



**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KHAMIR TOLERAN ALKOHOL DARI
*MOLASSES***

SKRIPSI

Oleh

**Anjas Wida Elistia Rini
NIM 121810401055**

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



**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KHAMIR TOLERAN ALKOHOL DARI
*MOLASSES***

SKRIPSI

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

Oleh

**Anjas Wida Elistia Rini
NIM 121810401055**

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

PERSEMBAHAN

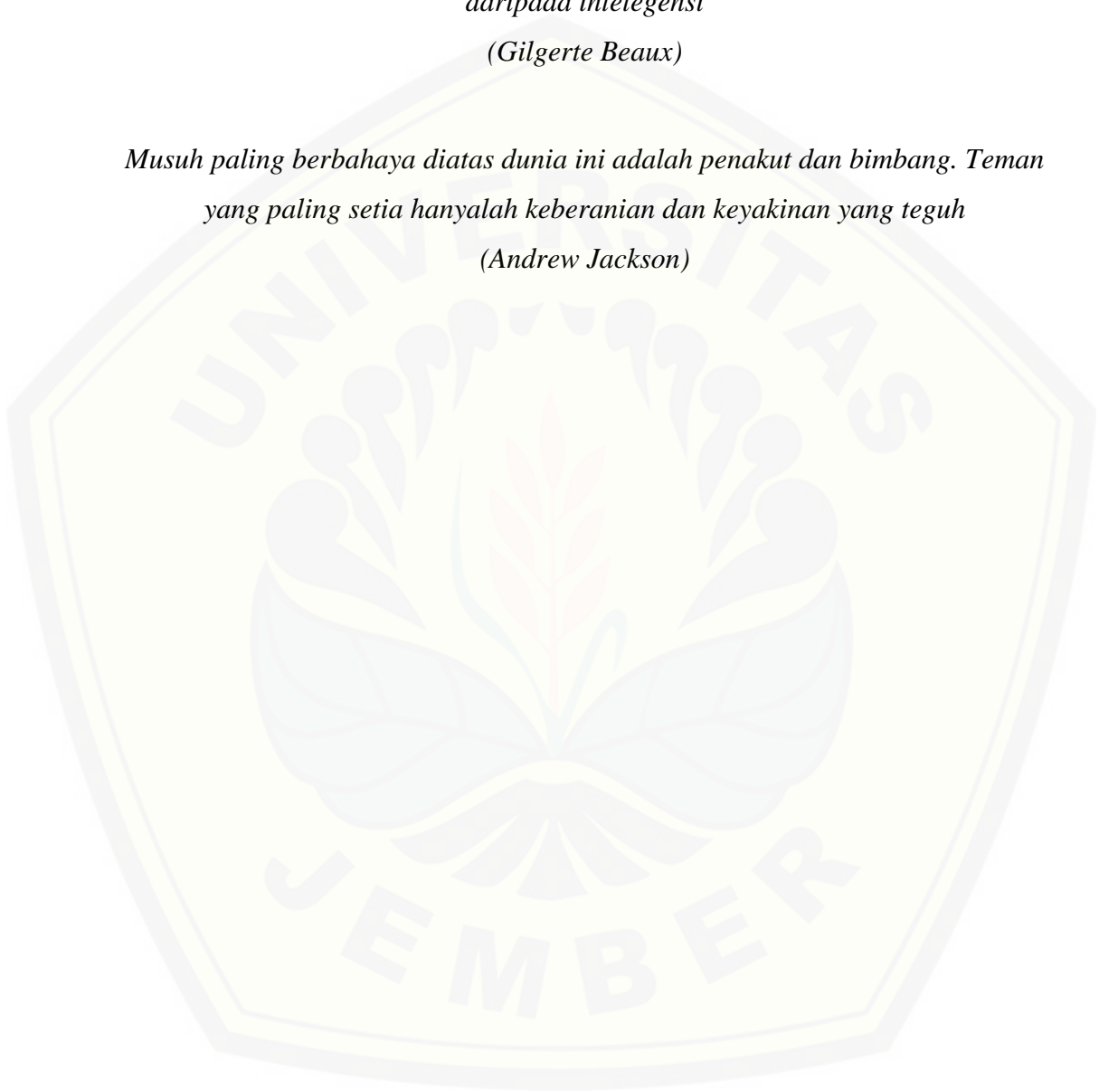
Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya, shalawat serta salam semoga senantiasa terlimpahkan kepada Nabi Muhammad SAW. Atas segala kebesaran tersebut saya persembahkan skripsi ini sebagai ungkapan terima kasih kepada orang-orang yang sangat berarti dalam hidup saya.

1. Orang tua tercinta yakni Ayahanda Suyitno, Ibunda Harini dan Ibunda Nuryati, terima kasih atas limpahan kasih sayang, doa, pengorbanan, kesabaran, dukungan, nasehat, dan perhatiannya;
2. Keluarga besar ayah dan ibu saya, terima kasih atas doa dan dukungannya selama ini;
3. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc. dan Dr. Nurhayati, S.Tp, M.Si. selaku dosen pembimbing yang dengan sabar meluangkan waktu, pikiran serta perhatian dalam penulisan skripsi ini;
4. Guru-guru saya sejak TK, SD, SMP, SMA, dan semua Dosen Program Studi Biologi FMIPA Universitas Jember yang saya hormati;
5. CDAST Universitas Jember atas biaya penelitian melalui Program Riset Penguatan Divisi Biomaterial dan Rekayasa Bioproses tahun 2014/2015;
6. Rekan penelitian Ika Fitriyah, rekan-rekan CDAST atas bantuan dan kerjasamanya dalam menyelesaikan skripsi ini.
7. Teman-teman Mahasiswa Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember, Angkatan 2012 yang selalu memberikan bantuan, semangat, dan inspirasi;
8. Almamater UNEJ yang saya banggakan.

MOTTO

Untuk meraih sebuah kesuksesan, karakter seseorang adalah lebih penting daripada intelegensi
(Gilgerte Beaux)

Musuh paling berbahaya diatas dunia ini adalah penakut dan bimbang. Teman yang paling setia hanyalah keberanian dan keyakinan yang teguh
(Andrew Jackson)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Anjas Wida Elistia Rini

NIM : 121810401055

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KHAMIR TOLERAN ALKOHOL DARI MOLASSES**” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 27 Maret 2017

Yang menyatakan,

Anjas Wida Elistia Rini
NIM 121810401055

SKRIPSI

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KHAMIR TOLERAN ALKOHOL DARI
*MOLASSES***

Oleh

**Anjas Wida Elistia Rini
NIM 121810401055**

Pembimbing

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

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Nurhayati, S.Tp, M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Isolasi Dan Identifikasi Khamir Toleran Alkohol Dari *Molasses*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Jember pada:

hari :

tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tim Penguji:

Ketua,

Sekretaris,

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

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

Anggota I,

Anggota II,

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 KHAMIR TOLERAN ALKOHOL DARI *MOLASSES*; Anjas Wida Elistia Rini, 121810401055; 2017; 82 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Produksi bioetanol secara efisien diperoleh melalui pemilihan jenis mikroorganisme yang tepat, bahan baku, dan kontrol proses fermentasi. *Molasses* adalah sisa dari proses pengkristalan gula pasir yang masih mengandung gula dan asam-asam organik sehingga merupakan bahan baku yang baik untuk pembuatan etanol. Khamir memiliki peran penting dalam dekomposisi senyawa organik dan dapat digunakan untuk keperluan industri terutama fermentasi etanol. Selama proses fermentasi etanol, khamir mengalami berbagai macam kondisi stres salah satunya yakni cekaman kadar etanol tinggi. Ketika konsentrasi etanol lebih dari 8% (v/v) maka dapat menyebabkan lapisan fosfolipid dari membran sel (lipid bilayer) khamir dan organel-organel seperti membran dalam mitokondria mengalami hiperpolarisasi, dengan demikian dapat meningkatkan ketidakstabilan membran dan akibatnya dapat menurunkan permeabilitas membran sehingga homeostasis sel terganggu. Oleh karena itu, diperlukan adanya strain khamir toleran alkohol strain khamir toleran alkohol yang berasal dari *molasses* sehingga kedepannya diharapkan mampu meningkatkan produktifitas etanol dan hasil produksi.

Penelitian dilakukan dalam empat tahapan. Pertama, tahap isolasi khamir pada substrat *molasses* yang mengandung alkohol 8% dan 20%. Tahap karakterisasi morfologi dilakukan dengan mengamati bentuk dan warna koloni khamir (makroskopis) serta mengamati bentuk sel khamir dan tipe pertunasan menggunakan mikroskop (mikroskopis). Tahap karakterisasi secara fisiologi dilakukan dengan uji suhu pertumbuhan optimal dan pH pertumbuhan optimal pada media MEB, uji kemampuan tumbuh pada *molasses* yang mengandung alkohol 8% v/v, 16% v/v, 24% v/v, uji kemampuan produksi alkohol, dan identifikasi pola fermentasi khamir menggunakan kit API 20C. Tahap selanjutnya

adalah identifikasi molekuler dengan metode PCR dan *sequencing* DNA menggunakan primer ITS1 dan ITS4.

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan tiga isolat yakni isolat X,Y,Z. Isolat X memiliki bentuk koloni bulat berwarna putih dengan tepi rata dan bentuk sel oval dengan pertunasan multipolar; suhu pertumbuhan optimalnya adalah 20°C, 30°C, 37°C dengan pH 3 dan pH 4. Isolat X mampu tumbuh pada *molasses* yang mengandung alkohol 8% dengan populasi khamir $3,78 \times 10^7$ cfu/ml dan *molasses* yang mengandung alkohol 16% dengan populasi khamir $3,98 \times 10^7$ cfu/ml dengan lama inkubasi 24 jam serta mampu memproduksi alkohol sebanyak 7% pada *molasses* yang mengandung alkohol 8%. Isolat X teridentifikasi secara fisiologis dengan kit API 20C sebagai *Candida tropicalis* dan teridentifikasi sebagai *Candida parapsilosis* strain AUMC 10714 dengan homologi *sequence* 100%.

Isolat Y memiliki bentuk koloni yang berlendir berwarna putih keruh dan memiliki bentuk sel oval dan berantai diplo atau strepto dengan suhu pertumbuhan optimal 40°C pada pH 4. Isolat Y mampu tumbuh pada *molasses* yang mengandung alkohol 8% dengan populasi khamir $2,74 \times 10^7$ cfu/ml serta pada *molasses* yang mengandung alkohol 16% dengan populasi khamir $2,78 \times 10^7$ cfu/ml dengan lama inkubasi 48 jam serta mampu memproduksi alkohol sebanyak 7% pada *molasses* yang mengandung alkohol 8%. Isolat Y teridentifikasi secara fisiologis dengan kit API 20C sebagai *Candida ciferri* dengan 99.9% ID.

Isolat Z memiliki bentuk koloni bulat dengan pinggiran berombak dan bentuk sel oval serta pertunasan multipolar dengan suhu pertumbuhan optimal 40°C pada pH 4. Isolat Z mampu tumbuh pada *molasses* yang mengandung alkohol 24% dengan populasi khamir $1,22 \times 10^8$ cfu/ml dengan lama inkubasi 24 jam serta mampu memproduksi alkohol sebanyak 7% pada *molasses* yang mengandung alkohol 8%. Isolat Z teridentifikasi secara fisiologis dengan kit API 20C sebagai *Candida tropicalis* dan teridentifikasi sebagai *Candida parapsilosis* ZA012 dengan homologi *sequence* 100%.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulisan skripsi yang berjudul “Isolasi dan Identifikasi Khamir Toleran Alkohol dari *Molasses*” dapat diselesaikan. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dr. Nurhayati, S.Tp, M.Si. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
2. Dr. Kahar Muzakhar, S.Si. dan Drs. Rudju Winarsa, M.Kes. selaku Tim Penguji skripsi yang memberikan bimbingan dan saran dalam penulisan skripsi ini;
3. Rekan penelitian Ika Fitriyah dan rekan-rekan CDAST atas bantuan dan kerjasamanya dalam menyelesaikan skripsi ini
4. CDAST Universitas Jember atas biaya penelitian melalui Program Riset Penguatan Divisi Biomaterial dan Rekayasa Bioproses tahun 2014/2015
5. Keluarga Besar Mahasiswa Jurusan Biologi FMIPA Angkatan 2012 (Biozva) Universitas Jember yang memberikan bantuan dan semangat dalam penulisan skripsi ini;
6. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menerima kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya, penulis berharap semoga skripsi dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Jember, Maret 2017

