak imersi [3].

D. Uji Potensi Fermentasi

Uji fermentasi gula dilakukan dengan cara 1 ml isolat *yeast* dari medium YMB yang telah berumur 24-48 jam diambil lalu diinokulasikan ke dalam media uji fermentasi yang mengandung glukosa pada tabung yang berbeda. Kemudian tabung dihomogenkan dan dilakukan inkubasi selama 72 jam pada temperatur 25-28°C. Hasil positif jika terdapat perubahan warna pada medium dan munculnya gelembung gas pada tabung Durham. Warna media berubah yang awalnya berwarna biru menjadi kuning karena formasi asam dan gas yang dihasilkan [9].

1) Pembuatan kurva pertumbuhan

Diambil 1 ose isolat *yeast* kemudian disuspensikan kedalam pada 100 mL air fisiologis steril 0,85% (NaCl dan aquades), diukur nilai ODnya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm hingga mencapai nilai OD = 0,5 [10]. Selanjutnya kultur diambil 20 ml dan ditambahkan ke medium YMB sebanyak 180 ml kemudian diinkubasi dalam *rotary shaker* dengan kecepatan 130 rpm pada suhu ruang. Setiap 24 jam dihitung OD kultur dengan menggunakan *Spektrofotometer UV-Vis* pada panjang 600nm selama 8 hari. Data OD yang didapatkan kemudian dibuat kurva pertumbuhannya sehingga umur starter dapat ditemukan [11].

E. Pembuatan starter yeast

Setelah *yeast* tumbuh pada medium YMEA, diambil 1 ose isolat kemudian di inokulasikan pada 10 ml air fisiologis (NaCl dan aquades) diukur nilai kepadatan selnya (*Optical Density*) nya hingga mencapai 0,5 dengan menggunakan *spektrofotometer* pada panjang gelombang 600 nm. Selanjutnya isolat diambil sebanyak 10% dan dimasukkan ke dalam medium starter lalu diinkubasi selama 2 hari hingga sel *yeast* mencapai fase eksponensial.

F. Uji fermentasi substrat glukosa

Media uji ini dibuat dengan cara melarutkan glukosa dan dengan konsentrasi 10%, 15%, 20%, *pepton water* 100 ml, *Bromthymol blue* 0,1 %, dan kloramfenikol 200 mg/l dalam 1

liter akuades. Larutan disterilkan dengan autoklaf 121°C, 1,5 atm selama 15 menit. Selanjutnya medium substrat glukosa dan fruktosa diambil sebanyak 100 ml ke dalam *erlenmeyer*.

Uji fermentasi substrat glukosa dilakukan dengan menginokulasi sebanyak 10% isolat yang telah berumur 48-78 jam dari medium YMB kedalam medium uji. Sebelum dilakukan inkubasi, diuji dahulu kadar gula reduksi sebagai data gula pereduksi awal. Fermentasi dilakukan selama 4 hari (96) jam dan diamati kadar etanol dan gula reduksi setiap 24 jam.

G. Pembuatan kurva standart glukosa

Glukosa anhidrat 10 mg dilarutkan dalam akuades hingga volume 10 ml. Larutan yang diperoleh konsentrasi akhirnya adalah 1 mg/ml yang kemudian menjadi larutan stok standar glukosa. Kemudian satuan mg/ml dikonversi menjadi $\mu\text{M}/\text{ml}$. Setelah itu dilakukan pengenceran bertingkat menggunakan penambahan akuades hingga didapatkan variasi konsentrasi glukosa anhidrat. Sebanyak 0,2 ml glukosa anhidrat dari masing-masing konsentrasi (10%, 15%, 20%) dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan reagen DNS sebanyak 2 ml. Tabung reaksi dipanaskan pada air mendidih selama 2 menit agar terjadi reaksi antara glukosa dengan DNS. Kemudian tabung didinginkan hingga mencapai suhu ruang dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm [12].

