



**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI YEAST OSMOFILIK ASAL TETES TEBU**

**SKRIPSI**

Oleh  
**Ika Fitriyah**  
**NIM 121810401068**

**JURUSAN BIOLOGI**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**UNIVERSITAS JEMBER**  
**2017**



**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI YEAST OSMOFILIK ASAL TETES TEBU**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1)  
dan mencapai gelas Sarjana Sains

Oleh  
**Ika Fitriyah**  
**NIM 121810401068**

**JURUSAN BIOLOGI**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**UNIVERSITAS JEMBER**  
**2017**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ayahanda Edy Purwanto dan Ibunda Dewi Nurriyana yang selalu mencurahkan doa dan kasih sayang untuk kesuksesan putrinya.
2. Adikku Taufik Hidayat yang selalu memberikan semangat.
3. Semua sahabat yang telah menemani perjalanan dan perjuangan selama di kota Jember.
4. Guru-guru sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi yang telah membimbing dan memberikan ilmu yang sangat berguna dan bermanfaat.
5. Almamater Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

**MOTTO**

“Allah tidak membebani seseorang kecuali menurut kekuatannya.”

(Q.S *Al-Baqorah* (2): 286)<sup>1)</sup>

“Maka sesungguhnya disamping kesulitan akan ada kemudahan.

Sesungguhnya disamping kesulitan akan ada kemudahan.”

(Q.S *Al Insyirah* (94): 5-6)<sup>1)</sup>

“Sedikit pengetahuan yang berperan, bernilai jauh lebih baik dari banyak pengetahuan namun terputus”

(Kahlil Gibran)<sup>2)</sup>

---

<sup>1)</sup> Departemen Agama Republik Indonesia. 2001. *Tarjamah Al-Qur'an Al-Hakim*. Surabaya: CV Sahabat Ilmu.

<sup>2)</sup> Gibran, Kahlil. 2011. A Third Treasury of Kahlil Gibran. *Philosophical Library*: 444.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tanga di bawah ini:

Nama : Ika Fitriyah

NIM : 121810401068

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Isolasi dan Identifikasi Yeast Osmofilik asal Tetes Tebu“ adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya ilmiah jiplakan. Penelitian ini merupakan proyek penelitian yang dibiayai oleh Program Riset Penguatan Divisi Biomaterial dan Rekayasa Bioproses CDAST tahun 2014/2015. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 14 Maret 2017

Yang menyatakan,

Ika Fitriyah

NIM 1218101401068

**SKRIPSI**

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI YEAST OSMOFILIK ASAL TETES TEBU**

Oleh

**Ika Fitriyah**

**NIM. 121810401068**

**Pembimbing :**

**Dosen Pembimbing Utama : Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc.**

**Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Nurhayati, M.Si., S.TP.**

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Isolasi dan Identifikasi Yeast Osmofilik asal Tetes Tebu” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal :

Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas  
Jember

Tim Penguji :

Ketua,

Anggota I,

Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc.  
NIP. 195510221982121001

Dr. Nurhayati, M.Si., S.TP.  
NIP. 197904102003122004

Anggota II,

Anggota III,

Dr. Kahar Muzakhar, S.Si.  
NIP. 196805031994011001

Drs. Rudju Winarsa, M.Kes.  
NIP. 196008161989021001

Mengesahkan

Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D.  
NIP. 196102041987111001

## RINGKASAN

**Isolasi dan Identifikasi Yeast Osmofilik Asal Tetes Tebu;** Ika Fitriyah, 121810401068; 2017; 75 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tetes tebu merupakan salah satu media untuk produksi alkohol secara komersial pada industri fermentasi alkohol. Industri menggunakan substrat dengan konsentrasi gula 16-18%, jika lebih tinggi dari 18% akan menyebabkan tekanan osmotik sehingga dapat mengurangi efisiensi proses fermentasi. Oleh karena itu, pada penelitian ini diisolasi yeast osmofilik asal tetes tebu. Penelitian ini bertujuan untuk (1) mengisolasi yeast osmofilik asal tetes tebu (2) mengkarakterisasi morfologi dan fisiologi, serta mengidentifikasi molekuler yeast osmofilik asal tetes tebu.

Penelitian dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu persiapan tetes tebu dan pengukuran brix tetes tebu menggunakan refraktometer. Isolasi isolat yeast osmofilik dilakukan dengan metode sebar pada media MEA. Purifikasi isolat yeast dilakukan dengan metode gores pada media MEA. Isolat yeast osmofilik dikarakterisasi morfologi dan fisiologinya serta dilakukan identifikasi molekuler. Karakterisasi morfologi meliputi pengamatan makroskopis (bentuk dan warna koloni) dan pengamatan mikroskopis (bentuk sel dan tipe pertunasan). Karakterisasi fisiologi meliputi uji suhu pertumbuhan, pH pertumbuhan, kemampuan tumbuh pada substrat tetes tebu dengan brix 14°, 24° and 34°, kemampuan produksi alkohol dan pola fermentasi menggunakan kit API 20C Aux. Identifikasi molekuler meliputi ekstraksi DNA menggunakan kit Presto™ Mini gDNA Yeast Kit (GBY100), pengukuran kuantitas dan kualitas DNA menggunakan Nanodrop Genomic DNA, amplifikasi PCR menggunakan primer ITS 1, ITS 4 dan KAPA Taq Extra HotStart Kit, elektroforesis menggunakan *gel agarose* 1% dan DNA Ladder 100 bp, sekuensing DNA secara *bi-directional sequencing* dan analisis filogenetik dengan metode *neigh-joining* (NJ).



Hasil penelitian yang diperoleh yaitu terdapat 2 isolat yang berhasil diisolasi yaitu isolat A dan B, dan dilakukan purifikasi untuk mendapatkan koloni tunggal. Isolat A dan B memiliki karakteristik morfologi yaitu isolat A dan B memiliki bentuk koloni bulat dan berwarna putih, isolat A memiliki bentuk sel bulat dan pertunasan dengan tipe multilateral; sedangkan isolat B memiliki bentuk sel silinder dan pertunasan dengan tipe multilateral. Isolat A dan B memiliki karakteristik fisiologi yaitu isolat A memiliki kemampuan tumbuh pada suhu 30°C; pH 5; kemampuan tumbuh pada substrat tetes tebu brix 14°, 24° dan 34°; produksi alkohol tertinggi pada tetes tebu brix 34° dengan lama inkubasi 48 jam; mampu memfermentasi glukosa, gliserol, kalsium-2-keto-glukonat, arabinosa, adonitol, galaktosa, inositol, sorbitol, methyl- D-glukopiranosida, N-asetil-glukosamin, cellobiosa, maltosa, sakarosa, trehalosa, melezitosa, raffinosa dengan kit API 20C Aux; sedangkan isolat B memiliki kemampuan tumbuh pada suhu 30°C; pH 5; kemampuan tumbuh pada substrat tetes tebu brix 14°, 24° dan 34°; produksi alkohol tertinggi pada tetes tebu brix 34° dengan lama inkubasi 48 jam; mampu memfermentasi glukosa, gliserol, kalsium-2-keto-glukonat, arabinosa, xylosa, adanitol, xylitol, galaktosa, sorbitol, methyl- D-glukopiranosida, N-asetil-glukosamin, cellobiosa, maltosa, sakarosa, trehalosa, raffinosa dengan kit API 20C Aux. Identifikasi molekuler dilakukan hanya pada isolat A, berdasarkan produksi alkohol tertinggi dan peningkatan pertumbuhan pada substrat tetes tebu dibandingkan isolat B. Isolat A adalah *Candida parapsilosis* ZA012 (100%) berdasarkan hasil pencarian homologi sekuen dengan program BLAST pada *database* NCBI.

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Isolasi dan Identifikasi Yeast Osmofilik asal Tetes Tebu” dengan baik.

Penyelesaian Karya Ilmiah Tertulis (skripsi) ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih atas semua dukungan dan bantuan kepada:

1. Drs. Sujito, Ph.D. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
2. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, M.Si. selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
3. Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc. selaku Dosen Pembimbing Utama, Dr. Nurhayati, M.Si, S.TP. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
4. Dr. Kahar Muzakhar, S.Si. selaku Dosen Penguji I dan Drs. Rudju Winarsa, M.Kes. selaku Dosen Penguji II, yang telah memberi masukan yang bermanfaat dalam skripsi ini;
5. Eva Tyas Utami, M.Si, S.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
6. Kedua orang tua, Ayahanda Edy Purwanto dan Ibunda Dewi Nurriyana serta Adikku Taufik Hidayat yang selalu meberikan doa, dukungan dan kasing sayang sehingga skripsi ini dapat terselesasikan.
7. CDAST Universitas Jember atas biaya penelitian melalui Program Riset Penguatan Divisi Biomaterial dan Rekayasa Bioproses tahun 2014/2015.
8. Rekan penelitian Anjas Wida Elistiarini dan rekan-rekan CDAST atas bantuan dan kerjasamanya dalam menyelesaikan skripsi ini.
9. Keluarga Biozva yang telah menemani dan memberikan dukungan serta semangat.

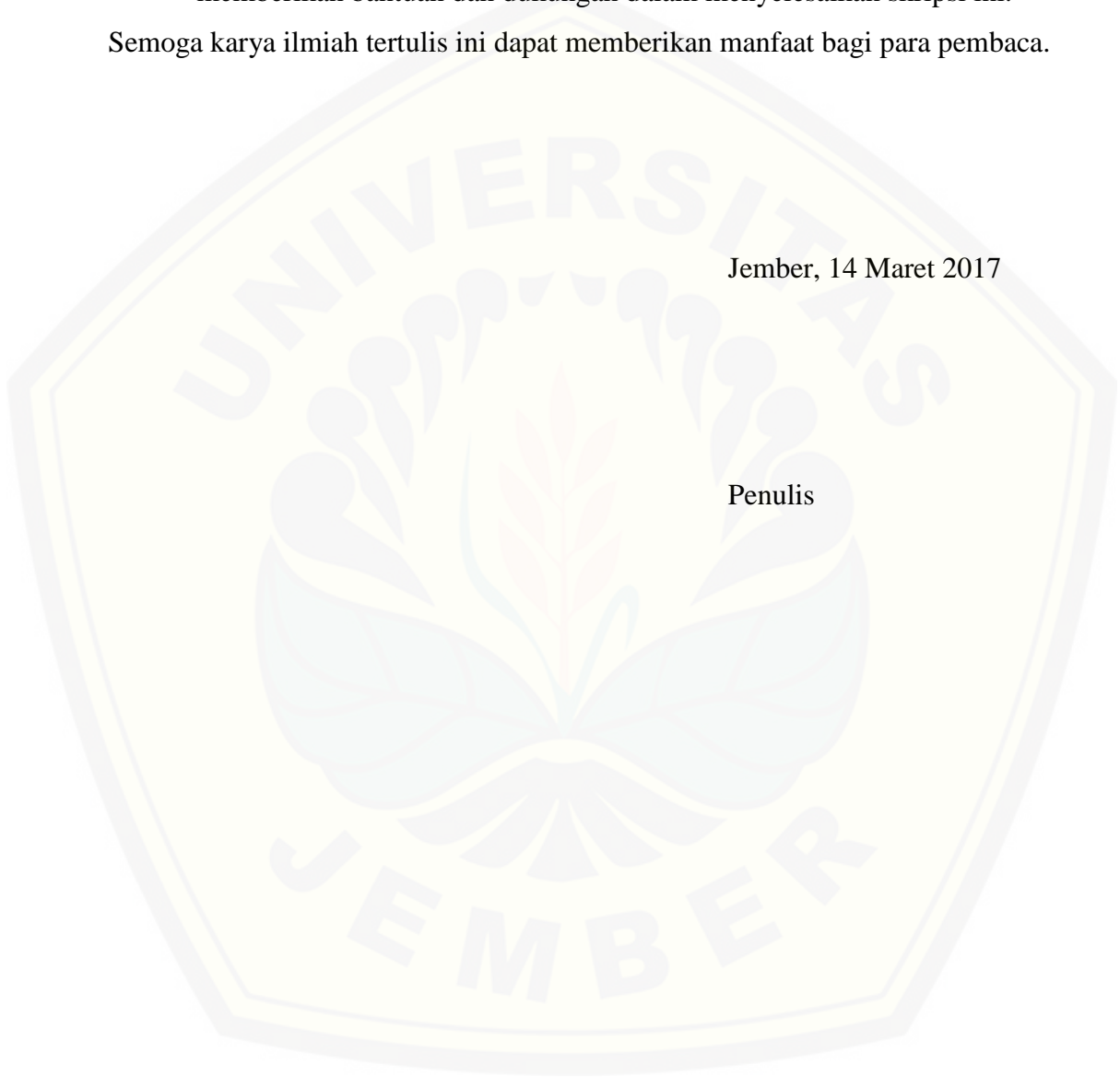
10. Sahabat Anugrah V Ilannuri, Rizky Ari Ekawati, Emeilia Rizky, Nurlaili Arumningtyas, Dewi Ulinnihayah yang tiada henti memberi motivasi, dukungan dan semangat.

11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dan dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini.

Semoga karya ilmiah tertulis ini dapat memberikan manfaat bagi para pembaca.

Jember, 14 Maret 2017

Penulis



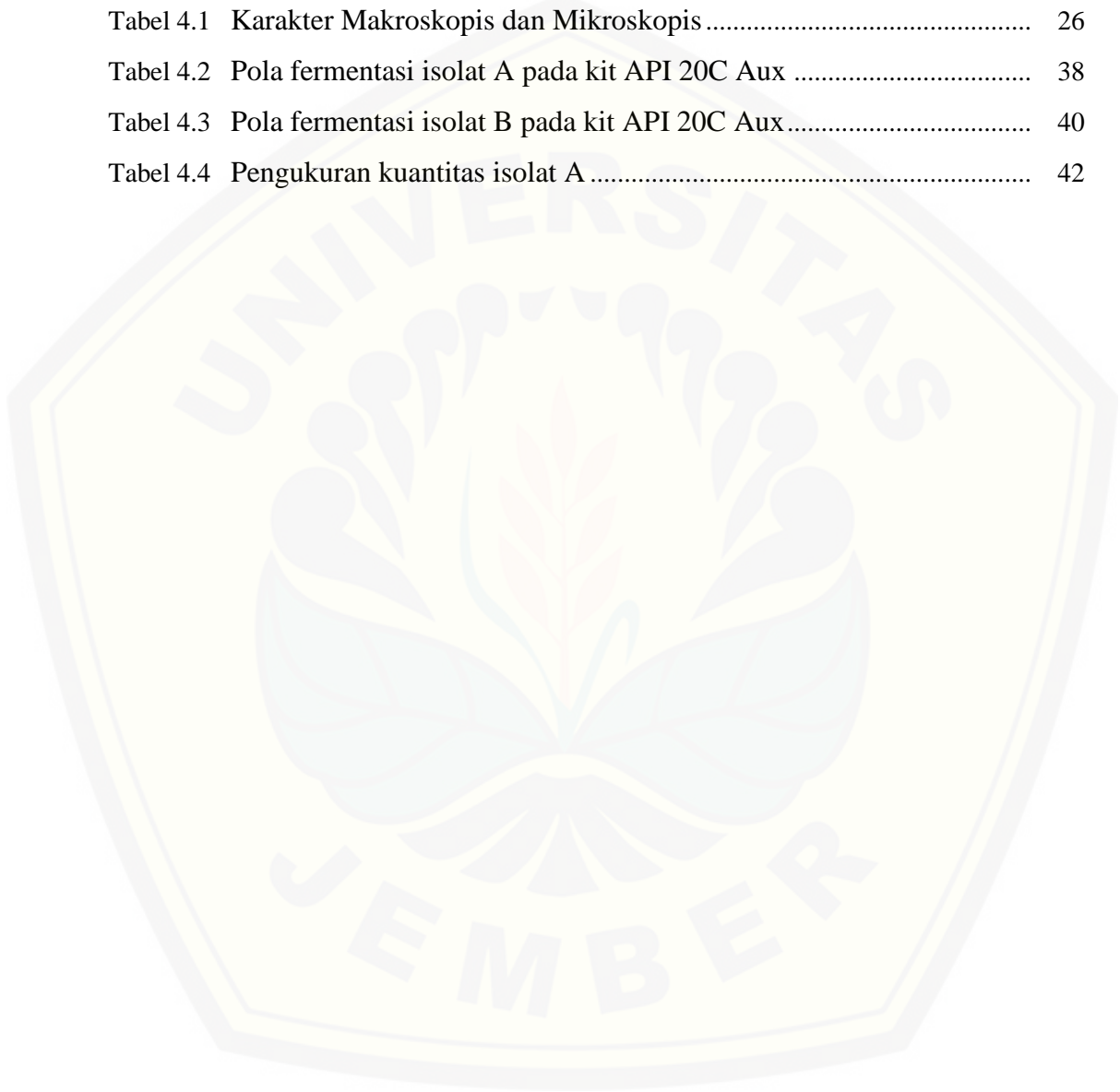
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	ii
HALAMAN MOTTO .....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBING .....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN .....	vii
PRAKARTA .....	ix
DAFTAR ISI .....	xi
DAFTAR TABEL .....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Batasan Masalah .....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Tujuan .....</b>	<b>3</b>
<b>1.5 Manfaat .....</b>	<b>3</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Bioetanol .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Tetes Tebu .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Yeast .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3.1 Karakteristik Morfologi .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3.2 Karakteristik Fisiologi.....</b>	<b>9</b>
<b>2.3.3 Karakteristik Molekuler .....</b>	<b>9</b>
<b>2.3.4 Taksonomi .....</b>	<b>11</b>