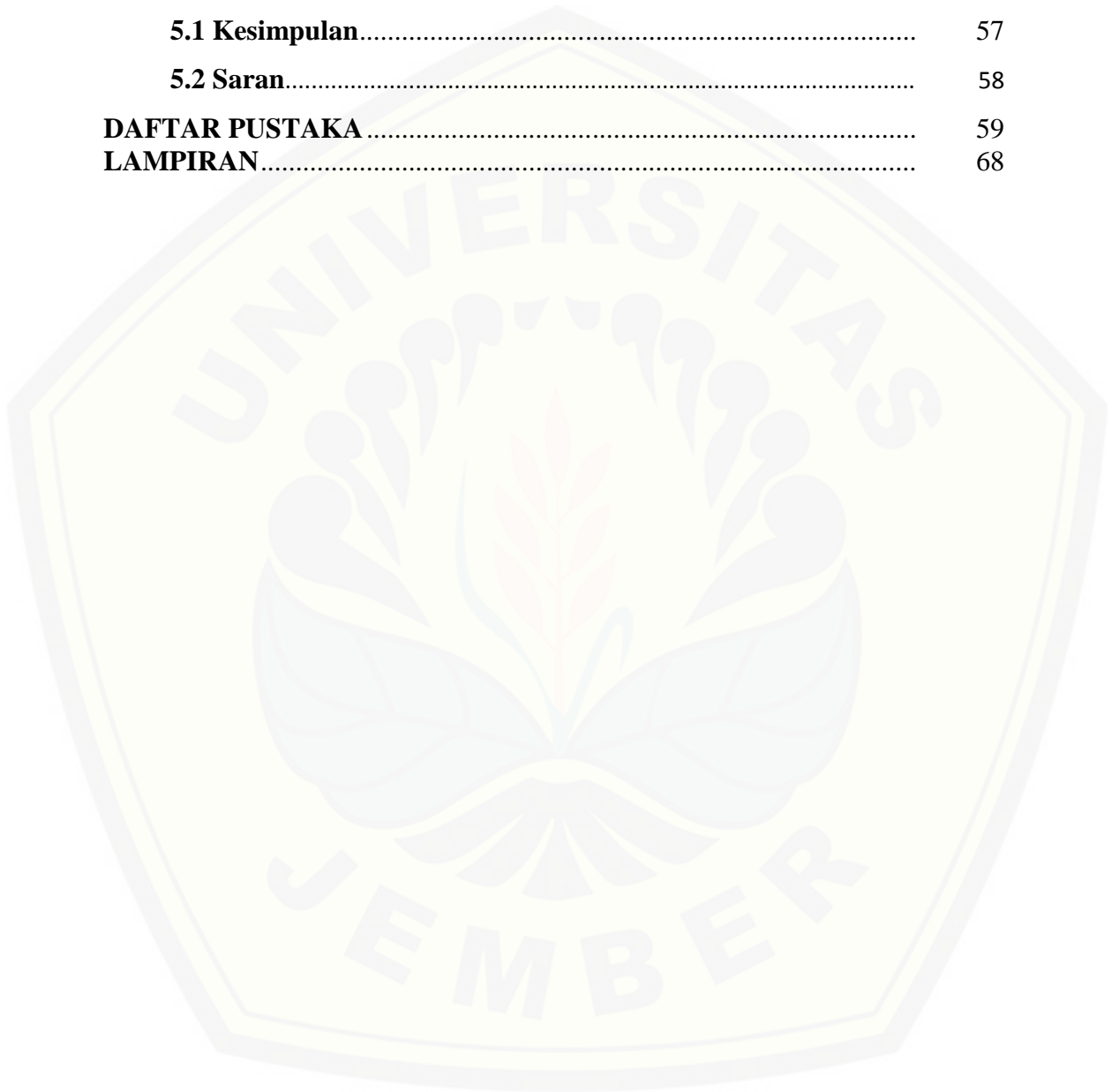
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Batasan Masalah	2
1.4 Tujuan	3
1.5 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Pemanfaatan <i>Molasses</i> Sebagai Substrat Fermentasi Bioetanol	4
2.2 Fermentasi <i>Molasses</i> Menjadi Bioetanol (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	5
2.3 Morfologi Khamir	7
2.4 Fisiologi dan Metabolisme Khamir.	9
2.5 Reproduksi Khamir	10
2.6 Taksonomi dan Pengelompokkan Khamir	11

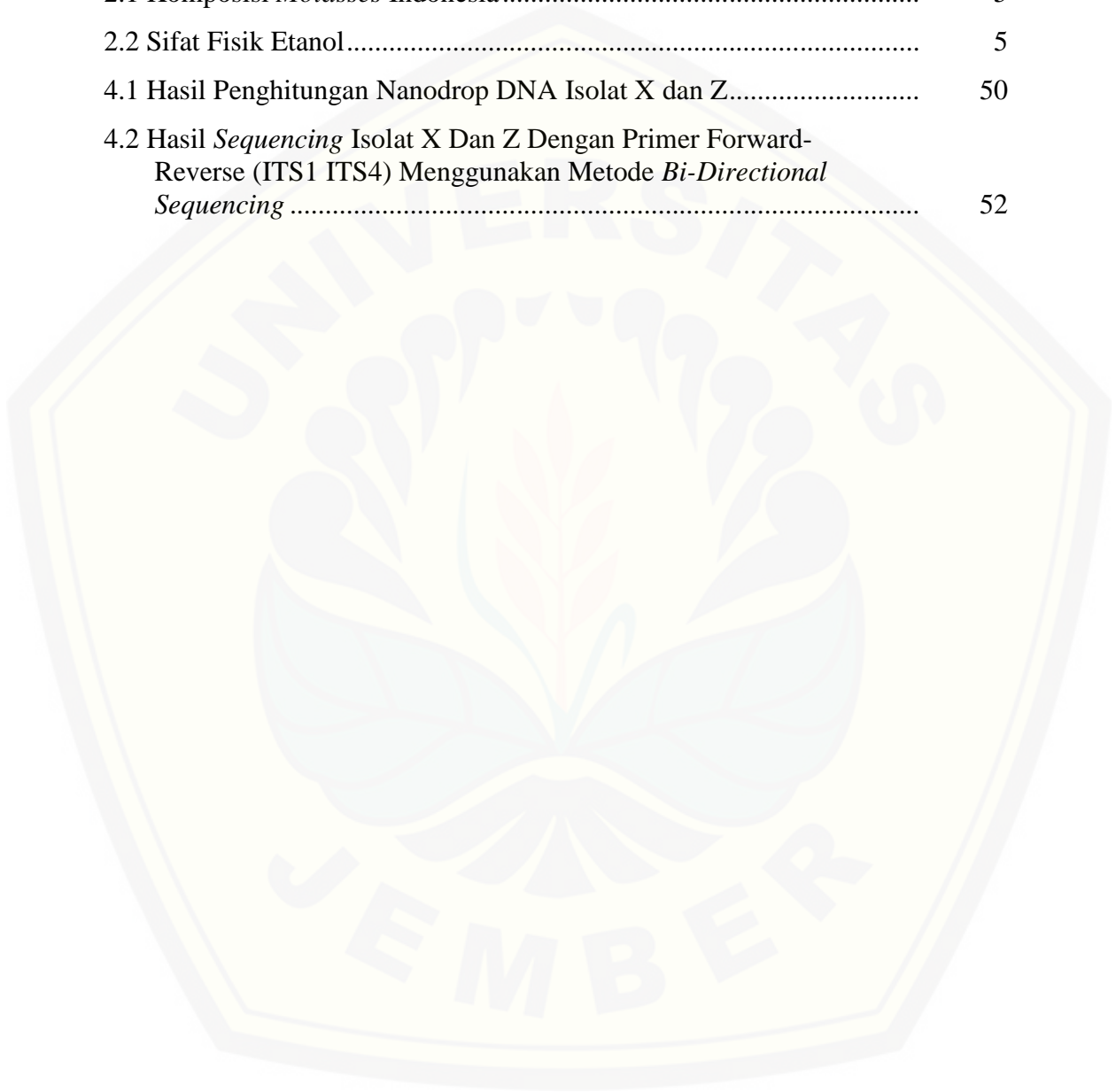
2.7 Respon Sel Khamir Terhadap Cekaman Etanol	13
2.8 Kit API 20C untuk Identifikasi Khamir	14
2.9 Identifikasi Molekuler pada Khamir (<i>Sequencing DNA</i> khamir dengan primer ITS).....	15
2.9.1 Metode <i>Sequencing DNA</i>	15
2.9.2 ITS <i>Region</i>	16
BAB 3 METODE PENELITIAN.....	18
3.1 Tahapan Penelitian	19
3.3.1 Persiapan <i>Molasses</i> (Media Isolasi Khamir Toleran Alkohol (KTA))	20
3.3.2 Isolasi dan Purifikasi Khamir Toleran Alkohol (KTA)...	20
3.3.3 Karakterisasi Morfologi Khamir KTA	20
3.3.4 Karakterisasi Fisiologi Khamir KTA.....	21
3.3.5 Identifikasi Molekuler Khamir KTA (Sekuensing ITS <i>Region</i> – ITS 1 dan ITS 4)	23
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	28
4.1 Isolasi dan Purifikasi Khamir KTA (Khamir Toleran Alkohol) dari <i>Molasses</i>	28
4.2 Karakteristik Makroskopis dan Mikroskopis Khamir KTA	29
4.3 Suhu Optimal Pertumbuhan Khamir KTA.....	31
4.4 pH Optimal Pertumbuhan Khamir KTA.....	34
4.5 Kemampuan Tumbuh Khamir KTA pada Media <i>Molasses</i> dengan Konsentrasi Alkohol 8%, 16%, 24%	37
4.6 Kemampuan Khamir KTA dalam Produksi Alkohol.....	41
4.7 Analisa Pola Fermentasi Khamir KTA pada kit API 20C ..	46
4.7.1 Data Apiweb Isolat X.....	46
4.7.2 Data Apiweb Isolat Y.....	47
4.7.3 Data Apiweb Isolat Z.	48
4.8 Analisa Hasil Molekuler DNA Khamir KTA	

dengan Metode PCR dan <i>Sequencing</i> DNA menggunakan Primer ITS-1 dan ITS 4	49
BAB 5 PENUTUP.....	57
5.1 Kesimpulan.....	57
5.2 Saran.....	58
DAFTAR PUSTAKA	59
LAMPIRAN.....	68



DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Komposisi <i>Molasses</i> Indonesia.....	5
2.2 Sifat Fisik Etanol.....	5
4.1 Hasil Penghitungan Nanodrop DNA Isolat X dan Z.....	50
4.2 Hasil <i>Sequencing</i> Isolat X Dan Z Dengan Primer Forward-Reverse (ITS1 ITS4) Menggunakan Metode <i>Bi-Directional Sequencing</i>	52



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Bentuk-Bentuk Sel Khamir	7
Gambar 2.2 Ultrastruktur Sel <i>Yeast</i>	8
Gambar 2.3 Perkembangan Bentuk Sel Pada Khamir Berbentuk Lemon (<i>Hanseniaspora</i>).....	8
Gambar 2.4 Bekas Luka (<i>Bud Scar</i>) Pada Dinding Sel Khamir	8
Gambar 2.5 Pembentukan <i>Pseudohyphae</i> Pada Khamir.....	9
Gambar 2.6 Daerah ribosomal DNA.....	16
Gambar 2.7 Pemetaan Sekuen Primer ITS dan <i>Sequencing</i> <i>Nuclear Ribosomal RNA</i>	17
Gambar 3.1 Tahapan Penelitian	19
Gambar 4.1 Morfologi Makroskopis Isolat X(a), Y(b), Z(c).....	29
Gambar 4.2 Mikroskopis Isolat Khamir X(a), Y(b), Z(c) Pada Lama Inkubasi 20 jam.....	30
Gambar 4.3 Mikroskopis Isolat Khamir X(a), Y(b), Z(c) Pada Lama Inkubasi 40 jam.....	30
Gambar 4.4 Persentase Pertumbuhan Isolat Khamir X(a),Y(b), Z(c) Pada Suhu Inkubasi 10°C, 20°C, 30°C, 37°C, 40°C Selama Waktu Inkubasi 8 jam, 24 jam, 32 jam dan 48 jam	32
Gambar 4.5 Persentase Pertumbuhan Isolat Khamir X(a), Y(b), Z(c) Pada pH Media 3,4,5,6 Selama Waktu Inkubasi 8 jam, 24 jam, 32 jam dan 48 jam.....	35
Gambar 4.6 Persentase Kemampuan Tumbuh Isolat X,Y,Z Pada Media <i>Molasses</i> Konsentrasi Alkohol 8%, 16%, 24% Selama Waktu Inkubasi 24 jam dan 48 jam	38
Gambar 4.7 Kadar Alkohol Yang Dihasilkan Isolat Khamir X, Y, Z Pada <i>Molasses</i> Beralkohol 8%, 16%, 24% Dengan Lama Waktu Inkubasi 24 Jam Dan 48 Jam Dengan Kontrol	

Kadar Alkohol 8%, 16%, 24%.....	42
Gambar 4.8 Hasil Dokumentasi Gel Elektroforesis Hasil PCR Isolat X dan Z.....	50
Gambar 4.9 Pohon filogenetik isolat X (<i>Candida parapsilosis</i> strain AUMC 10714) dan isolat Z (<i>Candida parapsilosis</i> ZA012).....	53



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Purifikasi isolat khamir KTA	68
B. Nilai absorbansi dan persentase tumbuh khamir KTA pada uji suhu pertumbuhan optimal.....	69
C. Nilai absorbansi dan persentase tumbuh khamir KTA pada uji pH optimal pertumbuhan	70
D. Kemampuan tumbuh isolat khamir X,Y,Z terhadap konsentrasi alkohol 8%, 16%, 24%	72
E. Populasi khamir selama inkubasi 24 jam dan 48 jam pada media <i>Molasses</i> dengan konsentrasi alkohol 8% v/v, 16% v/v dan 24% v/v.....	74
F. Kemampuan produksi alkohol khamir KTA	77
F1. Nilai absorbansi larutan $K_2Cr_2O_7$ + alkohol bebas yang dilepaskan oleh isolat khamir pada media <i>Molasses</i> selama waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam.....	77
F2. Kurva standart alkohol.....	77
F3. Kadar alkohol isolat khamir X,Y,Z selama waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam.....	78
F4. Uji produksi alkohol isolat X,Y,Z dengan metode Cawan Conwan.....	78
G. Uji kit Api 20C isolat X,Y,Z selama inkubasi 72 Jam.....	80
G1. Hasil analisis apiweb	80
H. Analisis blast hasil <i>Sequencing</i> Isolat X dan Z menggunakan primer Its1-Its4.....	82

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Produksi bioetanol secara efisien diperoleh melalui pemilihan jenis mikroorganisme yang tepat, bahan baku, dan kontrol proses fermentasi. *Molasses* adalah sisa dari proses pengkristalan gula pasir yang masih mengandung gula dan asam-asam organik sehingga merupakan bahan baku yang baik untuk pembuatan etanol. *Molasses* mempunyai keunggulan yakni selain harganya murah juga mengandung 50% gula sederhana sehingga dapat difermentasi langsung oleh khamir menjadi etanol tanpa pretreatment (Murtagh, 1995).