H. Pengukuran kadar etanol

Pengukuran kadar etanol dilakukan menggunakan piknometer. Piknometer adalah alat yang digunakan untuk mengukur nilai massa jenis atau densitas dari fluida. Cara kerja menggunakan piknometer pertama-tama yaitu dengan menimbang massa piknometer yang kosong dan kering menggunakan timbangan analitik. Hasilnya dianggap sebagai W1. Setelah itu mengisi piknometer menggunakan akuades, lalu ditutup. Piknometer dan akuades ditimbang, berat yang didapat adalah W2. Berat akuades (W) dihitung dengan cara W2-W1.

Piknometer kering diisi dengan hasil fermentasi, permukaan luar piknometer dikeringkan dan ditimbang. Hasil yang didapat adalah W3. Berat etanol hasil fermentasi adalah W3-W1=L. Berat air (L) dihitung dengan *specific gravity* atau $\text{spg} = L/W$. Nilai spg ditentukan menggunakan tabel AOAC (*Analysis of Association of Official Analytical Chemists*) dan selanjutnya persentase etanol dihitung [13].

I. Pengukuran kadar gula reduksi

Pengukuran kadar gula reduksi dilakukan dengan menggunakan metode DNS. Larutan Asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) dibuat terlebih dahulu dengan menimbang 1 gr NaOH, dilarutkan dengan 60 ml akuades, ditambah 18,2 gr Na-K Tartrat, 1 gr asam 3,5-dinitrosalisilat (ditambahkan perlahan lahan sambil diaduk hingga larut sempurna), kemudian ditambah 0,2 gr fenol untuk menstabilkan warna dan 0,05 gr Na_2SO_3 . Lalu dipindahkan kedalam labu ukur, kemudian diencerkan dengan akuades hingga mencapai 100 mL, kemudian kocok hingga homogen [14].

Pereaksi DNS yang telah dibuat ditambahkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 4 mL yang berisi 1 mL supernatan

sampel hasil hidrolisis [15]. Larutan tersebut dipanaskan dalam air mendidih selama 2 menit untuk mempercepat reaksi yang ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi lebih pekat, kemudian dipindahkan ke dalam air es untuk menghentikan reaksi. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 540 nm untuk memperoleh nilai OD. Nilai OD yang didapat dimasukkan ke dalam persamaan regresi yang dihasilkan dari pembuatan kurva standar glukosa untuk memperoleh nilai kadar gula reduksi. Pengukuran kadar gula reduksi dilakukan setiap hari selama 4 hari.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat *yeast* ini dikulturkan pada medium YMEA dan YMB dengan metode gores 16 selama 48-72 jam. Hasil isolasi tersebut menunjukkan bahwa hanya terdapat 2 isolat yang mampu tumbuh yaitu *Kloeckera* sp. dan *Debaryomyces* sp., sedangkan isolat *Candida* sp. 1., *Candida* sp.2., dan *Lindnera* tidak mampu tumbuh. Terdapat beberapa penyebab tidak tumbuhnya ketiga isolat *yeast* antara lain faktor ekstrinsik dan faktor intrinsik. Beberapa faktor ekstrinsik yang mempengaruhi pertumbuhan *yeast* tanah meliputi pH, materi organik, suhu, kelembaban dan nutrisi tanah [16]. Kadar nutrisi dan hara di dalam tanah sangatlah melimpah sehingga isolat *yeast* mampu tumbuh dengan baik di dalam tanah. Sehingga bila dibandingkan dengan kadar nutrisi pada medium tumbuh dengan kadar nutrisi di dalam tanah dimungkinkan berbeda, terdapat nutrisi-nutrisi yang tidak terpenuhi seperti nutrisi yang ada di dalam tanah sehingga beberapa isolat tidak mampu tumbuh. Selain itu, kondisi tanah seperti pH, materi organik, suhu, dan kelembaban isolat yang berbeda dengan medium tumbuh juga dapat menjadi penyebab isolat *Candida* sp.1., *Candida* sp.2., dan *Lindnera* sp. mati dan tidak tumbuh. Ketiga isolat *Candida* sp.1., *Candida* sp.2., dan *Lindnera* sp. telah coba ditumbuhkan pada suhu yang berbeda yaitu 4°C, 25°C, 37°C dan 40°C namun dalam berbagai macam suhu tersebut tetap tidak dapat tumbuh. Terdapat faktor internal yang juga turut mempengaruhi kemampuan tumbuh isolat *yeast*, seperti genetik sel yang juga memberikan pengaruh terhadap kemampuan pertumbuhan *yeast* tanah yang merupakan genus baru. Faktor lain seperti fisiologis sel dan metabolisme sel yang berbeda-beda pada tiap genus juga dapat menjadi penyebab kemampuan tumbuh *yeast* pada tiap genus berbeda-beda.

