



Khamir Potensial Probiotik Hasil Isolasi dari Fermentasi Jus Jeruk Siam (*Citrus nobilis* var. *microcarpa*)

Potential Probiotic Yeast Isolated From Siam Orange Juice Fermentation (Citrus nobilis var. microcarpa)

Linawati¹, Elvi Rusmiyanto², Rikhsan Kurniatuhadi³

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Tanjungpura, Pontianak, Indonesia

Received: 01 September 2021; Accepted: 30 Desember 2021; Published: 31 Desember 2021

KATA KUNCI Fermentasi, *Citrus nobilis* var. *microcarpa*, khamir probiotik, inhibisi

KEYWORDS Fermentation, *Citrus nobilis* var. *Microcarpa*, probiotic yeast, inhibition

ABSTRAK

Jus jeruk siam (*Citrus nobilis* var. *microcarpa*) yang difermentasi merupakan minuman nutrisi yang mengandung khamir. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensial probiotik khamir sebagai antimikroba yang diisolasi dari jus jeruk siam yang telah difermentasi dan mengetahui genus khamir probiotik. Kemampuan dari khamir probiotik diperoleh dengan melakukan pengujian ketahanan terhadap kondisi asam (pH rendah) dan uji daya hambat terhadap bakteri patogen *Eschericia coli*. Semua isolat khamir mampu tumbuh pada pH 2, 3 dan 4, pertumbuhan terbaik pada pH 4. Semua isolat khamir juga mampu menghambat pertumbuhan dari *E. coli* yang terlihat dari zona hambat yang terbentuk. Isolat khamir diidentifikasi berdasarkan pengamatan secara makroskopis koloni dan mikroskopis dari sel khamir, reproduksi sel, dan uji fisiologis. Berdasarkan hasil identifikasi diperoleh 6 isolat khamir probiotik yang menunjukkan genus *Kluyveromyces*, *Pichia*, dan *Saccharomyces*.

ABSTRACT

Siam orange juice (*Citrus nobilis* var. *microcarpa*) fermented is a processed drink that contains nutrients that support the growth of probiotic yeast. The research aims to determine the probiotic potential of yeast and to determine the genus of probiotic yeast isolated from fermented siam orange juice. The ability of probiotic yeast is obtained by testing the resistance towards acid conditions (pH) and testing the inhibitory against pathogenic bacteria *Eschericia coli*. All yeast isolates were able to grow at pH 2, 3 and 4, the best growth was at pH 4. All probiotic yeast isolates were also able to inhibit the growth of pathogenic bacteria *E. coli* as seen from the formed inhibition zone. The yeast isolates were identified on colony macroscopic and microscopic observation of yeast cells, cell reproduction, physiological tests. The results of the isolation obtained 6 isolates that showed probiotic properties from the genera *Kluyveromyces*, *Pichia*, and *Saccharomyces*.

*Correspondence:

Email: linawati.masni@gmail.com

1. Pendahuluan

Probiotik banyak ditemukan dan digunakan dalam industri, termasuk makanan, suplemen makanan, dan obat-obatan (Sanders *et al.*, 2018). Jenis mikroorganisme probiotik yang paling umum digunakan dari golongan bakteri asam laktat, dan beberapa khamir (Khotimah *et al.*, 2015). Kehadiran khamir dalam saluran pencernaan manusia sebagai mikroorganisme probiotik menunjukkan bahwa khamir memiliki efek menguntungkan pada inangnya. *Saccharomyces* dan *Candida* adalah khamir yang ditemukan pada saluran pencernaan manusia (Nash *et al.*, 2017).

Khamir merupakan mikroorganisme yang komersil digunakan dalam proses fermentasi makanan (Hsiung *et al.*, 2020). Penelitian dari Chelliah *et al.* (2016) telah melakukan isolasi dan karakterisasi khamir probiotik dari berbagai makanan fermentasi yang mampu tumbuh pada suhu 37°C, mentoleransi pH asam lambung dan mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen. Pengaplikasian khamir sebagai probiotik disebabkan potensi dan kemampuan dalam menghasilkan metabolit dan antibakteri (Indah *et al.*, 2015).

Beberapa penelitian sebelumnya yang dilakukan secara *in vitro* menunjukkan bahwa khamir probiotik dari genus *Saccharomyces* mampu mencegah infeksi usus yang disebabkan oleh *Escherichia coli* (Al-Dulaimi *et al.*, 2020). Khamir probiotik memberikan manfaat kesehatan bagi manusia dan dapat meningkatkan fungsi usus, penghambatan patogen, dan pengobatan penyakit diare dan radang usus (James & Wang, 2019). Penelitian lainnya juga menyebutkan genus khamir lain yang berpotensi sebagai probiotik seperti *Aureobasidium*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulaspora*, *Wickerhamomyces*, *Williopsis*, dan *Yarrowia* (Syal & Vohra, 2013; Dey *et al.*, 2017; Lara-Hidalgo *et al.*, 2017).

Genus yang sering diisolasi dari buah dan jus segar diantaranya *Candida*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Saccharomyces*, dan *Zygosaccharomyces* (ICMSF, 2005). Berdasarkan beberapa penelitian diperoleh isolat khamir yang diisolasi dari jus jeruk fermentasi. Adapun khamir yang teridentifikasi dari genus *Candida*, *Clavispora*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Kodamaea*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Torulaspora*, dan *Wickerhamomyces* (Aneja *et al.*, 2014; Obasi *et al.*, 2014). Jus jeruk siam yang difermentasi memiliki potensi sebagai sumber mikroorganisme probiotik. Menurut Rini *et al.* (2019) jus jeruk siam yang difermentasi mempunyai kandungan gula, mineral, dan vitamin yang tinggi. Selain itu, jeruk siam juga mengandung vitamin C, serat alami, dan metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, fenol, kumarin, saponin, steroid, tanin, dan triterpenoid. (Ghafar, 2010). Sanders *et al.* (2018) menyatakan syarat pertumbuhan mikroorganisme

probiotik adalah prebiotik yang merupakan nutrisi mendukung pertumbuhan dan perkembangan khamir probiotik yang terdapat juga pada jus jeruk siam yang difermentasi.

Keberadaan khamir yang berasosiasi dengan jus buah adalah objek kajian yang berpotensi untuk dilaksanakan dan dikembangkan, khususnya di Sambas, Kalimantan Barat yang merupakan sektor penghasil buah jeruk siam. Pengembangan khamir potensial probiotik dari fermentasi jus jeruk siam (*C. nobilis* var. *microcarpa*) perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui genus-genus, karakter, dan identifikasi khamir potensial probiotik yang diisolasi dari fermentasi jus jeruk siam (*C. nobilis* var. *microcarpa*).

2. Metode Penelitian

Waktu penelitian ini berlangsung dari awal Juni hingga akhir Desember 2020. Tempat penelitian ada 2 lokasi berdasarkan tempat pengambilan sampel di agen pengumpulan buah jeruk siam di Tekarang dan pengujian sampel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Tanjungpura.

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *autoklaf*, *biological safety cabinet* (BSC), botol kaca steril, erlenmeyer 250 ml, indikator pH, inkubator, jangka sorong, mikroskop cahaya, mikroskop stereo, ose, pemeras jeruk, *petri disk*, pH meter, pipet tetes, rak tabung, *shaker*, spuit, tabung reaksi, timbangan analitik, *vortex*, dan *wrapping*. Bahan-bahan yang digunakan yaitu alkohol (kadar 70% dan 95%), biakan bakteri *Escherichia coli*, CuSO_4 , indikator *bromothymol blue*, iod, jus jeruk siam (*C. nobilis* var. *microcarpa*), kristal violet, media GPY (*Glucosa Peptone Yeast extract*), media GPY cair, media GPY+HCl, media NA, media uji fermentasi gula (glukosa, sukrosa, dan laktosa), minyak imersi, pewarna *malachite green* 0,5%, safranin, safranin 0,5%.