Khamir memiliki peran penting dalam dekomposisi senyawa organik dan dapat digunakan untuk keperluan industri (Spencer dan Spencer, 1997). Beberapa jenis khamir yang digunakan dalam proses fermentasi diantaranya genus *Saccharomyces*, *Shizosaccharomyces*, *Torula*, *Willia*, *Yarrowia* yang masing-masing memiliki karakteristik dan tingkat produktifitas yang berbeda dalam menghasilkan etanol (Gray, 1941).

Selama proses fermentasi etanol, khamir mengalami berbagai macam kondisi stres mencakup peningkatan kadar etanol, racun yang berasal dari produk akhir yang mampu menghambat pertumbuhan khamir, suhu tinggi dan tekanan osmotik yang berasal dari substrat yang mengandung gula dengan konsentrasi yang tinggi. Diantara beberapa faktor tersebut, cekaman kadar etanol tinggi diyakini merupakan penyebab stres terbesar sehingga produksi etanol mengalami penurunan (Gibson *et al.*, 2007). Ketika konsentrasi etanol lebih dari 8% (v/v) maka dapat menyebabkan lapisan fosfolipid dari membran sel (lipid bilayer) khamir dan organel-organel seperti membran dalam mitokondria mengalami hiperpolarisasi, dengan demikian dapat meningkatkan ketidakstabilan membran dan akibatnya dapat menurunkan permeabilitas membran sehingga homeostasis sel terganggu (Lloyd *et al.*, 1993).

Proses hambatan yang diakibatkan oleh konsentrasi etanol tersebut dapat berbeda tergantung sifat toleran etanol yang dimiliki oleh jenis khamir tersebut

(Nagodawithana & Streinkraus, 1976). Pengembangan dari strain khamir toleran alkohol akan memberikan nilai ekonomi yang tinggi terhadap industri termasuk dalam hal fermentasi, penyaringan dan penyulingan etanol. Oleh karena itu, fokus penelitian ini adalah mengisolasi khamir toleran alkohol yang berasal dari substrat *molasses* serta melakukan uji identifikasi secara morfologi, fisiologi dan molekuler untuk mendapatkan identitas isolat strain khamir toleran alkohol yang berasal dari *molasses* sehingga kedepannya diharapkan mampu meningkatkan produktifitas etanol dan hasil produksi.

1.2 Rumusan Masalah

Khamir mampu menghasilkan bioetanol dari *molasses*. Selama proses produksi (pada proses fermentasi) terjadi proses akumulasi alkohol sehingga konsentrasi alkohol semakin meningkat. Semakin meningkatnya kadar alkohol dalam *molasses* tersebut dapat menghambat pertumbuhan khamir dikarenakan dapat menyebabkan lapisan fosfolipid dari membran sel (lipid bilayer) dan organel-organel seperti membran dalam mitokondria mengalami hiperpolarisasi, dengan demikian dapat meningkatkan ketidakstabilan membran dan akibatnya dapat menurunkan permeabilitas membran sehingga homeostasis sel terganggu. Proses hambatan yang diakibatkan oleh konsentrasi etanol tersebut dapat berbeda tergantung sifat toleran etanol yang dimiliki oleh jenis khamir tersebut. Oleh karena itu perlu ditemukan/diperoleh strain khamir yang memiliki ketahanan/toleransi terhadap kadar alkohol tinggi

1.3 Batasan Penelitian

Batasan dalam penelitian ini diantaranya :

1. Isolasi dan identifikasi khamir toleran alkohol berasal dari *molasses*
2. Bahan baku *molasses* yang digunakan diperoleh dari PG Jatiroto tahun giling 2015
3. Isolasi khamir toleran alkohol pada media MEA
4. Karakterisasi khamir toleran alkohol secara morfologi meliputi karakteristik makroskopis pada media MEA dan karakteristik mikroskopis

5. Karakterisasi khamir toleran alkohol secara fisiologi meliputi uji suhu pertumbuhan optimal pada media MEB, uji pH optimal pada media MEB, uji survival alkohol, uji kemampuan produksi alkohol, dan uji pola fermentasi pada kit API 20C
6. Identifikasi khamir toleran alkohol secara molekuler dilakukan dengan mengekstraksi DNA, analisis PCR serta *sequencing* dari ITS region dan analisis filogenetik

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengisolasi khamir toleran alkohol berasal dari *molasses*
2. Mengkarakterisasi secara morfologi isolat khamir toleran alkohol dari *molasses* secara makroskopis dan mikroskopis
3. Mengkarakterisasi secara fisiologi isolat khamir toleran alkohol dari *molasses* melalui uji suhu pertumbuhan optimal, uji pH media optimal, uji survival alkohol, uji kemampuan produksi alkohol dan uji pola fermentasi menggunakan kit API 20C
4. Mengidentifikasi secara molekuler isolat khamir toleran alkohol dari *molasses* menggunakan primer ITS

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini yaitu mengetahui strain khamir toleran alkohol dari *molasses* yang mampu meningkatkan produktivitas fermentasi etanol dalam skala industri dengan menggunakan starter isolat yang diharapkan dapat tahan terhadap konsentrasi alkohol yang tinggi.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pemanfaatan *molasses* sebagai substrat fermentasi bioetanol

Molasses diartikan sebagai residu sirup, merupakan hasil akhir yang dari pembuatan gula dengan kristalisasi berulang, dimana sukrosa yang ada sudah tidak dapat dikristalkan lagi. *Molasses* merupakan sumber karbon organik yang murah dan sumber energi bagi pertumbuhan mikroba yang mengandung karbohidrat 50%-60%, terutama golongan disakarida yaitu sukrosa yang mampu dihidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa (Andriani, 1993). *Molasses* umumnya berupa cairan kental seperti sirup dan berwarna cokelat gelap atau cokelat kemerahan bersifat asam, mempunyai pH 5,5-6,5 yang disebabkan oleh adanya asam-asam organik bebas (Harahap,2003).

Molasses banyak mengandung berbagai jenis bakteri. Bakteri yang dapat tumbuh dalam *molasses* yakni bakteri pembentuk lendir atau gum, bakteri aerob tidak membentuk spora yaitu tiga spesies micrococcus, sementara itukhamir yang dapat hidup dalam *molasses* adalah *S. cereviseae*, *S. carlbergensis*, *Candida crusei*, *C. intermed*. Adanya mikroorganisme yang tumbuh dalam *molasses* menyebabkan inversi sakarosa sehingga *molasses* menjadi asam dan berbau (Honig,1963).

Kualitas *molasses* terutama ditentukan oleh kadar gulanya. Komposisi *molasses* berbeda-beda, tergantung dari daerah asal, jenis tebu, sifat tanah, iklim di mana tebu ditanam serta cara pengolahannya. Menurut Paturau (1969), karakteristik dari *molasses* yakni memiliki berat jenis 1,39-1,49 , memiliki pH \pm 6,0, viskositas sangat bervariasi dan tergantung perbedaan temperatur dan kepekatan (brix) umumnya berkisar antara 90-95°brix, memiliki panas spesifik sebesar 0,5 cal/kg/°C, pada umumnya *molasses* berwarna cokelat kemerahan serta mengandung kadar gula antara 40-50%.Komposisi *molasses* yang ditunjukkan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi *molasses* Indonesia

Parameter	Persentase (%)
Berat kering	75
Total gula sebagai gula invert	50
Protein	6,0
Total abu	7,0

Sumber : Paturau, 1969

2.2 Fermentasi *Molasses* Menjadi Bioetanol (*Saccharomyces cerevisiae*)

Etanol (C_2H_5OH) adalah cairan biokimia yang berasal dari proses fermentasi gula dari sumber karbohidrat menggunakan bantuan mikroorganisme dan melibatkan proses biologis sehingga penamaannya yakni bioetanol (Yudiarto, 2007).

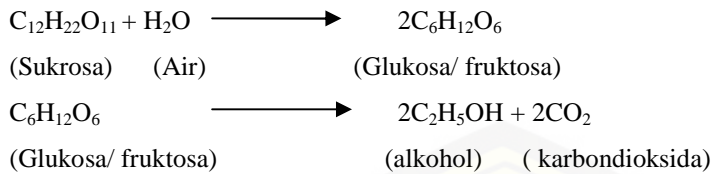
Tabel 2.2 Sifat fisik etanol

Sifat Fisik Etanol	
Massa molekul relative	46,07 g/mol
Titik beku	-114,1°C
Titik didih normal	78,32°C
Dentitas pada 20°C	0,7893 g/ml
Kelarutan dalam air 20°C	Sangat larut
Viskositas pada 20°C	1,17 cP
Kalor spesifik 20°C	0,579 kal/g°C
Kalor pembakaran 25°C	7092,1 kal/g
Kalor penguapan 78,32°C	200,6 kal/g

Sumber : Rizani, 2000

Khamir yang digunakan dalam proses fermentasi etanol adalah *S. cerivisiae*, *S. uvarum*, *Candida utilis*, *S. anamensis*, *Schizosaccharomyces pombe* (Bailey dan Ollis, 1986). Fermentasi glukosa menjadi etanol berlangsung dalam beberapa tahapan reaksi. Masing-masing tahap dikatalisis oleh enzim. Tahapan tersebut melalui jalur glikolisis dan fermentasi alkohol yang disusun oleh Embden, Meyerhof dan Parnas, yang dikenal dengan istilah EMP (Rahayu & Kuswanto, 1988).

Secara umum reaksi kimia fermentasi alkohol adalah sebagai berikut (Toharisman& Santoso, 1999) :



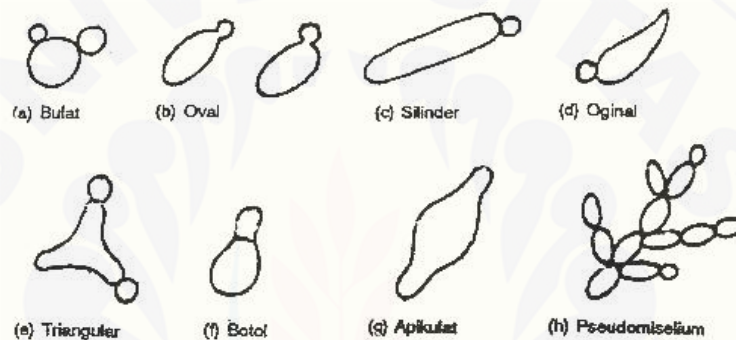
Pembentukan alkohol dilakukan dalam kondisi anaerob oleh *S. cerevisiae* yang merupakan jenis mikroba fakultatif anaerob. *S. cerevisiae* dapat melakukan dua mekanisme untuk mendapatkan energi yakni secara aerob dengan melakukan respirasi untuk pertumbuhan dan perkembangan sel sedangkan jika dalam kondisi anaerob maka *S. cerevisiae* melakukan respirasi anaerob (fermentasi) yang menghasilkan alkohol dan sedikit energi (Judoamidjojo, 1990).

Fermentasi etanol dibatasi dengan kapasitas khamir untuk mentolerir konsentrasi etanol, karena etanol yang terakumulasi menghambat fermentasi alkohol sehingga membatasi kadar etanol yang diproduksi oleh strain khamir tertentu. Penyebab lain juga terkait dengan faktor lingkungan seperti konsentrasi gula tinggi dan suhu tinggi yang menghambat fermentasi etanol (Wayman & Parekh, 1990).

Produk etanol yang terakumulasi dalam fermentor akan berpengaruh terhadap pertumbuhan khamir, etanol akan merusak membran plasma, terjadi denaturasi protein, dan terjadiperubahan profil suhu pertumbuhan yang dapat menghambat pertumbuhan atau mematikan mikroba sehingga menyebabkan menurunnya produktivitas. Pada konsentrasi alkohol 15% mikroba tidak dapat tumbuh (Bulawayo *et al.*, 1996). Ketika konsentrasi etanol lebih dari 8% (v/v) maka dapat menyebabkan lapisan fosfolipid dari membran sel (lipid bilayer) dan organel-organel seperti membran dalam mitokondria mengalami hiperpolarisasi. Dengan demikian membran tidak stabil dan akibatnya dapat menurunkan permeabilitas membran sehingga homeostasis sel terganggu (Lloyd *et al.*, 1993). Suhu yang baik untuk fermentasi maksimum adalah 30°C. Sebelum *molasses* digunakan sebagai media fermentasi etanol maka harus diencerkan terlebih dahulu hingga 14% brix (Jayus *et al.*, 2014).