Faktor lain yang juga mempengaruhi adalah lamanya waktu penyimpanan kultur isolat yang dapat menyebabkan nutrisi di dalam medium habis dikonsumsi sehingga dapat menyebabkan isolat dalam medium penyimpanan mati, hal inilah yang dapat menyebabkan isolat tak mampu tumbuh dalam kultur baru. Selain itu juga dapat disebabkan karena kurang terpenuhinya kebutuhan nutrisi dalam medium tumbuh.

A. Hasil Uji Konfirmasi (Makroskopis dan Mikroskopis)

Pengamatan makroskopis dilakukan setelah subkultur isolat berumur 48 jam. Berdasarkan pengamatan makroskopis, didapatkan koloni *yeast Kloeckera* sp. dengan ciri elevasi convex, entired margin, dried surface dan berwarna putih kekuningan. Sedangkan pada isolat *Debaryomyces* sp.

memiliki ciri elevasi: raise, margin: undulate, dried surface dan koloni isolat yang berwarna kuning pudar.

Warna koloni yang telah diamati ialah putih kekuningan dan kuning pudar. Menurut [3], beberapa koloni *yeast* memiliki warna khusus seperti kuning, oranye, dan merah. Namun warna putih atau tidak berpigmen sampai warna krem adalah karakteristik kebanyakan *yeast*. Isolat *yeast* hanya memiliki dua bentuk elevasi yaitu *raised* dan *flat*. Tepi koloni *yeast* beragam seperti *entire*, *filiform*, dan *undulate*. Sedangkan bentuk tepi koloni *yeast* meliputi *smooth*, *entire*, *undulating*, *lobed*, *erose*, atau membentuk filamen memanjang [3].

Pengamatan mikroskopis dilakukan saat isolat *yeast* telah berumur 48 jam lalu digunakan pewarna *lactofenol tryphan blue* dan diamati menggunakan mikroskop Olympus Binokular CX22 perbesaran 400x. Metode pewarnaan ini merupakan metode khusus untuk pewarnaan mikroorganisme jenis fungi [17]. Hasilnya ialah isolat *Kloeckera* sp. yang teramati memiliki bentuk lonjong menggelondong, seragam dan single cell dan beberapa sel ditemukan berpasangan. Sedangkan isolat *Debaryomyces* sp. memiliki ciri bentuk membulat, single cell. (Gambar 1).

B. Hasil Uji Potensi Fermentasi Glukosa

Berdasarkan Gambar 2 diatas, hasilnya seperti terlihat pada kedua tabung isolat, baik *Kloeckera* sp. dan *Debaryomyces* sp. muncul gelembung gas dan terjadi perubahan warna dari yang sebelumnya berwarna hijau menjadi kuning bening.

Perubahan warna medium menjadi kuning disebabkan karena terdapatnya indikator *bromthymol blue* (BTB) dalam medium. Penambahan indikator BTB ke dalam medium yang mengalami fermentasi menyebabkan perubahan karbohidrat menjadi asam dalam keadaan aerob, yang membuat pH menurun dan indikator BTB berubah warna menjadi kuning. Pada media glukosa juga terbentuk gelembung pada tabung Durham yang diletakkan terbalik didalam tabung media artinya hasil fermentasi berbentuk gas. Indikator BTB dalam larutan asam berwarna kuning dan dalam larutan basa berwarna biru [18].