2.1. Isolasi Khamir Potensial Probiotik dari Fermentasi Jus Jeruk Siam

Buah jeruk siam yang dipilih dari grade C dengan ciri-ciri fisik, yaitu warna kulit buah yang mengkilap dan tipis, warna buah hijau kekuningan, ukuran buah kecil, dan bebas dari kotoran maupun jamur. Tahapan awal buah jeruk siam (*C. nobilis* var. *microcarpa*) yang telah disortasi, dibersihkan dengan air mengalir dan ditiriskan. Buah jeruk siam (*C. nobilis* var. *microcarpa*) lalu dipotong menjadi dua bagian dan diperas dengan alat pemeras jeruk. Tahapan selanjutnya dilakukan proses penyaringan sehingga diperoleh cairan jus jeruk (Rini *et al.*, 2019). Jus jeruk siam kemudian dimasukkan ke dalam botol steril lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 6 minggu (fermentasi spontan). Pengukuran pH dilakukan sebelum dan setelah fermentasi (Nualkaekul *et al.*, 2011).

Isolasi khamir dari jus jeruk siam (*C. nobilis* var. *microcarpa*) yang telah difermentasi dilakukan dengan metode usap (*swab*) dan serial dilusi. Sampel

dipipet 1 ml dimasukkan dan diencerkan dalam 9 ml larutan salin steril. Pengenceran dilakukan berdasarkan pengenceran 10^{-1} - 10^{-5} , dilakukan 2 pengulangan pada setiap pengenceran. *Cotton bud* steril dimasukkan pada suspensi dari setiap seri pengenceran, kemudian digoreskan secara radian pada permukaan media GPY (*Glucose Peptone Yeast* yang terdiri atas: agar 20 g, glukosa 20 g, pepton 10 g, *yeast extract* 10 g dalam 1 L akuades) (Matthias, 2011). Isolasi dilakukan sebanyak dua ulangan. Cawan petri uji kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 hari (2x24 jam). Koloni khamir pada *petri dish* uji diseleksi dan dikultur kembali hingga diperoleh kultur murni dan diberi kode isolat (Yarrow, 1998).

2.2. Uji Aktivitas Khamir Potensial Probiotik Sebagai Antimikroba terhadap *E. coli*

Uji aktivitas daya hambat dilakukan menggunakan metode usap dengan sel utuh (Fakruddin *et al.*, 2017; Khisti *et al.*, 2019). Biakan bakteri *E. coli* yang telah murni diremajakan kembali sebelum diujikan pada media NA dan diinkubasi selama 1x24 jam sebelum dilakukan uji daya hambat. Isolat *E. coli* dikultur kembali pada media cair GPY diinkubasi selama 24 jam. Kemudian diinokulasikan pada media padat GPY dengan menggunakan metode swab. Sebelumnya isolat khamir diinokulasi terlebih dahulu dan diinkubasi selama 24 jam. Koloni khamir dipindahkan pada media uji daya hambat dan diletakkan di tengah membentuk lingkaran kecil. Media uji diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C . Isolat kandidat khamir probiotik yang berpotensi sebagai antimikroba terlihat dari zona bening (daya hambat) yang terbentuk sebagai pemisah di antara isolat khamir dan bakteri *E. coli* (Kurtzman dan Fell, 1998; Yuma, 2020).

Secara kualitatif, daya hambat terhadap bakteri patogen diklasifikasikan berdasarkan indeks daya hambat dengan kategori rendah apabila nilai IDH ≤ 1 , IDH antara 1-2 sedang, dan IDH ≥ 2 tinggi merupakan modifikasi dari indeks antibiosis (West, 2008). Indeks daya hambat diperoleh dengan rumus berikut:

$$\text{Indeks Daya Hambat} = \frac{\text{DZB}-\text{DKK}}{\text{DKK}} \text{ (West, 2008)}$$

Keterangan:

DZB = Diameter zona bening khamir (mm)

DKK = Diameter koloni khamir (mm)

2.3. Uji Resisten terhadap Kondisi Asam (pH rendah)

Uji resisten terhadap kondisi asam (pH rendah) dengan menggunakan metode gores pada media GPY dengan penambahan HCl untuk memperoleh pH 2, 3, 4. Setiap cawan uji diambil sebanyak 1 ose masing-masing isolat khamir, lalu diinokulasi pada media modifikasi GPY-HCl. Isolat diinkubasi

selama 2 hari (2x24 jam) pada suhu 37⁰C. Koloni khamir yang telah tumbuh pada media modifikasi GPY-HCl dapat dihitung sebagai kandidat khamir probiotik resistensi terhadap asam (Djide dan Wahyuddin, 2008).

2.4. Identifikasi khamir Tingkat Genus

2.4.1. Pengamatan morfologi koloni dan sel khamir

Pengamatan morfologi koloni khamir yang diamati yaitu bentuk, elevasi, diameter koloni, permukaan, tekstur, tepian, dan warna. Pengamatan morfologi sel khamir yaitu bentuk sel, ada tidaknya hifa atau pseudohifa, pertunasan (*budding*), dan tipe spora dari isolat yang dikultur pada media GPY (Kurtzman dan Fell, 1998).

2.4.2. Pewarnaan sel khamir

Kaca preparat disiapkan dan dibersihkan dari kotoran dan lemak, lalu ditetesi akuades diatasnya. Isolat khamir diinokulasikan dengan menggunakan jarum ose dan diletakkan diatas kaca preparat, lalu diratakan dan dikering anginkan. Kaca preparat difiksasi diatas api bunsen selama 5 detik. Apusan lalu ditetesi dengan larutan kristal violet, dibiarkan selama 60 detik, lalu dibilas dengan akuades hingga larutan kristal violet hilang dengan sempurna. Langkah selanjutnya apusan ditetesi iod, didiamkan selama 60 detik, dan dibilas dengan akuades. Setelah itu, ditetesi etanol 95% hingga apusan tidak berwarna. Terakhir apusan ditetesi larutan safranin dan didiamkan selama 30 detik, lalu dibilas dengan akuades kembali. Air yang menggenang diatas kaca diserap dengan tisu, dan dikeringanginkan. Preparat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali dengan penambahan minyak imersi (Mohan, 2009).

2.4.3. Uji pewarnaan askospora

Uji askospora dilakukan dengan menggunakan teknik modifikasi *Schaeffer-Fulton's* menggunakan *malachite green* 0,5% dan safranin 0,5% dengan perbandingan 1:1. Sebanyak 1 ose isolat ditetesi pewarna tersebut, lalu dilakukan pengamatan dibawah mikroskop. Askospora yang telah dewasa akan berwarna hijau, dan sel vegetatif khamir berwarna merah (Kreger-van Rij, 1987).

2.4.4. Uji pewarnaan kapsul

Uji kapsul pada khamir dilakukan dengan metode olesan (*smear*) pada kaca preparat uji. Sebanyak 1 ose isolat diletakkan pada kaca preparat uji yang ditetesi kristal violet selama \pm 5 menit kemudian dibilas dengan larutan CuSO₄ 1%. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali dengan penambahan minyak imersi. Kapsul akan terlihat sebagai

lingkaran biru pudar yang mengelilingi sel vegetatif khamir berwarna ungu (Kreger-van Rij, 1987).

2.4.5. Uji fermentasi gula

Media uji fermentasi gula (glukosa 1%, sukrosa 1%, dan laktosa 1%), ditambahkan pepton 1 gr, dan indikator *bromothymol blue* sebagai indikator terjadinya fermentasi. Isolat khamir sebanyak 1 ose diambil dari medium padat berumur 24 jam, diinokulasikan ke dalam tabung uji yang ditambahkan tabung durham. Isolat diinkubasi selama 72 jam pada suhu 37°C. Pengamatan yang dilakukan apabila terjadi perubahan warna dari hijau ke kuning pada medium dan adanya gelembung gas pada tabung durham maka hasilnya positif (Kreger-van Rij, 1987, Sari *et al.*, 2016).