2.3 Morfologi Khamir

Khamir adalah kelompok fungi yang memiliki sel vegetatif uniselular yang sering pula dapat membentuk miselium sejati, atau miselium palsu (pseudomiselium). Sel khamir mempunyai ukuran yang bervariasi dengan panjang 1-5 μm hingga 20 μm , dan lebar 1-10 μm . Warna koloni mengkilat seperti mentega. Sel khamir memiliki berbagai jenis bentuk yaitu bulat, oval, silinder atau batang, segitiga melengkung, berbentuk botol, bentuk apikulat atau lemon, membentuk pseudomiselium dan sebagainya (Fardiaz, 1992). Khamir tidak mempunyai flagela atau organ lain untuk bergerak (Sari, 2010).



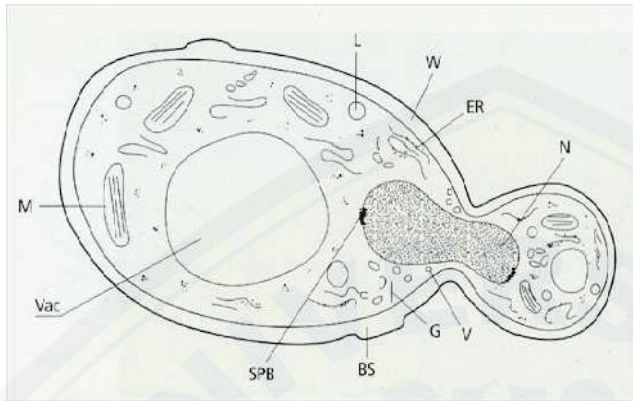
Gambar 2.1 Bentuk-bentuk sel khamir (Sumber : Fardiaz, 1992)

Berikut ini beberapa sifat-sifat koloni pada agar lempeng mengenai bentuk, permukaan dan tepi yaitu:

- Bentuk koloni berupa titik-titik, bulat, berbenang, takteratur serupa akar dan serupa kumaran
- Permukaan koloni dapat berbentuk datar, timbul mendatar, timbul melengkung, timbul mencembung, timbul membukit dan timbul berkawah
- Tepi koloni dapat berbentuk rata, berombak, berbelah-belah, berigi, berbenang-benang (filamen) dan keriting (Dwidjoseputro, 2005)
- Elevasi koloni dapat berbentuk datar maupun timbul

Sel khamir secara mikroskopik terdiri dari kapsul, dinding sel, membran sitoplasma, nukleus, satu atau lebih vakuola, mitokondria, globula lipid, volutin atau polifosfat, dan sitoplasma (Cook, 1958). Struktur luar beberapa jenis khamir tertutup oleh komponen ekstraseluler yang berlendir dan disebut kapsul. Kapsul yang menutupi dinding luar sebagian besar terdiri atas polisakarida termasuk

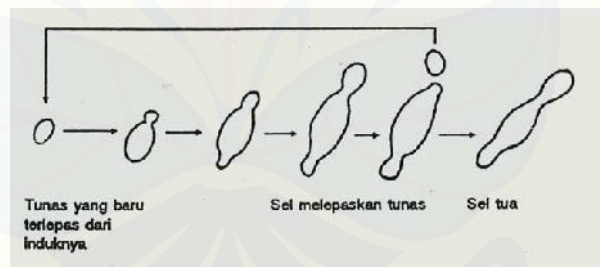
glukofosfomanan, suatu polimer menyerupai pati, dan heteropolisakarida yaitu polimer yang mengandung lebih dari satu macam unit gula seperti pentosa, heksosa, dan asam glukuronat (Fardiaz, 1992).



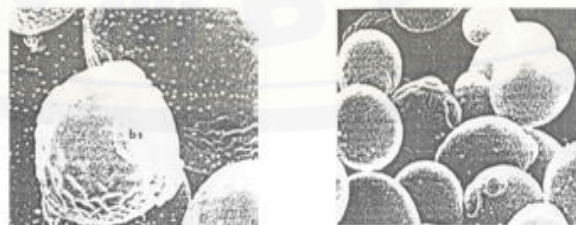
Keterangan:
 BS = bud scar
 ER = endoplasmic reticulum
 G = Golgi
 L = lipid body
 M = mitochondrion
 N = nucleus
 SPB = spindle-pole body
 V = vesicle
 Vac = large central vacuole
 W = wall.

Gambar 2.2 Ultrastruktur sel yeast
 (Sumber: Deacon, 1997)

Dalam kultur yang sama, ukuran dan bentuk sel khamir mungkin berbeda. Hal tersebut disebabkan oleh pengaruh umur sel dan kondisi lingkungan selama pertumbuhan. Sel biakan muda mungkin berbeda bentuknya dari sel biakan tua karena adanya proses ontogeni (perkembangan individu sel).



Gambar 2.3 Perkembangan bentuk sel pada khamir berbentuk lemon
 (*Hanseniaspora*) (Phaff *et al.*, 1968)



Gambar 2.4 Bekas luka (bud scar) pada dinding sel khamir
 (Sumber: Brock & Madigan, 1991)

Sel khamir yang melepaskan tunasnya akan meninggalkan tanda berupa bekas luka (*bud scar*) pada dinding sel (Brock & Madigan,1991). Kegagalan dalam memisahkan tunas baru yang terbentuk secara terus menerus akan menyebabkan dihasilkannya suatu rantai sel khamir yang memanjang menyerupai hifa (benang) yang disebut *pseudohyphae*.



Gambar 2.5 Pembentukan *pseudohyphae* pada khamir.
(Sumber: Brock & Madigan,1991)

2.4 Fisiologi dan Metabolisme Khamir

Khamir tumbuh optimal pada pH 4,0-4,5 (Fardiaz, 1992). Khamir mampu tumbuh normalnya pada interval a_w 0,89-0,94 (Rahayu, 1989). Suhu pertumbuhan khamir pada umumnya hampir sama dengan kapang yakni suhu optimum 25⁰C-30⁰C dan suhu maksimum 35⁰C -47⁰C. Beberapa khamir dapat tumbuh pada suhu 0⁰C (Viljoen *et al.*, 2003).

Saccharomyces cerevisiae memiliki kemampuan untuk memfermentasi berbagai jenis substrat gula diantaranya sukrosa, glukosa, fruktosa, galaktosa manosa, maltosa dan maltotriosa.dan gula pentosa jenis D-xilulase (Umbreit, 1959). Tahap awal penggunaan gula oleh *Saccharomyces cerevisiae* dilakukan dengan dua cara, cara pertama yaitu pemindahan senyawa gula ke dalam membran sel, cara kedua yakni hidrolisis senyawa gula di luar sel dan diikuti dengan pemindahan hasil hidrolisis ke dalam membran sel (Rahayu & Kuswanto,1988).

Berdasarkan sifat metabolismenya khamir dapat dibedakan atas dua kelompok yaitu bersifat fermentatif dan oksidatif (Fardiaz, 1992). Khamir mampu tumbuh pada suasana aerob (oksidatif), namun khamir fermentatif tumbuh pada

suasana anaerob (Jutono, 1972). Khamir genus *Saccharomyces* merupakan khamir fermentatif kuat namun jika terdapat oksigen maka *S. cerevisiae* juga dapat melakukan respirasi dengan mengoksidasi gula menjadi karbondioksida dan air. Kedua sistem tersebut menghasilkan energi meskipun energi yang dihasilkan melalui respirasi lebih tinggi dibandingkan dengan melalui fermentasi (Jarvis, 1978).

2.5 Reproduksi Khamir

Khamir adalah fungi uniseluler yang bereproduksi secara seksual dan aseksual. Secara seksual khamir bereproduksi dengan menghasilkan askospora dan basidiospora. Askospora terdiri atas berbagai bentuk yakni bulat, bentuk gada (*clavate*), bentuk topi (*hat shaped*), bentuk helm (*helmet*), dan bentuk jarum (*needle shaped*). Basidiospora dapat dihasilkan oleh basidium yang tidak berseptum (holobasidium) atau basidium yang berseptum (phragmobasidium). Alat reproduksi seksual khamir tidak ditutupi badan buah (Boekhout dan Phaff, 2003). Secara aseksual khamir bereproduksi dengan cara budding (pertunasan), fission (pembelahan) (Boekhout dan Phaff, 2003), menghasilkan konidia pada sterigma, balistokonidia, blastokonidia, klamidokonidia dan arthrokonidia (Spencer dan Spencer, 1997). Beberapa jenis khamir bersifat *dimorphic* (memiliki dua fase dalam hidupnya) yakni dapat membentuk fase uniseluler (*yeast-phase*) dan fase hifa (*mycelium-phase*) dalam siklus hidupnya yang disebut dengan *yeast-like fungi* (Phaff, 1990)

Terdapat tujuh tipe pertunasan sel khamir berdasarkan posisi pembentukannya diantaranya tipe monopolar, bipolar, multipolar, polar, simpodial, akropetal, basipetal. Tipe monopolar adalah pertunasan yang terjadi pada satu kutub (*Malassezia pachydermatis*). Tipe bipolar adalah pertunasan yang terjadi pada dua kutub (*Hanseniaspora osmophila* dan *Wickerhamia fluorescens*) tipe ini juga merupakan karakteristik khamir apikulat. Tipe multipolar adalah pertunasan pada beberapa tempat permukaan sel (*Saccharomyces cerevisiae*). Tipe polar adalah pertunasan yang terjadi pada bagian dekat kutub sel, umumnya pada dasar yang sempit (*narrow base*), tipe ini dimiliki oleh beberapa jenis

khamir basidiomycetes (*Rhodotorula glutinis*, *R. yarrowii*). Tipe simpodial adalah tipe pertunasan dengan tunas baru muncul di belakang dan berdekatan dengan tempat tunas sebelumnya (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). Tipe akropetal adalah pembentukan tunas suksesif pada suatu rantai dengan bagian termuda pada apeks. Tipe basipetal adalah pembentukan tunas suksesif dengan bagian tertua pada apeks (Gandjaret *al.*, 2006).

2.6 Taksonomi dan Pengelompokkan Khamir

Secara taksonomi khamir termasuk dalam kingdom Eumycota yang terdiri atas filum Ascomycota dan Basidiomycota. Filum Ascomycota terdiri atas tiga kelas yaitu Archiascomycetes, Euascomycetes dan Hemiascomycetes (Kurtzman & Sugiyama, 2001). Kelas Archiascomycetes terdiri atas ordo Pneumocystidales, Neoelectales, Schizosaccharomycetales, Protomycetales, Taphrinales dan khamir anamorfik anggota genus *Saitoella*. Khamir kelas Euascomycetes terdiri atas anggota genus *Endomyces* dan *Oosporidium* (Boekhout & Phaff, 2003). Khamir kelas Hemiascomycetes terdiri atas ordo Saccharomycetales yang memiliki 11 famili, antara lain adalah *Candidaceae*, *Metschnikowiaceae*, dan *Saccharomycetaceae* (Kurtzman & Fell, 1998). Kelompok khamir Ascomycetes membentuk spora seksual (askospora) (Barr, 2001). Dinding sel khamir Ascomycetes adalah tipe bilayer dan bereproduksi secara aseksual dengan pembentukan tunastipe holoblastik (Kurtzman dan Sugiyama, 2001)

Menurut Choudhary dan Johri (2009) khamir filum Basidiomycota memiliki tiga kelas yang terdiri atas yaitu Hymenomycetes, Urediniomycetes dan Ustilaginomycetes (Fellet *al.*, 2001). Kelas Hymenomycetes terdiri atas empat ordo yaitu Tremellales, Trichosporonales, Filobasidiales dan Cystofilobasidiales. Khamir kelas Ustilaginomycetes terdiri atas tiga ordo yaitu Exobasidiomycetidae, Ustilaginomycetidae dan ordo Malsseziales. Khamir kelas Urediniomycetes terdiri atas empat ordo yaitu Agaricostilbum, Microbotryum, Sporidiobolous dan Erythrobasidium (Fell *et al.*, 2000). Khamir Basidiomycetes menghasilkan spora seksual basidiospora yang berbentuk gada disebut dengan basidium (Kurtzman & Fell, 2006). Dinding sel khamir Basidiomycetes adalah

tipe multilayer dan bereproduksi secara aseksual dengan pembentukan tunastipe enteroblastik (Fell *et al.*, 2001). Beberapa genus dari khamir Basidiomycetes juga dapat menghasilkan teliospora. Teliospora adalah spora seksual kelompok khamir Basidiomycetes yang memiliki dinding tebal tempat berlangsungnya kariogami yang menghasilkan basidiospora (Alexopoulos *et al.*, 1996) pada khamir golongan Uredinales dan Ustilaginales (Gandjar *et al.*, 2006).

Kelompok khamir yang belum diketahui fase reproduksi seksualnya disebut khamir anamorfik sedangkan untuk kelompok khamir yang telah diketahui fase reproduksinya disebut khamir teleomorfik. Kelompok khamir anamorfik diklasifikasikan ke dalam kelompok Ascomycetes anamorfik dan kelompok Basidiomycetes anamorfik. Kelompok khamir Ascomycetes anamorfik contohnya genus *Candida*. Kelompok khamir Basidiomycetes anamorfik contohnya *Rhodotorula F.C.* Harrison. Kelompok khamir teleomorfik dapat diklasifikasikan ke dalam kelompok Ascomycetes teleomorfik dan Basidiomycetes teleomorfik. Kelompok khamir Ascomycetes teleomorfik contohnya genus *Debaryomyces* Lodder, Kreger-van Rij Nom Cons. dan *Pichia E.C* Hansen emend. Kurtzman. Kelompok khamir basidiomycetes teleomorfik contohnya *Filobasidium olive* (Yarrow, 1998).