C. Kurva pertumbuhan *Kloeckera* sp. dan *Debaryomyces* sp.

Berdasarkan kedua grafik diatas, dapat diamati bahwa pada kedua isolat *yeast* sedang berada pada fase log (eksponensial). Hal ini terlihat dari grafik yang dalam posisi garis naik mulai jam 0 hingga jam ke 144 (pada *Kloeckera* sp.) dan pada jam 0 hingga jam 72 (pada *Debaryomyces* sp.).

Tabel 1.
Hasil presentase kadar etanol dan gula reduksi pada glukosa 10%

Isolat	Jam	Kadar etanol	Gula reduksi awal	Gula reduksi akhir	Gula terpakai
<i>Kloeckera</i> sp.	24	0.8	4.148	3.928	0.22
	48	0.7	4.148	3.257	0.891
	72	0.7	4.148	3.041	1.107
	96	0.7	4.148	2.031	2.117
<i>Debaryomyces</i> sp.	24	0	4.148	4.060	0.088
	48	0	4.148	3.900	0.248
	72	0	4.148	3.656	0.492
	96	0	4.148	2.684	1.464

Tabel 2.
Hasil presentase kadar etanol dan gula reduksi pada glukosa 15%

Isolat	Jam	Kadar etanol	Gula reduksi awal	Gula reduksi akhir	Gula terpakai
<i>Kloeckera</i> sp.	24	0	4.979	1.186	3.793
	48	0.7	4.979	0.551	4.428
	72	0.7	4.979	0.297	4.682
	96	0.7	4.979	0.813	4.166
<i>Debaryomyces</i> sp.	24	22.95	4.979	0.647	4.332
	48	22.95	4.979	0.463	4.516
	72	22.95	4.979	0.248	4.731
	96	22.95	4.979	0.041	4.938

Tabel 3.

Hasil presentase kadar etanol dan gula reduksi pada glukosa 20%

Isolat	Jam	Kadar etanol	Gula reduksi awal	Gula reduksi akhir	Gula terpakai
<i>Kloeckera</i> sp.	24	0	5.907	4.083	1.824
	48	20.85	5.907	2.615	3.292
	72	30.75	5.907	1.255	4.652
	96	30.75	5.907	1.414	4.493
<i>Debaryomyces</i> sp.	24	0	5.907	2.608	3.299
	48	20.1	5.907	0.722	5.185
	72	20.1	5.907	0.383	5.624
	96	20.2	5.907	0.807	5.100

Kloeckera sp.



Perbesaran 400

Debaryomyces sp.

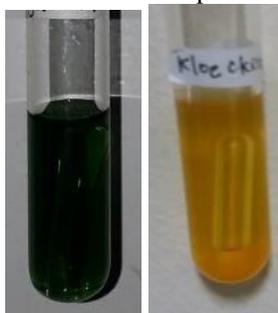


Perbesaran 400



Gambar 1. Hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis

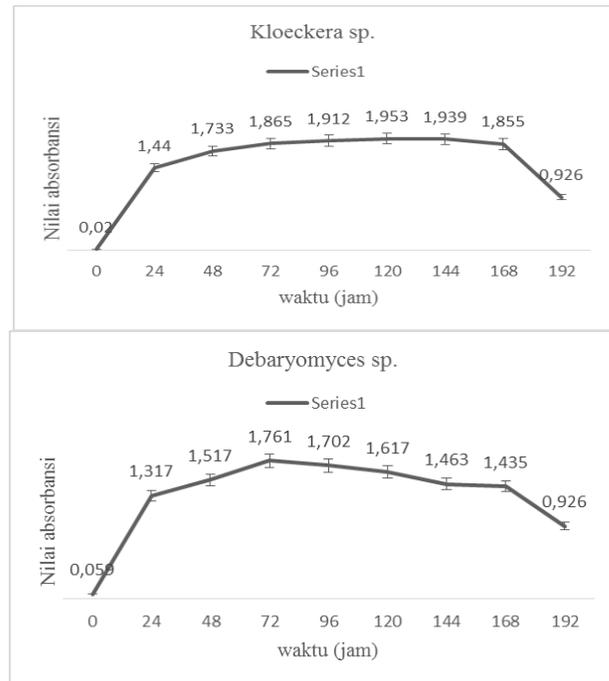
Kloeckera sp.