2.4.6. Uji pertumbuhan khamir probiotik pada media cair

Uji pertumbuhan khamir probiotik pada media cair menggunakan media GPY cair untuk mengamati ciri pertumbuhan isolat khamir pada media cair GPY, yaitu adanya cincin pada permukaan media, pelikel pada permukaan media, dan endapan pada dasar media (Nurhariyati, 2004).

2.5. Analisis Data

Analisis data dilakukan berdasarkan data kualitatif yang diperoleh dari hasil penelitian yang dikaji secara deskriptif. Data dibuat dalam bentuk tabel deskriptif meliputi karakter morfologi koloni khamir, morfologi sel khamir, uji potensial khamir probiotik, dan aktivitas fisiologi yang menunjukkan kemiripan karakter genus khamir berdasarkan acuan *The Yeast a Taxonomic Study* (Kurtzman dan Fell, 1998).

3. Hasil

3.1. Uji Khamir Potensial Probiotik pada Fermentasi Jus Jeruk Siam

Khamir hasil isolasi dari fermentasi jus jeruk siam (*C. nobilis* var. *microcarpa*) diperoleh 16 isolat khamir berdasarkan karakter makroskopis dan mikroskopis. Uji kandidat khamir potensial probiotik berdasarkan kemampuan menghambat pertumbuhan *E. coli*, reproduksi seksual, dan uji fisiologis. Berdasarkan hasil uji potensial probiotik diperoleh 6 isolat yang mampu menghambat pertumbuhan *E.coli* sebagai khamir potensial probiotik.

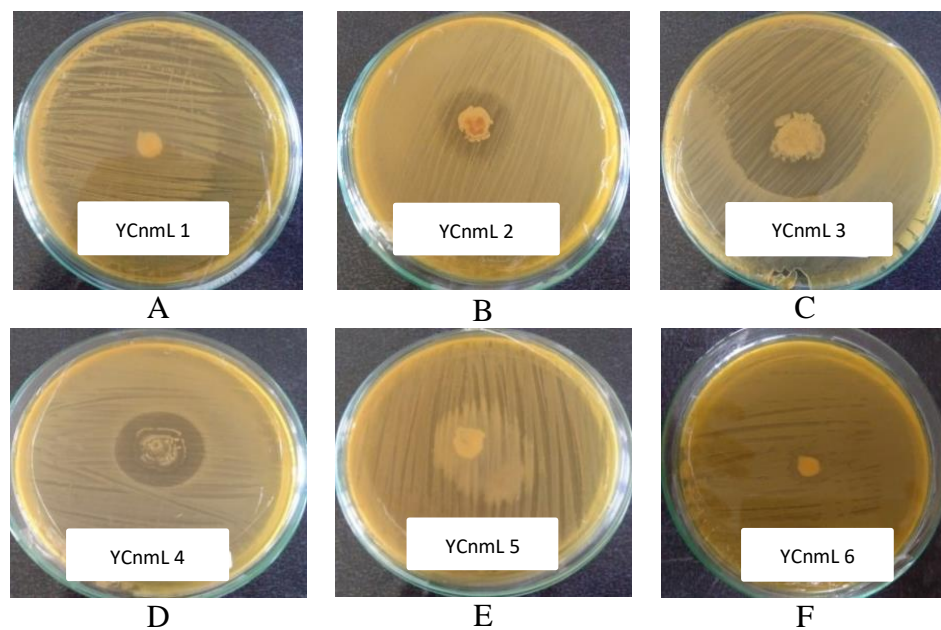
Tabel 3.1 Uji khamir potensial probiotik

Kode isolat	Uji kondisi asam			Uji daya hambat		IDH	Ket.
	pH 2	pH 3	pH4	Diameter koloni	Zona bening		
YCnmL 1	++	+++	+++	7.7mm	16.2 mm	1.10 mm	S
YCnmL 2	+	+	+++	10.5mm	28.3 mm	1.70 mm	S
YCnmL 3	+	+	+++	11.5 mm	66.3 mm	4.77 mm	T
YCnmL 4	+	+	+++	13.1 mm	30.7 mm	1.34 mm	S

YCnmL 5	++	+++	+++	9.2 mm	30.5 mm	2.32 mm	T
YCnmL 6	+	+++	+++	7.3 mm	19.5 mm	2.67 mm	T

Ket: (+++): tumbuh banyak; (++): tumbuh sedang; (+): tumbuh sedikit
 IDH: Indeks Daya Hambat
 (S): Sedang ; (T): Tinggi

Uji khamir potensial probiotik pada kondisi asam yang berbeda-beda menunjukkan hasil yang bervariasi. Semua isolat khamir potensial probiotik tumbuh pada pH 2, 3, dan 4. pH 2 isolat khamir potensial probiotik tumbuh sedikit (YCnmL 2; YCnmL 3; YCnmL 4; dan YCnmL 6) dan tumbuh sedang (YCnmL 1 dan YCnmL 5). pH 3 isolat khamir potensial probiotik tumbuh sedikit (YCnmL 2; YCnmL 3; YCnmL 4) dan tumbuh banyak (YCnmL 1; YCnmL 5; dan YCnmL 6). Pertumbuhan terbaik pada pH 4. Uji daya hambat isolat khamir potensial probiotik terhadap bakteri *E. coli* menunjukkan hasil yang bervariasi setiap isolatnya. Zona hambat terbesar isolat YCnmL 3 sebesar 66.3 mm dengan nilai IDH 4.77 mm dan zona hambat terkecil YCnmL1 sebesar 16.2 mm dengan nilai IDH 1.10 mm (Tabel 3.1).



Gambar 3.1 Zona hambat pada isolat khamir probiotik

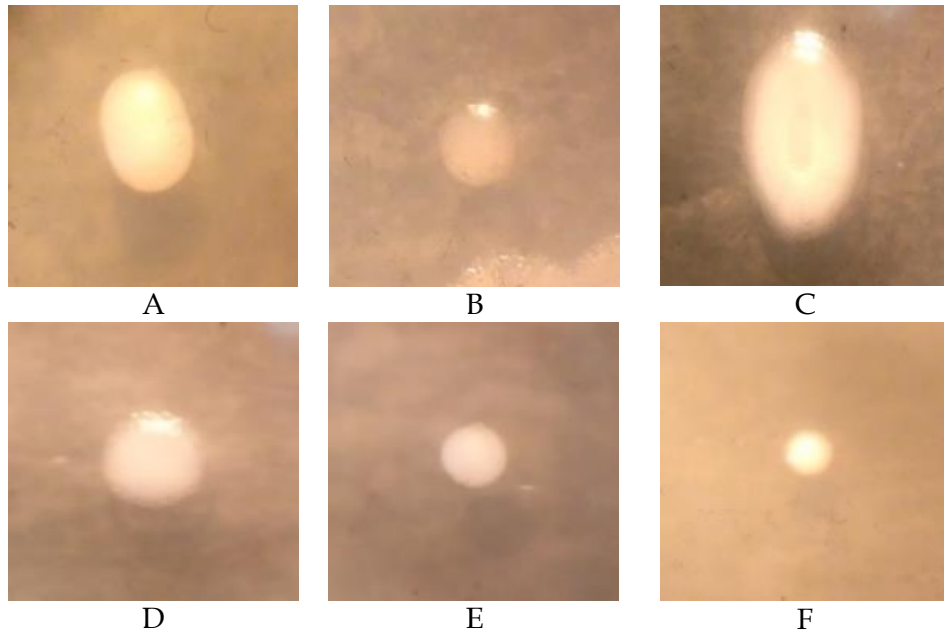
3.2 Karakteristik Morfologi Koloni, Sel Khamir, Reproduksi Seksual, dan Fisiologi Khamir Potensial Probiotik dari Jus Buah Jeruk Siam

Setiap khamir mempunyai karakteristik morfologi koloni yang beragam. Keenam isolat khamir probiotik memiliki bentuk koloni berbentuk bulat. Tekstur isolat khamir ini krim dan kental. Warna bervariasi yaitu putih, krem, dan krem kecoklatan. Permukaan koloni isolat khamir kusam. Elevasi koloni isolat khamir ini cembung dan sedikit menonjol. Tepian koloni isolat rata dan bergelombang. Diameter koloni bervariasi pada setiap isolat (Tabel 3.2).