Khamir dapat dikelompokkan berdasarkan sifat pertumbuhannya pada bahan pangan, meliputi :

1. “*Film yeast*” : *Pichia*, *Hansenulla*, *Debaryomyces*, *Candida* dan *Trichosperon* umumnya tumbuh pada permukaan makanan yang bersifat asam, seperti sauerkraut dan *pickles*, mampu mengoksidasi asam organik, dan toleran terhadap asam.
2. “*Apiculate*” atau “*lemon shape yeast*”: *Sacchomycodes*, *Hanseniospora*, *Nadsodia* dan *Kloeckera* adalah kelompok khamir yang merusak fermentasi wine dan menyebabkan *off-flavor*, menghasilkan alkohol rendah dan asam volatil tinggi.
3. “*Osmofilic yeast*” adalah jenis khamir yang tahan terhadap kadar gula dan garam tinggi. Syarat tumbuhnya yaitu rentang a_w 0.62 – 0.65 dan ada pula sekitar 0.78. Kelompok *Osmofilic yeast* diantaranya: *Saccharomyces rouxii*

dan *Saccharomyces mellis*. Hampir semua jenis khamir yang bersifat “*salt tolerant*” umumnya merupakan “*film yeast*” diantaranya: *Torulopsis*, *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Trichosporon*.

4. “*Alcohol yeast*” adalah jenis khamir yang digunakan untuk fermentasi alkohol, yang paling sering digunakan adalah genus *Saccharomyces*.
5. “*Lactose fermenting yeast*” adalah jenis khamir yang mampu melakukan fermentasi laktosa pada susu contohnya *Saccharomyces fragilis* dan *Saccharomyces lactis*.
6. “*Food dan feed yeast*” adalah jenis khamir yang digunakan untuk bahan pangan pakan, umumnya dalam bentuk protein sel tunggal (PST) (Sari, 2010).

2.7 Respon Sel Khamir Terhadap Cekaman Etanol

Selama proses fermentasi, konsentrasi etanol akan meningkat sehingga mengurangi viabilitas sel dengan mempengaruhi integritas membran sel serta fungsi normalnya (Piper, 1995). Etanol yang terakumulasi dalam konsentrasi tinggi, berkumpul di gugus kepala fosfolipid yang berdampak pada senyawa kimia-fisik dan fungsi membran sel selanjutnya menghambat pertumbuhan sel dan pada akhirnya sel mengalami kematian.

Sel khamir telah mengembangkan mekanisme untuk mengatasi berbagai jenis kerusakan yang disebabkan karena peningkatan konsentrasi etanol diantaranya : ketidakstabilan dan kerusakan membran plasma direspon dengan peningkatan ergosterol (Daum *et al.*, 1998) serta produksi asam amino (Hu *et al.*, 2005) dan inositol (Kelley *et al.*, 1988) yang meningkatkan stabilitas membran; ekspresi gen yang menstabilkan dan/atau memperbaiki protein yang rusak seperti trehalose dan protein *heat shock* (HSPs) (Swan & Watson, 1998), ekspresi gen untuk produksi protein finger zine (MacPherson *et al.*, 2006) dan peran *alcohol sensitive ring/protein* PHD finger I (AsrIp) (Betz *et al.*, 2004) juga berperan dalam toleransi alkohol pada *S. cerevisiae*.

Beberapa penelitian telah mengkaji mengenai tingkat toleransi alkohol oleh khamir. Gray (1941) telah mengelompokkan berbagai jenis khamir berdasarkan tingkat toleran alkohol menjadi 6 grup diantaranya: Grup 1 terdiri

atas khamir dengan toleransi alkohol paling rendah ($\pm 4-5\%$ alkohol) yakni *Yeast 32*, *Willia anrmala* Steuber, *Black Yeast*. Guilliermond dan Tanner (1920) menyebutkan bahwa no.20 adalah khamir genus *Willia*. Grup 2 terdiri atas khamir dengan tingkat alkohol rendah (lebih efisien dibanding grup 1 dan sangat sesuai untuk dimanfaatkan dalam industri) yakni *Saccharomyce cerevisiae* Hansen Strain S.C, Strain A, *Zygosaccharomyces soja*, *Torula lactosa* Kluuyver. Grup 3 terdiri atas khamir dengan toleransi alkohol $\pm 6-7\%$ yakni *Saccharomyces cerevisiae* Hansen Strain D.C.L, *Torula cremoris*, *Schizosaccharomyces mellacei* Jorgensen. Grup 4 terdiri atas khamir dengan toleransi alkohol rata-rata ($\pm 8-9\%$) yakni *Saccharomyces ellipsoideus* Hansen, *Yeast 30*, *Schizosaccharomyces pombe* Lindner, *Yeast 21*, *Saccharomyces cerevisiae* Hansen Strain Rasse XII, *Saccharomyces cerevisiae* Hansen Strain L.3, *Yeast 23*, *Schizosaccharomyces vordermani*. Grup 5 terdiri atas khamir dengan toleransi alkohol tinggi ($\pm 10\%$) yakni *Saccharomyces cerevisiae* Hansen Strain R, *Saccharomyces cerevisiae* Hansen Strain Rasse M. Grup 6 terdiri atas khamir dengan toleransi alkohol paling tinggi ($\pm 11\%$) yakni *Saccharomyces cerevisiae* Hansen Strain Brown-Forman.

Penelitian lain juga dilakukan oleh Zuehlke (2015) yakni uji *survival* khamir dengan menambahkan konsentrasi alkohol 13%, 15%, dan 17% pada media dan diperoleh strain yang mampu *survive* yakni strain *Z. baili* (ZB2, ZB6, W3) dan *S. cerevisiae* (EC1118). Tao (2011) melakukan identifikasi khamir toleran alkohol dalam produksi bioetanol. Uji ini dilakukan dengan penambahan alkohol 14% dan didapatkan strain Y-1 (dari Jiuqu) yang diidentifikasi merupakan strain *Pichia anomala*.

2.8 Kit API 20C untuk Identifikasi Khamir

Kit API 20C merupakan alat identifikasi khamir yang terdiri atas strip plastik dengan 20 miniatur tabung atau sumur (Carson, 2001). API 20C yang mengandung 20 sumuran berisireagen kering yang terdiri atas : 1 sumuran pertama berisi kontrol negatif, 1 sumuran kedua berisi glukosa sebagai kontrol positif dan sisa 18 sumuran yang mengandung substrat gula untuk 18 uji biokimia. 20 sumuran tersebut diantaranya berisi : Aucun (0), D-Glukosa (GLU), Gliserol

(GLY), Kalsium 2-keto-Glukonate (2KG), L-Arabinosa (ARA), D-Xilosa (XYL), Adonitol (ADO), XiliTol (XLT), D-Galaktosa (GAL), Inositol (INO), D-Sorbitol (SOR), Metil-D-Glukopiranosida (MDG), N-Asetil-Glukosamin (NAG), D-Cellobiosa (CEL), D-Laktosa (LAC), D-Maltosa (MAL), D-Sakarosa (SAC), D-Trehalosa (TRE), D-Melezitosa (MLZ), D-Raffinosa (RAF).

2.9 Identifikasi Molekuler pada Khamir (*Sequencing* DNA khamir dengan primer ITS)

2.9.1 Metode *Sequencing* DNA

Terdapat dua metode yang digunakan untuk mengurutkan molekul DNA yaitu metode Maxam-Gilbert dan metode Sanger. Kedua metode tersebut menghasilkan fragmen DNA dengan panjang bervariasi dengan perbedaan panjang satu basa menggunakan teknik gel poliakrilamid pendenaturasi (*denaturing polyacrylamide gels*). Gel pendenaturasi memisahkan untai ganda DNA menjadi DNA untai tunggal selama proses elektroforesis. Pemisahan kedua untai DNA disebabkan karena gel pendenaturasi mengandung urea dan adanya perlakuan suhu tinggi saat proses elektroforesis.

1. Metode Maxam-Gilbert

Metode Maxam-Gilbert adalah metode yang didasarkan atas pemotongan DNA pada daerah spesifik menggunakan zat kimiawi selain enzim.

2. Metode Sanger.

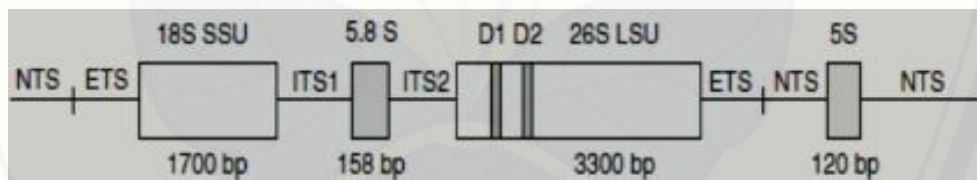
Metode ini dilakukan dengan reaksi *cycle sequencing* pada empat tabung terpisah yang masing-masing berisi semua pereaksi yang dibutuhkan. Setiap tabung diberi tanda, A jika yang ditambahkan adalah ddATP, G jika ddGTP, C jika ddCTP dan T jika ddTTP. Setelah reaksi *cycle sequencing* selesai, keempat hasil reaksi *dirunning* pada gel elektroforesis sehingga fragmen DNA yang dihasilkan akan terpisah. Urutan basa DNA dapat ditentukan dengan mengurutkan fragmen DNA yang muncul dimulai dari yang paling bawah (paling pendek). Fragmen DNA dapat divisualisasi karena primer telah dilabel dengan radioaktif atau *fluorescent*. Adapun pada teknik lain, pelabelan dilakukan pada ddNTP (dideoksinukleotida) (Triwibowo, 2005) dengan pemberian *fluorescent*. Fragmen

DNA yang muncul dipisahkan berdasarkan ukurannya melalui kapiler kemudian detektor laser akan membaca label yang berfluoresen dari setiap fragmen (Moat *et al.*, 2002).

2.9.2 ITS Region

Perbandingan *sequence* pada daerah gen penyandi ribosomal RNA (rRNA), atau ribosomal DNA (rDNA) dapat digunakan sebagai karakter untuk identifikasi molekuler suatu organisme karena memiliki daerah sekuen yang terkonservasi maupun variabel. Keuntungan penggunaan gen pengkode rDNA adalah bersifat universal (terdapat pada semua makhluk hidup), berasal dari nenek moyang yang sama dan mudah *disequencing* karena menggunakan primer yang bersifat universal (dapat digunakan pada semua makhluk hidup) (Kurtzman & Fell, 2006).

Gen pengkode rDNA terdiri atas daerah *coding* dan *non-coding*. Daerah *coding* rDNA terdiri atas *small sub unit* (SSU rDNA 18S), gen 5.8S, gen 5S dan *large sub unit* (LSU rDNA 28S). Daerah *non-coding* terdiri atas *Internal Transcribed Spacer* (ITS1 dan ITS2) dan *Intergenic Spacer* (IGS) (James dan Stratford, 2003).

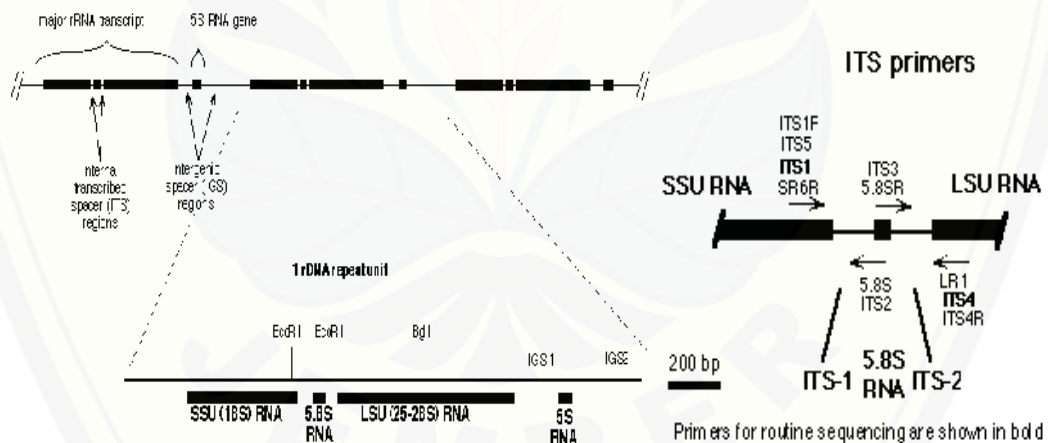


Gambar 2.6. Daerah ribosomal DNA
(Sumber : Deak, 2008)

Menurut James dan Stratford (2003), umumnya daerah ITS dan D1/D2 gen LSU yang digunakan untuk identifikasi khamir hingga tingkat spesies (Kurtzman & Blanz, 1998). Gen LSU rDNA 28S memiliki variasi nukleotida yang lebih tinggi daripada gen SSU rDNA 18S dan 5.8S. Menurut Daniel dan Meyer (2003), identifikasi khamir hingga tingkat spesies dapat menggunakan analisis sekuen daerah D1/D2 gen LSU rRNA karena memiliki sekuen daerah yang bervariasi pada spesies khamir yang berbeda. Namun menurut Fell *et al.* (2000) analisis daerah D1/D2 LSU tidak dapat digunakan untuk membedakan spesies khamir

karena sekuen D1/D2 LSU yang identik ternyata ditemukan pada beberapa spesies yang berkerabat dekat.