Debaryomyces sp.



Gambar 2. Perubahan warna sebagai hasil fermentasi



Gambar 3. Kurva Pertumbuhan

Pada grafik kurva pertumbuhan, sel *yeast* tidak tampak berada pada fase lag (adaptasi). Menurut [19], tidak adanya fase lag pada grafik kurva pertumbuhan dapat disebabkan karena tidak adanya fase adaptasi yang dilakukan *yeast*, hal ini dikarenakan komposisi medium yang sama saat subkultur dan mengukur OD. Kemungkinan lain adalah bahwa isolat *yeast* telah melewati fase lag dan sedang berada pada fase log saat pengukuran OD sehingga tidak muncul fase lag pada grafik pertumbuhan kedua isolat *yeast*. Sedangkan pada fase log didapatkan kurva yang relatif cepat karena waktu fase log dipengaruhi oleh komposisi medium, faktor lingkungan dan jumlah sel per unit volume [20].

D. Kadar Etanol dan Gula Reduksi Isolat *Kloeckera* sp dan *Debaryomyces* sp. pada Konsentrasi 10%

Berdasarkan tabel 1 diatas dapat diketahui bahwa pada isolat *Kloeckera* sp. dengan konsentrasi glukosa 10% mampu menghasilkan kadar etanol sebesar 0,8% sedangkan isolat *Debaryomyces* sp. tidak dapat menghasilkan etanol sama sekali. Menurut [21], *yeast* mampu membelah dengan cepat dan konstan mengikuti kurva pertumbuhan logaritmik. Umumnya fase log terjadi saat sel *yeast* berumur 24 jam. Pada fase log jumlah sel *yeast* yang hidup masih lebih banyak daripada jumlah sel yang mati [22]. Kadar gula reduksi berbanding terbalik dengan kadar etanol, karena apabila *yeast* mampu menghasilkan etanol maka kadar gula dalam medium pertumbuhannya semakin sedikit akibat dikonsumsi oleh isolat *yeast*. Gula dalam medium pertumbuhan *yeast*, selain digunakan pertumbuhan selnya juga digunakan untuk menghasilkan metabolit primer berupa etanol pada proses fermentasi. Sedangkan pada isolat *Debaryomyces* sp. tidak terdapat etanol yang dihasilkan. Hal ini dapat dimungkinkan karena konsentrasi gula pada medium yang terlalu sedikit, sehingga isolat *yeast Debaryomyces* sp. hanya dapat memanfaatkan gula

untuk pertumbuhannya saja, tidak mencukupi untuk menghasilkan metabolit primer berupa etanol.