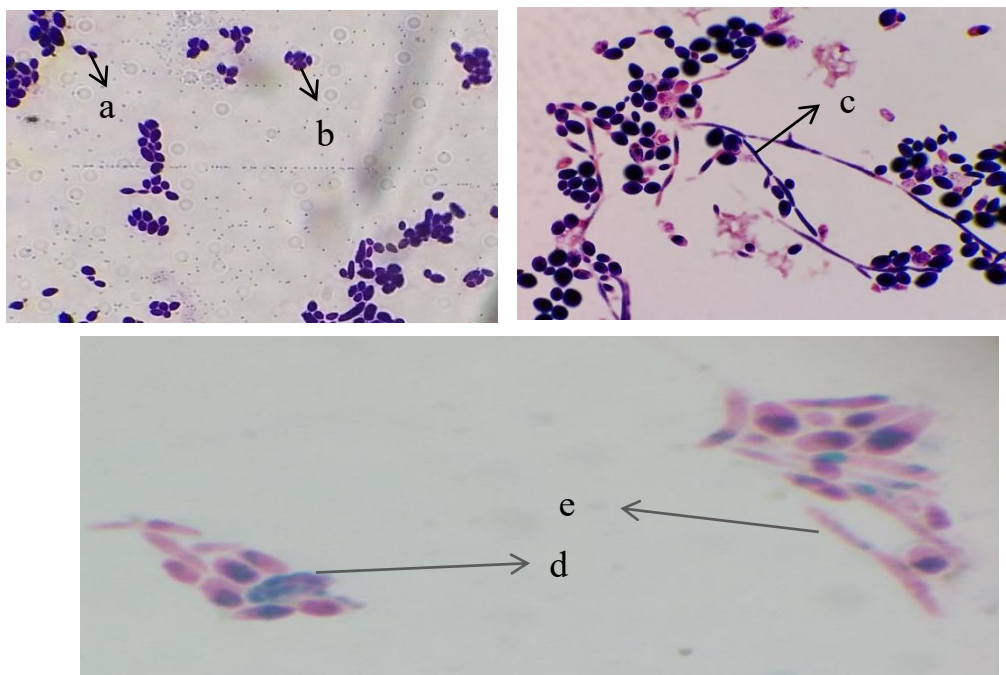
Tabel 3.2 Karakteristik morfologi koloni, sel, reproduksi sel, dan uji fisiologis khamir

No.	Karakteristik	Kode Isolat					
		YCnmL 1	YCnmL 2	YCnmL 3	YCnmL 4	YCnmL 5	YCnmL 6
1.	Morfologi koloni khamir						
	Bentuk	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat
	Tekstur	Krim	Krim	Kental	Kental	Krim	Krim
	Warna	Putih	Krem kecoklatan	Putih	Krem	Putih	Putih
	Permukaan	Kusam	Kusam	Kusam	Kusam	Kusam	Kusam
	Elevasi	Cembung	Sedikit menonjol	Sedikit menonjol	Sedikit menonjol	Cembung	Cembung
	Tepian	Rata	Rata	Bergelombang	Bergelombang	Rata	Rata
	Diameter (mm)	2-5	2-2.5	3-7	2-4	1-3	0.5-1.5
2.	Morfologi sel khamir						
	Bentuk sel khamir	Bulat, oval, dan memanjang	Bulat telur,elips, silindris memanjang	Bulat, elips, bulat telur memanjang	Bulat, elips, bulat telur memanjang	Bulat, oval, dan memanjang	Bulat, oval, dan memanjang
	<i>Budding</i> (Pertunasan)	Multipolar	Multipolar	Multipolar	Multipolar	Multipolar	Multipolar
	Jenis hifa	Pseudohifa	Pseudohifa	Pseudohifa	Pseudohifa	Pseudohifa	Pseudohifa
	Tipe dan banyak spora	Askospora (1-4)	Askospora (1-4)	Askospora (1-4)	Askospora (1-4)	Askospora (1-3)	Askospora (1-10)
3.	Pewarnaan sel khamir	+	+	+	+	+	+
4.	Uji kapsul	+	+	+	+	+	+
5.	Uji fermentasi gula						
	Glukosa	+	+	+	+	+	+
	Sukrosa	+	+	+	+	+	+
	Laktosa	-	-	-	-	-	-
6.	Uji tumbuh di media cair GPY	Tumbuh di dasar, endapan putih	Tumbuh di dasar dan di permukaan, endapan krem	Tumbuh di dasar, endapan putih	Tumbuh di dasar, endapan putih	Tumbuh di dasar, endapan putih	Tumbuh di dasar, endapan putih
7.	Hasil identifikasi	<i>Saccharomyces</i>	<i>Kluyveromyces</i>	<i>Pichia</i>	<i>Pichia</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces</i>

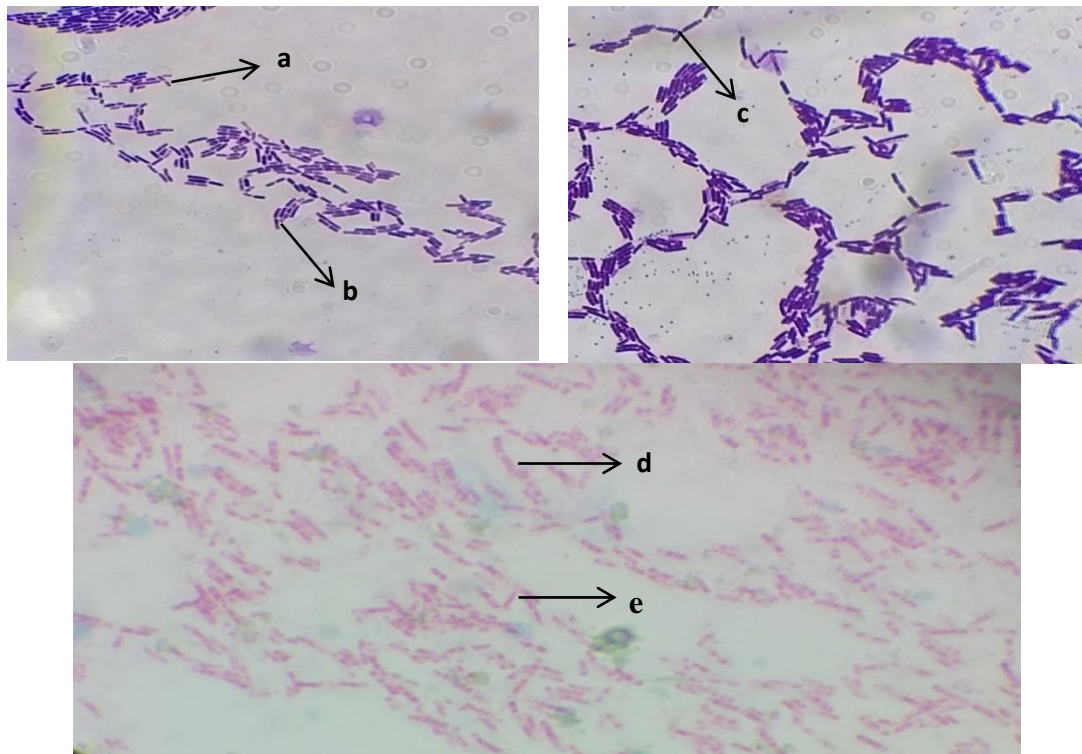
Keterangan: (+) : positif; (-) : negatif