Daerah ITS rDNA (daerah *non-coding*) terdiri atas ITS1 dan ITS2 yang menggapit gen 5,8S (Fujita *et al.*, 2001). Daerah ITS memiliki variasi sekuen yang lebih tinggi dari daerah D1/D2 LSU dikarenakan ITS adalah daerah *noncoding* yang memiliki laju mutasi lebih tinggi dari daerah *coding* (SSU dan LSU) (James *et al.*, 1996) sehingga variasi urutan nukleotida yang dimiliki sangat tinggi antarspesies (Ciardo *et al.*, 2006). Menurut James dan Stradford (2003), daerah ITS rDNA bahkan dapat digunakan untuk identifikasi spesies khamir yang berkerabat sangat dekat (*closely related species*). Sugita *et al.* (1999) melaporkan bahwa isolat khamir yang memiliki persentase DNA *relatedness* sebesar 80-100% memiliki homologi sekuen daerah ITS yang tinggi (99-100%), oleh karena itu analisis *sequence* ITS dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies khamir. Sekuen daerah ITS khamir dapat diakses dengan mudah pada database DNA internasional.



Gambar 2.7. Pemetaan Sekuen Primer ITS dan *Sequencing Nuclear Ribosomal RNA*

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Center for Development of Advance Science and Technology (CDAST) Universitas Jember. Waktu pelaksanaan dimulai pada bulan Januari 2016 hingga bulan Desember 2016.

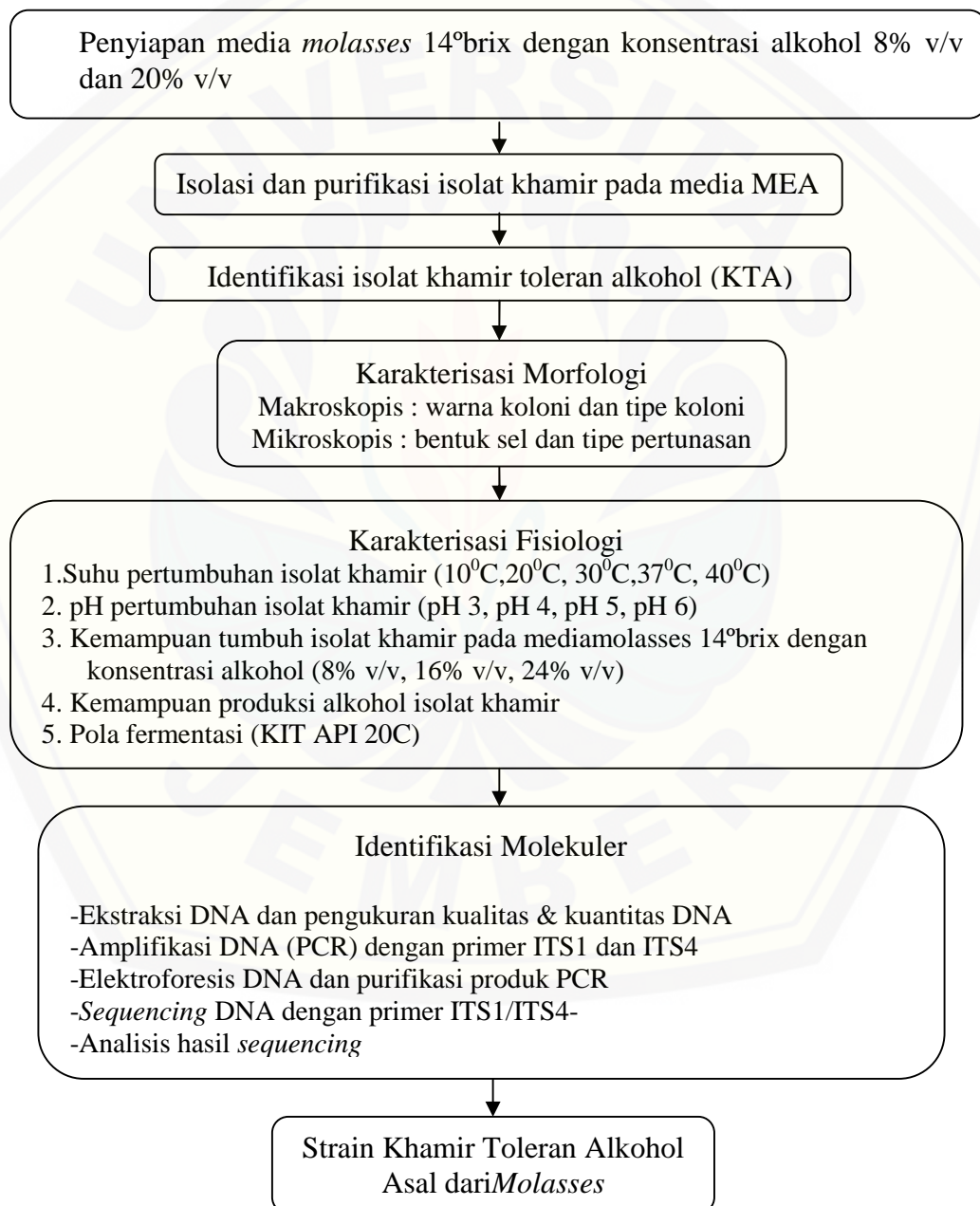
3.2 Alat dan Bahan

Alat utama yang digunakan dalam penelitian ini meliputi spektrofotometer UV-Vis, *Laminar Air Flow* (LAF), *UV illuminator*, mesin elektroforesis, mesin PCR *master mix*, sentrifuge, inkubator, autoclave, refraktometer, pH meter, rotary shaker, oven, mikroskop, cawan conway dengan penutupnya, *Gel Documentation System* (BIO-RAD), Gel Doc XR, program blastn, program bioedit dan program pendukung lainnya. Alat pendukung yang digunakan dalam penelitian ini meliputi ose cemplong, petridish steril, tabung reaksi, erlenmeyer, *hot plate*, labu ukur, vortex, pengaduk, mikropipet, tip, gelas ukur, neraca analitis, beaker glass, gelas obyek, gelas penutup, bunsen, alat dokumentasi, tabung eppendorf, sisir (*comb-well*), dan alat pendukung laboratorium lainnya.

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel *molasses* (tetes tebu) yang diperoleh dari Pabrik Gula Jatiroto-Jember dari musim giling tahun 2015. Bahan pendukung yang digunakan dalam penelitian ini meliputi air, akuades, alkohol 70%, variasi konsentrasi alkohol (8%, 16%, 20%, 24%), media MEB dan MEA, cat kristal violet, mordan, minyak imersi, NaCl, Na₂CO₃ jenuh, K₂Cr₂O₇, larutan standart (0,1 ml alkohol 96%/ 10ml aquades), KIT API 20C, NaOH, buffer PCR, dNTPs, primer ITS1 dan ITS4, MgCl₂, Taq DNA polymerase, ddH₂O, *Presto Mini gDNA Yeast Kit (Geneaid)*, *KAPA Taq HotStart Buffer*, *KAPA Taq HotStart DNA Polymerase*, RNase, gel agarosa 1%, loading dye, DNA Ladder 100bp (*DNA marker*), EtBr, buffer TBE 1x, etanol 70%, *Zymo DNA Clean & Concentrator KitTM*, spirtus, aluminium foil, dan tissue.

3.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan terdiri atas 5 tahapan diantaranya tahap penyiapan *molasses* dengan konsentrasi alkohol 8% v/v dan 20% v/v untuk isolasi khamir toleran alkohol (KTA), tahap isolasi dan purifikasi KTA, tahap karakterisasi morfologi KTA, tahap karakterisasi fisiologis KTA, dan tahap identifikasi molekular KTA. Tahapan penelitian ditunjukkan pada Gambar 3.1



Gambar 3.1 Tahapan Penelitian

3.3.1 Persiapan *Molasses* (Media Isolasi Khamir Toleran Alkohol (KTA))

Sampel *molasses* (tetes tebu) diperoleh dari Pabrik Gula Jatiroto-Jember dari musim giling tahun 2015. Pada perlakuan awal *molasses* kental diencerkan hingga mencapai 14° brix kemudian diberi perlakuan pemberian konsentrasi alkohol 8% v/v dan 20% v/v untuk isolasi khamir KTA.

3.3.2 Isolasi dan Purifikasi Khamir Toleran Alkohol (KTA)

Khamir diisolasi dari *molasses* 14° brix dengan penambahan alkohol 8% v/v dan 20% v/v kemudian dibiarkan pada suhu ruang selama 7 hari. Isolasi khamir KTA dengan 0,1 ml *molasses* disebarakan diatas media MEA yang telah memadat selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Isolat yang tumbuh kemudian dimurnikan menggunakan media MEA metode agar goresan sinambung sehingga diperoleh kultur tunggal. Masing masing isolat yang telah murni tersebut diremajakan pada agar miring dan disimpan pada lemari pendingin suhu $\pm 10^{\circ}\text{C}$ sebagai kultur stok (simpanan). Media MEA dibuat dengan menambahkan 2% bacto agar pada medium MEB. Media MEB dibuat dengan cara melarutkan 3g ekstrak yeast , 3 g ekstrak maltosa , 5 g pepton, dan 10 g glukosa.

3.3.3 Karakterisasi Morfologi Khamir KTA

Pengamatan morfologi khamir meliputi karakter makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis khamir meliputi warna koloni dan tipe koloni serta pengamatan mikroskopis meliputi bentuk sel dan tipe pertunasan sel khamir. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan mewarnai sel khamir yang telah difiksasi di atas gelas objek menggunakan pewarna kristal violet. Selanjutnya gelas objek yang telah diberi cat kristal violet dialiri dengan akuades kemudian ditunggu hingga agak kering dan diberi cat mordan. Setelah cat mordan telah mengering maka dialiri dengan akuades dan dikeringanginkan. Sel khamir diamati menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000x dengan pemberian sedikit minyak imersi. Pengamatan bentuk sel dan *budding* sel khamir dilakukan pada isolat khamir usia biakan muda (± 24 jam), usia biakan dewasa (± 48 jam).

3.3.4 Karakterisasi Fisiologi Khamir KTA

Karakterisasi fisiologi khamir KTA meliputi berbagai tahapan uji diantaranya uji suhu pertumbuhan, uji pH pertumbuhan, uji survival alkohol, uji kemampuan produksi alkohol dan uji pola fermentasi pada KIT API 20C. Uji suhu pertumbuhan isolat khamir dilakukan dengan cara diambil dua ose isolat khamir lalu dihomogenkan dengan 1 ml larfis (kultur kerja) kemudian dipipet sebanyak 10 μ l dan dimasukkan ke dalam media 1 ml MEB steril kemudian masing-masing diinkubasi pada suhu 10°C, 20°C, 30°C, 37°C, 40°C yang masing-masing diinkubasi selama 0, 8, 24, 32, dan 48 jam. Pada selang interval waktu tersebut dilakukan pengukuran nilai absorbansi isolat khamir yang tumbuh pada media MEB menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm.

Uji pH pertumbuhan isolat khamir dilakukan dengan cara diambil dua ose isolat khamir lalu dihomogenkan dengan 1 ml larfis (kultur kerja) kemudian dipipet sebanyak 10 μ l dan dimasukkan ke dalam media 1 ml MEB steril masing-masing dengan variasi pH media yakni pH 3, pH 4, pH 5, dan pH 6 lalu diinkubasi pada suhu 30°C selama 0, 8, 24, 32, dan 48 jam. Pada selang interval waktu tersebut dilakukan pengukuran nilai absorbansi isolat khamir yang tumbuh pada media MEB menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm.

Uji kemampuan tumbuh khamir KTA terhadap konsentrasi alkohol dilakukan dengan menggunakan media *molasses* 14^obrix yang telah disterilkan sebanyak 3 ml ditambah alkohol dengan masing-masing konsentrasi 8%, 16%, dan 24% v/v. Selanjutnya *molasses* tersebut diinokulasikan dengan 0,3 ml kultur kerja kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam. Selanjutnya dilakukan plating sebanyak 1 ml dari *molasses* hasil inkubasi tiap interval jam tersebut menggunakan metode pour plate (media MEA) dengan 7 seri pengenceran. Sebagai kontrol dilakukan plating jam 0 dengan menginokulasikan 0,3 ml kultur kerja pada 3 ml larutan fisiologis kemudian plating sebanyak 1 ml dengan metode pour (media MEA) menggunakan 6 seri pengenceran. Populasi tumbuh sel khamir diamati dan dibandingkan antar konsentrasi alkohol. Kemampuan tumbuh isolat khamir dihitung dengan

menggunakan rumus : % tumbuh = $N_t/N_0 \times 100\%$ (N_t = populasi tumbuh khamir pada waktu ke-t ; N_0 = populasi tumbuh khamir pada waktu ke-0).