2.4 Isolasi dan Identifikasi Yeast .....	11
2.4.1 Identifikasi Konvensional.....	11
2.4.2 Identifikasi Molekuler .....	12
<b>BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Alat dan Bahan .....</b>	<b>15</b>
3.2.1 Alat .....	15
3.2.2 Bahan .....	15
<b>3.3 Tahap Penelitian .....</b>	<b>17</b>
3.3.1 Persiapan Tetes Tebu .....	17
3.3.2 Isolasi dan Purifikasi .....	17
3.3.3 Karakterisasi Morfologi .....	17
3.3.4 Karakterisasi Fisiologi .....	18
3.3.5 Identifikasi Molekuler.....	21
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1 Isolasi dan Purifikasi Yeast Osmofilik.....</b>	<b>25</b>
<b>4.2 Karakteristik Morfologi Yeast Osmofilik.....</b>	<b>26</b>
<b>4.3 Karakteristik Fisiologi Yeast Osmofilik .....</b>	<b>28</b>
<b>4.4 Karakteristik Molekuler Yeast Osmofilik .....</b>	<b>41</b>
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>49</b>
<b>5.1 Kesimpulan .....</b>	<b>49</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>49</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>50</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>55</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 2.1 Komposisi Kimiawi Tetes Tebu.....	7
Tabel 4.1 Karakter Makroskopis dan Mikroskopis .....	26
Tabel 4.2 Pola fermentasi isolat A pada kit API 20C Aux .....	38
Tabel 4.3 Pola fermentasi isolat B pada kit API 20C Aux.....	40
Tabel 4.4 Pengukuran kuantitas isolat A .....	42



**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
Gambar 2.1 Proses konversi glukosa menjadi etanol.....	5
Gambar 2.2 Bentuk sel yeast .....	8
Gambar 2.3 Perkembangan bentuk sel yeast berbentuk lemon.....	9
Gambar 2.4 Unit gen penyandi ribosomal RNA pada mikroorganisme eukariota.....	10
Gambar 3.1 Diagram alir penelitian .....	16
Gambar 3.2 Cawan conway .....	20
Gambar 4.1 Purifikasi Isolat A dan B .....	25
Gambar 4.2 Kultur simpan dan kerja Isolat A dan B .....	26
Gambar 4.3 Karakter makroskopis isolat A dan B .....	27
Gambar 4.4 Bentuk dan tipe pertunasan sel isolat A dan B .....	28
Gambar 4.5 Kemampuan suhu pertumbuhan isolat A .....	29
Gambar 4.6 Kemampuan suhu pertumbuhan isolat B.....	30
Gambar 4.7 Kemampuan pH pertumbuhan isolat A .....	31
Gambar 4.8 Kemampuan pH pertumbuhan isolat B .....	32
Gambar 4.9 Kemampuan tumbuh isolat A pada substat tetes tebu .....	33
Gambar 4.10 Kemampuan tumbuh isolat B pada substat tetes tebu .....	34
Gambar 4.11 Kemampuan produksi alkohol isolat A .....	36
Gambar 4.12 Kemampuan produksi alkohol isolat B .....	37
Gambar 4.13 Elektroforesis produk PCR .....	43
Gambar 4.14 Urutan basa nukleotida isolat A.....	44
Gambar 4.15 Pohon filogenetik isolat A.....	48

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
A. Karakterisasi morfologi .....	55
B. Karakterisasi fisiologi-uji suhu pertumbuhan .....	56
C. Karakterisasi fisiologi-uji pH pertumbuhan.....	57
D. Karakterisasi fisiologi-uji ketahanan pada tetes tebu.....	58
E. Karakterisasi fisiologi-uji produksi alkohol.....	63
F. Karakterisasi fisiologi-uji pola fermentasi .....	66
G. Hasil BLAST isolat A dari database NCBI .....	71
H. Komposisi bahan .....	72
I. Protokol amplifikasi PCR .....	75
J. Elektroforesis .....	75



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Bioetanol adalah sumber energi alternatif yang melalui proses fermentasi bahan-bahan alami oleh mikroorganisme, bermanfaat sebagai alternatif pengganti BBM (Jeon, 2007). Produksi alkohol dengan cara fermentasi dapat diproduksi dengan 3 macam jenis karbohidrat yaitu bahan yang mengandung gula, pati, dan bahan yang mengandung selulosa (Harahap, 2003). Pada umumnya *molasses* digunakan sebagai media untuk produksi alkohol secara komersial pada industri fermentasi alkohol, karena mudah didapatkan secara luas, murah dan sebagai bahan baku yang berkualitas. Molasses berupa cairan kental seperti sirup dan berwarna coklat gelap atau coklat kemerahan bersifat asam dengan pH 5,5-6,5 (Harahap, 2003).

Pada industri, konsentrasi gula dalam substrat yang umum digunakan yaitu 16-18%. Jika konsentrasi gula lebih tinggi dari 18% akan menyebabkan tekanan osmotik yang mengurangi efisiensi proses fermentasi (Gaur, 2006). Fermentasi adalah reaksi dengan menggunakan mikroorganisme sebagai biokatalis seperti bakteri, yeast atau jamur untuk mengubah bahan baku menjadi suatu produk (Riadi, 2007). *Saccharomyces cerevisiae* merupakan yeast yang sering digunakan dalam proses fermentasi, karena keunggulannya yaitu mampu memproduksi tinggi, toleran dengan konsentrasi etanol yang cukup tinggi (12-18% v/v), tahan terhadap kadar gula yang tinggi dan tetap aktif melakukan fermentasi pada suhu 4-32°C (Gaur, 2006).

Yeast merupakan mikroorganisme golongan fungi yang berbentuk uniseluler yang memiliki daya tahan yang tinggi oleh adanya antibiotik, memiliki sifat antimikroba, serta memiliki ketahanan terhadap garam, asam dan gula (Roostita, 1993). Menurut Fardiaz (1992), ditinjau dari mikroorganismenya, mikroorganisme yang hidup pada konsentrasi gula tinggi termasuk mikrob osmofilik. Kadar gula yang tinggi akan menghasilkan tekanan osmotik yang tinggi (Weiser, 1962), sehingga air dari dalam sel keluar ke larutan gula menyebabkan sel kekurangan air, terhambat pertumbuhannya, atau mengalami

plasmolisis (Dhamayanti *et al.*, 2002). Hampir semua yeast yang bersifat osmofilik termasuk dalam jenis *Saccharomyces*, yaitu *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces rouxiivar*, *Saccharomyces polymorphus* dan *Saccharomyces melis* (Fardiaz, 1992). Pada penelitian Ridawati *et al.*, (2010), dilakukan isolasi pada yeast osmofilik dari makanan Indonesia dengan konsentrasi gula tinggi. Jenis yeast yang diidentifikasi yaitu *Candida metapsilosis*, *Candida etchelsii*, *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* dan *Sterigmatomyces halophilus*. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan, untuk perkembangan jenis atau strain yeast yang unggul, mampu meningkatkan hasil produksi bioetanol dan meningkatkan efisiensi waktu produksi. Maka dari itu, pada penelitian ini dilakukan isolasi yeast osmofilik asal tetes tebu, karakterisasi morfologi dan fisiologi dan identifikasi secara molekuler, sehingga diperoleh yeast osmofilik yang berpotensi tahan terhadap tekanan osmotik tinggi dan menghasilkan kadar bioetanol yang lebih tinggi dalam produksi bioetanol.

## 1.2 Rumusan Masalah

Yeast adalah mikroorganisme eukariota golongan fungi yang berbentuk uniseluler, bermanfaat dalam proses fermentasi pada industri produksi etanol menggunakan substrat seperti tetes tebu. Contoh yeast tersebut, seperti *Saccharomyces cerevisae*. Pada industri, konsentrasi gula dalam substrat yang umum digunakan yaitu 16-18%, dan jika lebih tinggi dari 18% akan menyebabkan tekanan osmotik yang mengurangi efisiensi proses fermentasi. Sebelumnya, telah banyak dilakukan penelitian tentang yeast penghasil bioetanol, sehingga pada penelitian ini dilakukan isolasi spesies atau strain yeast osmofilik asal tetes tebu yang tahan terhadap tekanan osmotik tinggi dari tetes tebu dengan brix 14°, 24°, 34°, dan melakukan karakterisasi morfologi, fisiologi dan identifikasi molekuler. Maka dari itu, rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu apakah spesies atau strain yeast osmofilik asal dari tetes tebu yang berhasil diisolasi, dikarakterisasi secara morfologi dan fisiologi serta diidentifikasi secara molekuler?

### 1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah penelitian ini yaitu:

1. Isolasi dan identifikasi yeast osmofilik asal tetes tebu, yang berasal dari PG Jatiroto tahun giling 2015.
2. Isolasi dilakukan pada media Malt Extract Agar (MEA).
3. Karakterisasi yeast osmofilik secara morfologi meliputi pengamatan makroskopis dan mikroskopis.
4. Karakterisasi yeast osmofilik secara fisiologi meliputi uji suhu pertumbuhan, pH pertumbuhan, ketahanan pada tetes tebu brix 14°, 24° dan 34°, kemampuan produksi alkohol cawan conway dan pola fermentasi pada Kit API 20C Aux.
5. Identifikasi yeast osmofilik secara molekuler dilakukan dengan amplifikasi PCR menggunakan primer ITS 1 dan ITS 4, dan sekuensing DNA.

### 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini yaitu:

1. Mengisolasi yeast osmofilik yang memiliki ketahanan tinggi terhadap tekanan osmotik dari tetes tebu.
2. Mengkarakterisasi secara morfologi dan fisiologi isolat yeast osmofilik asal tetes tebu.
3. Mengidentifikasi secara molekuler isolat yeast osmofilik asal tetes tebu.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini yaitu untuk mengetahui jenis atau strain yeast osmofilik asal tetes tebu dengan karakterisasi morfologi, fisiologi dan identifikasi molekuler. Yeast yang diperoleh diharapkan dapat diaplikasikan pada produksi bioetanol dengan kadar brix tetes tebu yang tinggi atau lebih dari 14°.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Bioetanol

Bioetanol adalah sumber energi alternatif yang melalui proses fermentasi bahan-bahan alami oleh mikroorganisme, bermanfaat sebagai alternatif pengganti BBM (Jeon, 2007). Fermentasi adalah reaksi dengan menggunakan mikroorganisme sebagai biokatalis seperti bakteri, yeast atau jamur untuk mengubah bahan baku menjadi suatu produk (Riadi, 2007). Produksi alkohol dengan cara fermentasi dapat diproduksi dengan 3 macam jenis karbohidrat yaitu bahan yang mengandung gula, seperti gula tebu, gula bit, molasses, dan bermacam sari buah-buahan; bahan yang mengandung pati, seperti jagung, gandum, ubi kayu, padi-padian, barley; dan bahan yang mengandung selulosa, seperti kayu, cairan buangan pabrik *pulp* dan kertas (Harahap, 2003).

Reaksi yang terjadi pada proses produksi etanol dibagi menjadi dua tahap, tahap pertama yaitu pemecahan komponen polisakarida menjadi komponen monosakarida yang dilakukan secara enzimatis maupun kimiawi. Proses pemecahan tahap pertama yaitu :

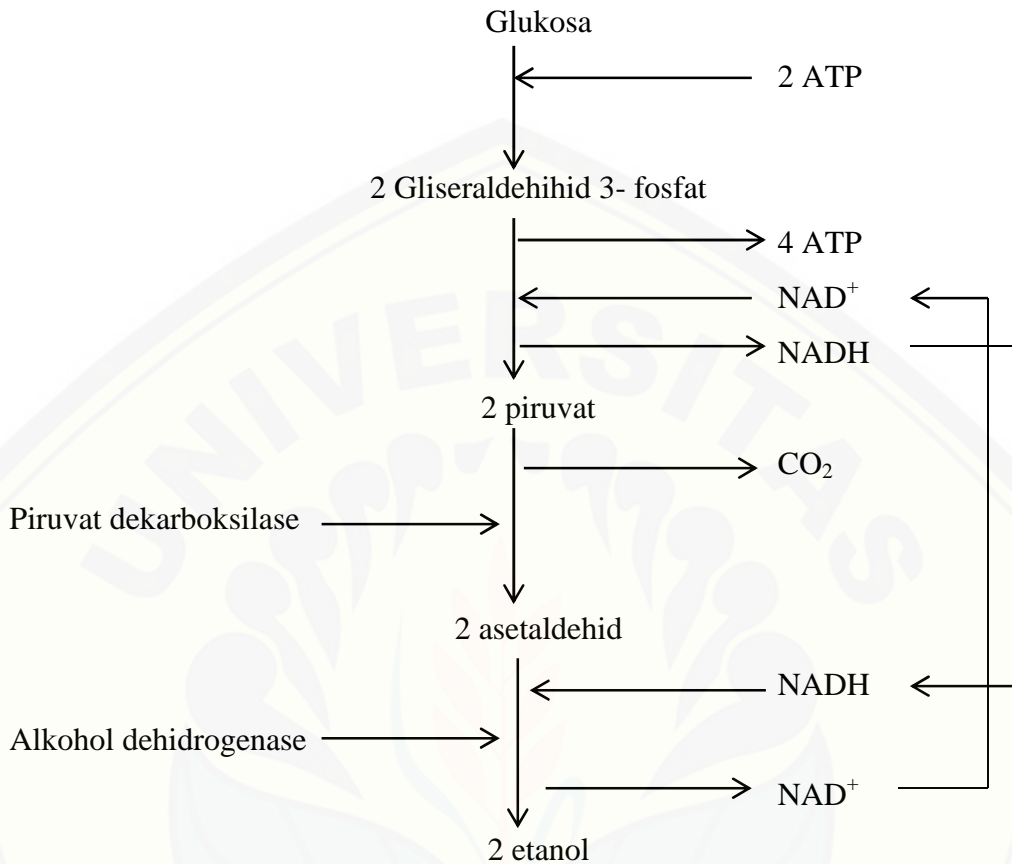


Tahap kedua, yaitu pengubahan komponen monomer glukosa menjadi etanol yang dilakukan dengan bantuan mikrob. Mikrob pengubah monomer glukosa menjadi etanol yang paling efektif adalah jenis yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Proses pemecahan tahap kedua yaitu :



Secara biokimia, proses pembentukan etanol didahului dengan proses glikolisis yaitu proses perubahan satu molekul glukosa menjadi dua molekul piruvat. Selanjutnya, pada keadaan tanpa oksigen maka proses siklus Krebs akan terhenti, sehingga piruvat tidak lagi masuk ke dalam siklus Krebs, tetapi dialihkan pemakaiannya untuk diubah menjadi etanol (Wirahadikusumah, 1985). Yeast memproduksi etanol dan  $\text{CO}_2$  melalui dua reaksi yaitu dekarboksilasi piruvat menjadi asetaldehid dan  $\text{CO}_2$  dengan katalis piruvat dekarboksilase dan reduksi

asetaldehid menjadi etanol oleh NADH dengan dikatalisis oleh alkohol dehidrogenase (Voet *et al.*, 2006).



Gambar 2.1 Proses konversi glukosa menjadi etanol (Voet *et al.*, 2006).