E. Kadar Etanol dan Gula Reduksi Isolat *Kloeckera sp* dan *Debaryomyces sp.* pada Konsentrasi 15%

Dapat diamati pada tabel 2 bahwa isolat yang mampu menghasilkan etanol paling besar dengan konsentrasi gula 15% ialah *yeast Debaryomyces sp.* yaitu sebesar 22,95%. Pada isolat *yeast Kloeckera sp.* tidak menghasilkan etanol pada jam ke-24, namun kemudian mampu menghasilkan etanol sebesar 0,7% pada jam ke-48. Idealnya, semakin banyak atau pekat kadar gula yang terdapat dalam medium, maka semakin baik pula *yeast* dalam menghasilkan etanol. Namun, isolat *Kloeckera sp.* tidak mampu menghasilkan etanol pada jam 24, hal ini dapat dimungkinkan karena gula yang terdapat dalam medium pertumbuhan hanya dapat dimanfaatkan *yeast* untuk memenuhi kebutuhan dalam pertumbuhan sel dan aktivitas intrasel, namun tidak mampu menghasilkan metabolit primer berupa etanol. Menurut [23], konsentrasi glukosa akan menurun selama fermentasi, bertepatan dengan peningkatan produksi sel dan etanol. Hal ini disebabkan sel-sel mengkonsumsi glukosa dalam sistem untuk meningkatkan pertumbuhan sel dan produksi etanol. Jumlah konsumsi gula oleh juga berhubungan dengan produksi etanol. Ketika *yeast* memproduksi etanol, maka gula yang di konsumsi akan lebih tinggi dari pada saat tidak memproduksi etanol. Namun, pada jam ke-48, *yeast Kloeckera sp.* mampu menghasilkan etanol sebesar 0,7%, walaupun hanya sedikit bila dibandingkan dengan etanol yang dihasilkan oleh *Debaryomyces sp.*[24] menyatakan bahwa tidak semua gula yang terdapat pada medium pertumbuhan *yeast* dimanfaatkan untuk produksi etanol, akan tetapi ada sebagian gula yang digunakan untuk metabolisme intraseluler, seperti sintesis enzim, DNA dan lainnya. Pada isolat *Debaryomyces sp.* mampu menghasilkan kadar etanol sebesar 22,95% mulai jam ke-24. Selain itu, nilai gula reduksi pada jam ke-24 juga mengalami penurunan yaitu sebesar 4,332%. Hal tersebut dapat menandakan bahwa isolat *yeast Debaryomyces sp.* mengkonsumsi gula tidak hanya untuk pertumbuhan sel dan metabolisme intraselnya, namun juga untuk menghasilkan metabolit primer. Alasan lain yang dapat menyebabkan hal tersebut adalah kondisi sel *yeast Debaryomyces sp.* yang diduga sedang berada pada fase eksponensial, sehingga dimungkinkan kemampuan *yeast* tersebut untuk mengkonsumsi nutrisi pada medium berada pada tingkat maksimumnya.

F. Kadar Etanol dan Gula Reduksi Isolat *Kloeckera sp* dan *Debaryomyces sp.* pada Konsentrasi 20%

Berdasarkan tabel 3 diatas, isolat *Kloeckera sp.* pada jam ke-24 tidak mampu menghasilkan etanol, begitu pula dengan isolat *Debaryomyces sp.* Pada jam berikutnya, yaitu jam ke-48 isolat *Kloeckera sp.* mampu menghasilkan etanol sebesar 20,85%. Dan pada isolat *Debaryomyces sp.* jam ke-48, mampu menghasilkan kadar etanol sebesar 20,1%. Namun, isolat *Kloeckera sp.* mampu meningkatkan hasil etanolnya pada jam ke-72 hingga 30,75%. Sedangkan etanol yang dihasilkan oleh isolat *Debaryomyces sp.* tidak mengalami pertambahan. Salah satu hal yang dapat menjadi penyebab kedua isolat tersebut tidak mampu menghasilkan kadar etanol pada jam ke-24 ialah

kondisi fisiologis sel *yeast* yang ada dalam medium pertumbuhan. Kondisi substrat yang kaya akan gula menyebabkan kepekatan dalam medium pertumbuhan, sehingga hal ini dapat menyebabkan sel *yeast* mengalami kesulitan dalam mengubah gula menjadi metabolit primer. Kepekatan glukosa dengan konsentrasi 20% dapat menyebabkan sel mengalami inhibisi antara substrat dengan produk [25]. Selain itu juga dapat dimungkinkan karena kondisi lingkungan selama proses fermentasi berlangsung dan kualitas bahan medium pertumbuhan [26].