Uji kemampuan produksi alkohol isolat khamir dilakukan dengan mengukur kadar alkohol yang dihasilkan oleh isolat khamir yang telah diinokulasikan pada media *molasses* dengan konsentrasi alkohol 8%v/v, 16%v/v, 24%v/v menggunakan alat berupa cawan conway (Conway,1939). Metode cawan conway dilakukan dengan mereaksikan sebanyak 1 ml sampel (yang telah diinkubasi selama 24 dan 48 jam) dengan 1 ml Na_2CO_3 jenuh dalam cawan conway dan dibiarkan selama ± 2 jam pada suhu ruang ($\pm 30^\circ\text{C}$). Alkohol bebas yang dihasilkan dari reaksi tersebut akan menguap dan diperangkap oleh $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (2 ml) yang menyebabkan perubahan warna $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ dari warna kuning menjadi warna biru kehijauan. Pengukuran secara kualitatif produksi alkohol diketahui dengan intensitas perubahan warna $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Pengukuran kadar alkohol secara kuantitatif dilakukan pada selang interval waktu inkubasi yang telah disebutkan dengan mengamati nilai absorbansi pada 605 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Untuk menghitung kadar alkohol dibuat kurva standar sehingga diperoleh persamaan garis linier $y = ax + b$, nilai y adalah nilai absorbansi dan x adalah kadar alkohol sampel. Larutan A (Na_2CO_3 jenuh) disiapkan dengan cara menimbang sebanyak 10 gram Na_2CO_3 jenuh kemudian ditera dengan 50 ml akuades. Larutan B ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) dibuat dengan cara melarutkan sebanyak 0,74 gram $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ke dalam 30 ml akuades. Ditambah 56 ml H_2SO_4 pekat kemudian diaduk secara perlahan menggunakan magnetic stirer lalu diencerkan dengan akuades hingga volume 100 ml.

Uji pola fermentasi isolat khamir dilakukan dengan menggunakan kit API 20C. Uji kit API 20C dilakukan dengan mengambil isolat (dari kultur stock) menggunakan ose cemplong steril kemudian diinokulasikan kedalam medium suspensi. Suspensi khamir ditujukan untuk mengisi sumuran uji dengan menginokulasikan 100 μl suspensi khamir ke dalam sumuran (jangan sampai melebihi batas sumuran). Pertumbuhan masing-masing isolat diamati pada 48 dan 72 jam. Perubahan kekeruhan yang terjadi pada sumuran diamati pada tiap interval jam dan dibandingkan dengan sumuran kontrol, jika sumuran lebih keruh

dibandingkan dengan sumuran kontrol maka hasilnya positif (mampu mengasimilasi substrat gula) sedangkan jika sumuran tidak menunjukkan adanya kekeruhan (sama dengan sumuran kontrol) maka hasilnya negatif (tidak mampu mengasimilasi substrat gula). Dari hasil kit API 20C akan didapatkan 7 biokode yang kemudian akan dianalisa menggunakan program *ATBTM instrument/ mini API/ apiwebTM* untuk memperoleh jenis isolat khamir yang kemungkinan mampu teridentifikasi.

3.3.5 Identifikasi Molekuler Khamir KTA (Sekuensing ITS Region – ITS 1 dan ITS 4)

Identifikasi molekuler khamir KTA dilakukan dalam 5 tahap diantaranya tahap ekstraksidan tahap pengukuran kualitas dan kuantitas DNA khamir KTA, tahap amplifikasi DNA khamir dengan metode PCR menggunakan primer ITS1 dan ITS4, tahap elektroforesis DNA khamir hasil amplifikasi PCR dan visualisasi dan tahap purifikasi produk PCR. Tahapan berikutnya adalah tahap *sequencing* DNA khamir menggunakan primer ITS1/ITS4, dan tahap analisis hasil *sequencing* menggunakan program blastn.

Tahap isolasi DNA khamir dilakukan menggunakan *Presto Mini gDNA Yeast Kit (Geneaid)*. *PrestoTM Mini gDNA Yeast Kit (Geneaid)* merupakan metode presipitasi DNA menggunakan reagen yang sederhana dan ramah lingkungan untuk mengisolasi molekul genom berukuran tinggi, mitokondria atau DNA virus dari *Saccharomyces cerevisiae* dan berbagai macam jenis khamir dan spesies jamur. Metode *Presto Mini gDNA Yeast Kit (Geneaid)* menggunakan buffer sorbitol yang ketika dikombinasikan dengan *zymolase* atau *lyticase* akan mampu secara efisien melisiskan dinding sel khamir atau spesies jamur lain yang mengandung kitin dan polisakarida. Prosedur protokol adalah sebagai berikut: 1) Tahap pemanenan sel dengan memindahkan suspensi sel khamir (hingga 2×10^8) ke tabung mikrosentrifugasi berukuran 1,5 ml kemudian suspensi sel khamir disentrifugasi selama 10 menit pada 5000 xg. Selanjutnya supernatan dibuang dan pelet diresuspensi menggunakan 600 μ l buffer sorbitol. Ditambahkan 200 U *lyticase* atau *zymolase* kemudian diinkubasi pada suhu 30⁰C selama 30 menit. Selanjutnya campuran larutan tersebut disentrifugasi selama 10 menit pada 2000

xg untuk memanen spheroplast kemudian supernatan dibuang. 2) Tahap lisis sel dilakukan dengan penambahan 300 μ l buffer sel lisis kemudian dilakukan resuspensi pelet sel dengan cara pipeting selanjutnya diinkubasi pada suhu 60⁰C minimal selama 10 menit untuk memastikan sampel telah bebas kontaminasi. (catatan : selama inkubasi, tabung diinvertir setiap 3 menit). Untuk tahap penghilangan RNA, setelah perlakuan inkubasi suhu 60⁰C, ditambahkan 5 μ l RNase (50 mg/ml) untuk membersihkan sampel kemudian dihomogenkan menggunakan vortex dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. 3) Tahap penghilangan protein dilakukan dengan penambahan 100 μ l buffer penghilang protein pada sampel kemudian segera divortex selama 10 detik. Setelah itu sampel disentrifugasi pada 14-16.000 xg selama 3 menit untuk memperoleh pelet protein yang tebal, berwarna putih (catatan : pada tahap sentriugasi pelet yang terbentuk harus tebal, berwarna putih. Jika pelet kurang tebal maka diinkubasi on ice selama 5 menit kemudian disentrifugasi pada 14- 16.000 xg selama 3 menit). 4) Tahap presipitasi DNA dilakukan dengan memindahkan supernatan dari proses sentrifugasi sebelumnya (dari tahap 3) ke tabung mikrosentrifuga berukuran 1,5 ml. Selanjutnya ditambahkan 300 μ l isopropanol dan diinvertir dengan hati-hati sebanyak 20 kali. Kemudian sampel disentrifugasi pada 14-16.000 x g selama 5 menit lalu supernatan dibuang dengan hati-hati dan ditambahkan 300 μ l 70% etanol 70% untuk membersihkan pelet. Sampel disentrifugasi kembali pada 14-16.000 x g selama 3 menit kemudian supernatan dibuang dan pelet dikeringanginkan selama 10 menit (catatan : jangan mengeringkan pelet DNA menggunakan vakum sentrifuga dan hindari mengeringanginkan pelet DNA terlalu lama). 5) Tahap rehidrasi DNA dilakukan dengan penambahan 50-100 μ l buffer hidrasi DNA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) atau ddH₂O kemudian diinkubasi suhu 60⁰C selama 10 menit untuk melarutkan pelet DNA.

Tahap pengukuran kualitas dan kuantitas DNA khamir dilakukan menggunakan spektrofotometer. Spektrofotometer dikalibrasi menggunakan 100 μ l akuabides sebagai larutan blanko. Sampel DNA sebanyak 30 μ l dimasukkan kedalam kuvet. Pengukuran dilakukan terhadap absorbansi DNA khamir pada panjang gelombang 260 nm. Kualitas atau tingkat kemurnian DNA yang baik

adalah 1,8-2,0 (1,8 A₂₆₀ 2,0). Konsentrasi DNA kemudian dihitung menggunakan rumus berdasarkan Seidman & Moore (2000), yaitu: Konsentrasi DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) = OD₂₆₀ x 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ x faktor pengenceran.

Tahap Amplifikasi (PCR) dengan primer ITS-1 (primer forward) 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' dan ITS-4 (primer reverse) 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White *et al.*, 1990) dilakukan dengan mereaksikan sebanyak 25 μl yang terdiri atas 5 μl 5X KAPA Taq HotStart Buffer (1x concentrated), 1,5 μl 25 mM MgCl₂, 0,5 μl 10 mM dNTP Mix, 0,5-1,25 μl 10 mM primer forward (ITS1), 0,5-1,25 μl 10 mM primer reverse (ITS4), 0,1 μl 5 U/ μl KAPA Taq HotStart DNA Polymerase, 2 μL DNA sampel (5 ng μL^{-1}), ditambahkan dengan ddH₂O hingga volume reaksi mencapai 25 μl . Campuran tersebut kemudian dimasukkan ke dalam tabung PCR 0.2 ml dan disentrifugasi 13.000 rpm selama 1 menit. Amplifikasi dilakukan tahap predenaturasi pada suhu 95°C selama 3 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus yang masing-masing terdiri atas 3 tahap: tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, tahap annealing pada suhu 55°C selama 30 detik, tahap extension pada suhu 72°C selama 2 menit. Tahap terakhir adalah tahap post extension pada suhu 72°C selama 5 menit. Produk PCR kemudian dapat disimpan pada suhu 4°C.

Tahap elektroforesis dilakukan yakni dengan menyiapkan gel agarosa TBE (1%). Tahap awal yakni harus disiapkan 10x TBE stok (10,8 g Tris Base; 5,5 g boric acid; 0,93 g EDTA; ditambahkan dH₂O sebanyak 100 ml dan diukur pH 8) kemudian disiapkan 1x TBE (dari 10x stok TBE) yang artinya untuk 1 ml dari 10x stok harus ditambah 9 ml dari dH₂O. Ditambahkan 0,6 g gel agarose sampai volume akhir 40 ml, dipanaskan larutan hingga mendidih untuk melarutkan agarose atau dalam microwave. Setelah mendidih kemudian ditambahkan 1 μl EtBr dalam campuran agarose lalu dihomogenkan. Ditunggu hingga campuran agarose hangat kuku setelah itu dituangkan agarose pada cetakan kemudian dipasang sumuran. Setelah agarose memadat, sumuran diambil dan diletakkan agarose pada alat *running* kemudian agarose direndam dengan buffer TBE hingga menggenangi gel. Sebanyak 2 μl loading dye dicampurkan dengan 1 μl DNA produk PCR kemudian dihomogenkan dengan cara pipeting dan dimasukkan ke

dalam sumur (well) yang terdapat dalam gel (agarosa 1%). Penentuan panjang fragmen daerah ITS dilakukan dengan menggunakan DNA marker ukuran 100 bp (DNA ladder) sebanyak 1 µl yang dicampurkan dengan 1 µl *loading dye* lalu dimasukkan pada sumur pertama. Waktu running selama 60 menit dengan tegangan 50 V. Tahap visualisasi gel hasil elektroforesis diamati menggunakan *Gel Documentation System* (BIO-RAD) kemudian didokumentasikan menggunakan program *Gel Doc XR*.

Tahap purifikasi produk PCR dilakukan menggunakan *Zymo DNA Clean & Concentrator KitTM* (*Zymo Research*). *Zymo DNA Clean & Concentrator KitTM* mampu mempurifikasi hingga 5 µg DNA dari proses PCR, enzim *endonuklease*, reaksi modifikasi DNA, reaksi penanda isotop/ *fluorescence*, dan lain-lain. Produk ini memfasilitasi penghilangan *DNA polymerase*, modifikasi enzim, *RNA polymerase*, *ligase*, *kinase*, *nuklease*, *phosphatase*, dan restriksi *endonuklease* seperti dNTP bebas dan hal serupa lainnya termasuk radiolabel dan derivat *fluorescent*. Kit ini secara khusus diformulasi dengan buffer pengikat DNA pada sampel memindahkan campuran larutan ke kolom *Zymo-SpinTM* yang telah tersedia. Tidak diperlukan adanya pendenaturasi organik ataupun kloroform. Berikut merupakan protokol penggunaan *Zymo DNA Clean & Concentrator KitTM*: 1) Preparasi buffer dilakukan dengan penambahan 24 ml 100% etanol (26 ml 95% etanol) pada 6 ml buffer pencuci DNA terkonsentrasi. Ditambahkan 96 ml 100% etanol (104 ml 95% etanol) pada 24 ml buffer pencuci DNA terkonsentrasi. 2) Penambahan 2-7 volume buffer pengikat DNA pada tiap volume DNA sampel dalam tabung mikrosentrifugasi berukuran 1,5 ml kemudian dihomogenkan dengan vortex. Berikut merupakan pebandingan volume untuk buffer pengikat DNA (sampel DNA pada berbagai macam aplikasi) : sampel plasmid , DNA genom (> 2kb) (2:1); produk PCR , fragmen DNA (5:1); ssDNA (7:1). 3) Campuran tersebut dipindahkan ke kolom *Zymo-Spin* yang telah tersedia dalam tabung koleksi. 4) Disentrifugasi selama 30 detik kemudian cairan dibuang. 4) Ditambahkan 200 µl buffer pencuci DNA pada kolom lalu disentrifugasi selama 30 detik dan diulangi langkah pencucian tersebut. 5) Ditambahkan 6 µl buffer pengelusi DNA secara langsung ke dalam matrix kolom dan diinkubasi

pada suhu ruang selama 1 menit. Kolom tersebut dipindahkan ke tabung mikrosentrifuga baru kemudian disentrifugasi kembali selama 30 detik untuk mengelusi DNA.