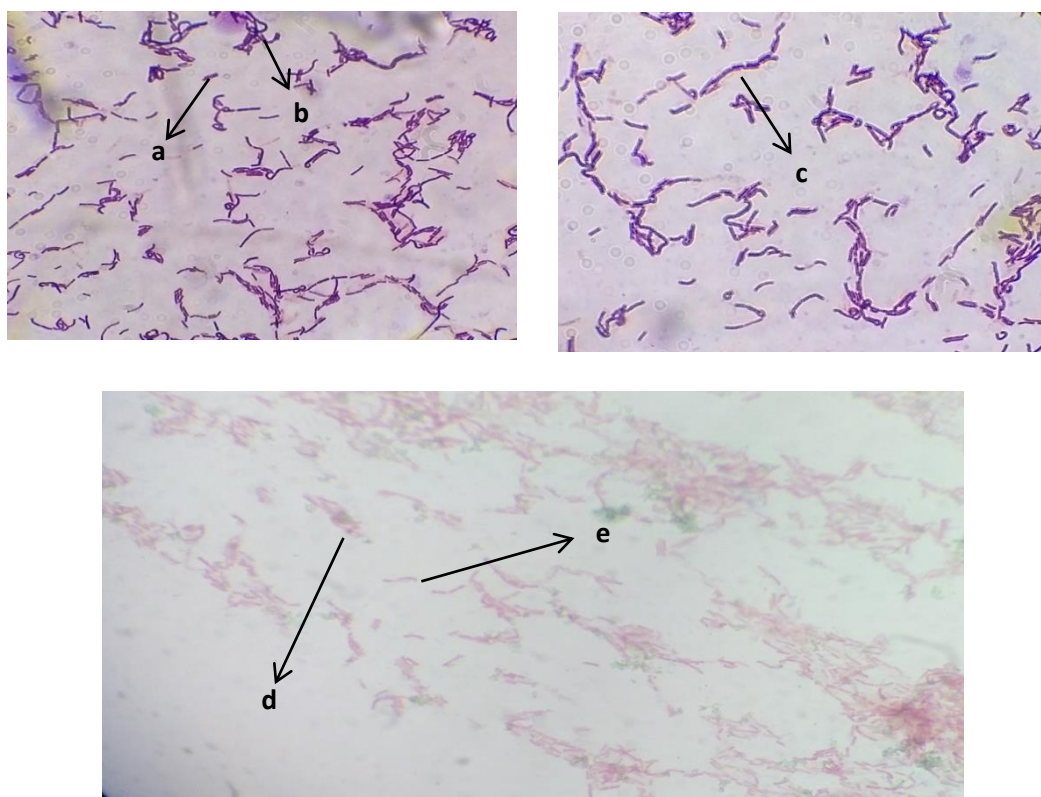
Gambar 3.2 Koloni tunggal isolat khamir (A) YCnmL 1; (B) YCnmL 2; (C) YCnmL 3; (D) YCnmL 4; (E) YCnmL 5; (F) YCnmL 6



Gambar 3.3 Sel khamir Genus *Saccharomyces* (YCnmL 6) (a) pertunasan (*budding cell*); (b) pertunasan multiseluler; (c) pseudohifa; (d) askospora; (e) sel vegetatif

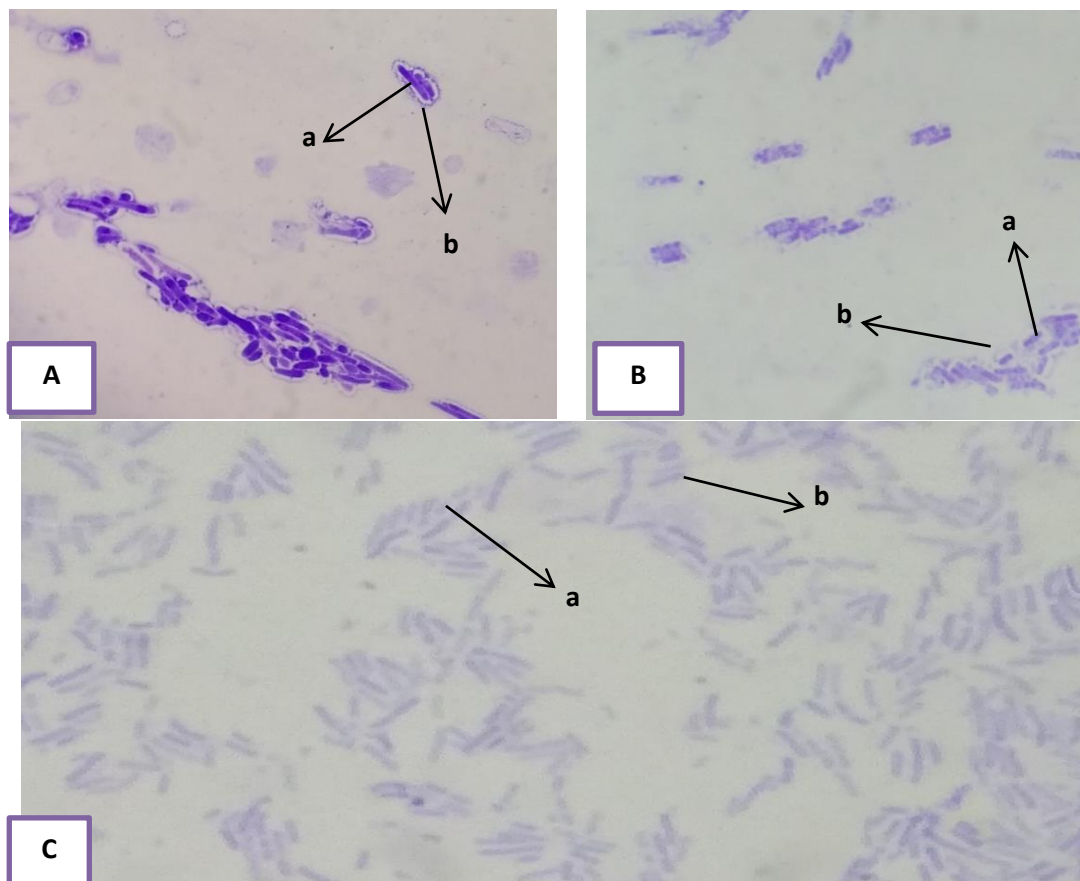


Gambar 3.4 Sel khamir Genus *Pichia* (YCnmL 4) (a) pertunasan (*budding cell*); (b) pertunasan multiseluler; (c) pseudohifa; (d) askospora; (e) sel vegetatif



Gambar 3.5 Sel khamir Genus *Kluyveromyces* (YCnmL 2) (a) pertunasan (*budding cell*); (b) pertunasan multiseluler; (c) pseudohifa; (d) askospora; (e) sel vegetatif

Berdasarkan Tabel 3.2 karakteristik mikroskopis khamir potensial probiotik memiliki karakter yang beda namun ada beberapa karakter yang mirip. Bentuk sel isolat khamir ada yang memiliki bentuk sel lebih dari satu yaitu bulat, oval, memanjang (YCnmL 1; YCnmL 5; YCnmL 6), dan memanjang (YCnmL 2; YCnmL 3; YCnmL 4). Semua isolat khamir memiliki tipe pertunasan multilateral dan jenis hifa pseudohifa dengan jumlah spora yang bervariasi. Askospora dan sel vegetatif terlihat jelas pada Gambar 3.3



Gambar 3.6 Uji kapsul (A) Genus *Saccharomyces* (YCnmL 6): (a) sel vegetatif, (b) kapsul; (B) Genus *Pichia* (YCnmL 4): (a) sel vegetatif, (b) kapsul ; (C) Genus *Kluyveromyces* (YCnmL 2): (a) sel vegetatif, (b) kapsul

Berdasarkan Tabel 3.2 hasil uji fisiologis dan biokimia isolat khamir hasil isolasi dari fermentasi jus jeruk siam menunjukkan hasil positif pada semua isolat pada uji kapsul. Uji fermentasi gula dari 3 jenis gula yang berbeda yaitu glukosa, sukrosa, dan laktosa menunjukkan bahwa glukosa dan sukrosa mampu difermentasi oleh semua isolat khamir potensial probiotik *Kluyveromyces*, *Pichia*, dan *Saccharomyces* sedangkan laktosa tidak dapat difermentasi oleh semua isolat khamir potensial probiotik. Kemampuan dalam memfermentasi gula berdasarkan adanya reaksi biokimia berupa perubahan warna media uji dari biru menjadi kuning. Selain itu semua isolate khamir juga mampu menghasilkan gas berupa gelembung udara pada permukaan media uji dan di dalam tabung durham. Uji pertumbuhan pada media

cair GPY menunjukkan hasil yang beragam. Khamir rata-rata tumbuh didasar media cair dan membentuk endapan berwarna putih, kecuali isolat YCnmL 2 memiliki perbedaan tumbuh dipermukaan dan dasar media cair dan membentuk endapan berwarna krem.