Bioetanol dari gula merupakan hasil aktivitas fermentasi sel yeast. Yeast yang baik digunakan untuk menghasilkan bioetanol yaitu dari genus *Saccharomyces*. *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan enzim zimase dan invertase. Enzim zimase berfungsi sebagai pemecah sukrosa menjadi monosakarida (glukosa dan fruktosa). Selanjutnya, enzim invertase mengubah glukosa menjadi bioetanol. Pada pembuatan bioetanol dengan bahan baku pati dan serat, dibutuhkan proses hidrolisis untuk memecah komponen polisakarida menjadi glukosa, yang kemudian akan dikonversi oleh *Saccharomyces cerevisiae* menjadi etanol melalui proses fermentasi (Judoamidjojo *et al.*, 1992). *Saccharomyces cerevisiae* merupakan jenis yeast yang sering digunakan dalam proses fermentasi, karena jenis ini mempunyai beberapa keunggulan yaitu mampu

berproduksi tinggi, toleran dengan konsentrasi etanol yang cukup tinggi (12-18% v/v), tahan terhadap kadar gula yang tinggi dan tetap aktif melakukan fermentasi pada suhu 4-32°C (Gaur, 2006).

## 2.2 Tetes Tebu

Pada umumnya molasses digunakan sebagai media untuk produksi alkohol secara komersial pada industri fermentasi alkohol karena molasses mudah didapatkan secara luas, murah dan sebagai bahan baku yang berkualitas. Pada industri, konsentrasi gula dalam substrat yang umum digunakan yaitu 16-18%. Jika konsentrasi gula lebih tinggi dari 18% akan menyebabkan tekanan osmotik, yang mengurangi efisiensi proses fermentasi (Gaur, 2006). Molasses berupa cairan kental seperti sirup dan berwarna coklat gelap atau coklat kemerahan bersifat asam, mempunyai pH 5,5-6,5, yang disebabkan oleh adanya asam-asam organik bebas (Harahap, 2003). Tetes tebu sebagai salah satu hasil samping pabrik gula tebu, memiliki nilai ekonomi yang cukup tinggi dengan kandungan gula tinggi sekitar 52% (Baikow, 1982). Karakteristik dari tetes adalah memiliki berat jenis: 1,39-1,49; pH: 6,0; viskositas sangat bervariasi, tergantung perbedaan temperatur dan kepekatan (Brix) yaitu 90-95 °Brix; panas spesifik: 0,5 cal/kg/°C, berwarna coklat kemerahan, kadar gula antara 40-50% (Paturau, 1969). Pada Tabel 2.1 menyajikan komposisi kimia tetes tebu.

Tabel 2.1. Komposisi Kimia Tetes Tebu

Unsur	Kisaran(%)
Air	17-25
Sukrosa	30-40
Dextrosa(glukosa)	4-9
Laevulosa (fruktosa)	5-12
Bahan Pereduksi Lain	1-5
Karbohidrat Lain	2-5
Abu	7-15
Unsur Nitrogen	2-6
Unsur bukan Nitrogen	2-8
Lilin, Sterol, Fosfolipid	0.1-1
Kalsium	-
Fosforus	-

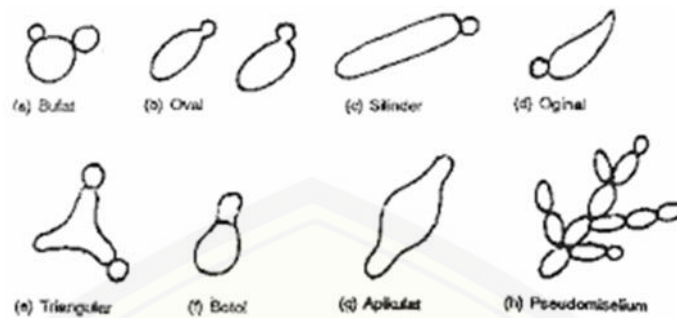
Sumber: Hidayat *et al.*, 2006

### 2.3 Yeast

Yeast merupakan mikroorganisme golongan fungi yang berbentuk uniseluler yang memiliki daya tahan yang tinggi oleh adanya antibiotik, memiliki sifat antimikroba, serta memiliki ketahanan terhadap garam, asam dan gula (Roostita, 1993). Menurut Fardiaz (1992), ditinjau dari mikroorganismenya, mikroorganisme yang hidup pada konsentrasi gula tinggi termasuk mikrob osmofilik. Hampir semua yeast yang bersifat osmofilik termasuk dalam jenis *Sacharomyces*, yaitu *Sacharomyces rouxii*, *Sacharomyces rouxiivar*, *Sacharomyces polymorphus* dan *Sacharomyces nelis*. Pada penelitian Ridawati *et al.*, (2010), dilakukan isolasi pada yeast osmofilik dari makanan Indonesia dengan konsentrasi gula tinggi. Jenis yeast yang diidentifikasi yaitu *Candida metapsilosis*, *Candida etchelsii*, *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* dan *Sterigmatomyces halophilus*.

#### 2.3.1 Karakteristik Morfologi Yeast

Yeast adalah fungi uniseluler yang bersifat mikroskopik. Sel yeast mempunyai ukuran yang bervariasi, yaitu dengan panjang 1-20  $\mu\text{m}$ , dan lebar 1-10  $\mu\text{m}$ . Bentuk sel yeast bermacam-macam (Gambar 2.2) yaitu bulat, oval, silinder atau batang, oginal, segitiga melengkung, berbentuk botol, bentuk apikulat atau lemon, membentuk pseudomiselium dan sebagainya (Fardiaz, 1992).



Gambar 2.2 Bentuk Sel Yeast

(<http://repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/25748/4/Chapter%20II.pdf>)

Sel vegetatif yang berbentuk apikulat atau lemon misalnya *Hanseniaspora* dan *Kloeckera*, berbentuk ogival misalnya *Brettanomyces*, berbentuk bulat misalnya *Debaryomyces*, berbentuk oval misalnya *Saccharomyces*, dan berbentuk triangular misalnya *Trygonopsis* (Fardiaz, 1992).

Ukuran dan bentuk sel yeast dapat berbeda, yang disebabkan oleh pengaruh umur sel dan kondisi lingkungan selama pertumbuhan. Sel yang muda berbeda bentuk dari yang tua, karena adanya proses ontogeni, yaitu perkembangan individu sel. Contoh, yeast yang berbentuk apikulat (lemon) pada umumnya berasal dari tunas berbentuk bulat sampai oval yang terlepas dari induknya, kemudian tumbuh dan membentuk tunas sendiri, karena proses pertunasannya bersifat bipolar, sel muda yang berbentuk oval, membentuk tunas pada kedua ujungnya sehingga mempunyai bentuk seperti lemon. Sel-sel yang sudah tua dan telah mengalami pertunasan beberapa kali, dapat memiliki bentuk yang berbeda-beda, seperti pada Gambar 2.3 (Fardiaz, 1992).





Gambar 2.3 Perkembangan bentuk sel yeast berbentuk lemon (*Hanseniaspora*) (<http://repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/25748/4/Chapter%20II.pdf>).

### 2.3.2 Karakteristik Fisiologi Yeast

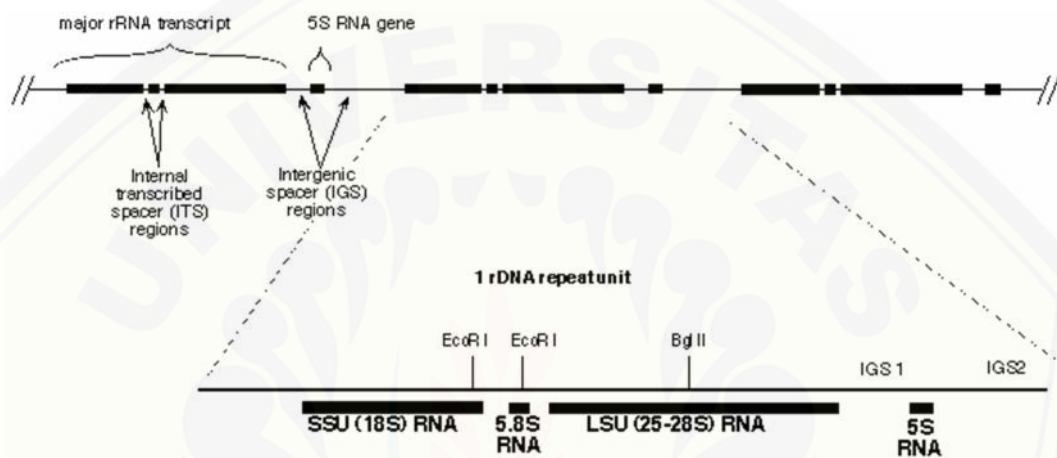
Suhu optimal untuk yeast yaitu antara 25-30°C dan suhu maksimal antara 35-47°C. Beberapa jenis yeast dapat hidup pada suhu 0°C (Fardiaz, 1988). Pertumbuhan yeast optimal pada pH 4,0-4,5 (Fardiaz, 1992). Yeast tumbuh pada kondisi dengan persediaan air cukup, karena dapat tumbuh pada media dengan konsentrasi solut (gula atau garam) lebih tinggi daripada bakteri, sehingga yeast memiliki kebutuhan air lebih kecil untuk pertumbuhan dibandingkan kebanyakan bakteri (Fardiaz, 1992). Jenis yeast tertentu mempunyai persyaratan  $a_w$  (aktivitas air) yang rendah yaitu tergolong dalam osmofilik. Interval  $a_w$  untuk pertumbuhan secara normal adalah 0,89-0,94, sedangkan untuk yeast osmofilik antara 0,62-0,65 (Rahayu, 1989).

Yeast dapat tumbuh dalam larutan yang pekat, seperti dalam larutan gula, garam, dan asam yang berlebih. Yeast memiliki sifat-sifat yang tahan terhadap stress lingkungan (gula, garam, dan asam berlebih). Kadar gula yang tinggi akan menghasilkan tekanan osmotis yang tinggi. Beberapa jenis kapang dan yeast toleran terhadap tekanan osmotis tinggi, sedangkan bakteri kurang toleran (Weiser, 1962). Tekanan osmosis yang tinggi menyebabkan air dari dalam sel yeast keluar ke larutan gula, sehingga sel kekurangan air, terhambat pertumbuhannya, atau bahkan mengalami plasmolisis (Dhamayanti *et al.*, 2002).

### 2.3.3 Karakteristik Molekuler Yeast

Perbandingan sequence pada daerah gen penyandi ribosomal RNA (rRNA) atau ribosomal DNA (rDNA), dapat digunakan sebagai karakter untuk identifikasi

molekular suatu organisme, karena mempunyai daerah sequence yang terkonservasi maupun variabel (Kurtzman & Fell, 2006). Daerah *small sub unit* (SSU) (18S), *internal transcribed spacer* (ITS), 5,8S, *large sub unit* (LSU) (28S), 5S, dan *intergenic spacer* (IGS) tersusun sebagai satu unit gen penyandi ribosomal RNA pada genom eukariota (Gambar 1.4). Daerah yang digunakan untuk identifikasi yeast sampai tingkat spesies adalah daerah ITS dan D1/D2 gen LSU (Kurtzman & Blanz, 1998).



Gambar 2.4. Unit gen penyandi ribosomal RNA pada mikroorganisme eukariota (<http://sites.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.html>).

Daerah LSU, 5S, 5,8S, dan SSU merupakan daerah *coding*, sedangkan daerah ITS dan IGS merupakan daerah *non coding* (Katsu *et al.*, 2003). Daerah D1/D2 adalah daerah sepanjang 600 nukleotida dari ujung 5' gen LSU rRNA (James & Stratford, 2003). Sequence D1/D2 LSU yang identik dapat ditemukan pada beberapa spesies yang berkerabat dekat, sehingga analisis daerah D1/D2 LSU tidak dapat digunakan untuk membedakan spesies-spesies tersebut (Fell *et al.*, 2000). Daerah ITS terdiri atas ITS1 dan ITS2 yang mengapit gen 5,8S pada yeast memiliki ukuran 300-900 bp (Fujita *et al.*, 2001). Variasi sequence yang lebih tinggi pada daerah D1/D2 LSU, dimiliki oleh daerah ITS karena termasuk daerah *noncoding* yang mempunyai laju mutasi lebih tinggi dari daerah *coding* (SSU dan LSU) (James *et al.*, 1996), sehingga analisis sequence daerah ITS dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies-spesies yang berkerabat dekat (Ciardo *et al.*, 2006; Esteve *et al.*, 1999).

### 2.3.4 Taksonomi Yeast

Yeast merupakan organisme eukariota uniselular yang secara taksonomi termasuk dalam kingdom Eumycota. Spesies-spesies yeast dapat ditemukan dalam filum Ascomycota maupun Basidiomycota (Boekhout & Phaff, 2003). Filum Ascomycota, terdiri dari 3 kelas yaitu Archiascomycetes, Euascomycetes dan Hemiascomycetes berdasarkan analisis sequence daerah gen rRNA (Kurtzman & Sugiyama, 2001). Kelas Archiascomycetes terdiri atas ordo Pneumocystidales, Neolectales, Schizosaccharomycetales, Protomycetales, Taphrinales dan genus *Saitoella*. Kelas Euascomycetes terdiri dari genus *Endomyces* dan *Oosporidium* (Boekhout & Phaff, 2003). Kelas Hemiascomycetes terdiri dari ordo Saccharomycetales yang mempunyai 11 famili, yaitu Candidaceae, Metschnikowiaceae, dan Saccharomycetaceae (Kurtzman & Blanz, 1998).

Filum Basidiomycota terdiri atas tiga kelas yaitu Hymenomyces, Urediniomyces, dan Ustilaginomyces berdasarkan sequence daerah D1/D2 gen LSU rRNA. Kelas Hymenomyces terdiri dari 4 clade yaitu Tremellales, Trichosporonales, Filobasidiales dan Cystofilobasidiales. Kelas Ustilaginomyces terdiri dari 3 clade yaitu Exobasidiomycetidae, Ustilaginomycetidae dan Malasseziales. Kelas Urediniomyces terdiri dari 4 clade yaitu Agaricostilbum, Microbotryum, Sporidiobolous dan Erythrobasidium (Fell *et al.*, 2000).

## 2.4 Isolasi dan Identifikasi Yeast

Isolasi merupakan cara untuk memisahkan atau memindahkan mikroba tertentu dari lingkungannya, sehingga diperoleh kultur murni atau biakan murni. (Waluyo, 2008). Identifikasi adalah membandingkan isolat yang belum diketahui dengan taksa yang sudah ada untuk menetapkan identitasnya (Barnett *et al.*, 2000).

### 2.4.1 Identifikasi Konvensional

Metode konvensional dapat digunakan untuk identifikasi yeast yaitu berdasarkan morfologinya, tetapi memiliki kelemahan karena morfologi yeast yang sederhana, sehingga hanya sedikit karakter morfologi yang dapat digunakan untuk identifikasi (Geiser, 2004). Karakter morfologi tidak dapat digunakan untuk

membedakan yeast sampai pada tingkat spesies (Price *et al.*, 1978). Karakter makroskopik yang diamati yaitu profil, warna, tepi koloni pada medium padat (Kirsop *et al.*, 1984), keberadaan endapan (sediment), pelikel (*pellicle*), cincin (ring), dan pulau-pulau (islets) pada medium cair (Yarrow, 1998). Karakter mikroskopik yang digunakan untuk identifikasi yeast yaitu bentuk sel, ukuran sel, tipe pertunasan, keberadaan miselium palsu atau sejati, dan tipe reproduksi seksual atau aseksual (Yarrow, 1998).

Identifikasi yeast secara konvensional juga dapat menggunakan beberapa uji fisiologi dan biokimia, karena umumnya spesies yeast dapat dibedakan berdasarkan karakter fisiologi dan biokimia (Ciardo *et al.*, 2006). Uji fisiologi dan biokimia yang digunakan untuk identifikasi yeast, yaitu kemampuan memfermentasi beberapa jenis gula, kemampuan mengasimilasi beberapa jenis karbon dan nitrogen, kebutuhan vitamin, pertumbuhan pada suhu tertentu, ketahanan terhadap antibiotik sikloheksimida dan uji urease (Barnett *et al.*, 2000).

Identifikasi konvensional berdasarkan morfologi, fisiologi maupun biokimia memiliki kelemahan yaitu memerlukan waktu pengerjaan yang lama dan dapat menimbulkan kesalahan identifikasi terutama pada spesies yang berkerabat dekat (Geiser, 2004). Dengan demikian, muncul kebutuhan untuk mengidentifikasi yeast dengan mudah, cepat dan akurat, sehingga dikembangkan metode identifikasi secara molekular untuk mengatasi kelemahan identifikasi konvensional (Fell *et al.*, 2000).