Terjadi kenaikan jumlah kadar etanol pada jam ke-72 pada isolat *Kloeckera sp.*, dari 20,85% menjadi 30,75%. Sedangkan pada isolat *Debaryomyces sp.* produksi etanol pada jam ke-48 sebesar 20,1% dan tidak mengalami kenaikan. Kenaikan produksi etanol dapat dimungkinkan karena isolat *Kloeckera sp.* sedang mengalami pertumbuhan yang sangat cepat yang menyebabkan pertumbuhan sel-sel baru menjadi lebih cepat sehingga mempengaruhi konsumsi gula dan produksi metabolit primernya. Selain itu juga dapat dikarenakan isolat *Kloeckera sp.* cenderung mengkonsumsi gula untuk pertumbuhannya lebih sedikit bila dibandingkan dengan isolat *Debaryomyces sp.* sehingga mampu menghasilkan etanol dengan jumlah besar, walaupun kadar gula pada substrat pertumbuhannya sama. Berbeda dengan *Debaryomyces sp.* yang membutuhkan lebih banyak isolat gula untuk pertumbuhannya dibanding untuk memproduksi metabolit primer. Menurut [27], pada fase pertumbuhan beberapa *yeast* membutuhkan energi yang lebih banyak daripada fase lainnya.

V. KESIMPULAN

Isolat yang berpotensi dalam fermentasi etanol ialah *yeast Kloeckera sp.* dan *Debaryomyces sp.* Pada isolat *Kloeckera sp.* optimum dalam menghasilkan etanol pada konsentrasi glukosa 20% yakni sebesar 30,75% pada jam ke-72. Sedangkan isolat *Debaryomyces sp.* mampu menghasilkan etanol secara optimum pada konsentrasi glukosa 15% yakni sebesar 22,95% pada jam ke 24-48.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis S.F.R mengucapkan terima kasih kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia sehingga naskah tugas akhir ini dapat terselesaikan dengan baik. Kepada dosen pembimbing Ibu Ir. Sri Nurhatika, M.P. dan Bapak Dr. Anton Muhibuddin, M.P., kepada dosen penguji I Ibu Nur Hidayatul Alami, S.Si, M.Si, dan dosen penguji II Ibu Kristanti Indah Purwani, S.Si, M.Si, serta kepada keluarga, teman-teman dan semua pihak yang telah banyak membantu dalam penyelesaian naskah tugas akhir ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] S. Singgih. 2007. *Statistik Deskriptif: Konsep dan Aplikasi dengan Microsoft Exel dan SPSS*. Yogyakarta: ANDI.
- [2] J. F. T. Spencer, and D. M. Spencer. 1997. *Yeast In Natural and Artificial Habitats*. Berlin: Springer Verlag
- [3] C.P. Kurtzman, and J.W. Fell. 1998. *The Yeast A Taxonomy Study*. New York: Elsevier.