4. Pembahasan

4.1. Uji Khamir Potensial Probiotik pada Fermentasi Jus Jeruk

Khamir yang diperoleh berdasarkan proses isolasi didapat 16 isolat khamir hasil fermentasi jus jeruk siam (*C. nobilis* var. *microcarpa*) berdasarkan karakter makroskopis dan mikroskopis. Hasil skrining terhadap 16 isolat khamir tersebut memperoleh 6 isolat khamir yang berpotensi sebagai probiotik. Enam isolat ini memiliki kemiripan karakter atau teridentifikasi sebagai anggota genus *Kluyveromyces*, *Pichia*, dan *Saccharomyces* berdasarkan karakter makroskopis, mikroskopis, reproduksi sel dan uji fisiologi (Tabel 3.2). Czerucka *et al.* (2007) menyatakan bahwa standar uji probiotik pada khamir dapat menghambat laju pertumbuhan bakteri patogen oportunistik *E. coli* pada saluran pencernaan dan suhu 37°C sesuai dengan suhu tubuh pada manusia.

Berdasarkan Tabel 3.1 hasil uji khamir probiotik berdasarkan uji daya hambat terhadap mikroorganisme patogen dari *E. coli* menunjukkan ke enam isolat khamir probiotik dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* terlihat dengan terbentuknya zona bening. Isolat khamir YCnmL 3 menunjukkan diameter zona bening tertinggi (66.3mm), diikuti isolat YCnmL 5.1.3 (30.7mm), YCnmL 5.1.4 (30.5mm), YCnmL 4.2.1.1 (28.3mm), YCnmL 5.2.3 (19.5mm), dan YCnmL 4.1.1 (16.2mm). Berdasarkan hasil penelitian, memperlihatkan zona bening yang terbentuk lebih besar dibandingkan penelitian sebelumnya, Fakruddin *et al.* (2017) telah melakukan pengujian aktivitas antibakteri atau daya hambat pada spesies khamir probiotik *Saccharomyces* terhadap *E. coli* dengan diameter zona bening sebesar 11 mm dan pada penelitian Al-Dulaimi *et al.* (2020) diameter zona bening yang terbentuk sebesar 17.2 mm.

Aktivitas daya hambat khamir *Kluyveromyces*, *Pichia*, dan *Saccharomyces* terhadap bakteri patogen *E. coli* ini diduga disebabkan oleh metabolisme khamir yang mampu memfermentasi *D*-glukosa pada media tanam menjadi asam-asam organik. Hal ini didukung oleh hasil pengamatan berupa bau alkohol dan asam dari isolat khamir pada media tanam. Selain itu proses fermentasi ini juga mampu menurunkan pH pada media. Hal ini selaras dengan proses fermentasi jus jeruk yang sebelum fermentasi pH 3.2 dan setelah fermentasi pH 3.

Menurut Oliveira *et al.* (2019), menyatakan daya hambat *Kluyveromyces* terhadap bakteri patogen *E.coli* dikarenakan adanya persaingan untuk mendapatkan nutrisi, produksi racun pembunuh (*killer toxin*), perubahan pH, dan produksi senyawa (mudah menguap atau tidak mudah menguap) sebagai asam organik (asetat, butirrat, dan propionat) dihasilkan saat proses fermentasi. Berdasarkan hasil

penelitian Hatoum *et al.* (2012) menyatakan *Pichia* mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dikarenakan senyawa antibakteri yang disekresikan oleh khamir, perubahan pH pada media, pelepasan senyawa antimikroba seperti racun pembunuh (*killer toxins*). Menurut Fakruddin *et al.* (2017) menyatakan bahwa genus *Saccharomyces* dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* disebabkan produksi toksin pembunuh (*killer toxin*), produksi etanol tinggi, dan antioksidan.

Semua isolat khamir probiotik diamati berdasarkan diameter koloni yang bervariasi pada setiap isolat khamir setelah diinkubasi selama 48 jam. Diameter koloni terluas dari isolat *Pichia* (YCNmL 4; YCNmL 3) sebesar 13.1mm dan 11.5mm, *Kluyveromyces* (YCNmL 2) sebesar 10.5mm, dan diameter terkecil dari isolat *Saccharomyces* (YCNmL 5; YCNmL 1; YCNmL 6) sebesar 9.2mm, 7.7mm, dan 7.3mm. Oleh karena itu diperoleh IDH yang bervariasi juga. IDH tertinggi dari isolat *Pichia* (YCNmL 3) sebesar 4.77 mm, diikuti isolat *Saccharomyces* (YCNmL 6) sebesar 2.67 mm, isolat *Saccharomyces* (YCNmL 5) sebesar 2.32 mm, isolat *Kluyveromyces* (YCNmL 2) sebesar 1.70 mm, isolat *Pichia* (YCNmL 4) sebesar 1.34 mm, dan isolat *Saccharomyces* (YCNmL 6) sebesar 1.10 mm (Tabel 3.1). Semua isolat menunjukkan IDH sedang (terlihat dari nilai IDH diantara 1-2) sampai tinggi (terlihat dari nilai IDH >2). Berdasarkan penelitian sebelumnya dari Fakruddin (2017) menyatakan bahwa isolat khamir probiotik memiliki aktivitas antimikroba sedang terhadap bakteri patogen *E. coli* dengan terbentuknya zona penghambatan. Hal ini dikarenakan hasil metabolisme yang dihasilkan isolat khamir mampu menghambat pertumbuhan dari *E. coli*.

Penelitian dari Plessas *et al.* (2012) menyatakan aktivitas antimikroba pada khamir adalah sifat probiotik yang dibutuhkan. Hal ini juga penting untuk strain probiotik untuk memiliki keunggulan kompetitif dan mencegah pertumbuhan bakteri patogen. Perricone *et al.* (2014) menyatakan bahwa mikroorganisme yang berpotensi probiotik dapat menghasilkan metabolit antibakteri atau memiliki aktivitas antagonis terhadap bakteri patogen. Berdasarkan proses fermentasi khamir probiotik menghasilkan asam-asam organik seperti asam laktat, asam asetat, dan asam organik lainnya yang mampu menghambat perkembangan bakteri patogen *E. coli* (Viljoen, 2006).

Potensi probiotik isolat khamir terhadap perlakuan pada kondisi asam yang berbeda-beda (pH 2, pH 3, dan pH 4), semua isolat mampu tumbuh pada pH tersebut. Pertumbuhan terbaik pada pH 4, semua isolat khamir tumbuh banyak. Isolat khamir pada pH 2 dan pH 3 pertumbuhannya sedikit dan sedang (Tabel 4.1). Kapsul pada khamir probiotik yang dapat melindungi dinding sel khamir dan dapat mempertahankan sel dari kondisi lingkungan yang asam. Berdasarkan hasil penelitian dari Hudson *et al.* (2019) menyatakan polisakarida dan mannoprotein pada kapsul khamir yang dapat berfungsi sebagai tempat pelekatan sel patogen sehingga tidak menempel pada dinding usus. Selain itu adanya kapsul pada khamir

ini menjadikan khamir mampu bertahan pada kondisi pH asam yang sesuai kondisi saluran pencernaan. Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya telah menemukan bahwa komponen kapsul dan dinding sel seperti glukosa dapat meningkatkan resistensi khamir probiotik terhadap tekanan pH sesuai kondisi gastrointestinal.