#### 2.4.2 Identifikasi Molekuler

Identifikasi berdasarkan karakter molekular dapat digunakan untuk mengidentifikasi yeast sampai tingkat spesies (Van *et al.*, 2003). Teknik molekular yang digunakan untuk mengidentifikasi suatu fungi, yaitu metode PCR dan analisis sequence DNA (Guarro *et al.*, 1999). Metode identifikasi yeast secara molekular yang umum digunakan dan akurat untuk mengidentifikasi sampai tingkat spesies adalah metode sequencing DNA (Kurtzman & Fell, 2006). Sequence DNA yang dihasilkan digunakan untuk identifikasi dengan melakukan pencarian homologi sequence pada database nukleotida internasional (Hall, 2004). Tahap pertama yang dilakukan pada metode sequencing DNA yaitu isolasi DNA

genom, untuk mendapatkan DNA murni tanpa tercampur komponen sel lain, seperti protein dan karbohidrat. Tahap utama pada isolasi DNA yeast yaitu penghancuran dinding sel yeast (Lohr, 1998). Proses ini dapat dilakukan dengan metode mekanik dan lisis (Kurtzman, 1998). Metode mekanik untuk menghancurkan dinding sel yeast yaitu penggunaan sonikasi, mortar (*grinding*) (Kurtzman, 1998) dan boiling (Sjamsuridzal & Oetari, 2003).

Tahap kedua yaitu pengukuran kuantitas dan kualitas DNA menggunakan spektrofotometer. Sampel yang mengandung DNA dan RNA memiliki absorbansi maksimal pada panjang gelombang 260 nm, dan sampel yang mengandung protein memiliki absorbansi maksimal pada panjang gelombang 280 nm. Kuantitas DNA dalam suatu sampel, dihitung berdasarkan nilai absorbansi pada panjang gelombang tersebut. Kualitas DNA atau tingkat kemurnian DNA dalam suatu sampel diukur berdasarkan perbandingan nilai absorbansi antara DNA dan protein. Nilai perbandingan antara absorbansi DNA dan protein dalam suatu sampel, yang menunjukkan kualitas DNA yang baik adalah 1,8-2,0 (Seidman & Moore, 2000).

Tahap ketiga yaitu amplifikasi daerah ITS dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Prinsip dasar metode PCR yaitu amplifikasi suatu fragmen DNA spesifik menggunakan enzim DNA polimerase dan dua macam fragmen nukleotida sintetik (primer) yang telah diketahui. Satu siklus dalam metode PCR terdiri atas tiga tahap utama yaitu *denaturation*, *annealing* dan *extension* yang memiliki suhu spesifik yang berbeda (Palumbi, 1996). Komponen-komponen yang diperlukan pada proses PCR yaitu templat DNA; sepasang primer; dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates); buffer PCR; magnesium klorida ( $MgCl_2$ ) dan enzim polimerase DNA (Newton & Graham, 1994). Selanjutnya, fragmen DNA berukuran 100 bp - 3kb dapat divisualisasikan dengan baik menggunakan elektroforesis gel agarosa 2%. Komponen-komponen elektroforesis yang digunakan untuk membandingkan ukuran panjang basa pada fragmen DNA sampel, yaitu gel agarosa, buffer, pewarna etidium bromida (EtBr), sampel DNA, loading dye dan DNA ladder. Pemendaran yang dihasilkan oleh pewarna EtBr dapat dilihat menggunakan sinar UV (Sambrook & Russell, 2001).

Selanjutnya, tahap sequencing DNA yang diawali oleh proses *cycle sequencing* yaitu proses amplifikasi dengan metode PCR untuk mendapatkan DNA untai tunggal sebagai cetakan (template) untuk proses sequencing (Sambrook & Russell, 2001). Dua macam metode sequencing yang awalnya dikembangkan adalah metode Maxam Gilbert dan metode Sanger. Metode automated DNA sequencing merupakan pengembangan dari metode Sanger. Metode tersebut menggunakan dideoksinukleotida trifosfat (ddNTPs), yang berfungsi menghentikan polimerisasi saat melekat pada ujung 3' untai DNA. Pewarna pada ddNTP dapat dideteksi oleh sensor pada mesin sequencer. Penggunaan metode tersebut akan melakukan pembacaan urutan DNA dengan mesin dan terdokumentasikan secara otomatis pada komputer (Klug & Cummings, 2003). Data sequence berupa *text file* untuk mencari identitas suatu isolat dengan mencari homologi sequence spesies terdekatnya pada data sequence dalam database (Hall, 2004). Data sequence juga untuk melihat hubungan kekerabatan berdasarkan rekonstruksi pohon filogeni (Li & Graur, 1991). Pencarian homologi sequence dapat menggunakan program BLASTn (Altschul *et al.*, 1990). Alamat situs database sequence DNA yang dapat diakses untuk pencarian homologi sequence dengan program BLAST, seperti <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Hall, 2004).

## BAB 3 METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium CDAST (*Center for Develepment of Advanced Sciences and Technology*) Universitas Jember. Waktu pelaksanaan penelitian dimulai bulan Januari sampai Desember 2016.

### 3.2 Alat dan Bahan

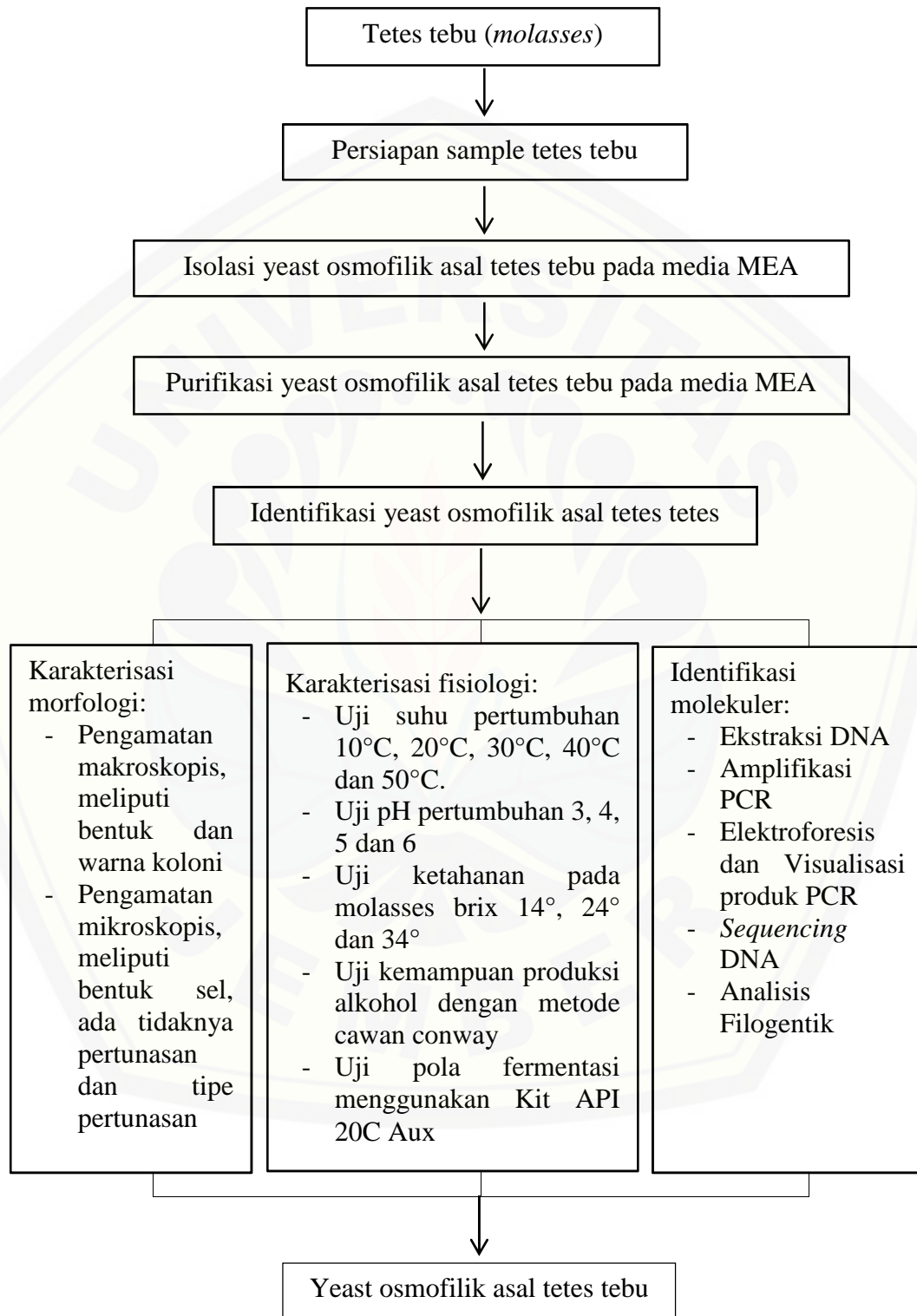
Alat utama yang digunakan dalam penelitian ini meliputi autoklaf, oven, *Laminar Air Flow*, refraktometer brix, mikroskop DM Leica 2500, mesin PCR mix, spektrofotometer, sentrifuge, alat elektroforesis, pH meter, timbangan analitik, vortex, oven, *hot plate*, dan kulkas. Alat pendukung yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *deck glass*, *cover glass*, *microtube*, mikropipet, mikrotip, cawan petri, erlenmeyer, gelas ukur, gelas beaker, labu ukur, tabung ulir, tabung reaksi, cawan conway, *comb well*, lampu bunsen, ose kolong, jarum suntik, timbangan analitik dan pipet tetes.

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini meliputi tetes tebu pekat yang diperoleh dari PG Jatiroto tahun giling 2015. Bahan pendukung yang digunakan dalam penelitian ini meliputi Malt Extract Broth, Bacteriological Agar, *crystal violet*, mordan, minyak imersi, NaCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, kit API 20C Aux, Presto™ Mini gDNA Yeast Kit (GBY100), KAPA Taq Extra HotStart Kit, primer *foward* ITS 1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'), primer *reverse* ITS 4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), Zymo DNA Clean & Concentration™-5 Kit (D4003), gel agarose, buffer TAE, EtBr (*ethidium bromide*), DNA Ladder 100 bp (*DNA marker*), ddH<sub>2</sub>O, alkohol 96%, alkohol 70%, akuades, spirtus, kapas, alumunium foil dan tissue.

### 3.3 Tahap Penelitian

Tahap penelitian yang dilakukan meliputi persiapan sampel tetes tebu; isolasi dan purifikasi yeast osmofilik asal tetes tebu; dan identifikasi yeast osmofilik asal tetes tebu yang meliputi karakterisasi morfologi, karakterisasi

fisiologi dan identifikasi molekuler. Tahap penelitian yang dilakukan seperti yang terlihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Diagram Alir Penelitian



### 3.2.1 Persiapan Tetes Tebu

Tetes tebu berasal dari Pabrik Gula Jatiroto dari musim giling tahun 2015, yang disimpan pada suhu 27°C (suhu ruang) dalam wadah dirigen. Pada tahap persiapan, tetes tebu diukur menggunakan refraktometer. Tetes tebu yang digunakan yaitu tetes tebu dengan brix 14°, 24° dan 34°. Tetes tebu brix 34°, diukur dengan menuang 200 ml tetes tebu pekat ke gelas ukur dan diencerkan dengan 350 ml akuades. Tetes tebu brix 24°, diukur dengan menuang 200 ml tetes tebu pekat ke gelas ukur dan diencerkan dengan 555 ml akuades. Tetes tebu brix 14°, diukur dengan menuang 200 ml tetes tebu pekat ke gelas ukur dan diencerkan dengan 935 ml akuades.

### 3.2.2 Isolasi dan Purifikasi Yeast Osmofilik asal Tetes Tebu

Tahap isolasi dilakukan menggunakan metode sebar (*spread*), yaitu 1 ml tetes tebu pekat, disebar diatas permukaan media MEA padat. Selanjutnya, masing-masing *plate* diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam atau sampai terdapat yeast yang tumbuh pada permukaan media. Setelah 48 jam, dilakukan tahap purifikasi pada yeast yang tumbuh dari masing-masing *plate*. Purifikasi dilakukan dengan mengambil koloni tunggal yeast yang berbeda, sebanyak 1 ose koloni yeast digoreskan pada media MEA padat menggunakan metode gores (*streak*). Selanjutnya, diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Setiap yeast yang tumbuh, dipurifikasi kembali pada media MEA padat miring dalam tabung reaksi, sebagai kultur simpan dan kultur kerja. Tahap purifikasi dilakukan dengan mengambil 1 ose koloni tunggal, digores pada media MEA miring secara zig-zag dari permukaan bawah sampai permukaan atas media, diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam, dan disimpan dalam lemari pendingin.

### 3.2.3 Karakterisasi Morfologi Yeast Osmofilik asal Tetes Tebu

Tahap karakterisasi morfologi yeast yang dilakukan, meliputi pengamatan karakter makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis dilakukan secara langsung pada koloni yeast yang tampak dan tumbuh pada media MEA padat, meliputi bentuk dan warna koloni yeast. Pengamatan mikroskopis dilakukan untuk mengetahui karakter morfologi, meliputi bentuk sel, ada tidaknya *budding* dan tipe *budding*. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan mengamati

preparat basah yeast. Preparat basah dibuat dengan memfiksasi sel yeast pada *object glass*, diberi zat warna *crystal violet*, dan dilakukan pengecatan kembali dengan mordan. Tahap akhir, dilakukan pengamatan dibawah mikroskop perbesaran 1000x dengan penambahan minyak imersi dan ditutup dengan *cover glass*.

### 3.2.3 Karakterisasi Fisiologi Yeast Osmofilik asal Tetes Tebu

Tahap karakterisasi fisiologis yeast yang dilakukan meliputi uji suhu dan pH pertumbuhan, uji ketahanan pada tetes tebu brix 14°, 24° dan 34°, uji kemampuan produksi alkohol metode cawan conway, dan uji pola fermentasi dengan Kit API 20C.

#### a) Uji suhu pertumbuhan yeast

Uji ini dilakukan dengan mengambil 0,03 ml kultur yeast dari 3 ml MEB umur 48 jam, kemudian diinokulasikan pada 1 ml media MEB steril. Selanjutnya, setiap kultur yeast diinkubasi pada berbagai suhu yaitu 10°C, 20°C, 30°C, 40°C dan 50°C selama 48 jam. Pengamatan pertumbuhan yeast pada setiap suhu, dilakukan dengan mengambil 1 ml kultur yeast dan dimasukkan kedalam kuvet untuk diukur menggunakan spektrofotometer dengan OD 600 nm pada waktu inkubasi 12 jam, 24 jam, 36 jam dan 48 jam. Hasilnya berupa nilai absorbansi yang digunakan untuk membuat kurva pertumbuhan masing-masing isolat yeast.

#### b) Uji pH pertumbuhan yeast

Uji ini dilakukan dengan mengambil 0,03 ml kultur yeast dari 3 ml MEB umur 48 jam, kemudian diinokulasikan pada 1 ml media MEB steril dengan pH yang telah diukur yaitu pH 3, 4, 5, 6. Selanjutnya, kultur yeast diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Pengamatan pertumbuhan yeast pada setiap pH media MEB, dilakukan dengan mengambil 1 ml kultur yeast dan dimasukkan kedalam kuvet untuk diukur menggunakan spektrofotometer dengan OD 600 nm pada waktu inkubasi 12 jam, 24 jam, 36 jam dan 48 jam. Hasilnya berupa nilai absorbansi yang digunakan untuk membuat kurva pertumbuhan masing-masing isolat yeast.