- [4] C.P. Kurtzman, and J. Piskur. 2006. *Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts*. Berlin: Springer-Verlag
- [5] C.P. Kurtzman, and J.W. Fell. 2006. *Yeast Systematics and Phylogeny- Implication of Molecular Identification Methods For Studies In Ecology*. Springer-Verlag. Berlin
- [6] Jumiayati, H. S. Bintari dan I. Mubarak. 2012. *Isolasi dan Identifikasi Khamir Secara Morfologi di Tanah Kebun Wisata Pendidikan Universitas Negeri Semarang*. Biosantifika. Semarang
- [7] A. Kanti. 2005. *Keragaman Khamir Tanah Asal Taman Nasional Kalimutu Dan Taman Wisata Alam Ruteng Nusa Tenggara Timur*. Laporan Teknik bidang Zoologi. Pusat penelitian Biologi LIPI.
- [8] A. Muhibuddin, dan I.R. Sastrahidayat. 2015. Soil Drive Nutrients Creation through Alternate Host System Propagation of VAM to Support Selective Exploration of Microbial Fermentation. *Laporan Akhir Penelitian Kerjasama Luar Negeri Publikasi Internasional*. Universitas Brawijaya. Malang
- [9] K. Van Rij, M. Kobatake, N.J.W. Placido, M.T.L.C., and N. Van Uden. 1992. *Isolation of Proteolytic Psychrophilic Yeasts from Raw Sea Foods*. Lett. Appl. Microbiology 14: 37- 42.
- [10] V. Lundblad, and K. Struhl. 2008. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- [11] V. N. Jisha, R.B Smitha, S. Pradeep, Sreedevi, Unni, K.N., Sajith, S., Priji P., Josh, M.S., Benjamin. 2013. Versatility of microbial proteases. Creative Common Attribution License. India
- [12] B. D. A Kodri, dan Y. Rini. 2013. Pemanfaatan Enzim Selulase dari *Trichoderma Reseei* dan *Aspergillus niger* sebagai Katalisator Hidrolisis Enzimatik Jerami Padi dengan Pretreatment
- [13] Purwanto. 2004. *Aktivitas Fermentasi Alkoholik Cairan Buah*. Jurnal Universitas Widy Mandala Madiun. No. 1 th. XXXII/ISSN 0854-1981
- [14] S. Maturindo. 2014. *Hidrolisis Enzimatis Limbah Tongkol Jagung oleh *Penicillium sp. H9* dengan Variasi pH dan Suhu*. Skripsi. Prodi S1 Biologi Universitas Airlangga.
- [15] K. Sridevi, and T. Janakiram. 2011. *Phsyco-chemical examination of market wastes-an aerobic composting study*. J RJPBCS. 2 (2):121-129
- [16] L. M. Manici, F. Caputo, and G. Baruzzi. 2005. Additional experience to elucidate the microbial component of soil suppressiveness towards strawberry black root rot complex. *Annals of Applied Biology*. Research Institute for Industrial Corps. Italy
- [17] J. P. Harley, and L. M Prescott. 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology*, Fifth Edition. Mc-Graw Hill Companies. Newyork
- [18] Winn Jr, Washington C., et al. 2006. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6th Ed, USA, Lippincott Williams & Wilkins, p 251-259.
- [19] M. T. Madigan and J. M. MartinkO. 2006. *Brock: Biology of Microorganisms, 11th ed*. USA: Pearson Prentice Hall, pp: 705
- [20] D. Falahudin. 2014. Bioassay antioksidan ekstrak daging buah salak bongkok (*Sallaca edulis* reinw.) dengan khamir *Candida* sp. Y. 390. *Jurnal Oseanografi*. Jakarta: LIPI.
- [21] Natsir. 2003. *Mikrobiologi Farmasi Dasar*. Universitas Hasanudin: Makassar
- [22] S. Fardiaz. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- [23] Cheng, Ngoh Gek., Hasan, Masitah., Kumoro, Andri Chahyo., Ling, Chew Fui., Tham, Margaret., 2009. *Production of Ethanol by Fed-Batch Fermentation*. *Pertanika J.Sci & Technol* 17 (2):399-408
- [24] J.C.F Walker. 1993. *Primary Wood Pprocessing Principles and Practice*. Chapman and Hall. London.
- [25] Elevri, Putra dan Surya Rosa Putra. 2006. *Produksi Etanol Menggunakan Saccharomyces cerevisiae yang Diamobilisasi dengan Agar Batang*. *Kimia ITS*. Akta Kimindo 1(2): 109-110.
- [26] A. M. Jannah. 2010. Proses Fermentasi Hidrolisat Jerami Padi untuk Menghasilkan Bioetanol. *Jurnal Teknik Kimia* No. 1 Vol. 17
- [27] E. Purwitasari, A. Pangastuti, dan R. Setyaningsih. 2004. Pengaruh media tumbuh terhadap kadar protein *Saccharomyces cerevisiae* dalam pembuatan protein sel tunggal. *Jurnal Bioteknologi*. Vol 1 (2): 37-42.