Isolat khamir probiotik *Kluyveromyces*, *Pichia* dan *Saccharomyces* mampu bertahan pada pH asam disebabkan proses metabolisme yang dilakukan oleh khamir selama proses fermentasi yang menghasilkan asam-asam organik sehingga terjadi perubahan pH menjadi lebih asam. Menurut Oliveira *et al.* (2019) faktor yang menyebabkan khamir mampu bertahan pada kondisi gastrointestinal adalah perubahan pH selama metabolisme dan produksi asam-asam organik seperti asam asetat, laktat, butirat, propionat yang dihasilkan selama proses fermentasi.

4.2 Identifikasi Khamir Potensial Probiotik Pada Fermentasi Jus Jeruk Siam

Isolat-isolat khamir probiotik yang diperoleh dari genus *Kluyveromyces* (YCnmL 2), *Pichia* (YCnmL 3 dan YCnmL 4), dan *Saccharomyces* (YCnmL 1, YCnmL 5, dan YCnmL 6). Isolat khamir *Kluyveromyces* memiliki koloni berbentuk bulat, teksturnya krim (*butyrous*), berwarna krem kecoklatan, permukaan kusam, elevasi sedikit menonjol (*raised*), tepian rata, dengan diameter koloni 2-5mm. Sel berbentuk bulat telur, elips, silinder, dan memanjang, terlihat adanya pseudohifa. Reproduksi vegetatif dengan pertunasan multipolar dan reproduksi secara generatif dengan askospora berjumlah 1-4 atau lebih. Pertumbuhan khamir dari media GPY cair tumbuh pada dasar media, terdapat endapan krem kecoklatan, dan terbentuk pelikel. Isolat ini mampu memfermentasi sukrosa dan glukosa, namun tidak mampu memfermentasi laktosa, dan dapat menghasilkan gas (Tabel 3.2). Isolat mampu tumbuh pada suhu 37°C dan tumbuh baik pada pH 4 (tumbuh kurang baik pada pH 2 dan 3) setelah 24 jam. Berdasarkan hasil pengamatan terdapat kemiripan pada isolat YCnmL 2 dengan *Kluyveromyces*.

Menurut Kurtzman dan Fell (1998), *Kluyveromyces* memiliki koloni berbentuk bulat berwarna krem kecoklatan, dan kadang merah muda, tekstur krim, permukaan kusam, halus atau keriput. Pertumbuhan pada media cair terdapat pelikel dan endapan. Sel berbentuk bulat telur, elips, silinder, sampai memanjang. Formasi sel tunggal, berpasangan, dan berkelompok dan dapat membentuk pseudohifa. Hifa sejati tidak terbentuk. Reproduksi vegetatif dengan pertunasan multipolar dan secara generatif dengan askospora berjumlah 1-4 atau lebih. Satu sampai empat, atau pada beberapa spesies, banyak askospora yang terbentuk per askus. Askospora dibebaskan pada saat dewasa. Fermentasi glukosa dengan kuat dan pelikel bisa terbentuk di media cair.

Karakteristik makroskopis koloni isolat khamir dari genus *Pichia* berbentuk bulat, bertekstur kental (*viscous*), berwarna putih dan krem, permukaan kusam, elevasi sedikit menonjol (*raised*), dan diameter koloni 2-7mm. Karakteristik sel khamir ini ditemukan pada isolat khamir YCnmL 3 dan YCnmL 4. Isolat dari *Pichia*

memiliki bentuk bulat, elips, bulat telur memanjang, bereproduksi dengan pertunasan multipolar dan membentuk askospora dengan jumlah 1-4 tiap askus. Formasi sel tunggal, berpasangan, rantai, dan berkelompok, dan dapat memfermentasi sukrosa dan glukosa, dan tidak dapat memfermentasi laktosa dan menghasilkan gas. Khamir *Pichia* ini memiliki hifa pseudohifa, tumbuh pada GPY cair tumbuh di dasar, dan terdapat endapan putih pada media uji (Tabel 3.2). Berdasarkan hasil pengamatan terdapat kemiripan pada isolat YCnmL 2 dengan *Pichia*.

Khamir *Pichia* bentuk sel bulat, bulat telur memanjang, dan elips dan terdapat hifa pseudohifa. Formasi sel tunggal, berpasangan, rantai, dan berkelompok. Reproduksi vegetatif dengan pertunasan multipolar dan reproduksi generatif dengan askospora berjumlah 1-4 tiap askus, dan mampu memfermentasi glukosa dan sukrosa (Kurtzman dan Fell, 1998).

Isolat khamir *Saccharomyces* memiliki bentuk koloni bulat, bertekstur krim (*butyrous*), berwarna putih, permukaan kusam, elevasi cembung (*convex*), tepian rata, dan diameter koloni 0.5-5mm. Sel khamir berbentuk bulat, oval, dan silinder memanjang, terlihat adanya pseudohifa. Formasi sel tunggal, berpasangan, dan berkelompok. Reproduksi vegetatif dengan pertunasan multipolar, dan reproduksi generatif membentuk askospora berjumlah 1-10 tiap askus. Khamir ini dengan cepat melakukan fermentasi pada sukrosa dan glukosa, dan tidak bisa memfermentasi laktosa. Khamir *Saccharomyces* tumbuh pada GPY cair di dasar terdapat endapan putih, tidak membentuk pelikel atau cincin (Tabel 3.2). Tumbuh pada suhu 37°C dan pH asam (2, 3, dan 4), dan dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen *E. coli*. Berdasarkan hasil uji di atas terlihat kesamaan antara isolat khamir YCnmL 1, YCnmL 5, dan YCnmL 6 dengan *Saccharomyces*.

Khamir *Saccharomyces* memiliki morfologi koloni berbentuk bulat, berwarna putih dan krem, tekstur krim, permukaan halus dan kusam, elevasi datar, sedikit menonjol, terlipat, dan cembung. Khamir ini memiliki bentuk sel bulat, oval dan silinder memanjang, bisa membentuk pseudohifa. Formasi sel tunggal, berpasangan, dan berkelompok. Reproduksi vegetatif dengan perbanyakan tunas multipolar, dan reproduksi generatif dengan askospora berjumlah 1-4 atau lebih per askus, fermentasi gula. Khamir ini tumbuh pada GPY cair menunjukkan endapan putih atau krem di dasar media uji, dan tidak terdapat pelikel (Kurtzman dan Fell, 1998).

5. Kesimpulan

Uji potensial khamir probiotik terhadap semua isolat menunjukkan mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen *E. coli*. Zona bening tertinggi dari genus *Pichia* (YCnmL 4.2.2) sebesar 66.3 mm dengan nilai IDH 4.77mm. Uji potensial khamir probiotik ketahanan terhadap kondisi asam menunjukkan bahwa semua isolat khamir dapat tumbuh pada pH 2, 3, dan 4. Semua khamir tumbuh baik pada pH 4. Khamir potensial probiotik hasil isolasi dari fermentasi jus jeruk siam (C.

nobilis var. *microcarpa*) diperoleh 6 isolat teridentifikasi dari genus *Kluyveromyces*, *Pichia*, dan *Saccharomyces*. Saran untuk penelitian selanjutnya mengenai potensi khamir probiotik dari fermentasi jus jeruk siam (*Citrus nobilis* var. *microcarpa*) dapat dilakukan pengujian probiotik lanjutan untuk mengetahui kualitas dari setiap isolat yang ditemukan.