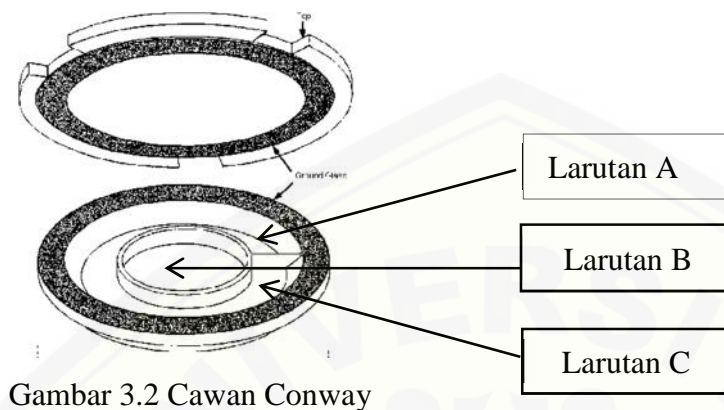
c) Uji ketahanan tumbuh pada tetes tebu brix 14°, 24° dan 34°

Uji ini dilakukan dengan mengambil 0,03 ml kultur kerja yeast dalam 3 ml MEB umur 48 jam, kemudian diinokulasikan pada 3 ml tetes tebu steril dengan brix 14°, 24° dan 34, dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam dan 48 jam. Uji ketahanan tumbuh dilakukan dengan metode *spread plate*. Pada kontrol, kultur yeast dalam 3 ml MEB umur 48 jam, diinokulasikan pada 3 ml garam fisiologis. Selanjutnya, kultur yeast diambil sebanyak 1 ml dan diencerkan pada 9 ml larutan garam fisiologi pada seri pengenceran  $10^{-1}$  sampai  $10^{-7}$ . Pada uji ketahanan tumbuh yeast osmofilik, kultur yeast dalam 3 ml MEB umur 48 jam diambil sebanyak 0,03 ml dan diinokulasikan pada tetes tebu brix 14°, 24° dan 34°. Kultur yeast diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam dan 48 jam. Kultur yeast umur 24 jam dan 48 jam, diambil sebanyak 1 ml dan diinokulasikan pada 9 ml larutan garam fisiologi. Tahap pengenceran dilakukan dari seri  $10^{-1}$  sampai  $10^{-7}$ . Pengenceran seri  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  dan  $10^{-7}$  pada kontrol dan perlakuan, diambil masing-masing sebanyak 1 ml, disebar pada media MEA padat dan diinkubasi 30°C selama 48 jam. Koloni yeast yang tumbuh pada tiap *plate*, dihitung jumlah koloninya dan dibandingkan dengan kontrol (Log CFU/ml).

d) Uji kemampuan produksi alkohol

Kemampuan produksi alkohol dilakukan dengan mengukur kadar, yang dilakukan dengan proses fermentasi. Kadar alkohol diukur menggunakan metode cawan conway. Pada uji kemampuan produksi alkohol digunakan 3 jenis larutan yaitu larutan A, B dan C. Larutan A terdiri dari 10 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  yang dilarutkan dalam 50 ml akuades ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  jenuh). Larutan B terdiri dari 0,76 g  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  yang dilarutkan dalam 30 ml akuades 30, ditambahkan 56 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dan diencerkan dengan akuadest sampai volume 100 ml. Larutan C sampel yaitu kultur yeast dalam tetes tebu brix 14°, 24° dan 34° dengan waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam. Larutan C standart yaitu 0,1 ml alkohol 96% yang diencerkan dengan akuades sampai volume 10 ml. Larutan B sebanyak 2 ml dimasukan pada bagian tengah cawan conway, larutan A sebanyak 1 ml pada bagian luar larutan B, dan larutan C sebanyak 1 ml pada bagian luar lainnya, seperti pada Gambar 3.2. Pada keadaan

cawan tertutup, larutan A direaksikan dengan larutan C dan inkubasi suhu 27°C selama 2 jam.



Gambar 3.2 Cawan Conway

Pengamatan kemampuan produksi alkohol, dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Pengamatan secara kualitatif, dilakukan dengan pengamatan perubahan warna pada larutan B. Hasil reaksi dari larutan A dan C yaitu alkohol yang menguap dan ditangkap oleh larutan B, yang menyebabkan perubahan warna larutan B dari warna kuning menjadi hijau kebiruan. Selanjutnya, pengamatan secara kuantitatif dilakukan dengan mengukur jumlah alkohol yang dihasilkan oleh setiap yeast menggunakan spektrofotometer. Larutan B diukur nilai absorbansinya dengan OD 605 nm. Nilai absorbansi setiap larutan B dibandingkan dengan pembuatan kurva larutan standart. Standart digunakan yaitu alkohol dengan volume 0  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 150  $\mu\text{l}$  dengan absorbansi yang telah diketahui. Persamaan garis yang digunakan pada kurva standart yaitu  $y = ax + b$ , nilai  $y$  adalah nilai absorbansi dan nilai  $x$  adalah jumlah alkohol.

e) Uji Pola Fermentasi dengan Kit API 20C Aux

Uji ini dilakukan menggunakan Kit API 20C Aux. Kit ini berupa strip plastik sekali pakai yang terdiri dari 20 sumuran, sumuran pertama sebagai kontrol negatif (O), sumuran kedua sebagai kontrol positif berisi glucose (GLU), dan 18 sumuran lainnya berisi substrat gula yang berbeda yaitu glycerol (GLY), calcium 2-keto-gluconate (2KG), arabinose (ARA), xylose (XYL), adonitol (ADO), xylitol (XLT), galactose (GAL), inositol (INO), sorbitol (SOR), methyl-

D-glucopyranoside (MDG), N-Acetyl-Glucosamine (NAG), cellobiose (CEL), lactose (LAC), maltose (MAL), saccharose (SAC), trehalose (TRE), melezitose (MLZ) dan raffinose (RAF), yang akan diasimilasi oleh mikroorganisme uji.

Uji fermentasi dilakukan dengan mengambil 1-2 ose isolat yeast dari kultur stok, digoreskan pada media MEA padat dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Selanjutnya, diambil 1-2 ose koloni tunggal dari masing-masing isolat yeast dan disuspensikan pada 2 ml larutan garam fisiologi. Suspensi tersebut dihomogenkan menggunakan vortex, kemudian diambil sebanyak 100 µl dan diinokulasikan pada API C medium. Suspensi tersebut dihomogenkan dan diambil secukupnya menggunakan pipet tetes, untuk diinokulasikan pada strip Kit API 20C Aux. Suspensi yeast yang ditetaskan pada setiap sumuran, diharuskan sampai tetesan sedikit menggelembung. Selanjutnya strip diletakkan pada *incubation box* dan ditutup dengan penutup box. Strip yang telah diinokulasi dengan isolat yeast, diinkubasi pada suhu 30°C selama 72 jam. Pengamatan pola fermentasi dilakukan pada waktu inkubasi 48 jam dan 72 jam, berdasarkan pada keruh atau tidak keruhnya substrat gula. Jika media menjadi keruh, berarti reaksi positif dan jika media tidak keruh berarti reaksi negatif. Hasil reaksi positif dan negatif ditulis pada *sheet result*. Hasil reaksi akan diakumulasikan dan diperoleh biokode sebanyak 7 digit. Kode tersebut akan dibandingkan dengan buku identifikasi atau dimasukkan pada *apiweb*<sup>TM</sup> untuk mengidentifikasi kemungkinan jenis isolat yeast tersebut.

### 3.3.6 Identifikasi Molekuler Yeast Osmofilik asal Tetes Tebu

Identifikasi molekuler yeast osmofilik yang dilakukan meliputi, ekstraksi DNA, amplifikasi PCR, *sequencing* daerah ITS dan analisis filogenetik. Tahap ekstraksi DNA dilakukan untuk mendapatkan ekstrak DNA atau DNA *template*. Tahap ekstraksi dilakukan menggunakan kit komersial merupakan metode gabungan antara metode lisis dan mekanik, yaitu Presto<sup>TM</sup> Mini gDNA Yeast Kit (GBY100). Proses ekstraksi yang dilakukan meliputi tahap pemanenan sel, *lysis*, *removal* protein, DNA *precipitation* dan DNA *rehydration*. Pada tahap pemanenan, sel yeast dalam appendorf 1,5 ml disentrifugasi selama 10 menit pada 5000 x g. Supernatan dibuang dan pellet disuspensikan dengan 600 µl Sorbitol

buffer. Selanjutnya, ditambahkan 200 U lyticase atau zymolase dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Campuran tersebut disentrifugasi selama 10 menit pada 2000 x g dan dibuang supernatan untuk mendapatkan pellet. Pada tahap pemecahan sel atau *lysis*, pellet ditambahkan 300 µl Cell Lysis Buffer dan diresuspensi menggunakan pipet. Campuran tersebut, diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Pada campuran tersebut juga ditambahkan 5 µl RNase A, selanjutnya divortex dan inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit.

Tahap *protein removal*, campuran ditambahkan 100 µl Protein Removal buffer dan divortex selama 10 detik. Selanjutnya, disentrifugasi pada 14.000-16.000 x g selama 3 menit, sampai membentuk pellet yang putih dan panjang dan diinkubasi *on ice* 5 menit jika tidak terbentuk pellet yang putih dan panjang. Tahap presipitasi DNA, dilakukan dengan mengambil supernatan pada tahap *protein removal*. Supernatan dipindahkan pada appendorf 1,5 ml baru. Supernatan ditambahkan dengan 300 µl isopropanol dan dihomogenkan dengan inverting 20x. Campuran tersebut, disentrifugasi pada 14.000-16.000 x g selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pellet ditambahkan 300 µl ethanol 70% untuk mencuci pellet. Selanjutnya, disentrifugasi kembali pada 14-16.000 x g selama 3 menit. Supernatan dibuang dan pellet dikeringanginkan selama 10 menit. Tahap DNA Rehydration, pellet ditambahkan 100 µl DNA Hydration buffer atau ddH<sub>2</sub>O, kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit untuk melarutkan DNA pellet.

Hasil dari ekstraksi DNA berupa ekstrak DNA dilakukan pengukuran kuantitas dan kualitas DNA. Ekstrak DNA sebanyak 30 µl diukur kuantitas menggunakan Nanodrop Genomic DNA. Hasil dari pengukuran kuantitas DNA yaitu konsentrasi DNA, nilai absorbansi DNA pada panjang gelombang 260 nm, protein pada panjang gelombang 280 dan RNA pada panjang gelombang 230. Nilai perbandingan antara DNA dan protein ( $A_{260/280}$ ) akan menunjukkan kualitas atau tingkat kemurnian DNA. Nilai perbandingan absorbansi antara DNA dan protein, yang menunjukkan kualitas DNA yang baik adalah 1,8-2,0 (Seidman & Moore, 2000).

Amplifikasi PCR dilakukan dengan menggunakan KAPA Taq Extra HotStart Kit, primer *forward* ITS 1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') dan primer *reverse* ITS 4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3) (White *et al.*, 1990). Komponen PCR disiapkan dalam 25  $\mu$ l volume total, seperti pada Lampiran J, terdiri dari DNA template, ddH<sub>2</sub>O, 5x KAPA Taq Extra Buffer, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTP Mix, 10 pmol/ $\mu$ l Primer ITS 1, 10 pmol/ $\mu$ l Primer ITS 4 dan 5 U/ $\mu$ l KAPA Taq Extra DNA Polymerase. Proses PCR terdiri dari 35 siklus seperti pada Lampiran J, yaitu pre-denaturasi pada 95°C selama 3 menit, denaturasi pada 95°C selama 30 detik, *annealing* pada 52°C selama 30 detik, *extention* pada 72°C selama 45 detik dan *hold* suhu 4°C.

Produk PCR dielektroforesis menggunakan 1% gel *agarose*. Gel *agarose* terdiri dari 0,5 g bubuk *agarose*, yang ditambahkan dengan 50  $\mu$ l TAE dan 3  $\mu$ l Ethidium Bromida (EtBr). Gel *agarose* 1% dituang pada wadah dan sisiran gel, ditunggu sampai gel padat. Tahap elektroforesis dilakukan dengan mencampurkan 1  $\mu$ l *loading dye* dengan 5  $\mu$ l sampel DNA, dihomogenkan menggunakan mikropipet dengan cara dihisap dan dikeluarkan beberapa kali, dan campuran dimasukkan ke dalam sumuran yang terdapat dalam gel. Selanjutnya, penentuan panjang fragmen daerah ITS dilakukan dengan mencampurkan 1  $\mu$ l *loading dye* dengan DNA Ladder 100 bp (DNA *marker*) sebanyak 1  $\mu$ l, dimasukkan pada sumuran pertama. Proses elektroforesis menggunakan mesin elektroforesis dengan tegangan listrik 100 V selama 30 menit, dan gel diposisikan terendam dengan TAE 1x. Tahap visualisasi dilakukan dengan mengamati gel dibawah sinar UV menggunakan *Chemidoc Gel System* (Biorad), yang didokumentasikan menggunakan program Gel Doc XR.

Produk PCR yang telah dielektroforesis dan divisualisasi, dipurifikasi menggunakan kit purifikasi untuk memperoleh DNA murni tanpa kontaminan seperti RNA atau protein. Kit purifikasi yang digunakan yaitu DNA Clean & Concentrator<sup>TM</sup>-5 (D4003). DNA sampel sebanyak 100  $\mu$ l dalam appendorf 1,5 ml, ditambahkan 500  $\mu$ l DNA Binding buffer dan dihomogenkan dengan vortex. Campuran tersebut dipindahkan ke kolom Zymo-Spin<sup>TM</sup> dalam *collection tubes* dan disentrifugasi 10.000-16.000 x g selama 30 detik. Campuran tersebut

ditambahkan 200  $\mu$ l DNA Wash Buffer ke kolom dan disentrifugasi kembali 10.000-16.000 x g selama 30 detik. Selanjutnya, ditambahkan 6  $\mu$ l DNA Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.1 mM EDTA) pada kolom dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. Campuran dipindahkan ke eppendorf 1,5 ml dan disentrifugasi 10.000-16.000 x g selama 30 detik, sehingga diperoleh DNA murni yang siap untuk digunakan.

*Sequencing* DNA dilakukan secara *bi-directional sequencing*. Komponen-komponen yang digunakan yaitu sampel DNA, primer ITS 1 dan ITS 4. Tahapan yang dilakukan meliputi *cycle sequencing* dan *sequencing* yang dilakukan di Divisi Laboratorium Genetika, PT. Genetika Science Indonesia, Jakarta. Hasil tahap *sequencing* berupa data *sequence* yang terdiri dari urutan basa-basa yang dilakukan oleh program *sequence assembly*. Data *sequence* dapat digunakan untuk mencari identitas suatu isolat dengan cara mencari homologi *sequence* spesies terdekatnya pada data *sequence* dalam database (Li & Gaur, 1991). Pencarian homologi *sequence* menggunakan program BLAST, dapat dilakukan dengan mengakses alamat situs database seperti <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Hall, 2004). Hasil pencarian homologi data *sequence* pada database menghasilkan identifikasi berdasarkan persentase homologi (% identities) yang tertinggi antara *sequence* isolat dengan *sequence* spesies terdekatnya, sehingga diperoleh identitas isolat yeast dan hubungan kekerabatannya dengan spesies lainnya. Hubungan kekerabatan isolat dilakukan dengan analisis filogenetik dilakukan dengan membuat pohon filogenetik menggunakan metode *neigh-joining* (NJ) (Saitou and Nei, 1987).



## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan dapat ditarik kesimpulan bahwa:

1. Terdapat 2 isolat yeast yaitu isolat A dan B yang berhasil diisolasi dari tetes tebu dengan kadar brix pekat ( $>14^{\circ}$  brix).
2. Karakteristik morfologi isolat A dan B yaitu isolat A dan B memiliki bentuk koloni bulat dan warna koloni putih; isolat A memiliki bentuk sel bulat dan pertunasan tipe multilateral; sedangkan isolat B memiliki bentuk sel silinder dan pertunasan tipe multilateral.
3. Karakteristik fisiologi isolat A yaitu optimal tumbuh pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  dan pH 5; memiliki kemampuan tumbuh pada substrat tetes tebu brix  $14^{\circ}$ ,  $24^{\circ}$  dan  $34^{\circ}$ ; memproduksi alkohol tertinggi pada substrat tetes tebu brix  $34^{\circ}$  selama 48 jam; dan mampu memfermentasi glukosa, gliserol, kalsium-2-keto-glukonat, arabinosa, adonitol, galaktosa, inositol, sorbitol, methyl-D-glukopiranosida, N-asetil-glukosamin, cellobiosa, maltosa, sakarosa, trehalosa, melezitosa, raffinosa; sedangkan isolat B optimal tumbuh pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  dan pH 5; memiliki kemampuan tumbuh pada substrat tetes tebu brix  $14^{\circ}$ ,  $24^{\circ}$  dan  $34^{\circ}$ ; memproduksi alkohol tertinggi pada tetes tebu brix  $34^{\circ}$  selama 48 jam; dan mampu memfermentasi glukosa, gliserol, kalsium-2-keto-glukonat, arabinosa, xylosa, adonitol, xylitol, galaktosa, sorbitol, methyl-D-glukopiranosida, N-asetil-glukosamin, cellobiosa, maltosa, sakarosa, trehalosa, raffinosa.
4. Identifikasi molekuler menunjukkan, isolat A adalah *Candida parapsilosis* ZA012 (100%) dengan pencarian homologi sekuen dalam *database*.

### 5.2 Saran

Untuk mengidentifikasi jenis atau strain yeast, perlu dilakukan karakteristik morfologi dan fisiologi serta identifikasi molekuler, sehingga yeast teridentifikasi secara akurat dan tidak menimbulkan kesalahan identifikasi dengan spesies terdekatnya.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W and Lipman, D.J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Amrutkar, S.M., Banoth, L., Banerjee, U.C. 2013. One-pot synthesis of (R)-1-(1-naphthyl) ethanol by stereoinversion using *Candida parapsilosis*. *Tetrahedron Letters* 54: 3274–3277.
- Astawan, M dan Mita, W. 1991. *Teknologi Pengolahan Nabati Tepat Guna*. Bogor: CV Akademika Presindo.
- Baikow. 1982. *Manufacturing and Refining of Raw Cane Sugar*. NewYork: Elsevier.
- Barnett, J.A., Payne, R.W and Yarrow, D. 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification* 3rd edition. Cambridge University Press: Cambridge.
- Boekhout, T., Phaff, H.J. 2003. *Yeast Biodiversity*. In : Boekhout, T. and Robert, V. 2003. *Yeasts In Food: Beneficial and Detrimental Aspects*. CRC Press, Boca Raton: 1-38.
- Ciardo, D.E., Schar, G., Bottger, E.C., Altwegg, M., Bosshard, P.P. 2006. Internal Transcribed Spacer Sequencing Versus Biochemical Profiling For Identification Of Medically Important Yeasts. *Journal of Clinical Microbiology* 44(1): 77-84.
- Dhamayanti, R., Suranto., Setyaningrum, R. 2002. Keragaman Jenis Kapang pada Manisan Buah Salak (*Salacca edulis* Reinw.). *Biodiversitas* 3(2): 220-224.
- Dmytruk, K.V and Sibirny, A. A . 2012. *Candida famata (Candida flareri)*. *Yeast* 29: 453–458. Wiley Online Library.DOI: 10.1002/yea.2929
- Esteve, Z.B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. 1999. Identification Of Yeasts By RFLP Analysis Of The 5.8S Rrna Gene and The Two Ribosomal Internal Transcribed Spacers. *International Journal Of Systematic Bacteriology* 49: 329-337.
- Fardiaz, S. 1988. *Fisiologi Fermentasi*. Bogor : PAU Pangan dan Gizi IPB.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G and Statzell, T.A. 2000. Biodiversity and Systematic of Basidiomycetous Yeasts As Determined By Large Subunit rDNA D1/D2 Domain Sequence Analysis. *Journal System Evolution Microbiol* 50:1351-1371.

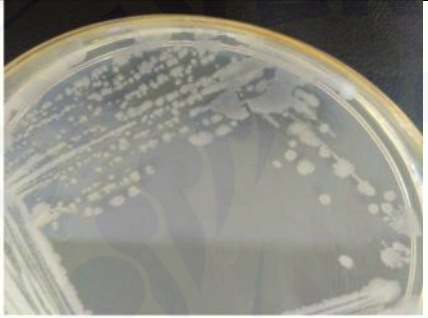
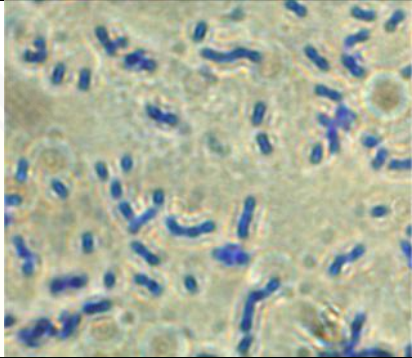
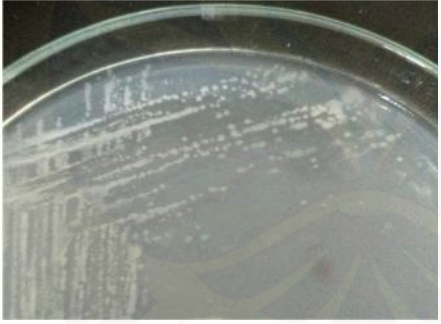
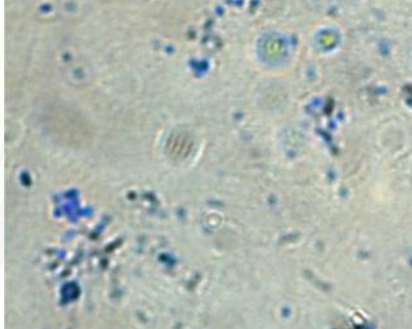
- Fujita, S., Senda, Y., Nakaguchi, S and Hashimoto, T. 2001. Multiplex PCR Using Internal Transcribed Spacer 1 and 2 Regions For Rapid Detection and Identification Of Yeast Strains. *Journal of clinical microbiology* 39 (10): 3617-3622.
- Gaur K. 2006. Process Optimatization For The Production Of Ethanol Via Fermentation. *Dissertation*. Deemed University: Patiala, Punjab, India.
- Geiser, D.M. 2004. Practical *Fungal Species Recognition Using Molecular Phylogenetics*. In : Watanabe, M.M., Suzuki, K and Seki, T. 2004. *Innovative Roles Of Biological Resource Centers: Proceedings Of The Tenth International Congress For Cultures Collections Tsukuba*. Japan Society for Culture Collections and World Federation for Culture Collections, Tsukuba: 89-92.
- Guarro, J., Gene, J and Stchigel, A.M. 1999. Developments In Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (3): 454-500.
- Hall, B.G. 2004. *Phylogenetic Trees Made Easy: A How To Manual 2nd Edition*. Sinauer Associates, Inc., Massachusets: xiii + 221 hlm.
- Harahap, H. 2003. *Karya Ilmiah Produksi Alkohol*. USU Library.
- Hidayat, N., Padaga, M.C., Suhartini, S. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta: Andi Offset.
- James, S.A and Stratford, M. 2003. Spoilage Yeasts With Emphasis on The Genus *Zygosaccharomyces*. In : Boekhout, T and Robert, V. 2003. *Yeasts In Food: Beneficial and Detrimental Aspects*. CRC Press, Boca Raton: 171-192.
- James, S.A., Collins, M.D and Roberts, I.N. 1996. Use of An Rrna Internal Transcribed Spacer Region to Distinguish Phylogenetically Closely Related Species of The Genera *Zygosaccharomyces* And *Torulaspota*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46 (1): 189-194.
- Jeon, B.Y. 2007. Development of A Serial Bioreactor System for Direct Ethanol Production From Starch Using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 12: 566- 573.
- Judoamidjojo, M., Darwis, A.A dan Sa'id, E.G. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Edisi 1. Jakarta: Rajawali Press.
- Katsu, M., Kidd, A., Ando, A., Moretti, B.M.L., Mikami, Y., Nishimura, K. and Meyer, W. 2003. The Internal Transcribed Spacers and 5.8S Rrna Gene Show Extensive Diversity Among Isolates of The *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *FEMS Yeast Research* 1608: 1-12.

- Kirsop, B., Paintin, K and Henry, J. 1984. *Yeast Identification*. In: *Yeasts: Their Identification, Preservation and Use In Biotechnology*. Bangkok: 10-106.
- Klug, W.S and Cummings, M.R. 2003. *Concepts of Genetics*. 7th ed. Prentice Hall Pearson Education Inc., Upper Saddle River:
- Kurtzman, C.P. 1998. *Nuclear DNA hybridization: Quantitation of close genetic relationships*. In: Kurtzman, C. P. & J. W. Fell. (eds.). 1998. *The yeasts: A taxonomic study*. 4rd ed. Elsevier, Amsterdam: 63-68
- Kurtzman, C.P. & P.A. Blanz. 1998. *Ribosomal RNA/DNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships*. In : Kurtzman, C.P. & J.W. Fell. (eds.). 1998. *The yeasts: A taxonomic study*. 4rd ed. Elsevier, Amsterdam: 69-74.
- Kurtzman, C.P and Sugiyama, J. 2001. *Ascomycetous Yeasts and Yeastlike Taxa*. In: McLaughlin, D.J., McLaughlin, E.G and Lemke, P.A. 2001. *The Mycota VII Part A: Systematics and Evolution*. SpringerVerlag, Berlin: 179-200.
- Kurtzman, C.P and Fell, J.W. 2006. *Yeast Systematics and Phylogeny-Implications of Molecular Identification Methods for Studies In Ecology*. In: Rosa, C.A. & Peter, G. (eds.). 2006. *The yeast handbook: Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer-Verlag Springer-Verlag, Berlin: 11-30.
- Kreger-van Rij, N. J. W. 1987. *The Yeast: A Taxonomic Study*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher.
- Li, W. H and Graur, D. 1991. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland: xv + 284 hlm.
- Lohr, D. 1988. *Isolation Of Yeast Nuclei and Chromatin for Studies of Transcription-Related Processes*. In: Campbell, J and Duffus, J. H. 1988. *Yeast: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford: 125-145.
- Newton, C.R and Graham, A. 1994. *PCR*. UK: Bios Scientific Publisher.
- Obasi, B.C., Whong, C.M.Z., Ado, S.A and Abdullahi, I.O. 2014. Isolation and Identification Of Yeast Associated With Fermented Orange Juice. *The International Journal of Engineering and Science (IJES)* Vol 3 (9): 64-69.
- Ogba, O.M., Abia-Bassey, L.N., Epoke, J., Mandor, B.I., Iwatt, G.D. 2013. Characterization of Candida Species Isolated from Cases of Lower Respiratory Tract Infection among HIV/AIDS Patients in Calabar, Nigeria. *World Journal of AIDS* 3: 201-206
- Palumbi, S.R. 1996. *Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction*. In : Hillis, D.M., Moritz, C and Marble, B.K. 1996. *Molecular Systematics 2nd edition*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland: 205-247.

- Paturau, J.M. 1969. *By-Products of The Cane Sugar Industry, An Introduction To Their Industrial Utilization*. Elsevier Publishing : New York.
- Prescott, S.C and Dunn, G. 1981. *Industrial Microbiology*. Mc Graw Hill Book Co. Ltd, New York.
- Price, C. W., Fuson, G.B and Phaff, J. 1978. Genome Comparison In Yeasts Systematics: Delimitation of Species Within The Genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces* and *Pichia*. *Microbiological Reviews* 42 (1): 161-193.
- Rahayu, K. dan S. Sudarmadji. 1989. *Mikrobiologi Pangan*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada: Yogyakarta.
- Riadi, L. 2007. *Teknologi Fermentasi*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Ridawati., Jenie, B.S.L., Djuwita, I., Sjamsuridzal, W. 2010. Genetic Diversity of Osmophilic Yeasts Isolated from Indonesian Foods with High Concentration of Sugar. *Microbiology* Vol 4 (3): 113-118. ISSN 1978-3477.
- Rodrigues, J., Perrier, V., Lecomte, J., Dubreucq, E., Ferreira-Dias, S. 2016. Biodiesel Production from Crude Jatropha Oil Catalyzed by Immobilized Lipase/Acyltransferase from *Candida parapsilosis* in Aqueous Medium. *Bioresource Technology* 218: 1224-1229.
- Roostita, R. 1993. Occurrence, Growth and Biochemical Properties of Yeasts in Cheeses and Milk. *Thesis*. The University of New South Wales, Australia.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology Evolution* 4: 406-25.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xxvii + 1.1-18.136 hlm.
- Santra, T., Ghosh, S. K and Chakravarty, A. 2014. Different Methods for DNA Extraction from Yeast-*Candida famata* Isolated from Toddy. *British Biotechnology Journal* 4(1): 64-73.
- Seidman, L.A. and Moore, C.J. 2000. *Basic Laboratory Methods for Biotechnology: Textbook and Laboratory Reference*. Prentice Hall, Upper Saddle River: vi + 751 hlm.
- Sjamsuridzal, W and Oetari, A. 2003. Rapid Preparation of Fungal and Bacterial Genomic DNA for PCR. *Hayati* 10:122-4.

- Supriyanto, Tri dan Wahyudi. 2011. Proses Produksi Etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* dengan Operasi Kontinyu pada Kondisi Vakum. *Skripsi*. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Van, D.V., H. Rahaoui., De Nus and Hartog, B.J. 2003. *PCR Methods for Tracing and Detection of Yeasts In The Food Chain*. In: Boekhout, T and Robert, V. 2003. *Yeasts In Food: Beneficial and Detrimental Aspects*. CRC Press, Boca Raton: 123-138.
- Voet, D., Voet, J. G., and Pratt, C. W. 2006. *Fundamental of Biochemistry*. New York: John Willey and Sons.
- Waluyo, Lud. 2008. *Mikrobiologi Umum*. Malang: UPT Penerbitan Universitas Muhammadiyah Malang.
- Weiser, H.H. 1962. *Practical Food Microbiology and Technology*. Ohio: The Avi Publishing Co. Inc.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics*. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. 1990. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press : 315-322.
- Wirahadikusumah. 1985. *Metabolisme Energi, Karbohidrat dan Lipid*. Bandung: ITB Press.
- Yarrow, D. 1998. *Methods For The Isolation, Maintenance and Identification of Yeasts*. In: Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. 1998. *The Yeasts: A Taxonomic Study 4rd Edition* . Amsterdam: Elsevier.

## LAMPIRAN A. KARAKTERISASI MORFOLOGI

Kode Isolat	Makroskopis		Mikroskopis	
	Karakteristik	Gambar	Karakteristik	Gambar
<b>A</b>	Bentuk koloni: bulat Warna koloni : putih keruh		Bentuk sel : bulat Tipe pertunasan : multilateral	
<b>B</b>	Bentuk koloni: bulat Warna koloni : putih keruh		Bentuk sel : silinder Tipe pertunasan: multilateral	

## LAMPIRAN B. KARAKTERISASI FISILOGI - UJI SUHU PERTUMBUHAN

Suhu	Nilai Absorbansi Isolat A					Nilai Absorbansi Isolat B				
	0 jam	12 jam	24 jam	36 jam	48 jam	0 jam	12 jam	24 jam	36 jam	48 jam
10°C	0,13	0,185	0,168	0,072	0,278	0,077	0,074	0,072	0,218	0,07
20°C	0,116	0,309	1,192	1,259	1,42	0,076	0,065	0,087	0,071	0,17
30°C	0,108	0,294	1,122	1,32	1,518	0,075	0,186	0,392	0,633	0,917
40°C	0,101	0,249	0,488	0,481	0,569	0,068	0,318	0,438	0,542	0,662
50°C	0,113	0,069	0,073	0,099	0,104	0,081	0,057	0,07	0,062	0,075

$$\text{Peningkatan Pertumbuhan (\%)} = \frac{\text{Nilai Abs } T(n) - \text{Nilai Abs } T(0)}{\text{Nilai Abs } T(0)} \times 100\%$$

Keterangan: T(n) = waktu inkubasi (12 jam, 24 jam, 36 jam atau 48 jam)

T(0) = waktu inkubasi 0 jam

Suhu	Peningkatan Pertumbuhan Isolat A (%)				Peningkatan Pertumbuhan Isolat B (%)			
	12 jam	24 jam	36 jam	48 jam	12 jam	24 jam	36 jam	48 jam
10°C	29,230	32,307	42,307	113,84	-3,896	-6,493	-7,792	-9,091
20°C	166,379	927,586	985,345	1124,14	-1,3158	-11,842	-19,736	123,684
30°C	172,222	938,889	1122,22	1305,56	148	422,667	744	1122,67
40°C	146,535	376,238	383,168	463,366	367,647	544,118	697,059	873,529
50°C	-38,938	-35,398	-12,389	-7,9646	-7,4074	-13,58	-23,456	-29,63



## LAMPIRAN C. KARAKTERISASI FISILOGI - UJI PH PERTUMBUHAN

pH	Nilai Absorbansi Isolat A					Nilai Absorbansi Isolat B				
	0 jam	12 jam	24 jam	36 jam	48 jam	0 jam	12 jam	24 jam	36 jam	48 jam
pH 3	0,132	0,355	0,88	0,71	1,21	0,073	0,05	0,97	0,34	0,688
pH 4	0,135	0,712	1,086	1,146	1,33	0,077	0,056	0,306	0,527	1,069
pH 5	0,12	0,707	1,16	1,245	1,362	0,069	0,229	0,346	1,005	0,839
pH 6	0,138	0,916	0,999	1,308	1,446	0,078	0,277	0,623	0,745	0,769

$$\text{Peningkatan Pertumbuhan (\%)} = \frac{\text{Nilai Abs } T(n) - \text{Nilai Abs } T(0)}{\text{Nilai Abs } T(0)} \times 100\%$$

Keterangan: T(n) = waktu inkubasi (12 jam, 24 jam, 36 jam atau 48 jam)




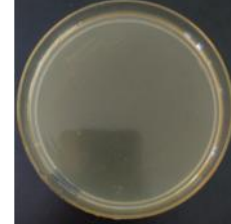


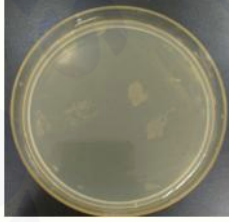
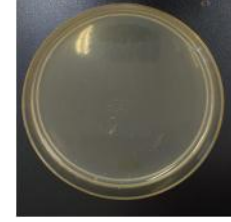