Daftar Pustaka

- Al-Dulaimi FKY, Al-Tarjuman JK, Abid FNM. 2020. Inhibitory Activity of *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorulaglutinis* and *Lactobacillus* spp Against *Escherichia coli* Isolated from Children Diarrhea Infection. *Annals of Tropical Medicine dan Public Health*. 23(7): 1-4
- Aneja KR, Dhiman R, Aggarwal NK, Kumar V, Kaur M. 2014. Microbes Associated with Freshly Prepared Juices of Citrus and Carrots. *International Journal of Food Science*. 1(1): 1-7
- Chelliah R, Ramakrishnan SR, Prabhu PR, Antony U. 2016. Evaluation of Antimicrobial Activity and Probiotic Properties of Wild-Strain *Pichia kudriavzevii* Isolated from Frozen Idli Batter. *Yeast*. 33(8): 385-401
- Czerucka D, Piche T, Rampal P. 2007. Review Article: Yeast as Probiotics *Saccharomyces boulardii*. *Aliment Pharmacol Therap*. 26(6): 767-778
- Dey A, Ragavan ML, Mandal SK, Das N. 2017. Isolation, Identification, and In vitro Characterisation of Probiotic Yeast. *Research Journal Pharmation and Technology*. 10(3): 726
- Djide MN, Wahyuddin E. 2008. Isolasi Bakteri Asam Laktat dan Air Susu Ibu dan Potensinya dalam Penurunan Kadar Kolestrol secara In Vitro. *Majalah Farmasi Dan Farmakologi*. 12(3): 73-78
- Fakruddin M, Hossain MN, Ahmed MM. 2017. Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, A Potential Probiotic, *MBC Complementary and Alternative Medicine*. 17(64): 1-11
- Ghafar MFA. 2010. Flavoid, Hesperidin, Total Phenolic Content and Antioxidan Activities from *Citrus* Species. *African Journal of Biotechnology*. 9(3): 326-330
- Hatoum R, Labrie S, Fliss I. 2012. Review Article: Antimicrobial and Probiotic Properties of Yeasts from Fundamental to Novel Applications. *Frontier in Microbiology*. 3: 1-12
- Hsiung RT, Fang WT, LePage BA, Hsu SA, Hsu CH, Chou JY. 2020. In Vitro Properties of Potential Pobiotic Indigenous Yeasts Originating from Fermented Food and Beverages in Taiwan. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 1: 1-12
- Hudson LE, Mc Dermott CD, Stewart TP, Hudson WH, Rios D, Fasken MB *et al*. 2016. Characterization of the Probiotic Yeast *Saccharomyces boulardii* in the Healthy Mucosal Immune System. *PLoS ONE*. 11(4): 1-21
- ICMSF. 2005. *Soft Drinks, Fruit Juices, Concentrates and Food Preserves*, in *Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodity*. Kluwer Academic.
- Indah H, Putri F, Utama GL. 2015. Preliminary Studies of Halophilic Yeasts Antimicrobial Activities Isolated from Cocoa Bean Pulp Towards *E. coli* and

- Salmonella* Spp., *Int J. On Adv. Sci. Eng. and Information Technology*. 5(2): 107-109
- James A, Wang Y. 2019. Characterization, Health Benefits and Applications of Fruit and Vegetable Probiotics. *Journal of Food*. 17(1): 770-780
- Khisti UV, Kathade SA, Aswani MA, Anand PK, Bipinraj NK. 2019. Isolation and Identification of *Saccharomyces cerevisiae* from Caterpillar Frass and their Probiotic Characterization. *Biosciences Biotechnology research Asia*. 16(1): 179-186
- Khotimah K, Balia R, Chaerunnisa H, Safitri R, Utama GL, Saputra MI, Syara A. 2015. Isolation and Identification Probiotic Candidates Bacteria from Crossbreed Fries Holland (cfh) Colostrum that Grown on Nutrient Agar with Olive Oil and Casein Enrichment. *Adv. J. Of Food Sci. and Techno*. 8(1): 22-26
- Kreger-van Rij NJW. 1987, Holt JG, Krieg NG, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. 1994. *Bergey`s Manual Determinative Bacteriology*. Edisi 9. Williams and Wilkins Company. Baltimore
- Kurtzman CP, Fell JW. 1998. *The Yeast A Taxonomy Study*. Elviesier. New York
- Lara-Hidalgo CE, Hernandez-Sanchez H, Hernandez-Rodriguez C, Dorantes-Alvarez L. 2017. Yeasts in Fermented Foods and their Probiotic Potential. *Austin Journal of Nutrition and Metabolism*. 4(1): 1045
- Matthias S. 2011. Dimorphic Cycle in *Candida citri* sp. nov., a Novel Yeast Species Isolate from Rotting Fruit in Borneo. *Federation of European Microbiological Societies*. 11(1): 202-208
- Mohan SK. 2009. *Gram Stain: Looking Beyond Bacteria to Find Fungi in Gram Stained*
- Nash AK, Auchtung TA, Wong MC, Smith DP, Gesell JR, Ross MC, Stewart CJ, Metcalf GA, Muzny DM, Gibbs RA, Ajami NJ. 2017. The Gut Mycobiome of the Human Microbiome Project Healthy Cohort. *Microbiome*. 5(153): 1-13
- Nualkaekul S, Salmeron I, Charalampopoulos D. 2011. Investigation of The Factors Influencing The Survival of *Bifidobacterium longum* in Model Acidic Solutions and Fruit Juices. *Food Chem*. 129(3): 1036-1044
- Nurhariyati T. 2004. Keanekaragaman Khamir Pendegradasi Minyak Hasil Isolasi dari Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya. *Berk Penel Hayati*. 9: 87-91
- Obasi BC, Whong, CMZ, Ado SA, Abdullahi IO. 2014. Isolation and Identification of Yeast Associated with Fermented Orange Juice. *The International Journal of Engineering and Science (IJES)*. 3(9): 64-69
- Oliveira DR, Lopes ACA, Pereira RA, Cardoso PG, Duarte EF. 2019. Selection of Potentially Probiotic *Kluyveromyces lactis* for the Fermentation of Cheese Whey-Based Beverage. *Annals of Microbiology*. 69: 1361-1372
- Perricone M, Bevilacqua A, Corbo MR, Sinigaglia M. 2014. Technological Characterization and Probiotic Traits of Yeasts Isolated from Altamura Sourdough to Select Promising Microorganisms as Functional Starter Cultures for Cereal-Based Products. *Food Microbiol*. 38: 26-35
- Plessas S, Bosnea L, Alexopoulos A, Bezirtzoglou E. 2012. Potential Effects of Probiotics in Cheese and Yogurt Production. *Engineering in Life Science*. 12: 1-9

- Rini AP, Nocianitri KA, Hapsari NMI. 2019. Viabilitas *Lactobacillus* sp. F213 pada Berbagai Minuman Sari Buah Probiotik Selama Penyimpanan. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*. 8(4): 408-418
- Sanders ME, Merenstein D, Merrifield CA, Hutkins R. 2018. Probiotics for Human Use. *Nutr Bull*. 43(3): 212-225
- Sari DYR, Saputro TB, Muhibuddin A. 2016. Uji Potensi Fermentasi Etanol *Yeast* Tanah yang Diisolasi dari Metode Budidaya SDN di Daerah Batu, Jawa Timur, *Jurnal Sains dan Seni ITS*. 5(2): 39-43
- Syal P, Vohra A. 2013. Probiotic Potential of Yeast Isolated from Traditional Indian Fermented Foods. *International Journal of Microbiology Research*. 5(2): 390-398
- Viljoen B. 2006. *Yeast Ecological Interactions*. Springer. Berlin
- West PV. 2008. *Stress in Yeast and Filamentous Fungi*. Academic Press. UK
- Yarrow D. 1998. *Methods for The Isolation, Maintenance and Identification of Yeast*, Dalam: Kurtzman CP, Fell JW (eds.). 1998. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 4th ed. Elsevier. Amsterdam
- Yuma YS. 2020. Isolation and Characterization of Yeast as Potential Probiotics from Fermented Cereals Dough. *Journal of Veterinary Medicine and Research*. 7(6): 1-7