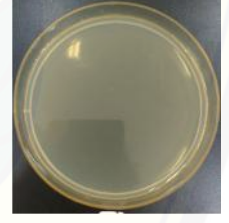



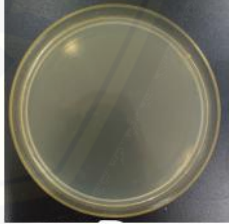
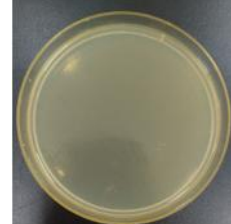
T(0) = waktu inkubasi 0 jam

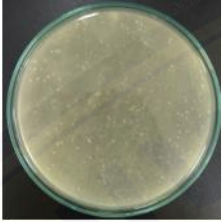

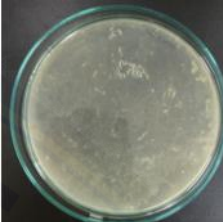
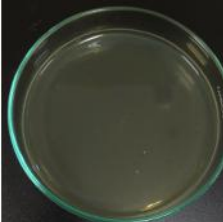
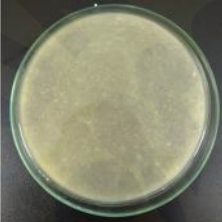
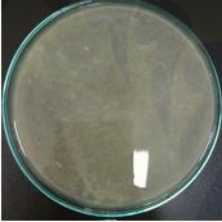
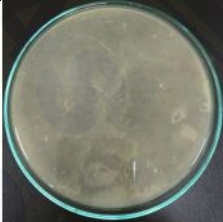
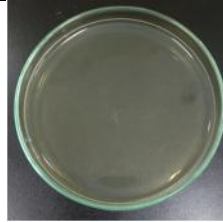
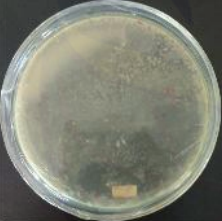
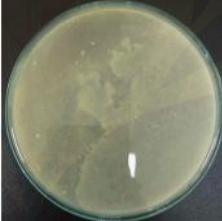
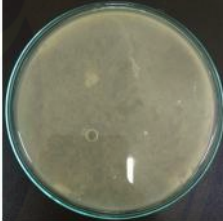
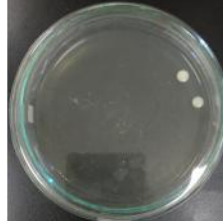
pH	Peningkatan Pertumbuhan Isolat A (%)				Peningkatan Pertumbuhan Isolat B (%)			
	12 jam	24 jam	36 jam	48 jam	12 jam	24 jam	36 jam	48 jam
pH 3	168,939	437,879	566,667	816,667	16,4384	365,753	842,466	1228,77
pH 4	427,407	704,444	748,889	885,185	11,6883	297,403	584,416	1288,31
pH 5	489,167	866,667	937,5	1035	231,884	401,449	1115,94	1356,52
pH 6	563,768	623,913	847,826	947,826	255,128	698,718	855,128	885,897

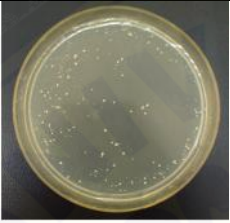
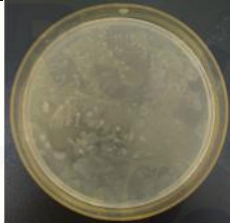


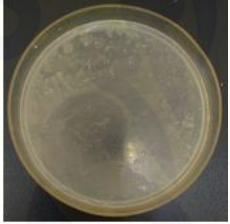


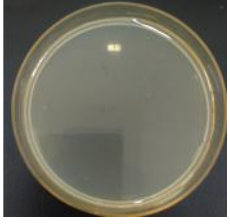


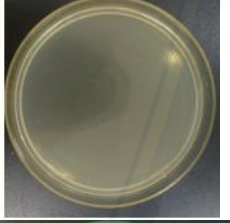


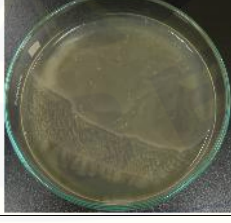


LAMPIRAN D. KARAKTERISASI FISILOGI - UJI KETAHANAN TETES TEBU BRIX 14°, 24° DAN 34°

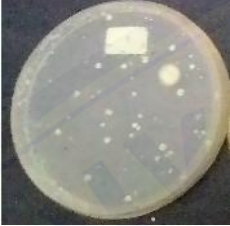
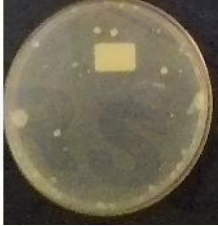

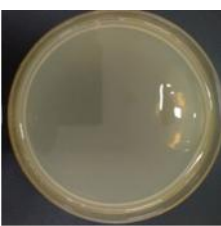
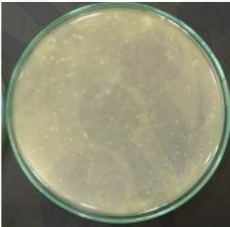
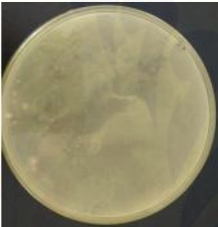
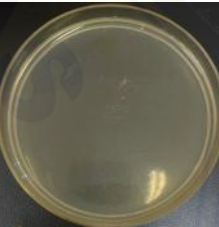

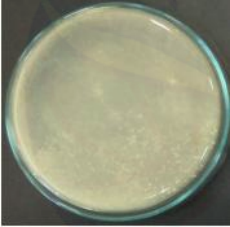


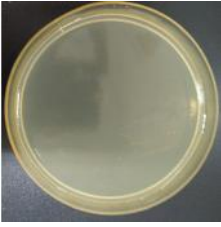
Kode Isolat	°Brix	Jumlah Koloni												Peningkatan Pertumbuhan(%)	
		0 jam				24 jam				48 jam				24 jam	48 jam
		10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>		
A	14°					123	31	0	0	TBUD	56	23	0	0,186	11,761
	24°	113	37	11	0	149	42	0	0	TBUD	72	15	0	1,710	12,444
	34°					183	51	0	0	TBUD	81	9	2	3,148	12,684
B	14°					130	44	0	0	69	22	0	0	0,416	-4,143
	24°	124	40	14	0	156	29	0	0	75	35	0	0	0,847	-3,212
	34°					175	31	0	0	93	29	0	0	1,604	-2,081

Jumlah Koloni	Perlakuan °Brix dan Waktu						
	0 jam	14°		24°		34°	
		24 jam	48 jam	24 jam	48 jam	24 jam	48 jam
Isolat A (CFU/ml)	1363636	1400000	7181818	1736364	7909091	2127273	8181818
	1,3×10 <sup>6</sup>	1,4×10 <sup>6</sup>	7,1×10 <sup>7</sup>	1,7×10 <sup>6</sup>	7,9×10 <sup>6</sup>	2,1×10 <sup>6</sup>	8,1×10 <sup>6</sup>
Log CFU/ml	6,1347	6,14613	6,856234	6,23964	6,89813	6,32782	6,91285
Isolat B CFU/ml	1490909	1581818	827273	1681818	1000000	1872727	1109091
	1,4×10 <sup>6</sup>	1,5×10 <sup>6</sup>	8,2×10 <sup>5</sup>	1,6×10 <sup>6</sup>	1×10 <sup>6</sup>	1,8×10 <sup>6</sup>	1,1×10 <sup>6</sup>
Log CFU/ml	6,17345	6,19916	5,91765	6,22578	6	6,27247	6,044967

Kode	Umur Isolat	Perlakuan Brix	Pengenceran			
			$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
A	0 jam	-				
	24 jam	14°				
		24°				
		34°				

48 jam	14°				
	24°				
	34°				

Kode	Umur Isolat	Perlakuan Brix	Pengenceran			
			$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
B	0 jam	-				
	24 jam	14°				
		24°				
		34°				

	48 jam	14°				
		24°				
		34°				

**LAMPIRAN E. KARAKTERISASI FISILOGI-UJI PRODUKSI ALKOHOL METODE CAWAN CONWAY**

Larutan Standart Alkohol	
Alkohol (%)	Absorbansi (y)
0	0,183
0,5	0,409
1,0	0,663
1,5	0,88

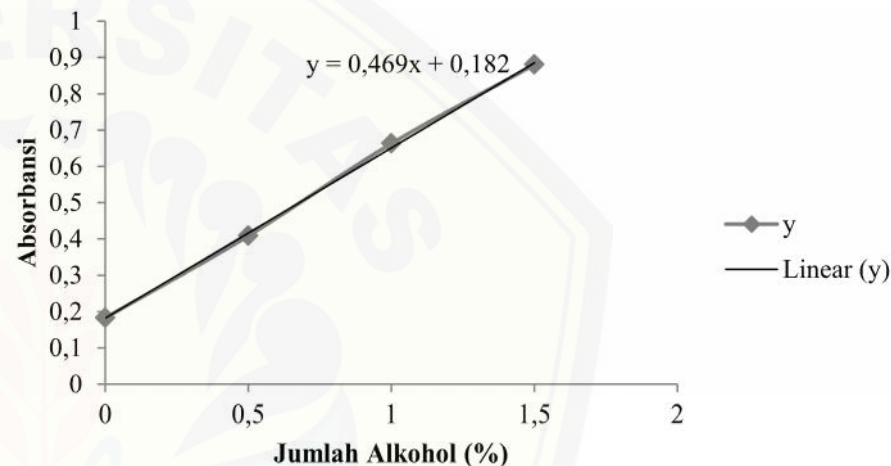
$$y = 0,469x + 0,182$$

$$x = \frac{y - 0,182}{0,469}$$

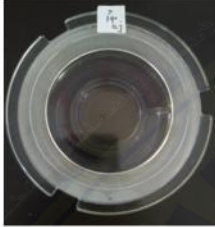

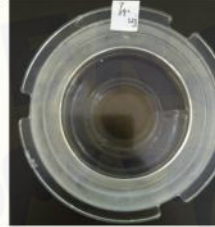
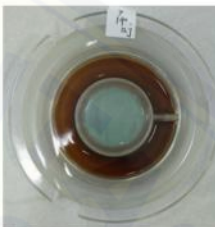
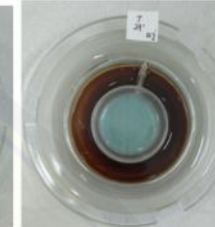
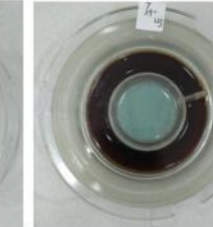
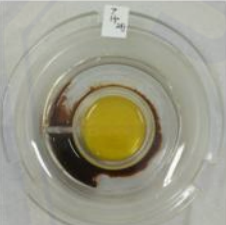
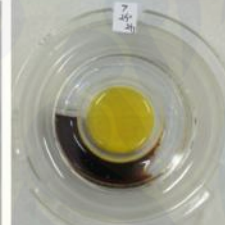
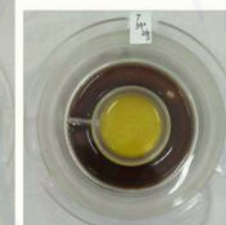
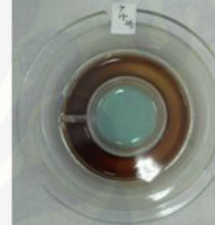
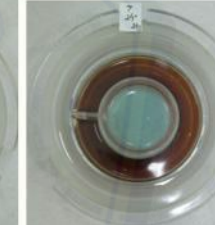
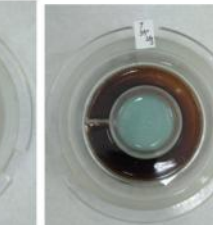
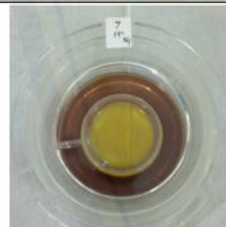
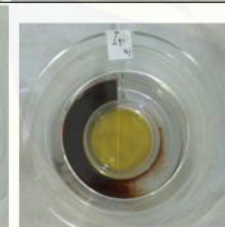
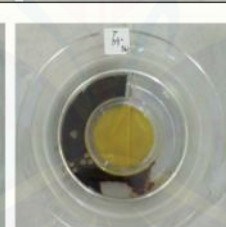
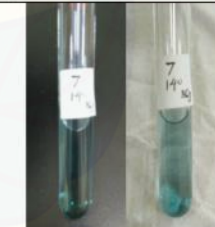
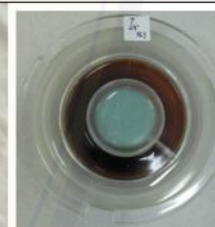
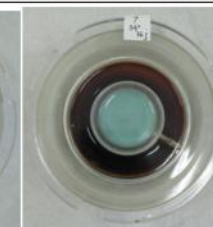
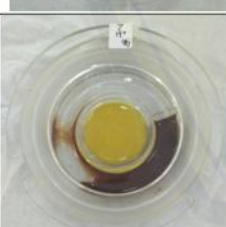
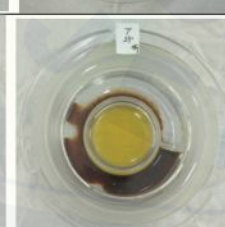
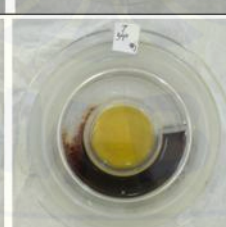
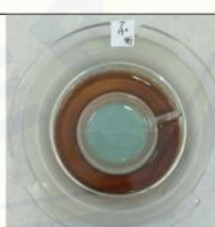
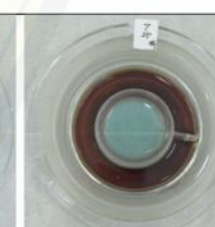
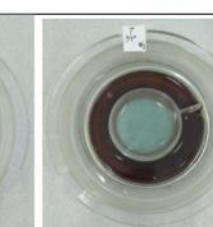
x = alkohol (%)

y = nilai absorbansi

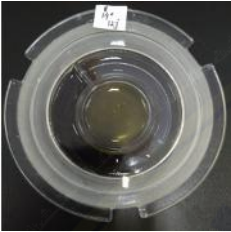
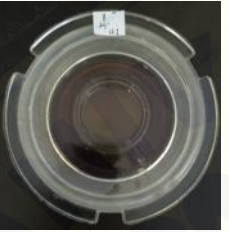
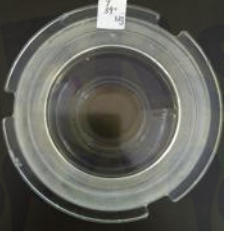
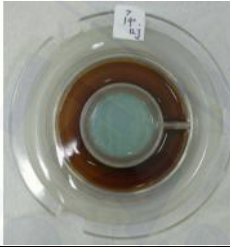
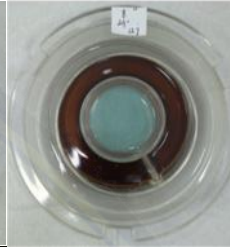
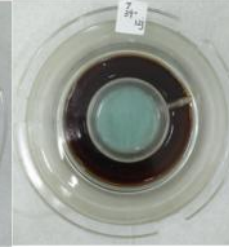
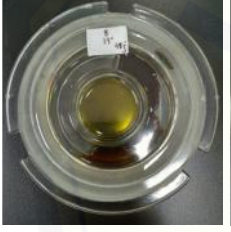
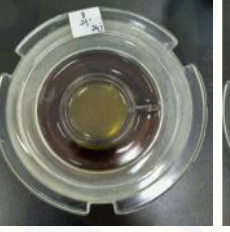
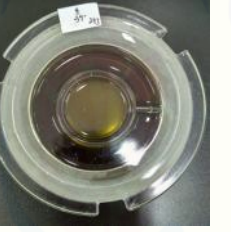

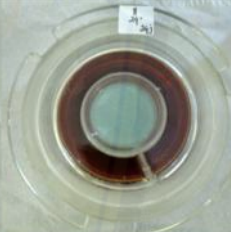
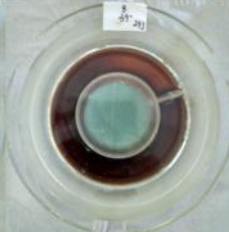
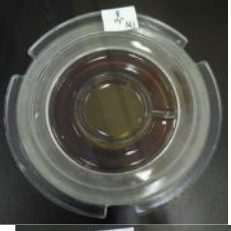
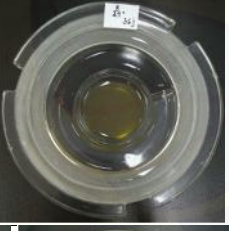
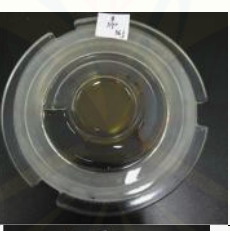


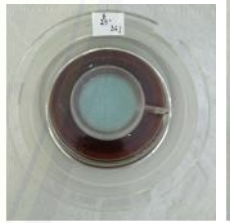
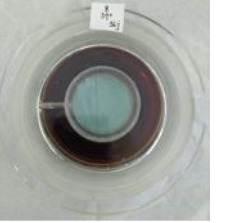
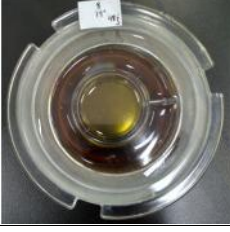
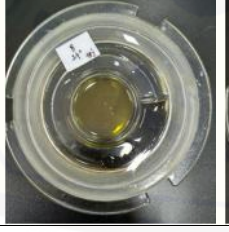
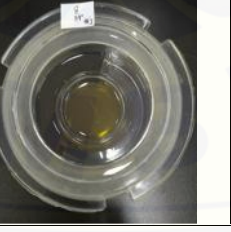
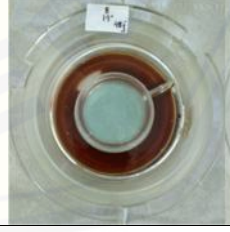
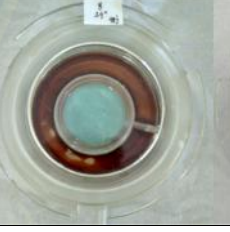
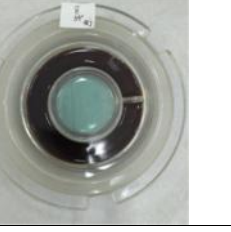
**Grafik Larutan Standart Alkohol**




Isolat	Brix	Nilai Absorbansi (y)				Alkohol (%)			
		12 jam	24 jam	36 jam	48 jam	12 jam	24 jam	36 jam	48 jam
A	14°	0,924	0,911	0,904	1,005	1,582	1,554	1,539	1,755
	24°	0,901	0,9	0,91	0,976	1,533	1,531	1,552	1,693
	34°	0,898	0,907	0,917	1,047	1,527	1,546	1,567	1,844
B	14°	0,838	0,879	0,883	0,89	1,399	1,486	1,495	1,510
	24°	0,907	0,902	0,907	0,91	1,546	1,535	1,546	1,552
	34°	0,9	0,915	0,9	0,924	1,531	1,563	1,531	1,582

Isolat	Umur Isolat	Perlakuan					
		Sebelum inkubasi 2 jam			Sesudah inkubasi 2 jam		
A	12 jam						
	24 jam						
	36 jam						
	48 jam						

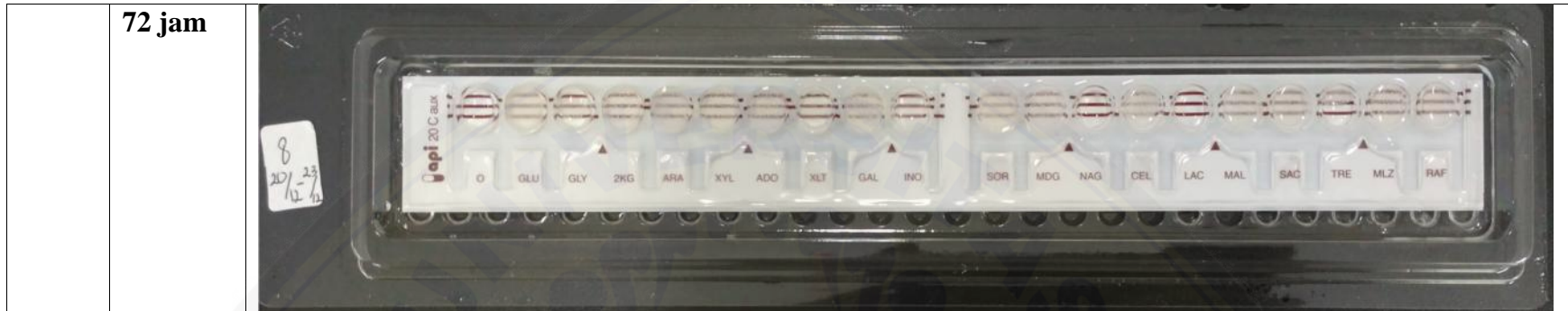


Isolat	Umur Isolat	Perlakuan						
		Sebelum inkubasi 2 jam			Sesudah inkubasi 2 jam			
								
								
								
								

LAMPIRAN F. KARAKTERISASI FISILOGI - UJI POLA FERMENTASI KIT API 20C AUX

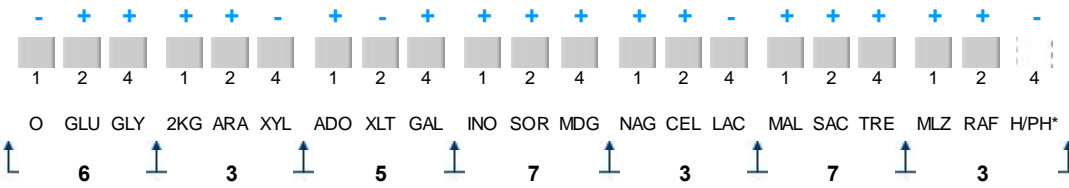
Isolat	Waktu inkubasi	Gambar Kit API 20C Aux
A	0 jam	
	48 jam	

	<p><b>72 jam</b></p>	 <p>A microarray plate (Cepi 20 C-Box) showing 20 wells. A white label with the number '7' and '25/10' is attached to the left side. The wells are labeled with various substrates: O, GLU, GLY, 2KG, ARA, XYL, ADO, XLT, GAL, INO, SOR, MDG, NAG, CEL, LAC, MAL, SAC, TRE, MLZ, RAF. Each well contains a small amount of liquid, and the color of the liquid varies across the wells, indicating different levels of substrate utilization.</p>
<p><b>B</b></p>	<p><b>0 jam</b></p>	 <p>A microarray plate (Cepi 20 C-Box) showing 20 wells. A white label with the number '8' and '20/12-23/10' is attached to the left side. The wells are labeled with various substrates: O, GLU, GLY, 2KG, ARA, XYL, ADO, XLT, GAL, INO, SOR, MDG, NAG, CEL, LAC, MAL, SAC, TRE, MLZ, RAF. Each well contains a small amount of liquid, and the color of the liquid is uniform across all wells, indicating no substrate utilization.</p>
	<p><b>48 jam</b></p>	 <p>A microarray plate (Cepi 20 C-Box) showing 20 wells. A white label with the number '8' and '20/12-23/10' is attached to the left side. The wells are labeled with various substrates: O, GLU, GLY, 2KG, ARA, XYL, ADO, XLT, GAL, INO, SOR, MDG, NAG, CEL, LAC, MAL, SAC, TRE, MLZ, RAF. Each well contains a small amount of liquid, and the color of the liquid varies across the wells, indicating different levels of substrate utilization.</p>





API 20 C AUX V5.0



**REFERENCE**      **DATE**  
 Isolat A              12/28/16  
**COMMENT**

DOUBTFUL PROFILE

**Strip**                      API 20 C AUX V5.0  
**Profile**                    6 3 5 7 3 7 3  
**Note**                      POSSIBILITY OF *Candida tropicalis*

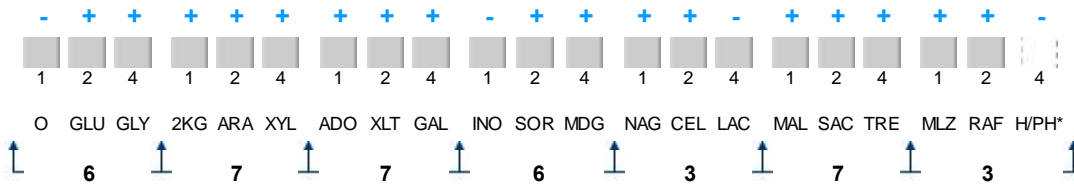
Significant taxa	% ID	T	Tests against							
<i>Candida famata</i>	63.2	0.33	XLT	75%	INO	0%				
<i>Candida guilliermondii</i>	26.5	0.21	XYL	85%	XLT	92%	INO	0%		
Next taxon	% ID	T	Tests against							
<i>Cryptococcus laurentii</i>	4.9	0.15	GLY	6%	XYL	99%	XLT	76%	LAC	99%
Complementary test(s)	ESC (HYD.)		dMELa							
<i>Candida famata</i>	65%		19%							
<i>Candida guilliermondii</i>	93%		89%							
<i>Candida tropicalis</i>	0%		0%							

Close

Print



**API 20 C AUX V5.0**



**REFERENCE**      **DATE**  
 Isolat B              12/28/16  
**COMMENT**

**EXCELLENT IDENTIFICATION TO THE GENUS**

**Strip**                                      API 20 C AUX V5.0  
**Profile**                                    6 7 7 6 3 7 3  
**Note**                                      POSSIBILITY OF *Candida tropicalis*

Significant taxa	% ID	T	Tests against					
<i>Candida guilliermondii</i>	84.3	1.0						
<i>Candida famata</i>	15.6	0.94						
Next taxon	% ID	T	Tests against					
<i>Cryptococcus laurentii</i>	0.1	0.4	GLY	6%	INO	84%	LAC	99%
Complementary test(s)	ESC (HYD.)		dMELa					
<i>Candida famata</i>	65%		19%					
<i>Candida guilliermondii</i>	93%		89%					
<i>Candida tropicalis</i>	0%		0%					

Close

Print

## LAMPIRAN G. HASIL BLAST ISOLAT A DARI DATABASE NCBI

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Candida parapsilosis isolate ZA012 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe</a>	944	944	100%	0.0	100%	<a href="#">FJ662412.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Candida parapsilosis strain AUMC 8904 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal trans</a>	940	940	99%	0.0	100%	<a href="#">KU095857.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Candida parapsilosis isolate ZA033 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe</a>	939	939	100%	0.0	99%	<a href="#">FJ662414.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Candida parapsilosis isolate ZA039 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe</a>	937	937	100%	0.0	99%	<a href="#">FJ662416.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Candida parapsilosis strain DMic 134410 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tran</a>	935	935	99%	0.0	99%	<a href="#">KX833099.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Candida parapsilosis culture-collection CBS:2193 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequ</a>	933	933	99%	0.0	99%	<a href="#">KY102320.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Candida parapsilosis culture-collection CBS:6318 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequ</a>	933	933	99%	0.0	99%	<a href="#">KY102319.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Candida parapsilosis culture-collection CBS:2915 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequ</a>	933	933	99%	0.0	99%	<a href="#">KY102317.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Candida parapsilosis culture-collection CBS:2196 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequ</a>	933	933	99%	0.0	99%	<a href="#">KY102303.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Candida parapsilosis culture-collection CBS:2215 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequ</a>	933	933	99%	0.0	99%	<a href="#">KY102301.1</a>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/222477013,1021260935,222477015,222477017,1070637025,1102638750,1102638749,1102638747,1102638733,1102638731>

**LAMPIRAN H. KOMPOSISI BAHAN****Komposisi Media MEA**

Komposisi	Jumlah
Malt Extract Broth	17 gram
Bacteriological Agar	20 gram
Akuades	1000 ml

**Komposisi Media MEB**

Komposisi	Jumlah
Malt Extract Broth	17 gram
Akuades	1000 ml

**Komposisi Larutan Garam Fisiologi**

Komposisi	Jumlah
NaCl	8,5 gram
Akuades	1000 ml

**Komposisi Tetes Tebu brix 14°, 24° dan 34°**

Komposisi	Jumlah
Tetes Tebu brix 14°	
1. Tetes tebu pekat	200 ml
2. Akuades	935 ml
Tetes tebu brix 24°	
1. Tetes tebu pekat	200 ml
2. Akuades	555 ml
Tetes tebu brix 34°	
1. Tetes tebu pekat	200 ml
2. Akuades	350 ml

**Komposisi Larutan Uji Produksi Alkohol**

Komposisi	Jumlah
Larutan A	
1. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10 gram
3. Akuades	50 ml
Larutan B	
1. K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	0,74 gram
2. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat	56 ml
3. Akuades	Ditambahakan sampai volume 100 ml
Larutan C (Standart)	
1. Alkohol 96%	0,1 ml
2. Akuades	10 ml
Larutan C (Sampel)	
1. Tetes tebu brix 14°, 24° dan 34°	3 ml
2. Isolat A atau B	30 µl



**Komposisi Strip Kit API 20C Aux**

Komposisi	Jumlah
O (none)	1,2 mg/cup
GLU (D-glukosa)	1,2 mg/cup
GLY (Glycerol)	1,2 mg/cup
2KG (calcium-2-Keto-Gluconate)	1,2 mg/cup
ARA (L-Arabinose)	1,2 mg/cup
XYL (D-Xylose)	1,2 mg/cup
ADO (Adonitol)	1,2 mg/cup
XLT (Xylitol)	1,2 mg/cup
GAL (D-galactose)	1,2 mg/cup
INO (Inositol)	2,36 mg/cup
SOR (Sorbitol)	1,2 mg/cup
MDG(Methyl- D-Glucopyranoside)	1,2 mg/cup
NAG (N-Acetyl-Glucosamine)	1,2 mg/cup
CEL (D-Cellobiose)	1,2 mg/cup
LAC (D-Lactose)	1,2 mg/cup
MAL (D-Maltose)	1,2 mg/cup
SAC (D-Saccharose)	1,2 mg/cup
MLZ (D-Melezitose)	1,2 mg/cup
RAF (D-Raffinose)	1,9 mg/cup

**Komposisi Media API C**

Komposisi	Jumlah
Ammonium sulfate	5 gram
Monopotassium phosphat	0,31 gram
Dipotassium phosphat	0,45 gram
Disodium phosphat	0,92 gram
Sodium chloride	0,1 gram
Calcium chloride	0,05 gram
Magnesium sulfate	0,2 gram
L-Histidine	0,005 gram
L-Tryptopan	0,02 gram
L-Methionine	0,02 gram
Gelling agent	0,5 gram
Vitamin solution	1 ml
Trace element	10 ml
Demineralized water pH final: 6,4-6,8 (pada suhu 20°C-25°C)	Ditambahkan sampai volume 1000 ml

**Komposisi Presto™ Mini gDNA Yeast Kit (GBY100)**

Komposisi	Jumlah
Sorbitol Buffer	90 ml
Cell Lysis Buffer	40 ml
Protein Removal Buffer	15 ml
DNA Hydration Buffer	50 ml

**Komposisi KAPA Taq Extra HotStart Kit**

Komposisi	Jumlah
KAPA Taq Extra DNA Polymerase	5 U/μl
KAPA Taq Extra Buffer	5X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM
KAPA dNTP Mix	@ 10 mM

**Komposisi Zymo DNA Clean & Concentration™-5 Kit (D4003)**

Komposisi	Jumlah
DNA Binding Buffer	50 ml
DNA Wash Buffer	6 ml
DNA Elution Buffer	1 ml
Zymo-Spin™ Columns	50 kolom tanpa tutup
Collection Tubes	50 tabung

**Komposisi Gel Elektroforesis**

Komposisi	Jumlah
Agarose	0,5 gram
Buffer TAE	50 ml
Ethidium Bromida (EtBr)	3 ml

**Kompisisi Primer ITS 1 dan ITS 4**

Komposisi	Sequence
Primer ITS 1 ( <i>foward</i> )	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'
Primer ITS 4 ( <i>reverse</i> )	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'

**LAMPIRAN I. PROTOKOL AMPLIFIKASI PCR****PCR Master Mix**

Komposisi	Jumlah
dd H <sub>2</sub> O	15,875 µl
5x KAPA Taq Extra Buffer	5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
10 mM dNTP Mix	0,5 µl
10 pmol/µl Primer ITS1	0,5 µl
10 pmol/µl Primer ITS4	0,5 µl
5 U/µl KAPA Taq Extra DNA Polymerase	0,125 µl
Template DNA	1 µl

**Kondisi PCR**

Tahap	Suhu (°C)	Durasi	Siklus
Initial Denaturation	95	3 menit	1
Denaturation	95	30 detik	
Annealing	52	30 detik	35
Extension	72	45 detik	
Hold	4	∞	1

**LAMPIRAN J. ELEKTROFORESIS****Komponen Elektroforesis**

Komposisi	Jumlah
Agarose	0,5 gram
Buffer TAE	50 ml
Ethidium Bromida (EtBr)	3 ml
<i>Loading dye</i>	1 µl
Produk PCR	5 µl
DNA Ladder 100 bp (DNA <i>marker</i> )	1 µl