Tahap *sequencing* DNA khamir dilakukan dengan metode *Bi-directional Sequencing* menggunakan primer ITS1-ITS4. Komponen untuk *sequencing* berupa DNA khamir yang telah dipurifikasi serta primer forward-reverse (ITS1-ITS4) dikirim ke Divisi Laboratorium Genetika, P.T Genetika Science Indonesia, Jakarta. *Bi-directional Sequencing* ini juga dikenal dengan *doublex sequencing* yang merupakan metode dimana kedua strand DNA (asal dari plasmid atau produk PCR) *disequencing* secara bersamaan dengan kombinasi primer forward dan primer reverse (ITS1 dan ITS4) yang masing-masing telah dilabeli dengan pewarna yang berbeda saat tahap reaksi *sequencing*. Melalui sistem *sequencing* DNA dengan laser ganda yang otomatis, dua warna *sequencer* DNA dapat dideteksi dan dianalisa keduanya merupakan sekuen forward dan sekuen reverse menggunakan reaksi *bidirectional* dalam paralel. Urutan kerja DNA *sequencing* secara umum yakni mengamplifikasi hasil ekstraksi DNA sampel sebelum disekuen. Untuk mengamplifikasi DNA sample dibutuhkan *DNA polymerase*, nukleotida (dNTP), buffer reaksi, primer dan *thermal cycler*.

Tahap analisis data *sequencing* dilakukan menggunakan program blastn untuk mencari homologi *sequence* terhadap database *sequence* daerah ITS khamir yang telah diketahui. Analisis kesejajaran lokal (*local alignment*) hasil pengurutan DNA dengan data yang ada di *GeneBank* dilakukan dengan program blast (*Basic LocalAlignment Search Tools*) yang disediakan NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) melalui <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> (Mursyidin *et al.*, 2012). Konstruksi pohon filogenetik dengan metode *neighbour-joining* menggunakan program Phydit (*phylogenetik tree*) (Sembiring *et al.*, 2008).

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

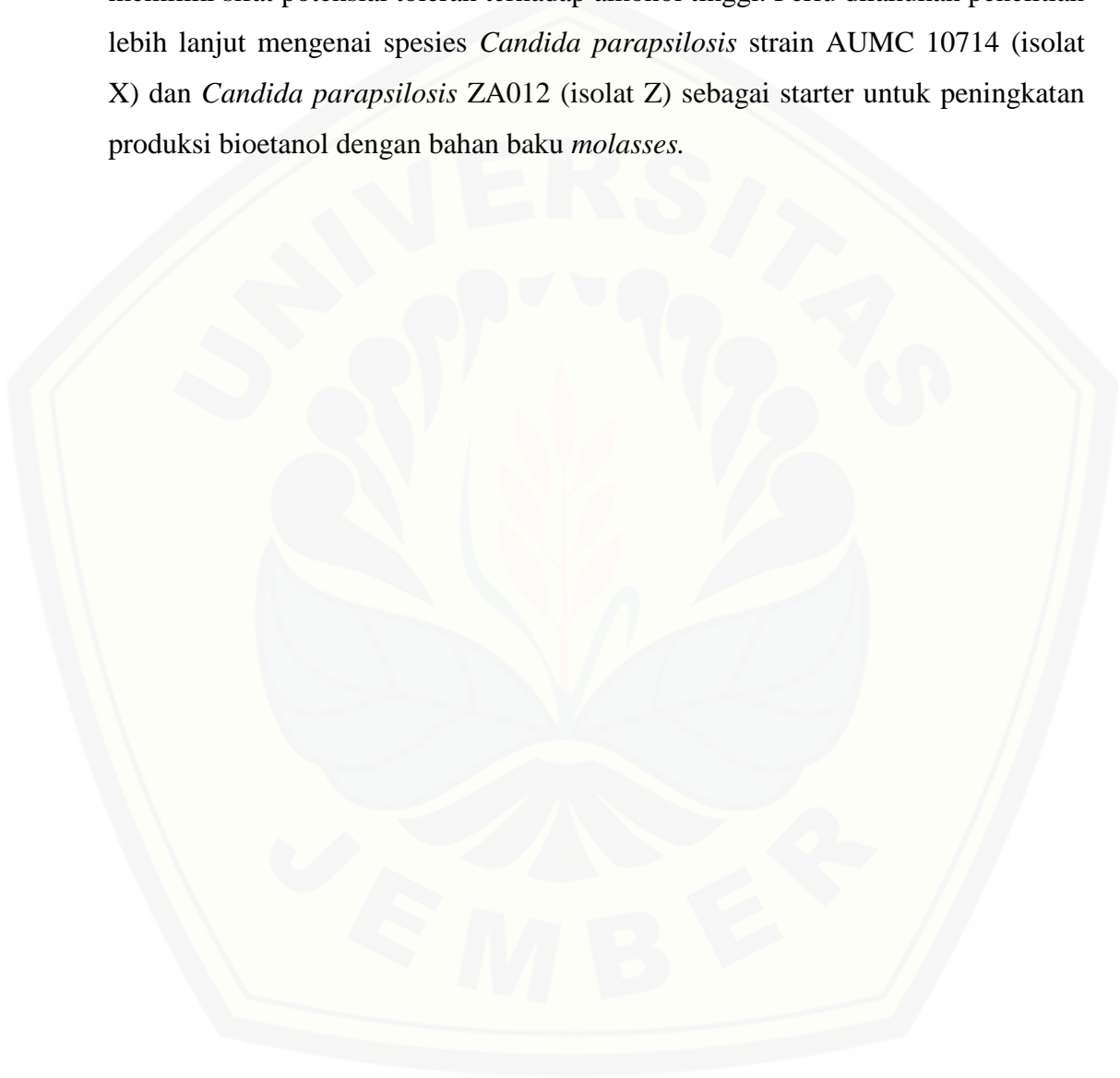
Terdapat tiga isolat khamir (X,Y,Z) yang bersifat potensial toleran alkohol (8% v/v, 16% v/v, 24% v/v). Isolat X memiliki bentuk koloni bulat berwarna putih dengan tepi rata dan bentuk sel oval dengan pertunasan multipolar. Isolat X tumbuh optimal pada suhu 20°C, 30°C, 37°C dengan pH 3 dan pH 4. Isolat X mampu tumbuh pada *molasses* yang mengandung alkohol 8% dengan populasi khamir $3,78 \times 10^7$ cfu/ml dan *molasses* yang mengandung alkohol 16% dengan populasi khamir $3,98 \times 10^7$ cfu/ml dengan lama inkubasi 24 jam serta mampu memproduksi alkohol sebanyak 7% pada *molasses* yang mengandung alkohol 8%. Isolat X teridentifikasi secara fisiologis dengan kit API 20C sebagai *Candida tropicalis* dan teridentifikasi sebagai *Candida parapsilosis* strain AUMC 10714 dengan homologi *sequence* 100%.

Isolat Y memiliki bentuk koloni yang berlendir berwarna putih keruh dan memiliki bentuk sel oval dan berantai diplo atau strepto. Isolat Y tumbuh optimal pada suhu 40°C dengan pH 4. Isolat Y mampu tumbuh pada *molasses* yang mengandung alkohol 8% dengan populasi khamir $2,74 \times 10^7$ cfu/ml serta pada *molasses* yang mengandung alkohol 16% dengan populasi khamir $2,78 \times 10^7$ cfu/ml dengan lama inkubasi 48 jam serta mampu memproduksi alkohol sebanyak 7% pada *molasses* yang mengandung alkohol 8%. Isolat Y teridentifikasi secara fisiologis dengan kit API 20C sebagai *Candida ciferri* dengan 99.9% ID.

Isolat Z memiliki bentuk koloni bulat dengan pinggir berombak dan bentuk sel oval serta pertunasan multipolar. Isolat Z tumbuh optimal pada suhu 40°C dengan pH 4. Isolat Z mampu tumbuh pada *molasses* yang mengandung alkohol 24% dengan populasi khamir $1,22 \times 10^8$ cfu/ml dengan lama inkubasi 24 jam serta mampu memproduksi alkohol sebanyak 7% pada *molasses* yang mengandung alkohol 8%. Isolat Z teridentifikasi secara fisiologis dengan kit API 20C sebagai *Candida tropicalis* dan teridentifikasi sebagai *Candida parapsilosis* ZA012 dengan homologi *sequence* 100%.

5.2 Saran

Hasil isolasi khamir berasal dari bahan baku *molasses* ditemukan isolat X yang teridentifikasi *Candida parapsilosis* strain AUMC 10714 dan isolat Z yang teridentifikasi sebagai spesies *Candida parapsilosis* ZA012 sebagai khamir yang memiliki sifat potensial toleran terhadap alkohol tinggi. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai spesies *Candida parapsilosis* strain AUMC 10714 (isolat X) dan *Candida parapsilosis* ZA012 (isolat Z) sebagai starter untuk peningkatan produksi bioetanol dengan bahan baku *molasses*.



DAFTAR PUSTAKA

- Alexopoulos, C.J., C.W. Mims & M. Blackwell. 1996. *Introductory mycology*. New York: John Wiley & Sons. Inc.
- Amrutkar ,S. M ., Banoth, Linga., Banerjee, U.C. 2013. *One-pot synthesis of (R)-1-(1-naphthyl)ethanol by stereoinversion using Candida parapsilosis*. India :Elsevier (3274–3277).
- Anonim. 2014. *Viticulture & Enology : Candida parapsilosis*. California : University of California, Davis Campus. http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/Candida_parapsilosis.html [Diakses tanggal 28 Januari 2017].
- Andriani, A.N. 1993. *Biodegradasi Minyak Pada Air Buangan Kilang Minyak Dengan Lumpur Aktif*. Surabaya: Jurusan Teknik Lingkungan, FTSP, Institut Teknologi Sepuluh November.
- Bailey, James E., Ollis, David F. 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd edition*. Singapore : McGraw-Hill Book Co.
- Barr, M.E. 2001. *Ascomycota*. Dalam: McLaughlin, D.J., E.G. McLaughlin & P.A. Lemke (eds.). 2001. *The mycota VII Part A : Systematics and evolution*. Berlin: Springer- Verlag 161-177
- Betz, C., Schlenstedt, G., & Bailer, S.M. 2004. *Asr1p, a novel yeast ring / PHD finger protein, signals alcohol stress to the nucleus*. *Journal of Biology and Chemistry* 279, 28174–28181.
- Boekhout, T., & Phaff, H.J. 2003. *Yeast Biodiversity*. Dalam: Boekhout, T. & V. Roberts (eds). 2003. *Yeast in Food: Beneficial and Detrimental Aspects*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited (1-38).
- Brock, T. D., & Madigan, M.T. 1991. *Biology of Microorganism*. Sixth ed. Prentice Hall International, Inc.
- Bulawayo, B., Bvochora, J.M., Muzondo, M.I., Zvauya, R. 1996. *Ethanol production by fermentation of sweet stem sorghum juice using various yeast strains*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (12): 357-360.
- Calderone, R.A. 2002. *Candida and candidiasis*. Washington: ASM Press.
- Carson , J., Wagner, T., Wilson, T., Donachie, L. 2001. *Miniaturized test for computer assisted identification of motile Aeromonas species with an*

improved probability matrix. Dalam: Journal of Applied Microbiology (90):190-200.

Chadha, Venkataraman, Preetha and Padhi. 2016. *Candida parapsilosis: A versatile biocatalyst for organic oxidation-reduction reactions*. India : Laboratory of Bioorganic Chemistry, Department of Biotechnology.

Choudary, D.K. & Johri, B.N. 2009. *Basidiomycetous yeasts : Current status*. Dalam: T. Satyanarayana & G. Kunze. (eds.). 2009. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Berlin: Springer Science + Bussiness Media B.V (19-46).

Ciardo, D.E., G. Schar,E.C., Bottger, M. A., 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.

Conway, E.J. 1939. *Microdiffusion analysis and volumetric error*. London: Crosby Lockwood, p. 435.

Cook, A.H. 1958. *The Chemistry and Biology of Yeast. An Extensive Review of The Classification, Ecology, Cytology, Genetics, Chemical Composition, and Physiology of Yeast*. New York: Academic Press.

Daniel, H.M., & Meyer, W. 2003. *Evaluation of ribosomal DNA and actin gene sequence for the identification of ascomycetous yeasts*. International Journal of Food Microbiology 86: 61-78.

Daum, G., Lees, N.D., Bard, M., Dickson, R. 1998. *Cell biology and molecular biology of lipids of Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 14:1471–1510.

Deacon, Terrence. 1997. *The Symbolic Species*. London: Penguin Press.

Deak, T. 2008. *Handbook of food spoilage yeasts*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press.

Dmytruk, Kostyantyn V., Sibirny,A. A. 2012. *Yeast : Candida famata (Candida flareri)*. Ukraine : Department of Molecular Genetics and Biotechnology, Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences (NAS).

Dwidjoseputro. 2005. *Dasar-dasar mikrobiologi*. Malang: Djambatan.

Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.

- Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Sampaio, J. 2001. *Basidiomyceteous Yeast*. Dalam: McLaughlin & P.A. Lemke (eds) 2001. *The mycota VV Part B: Systematic and evolution*. Tokyo: Springer (1-36).
- Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., Tallman, A. Statzell. 2000. *Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sekuen analysis*. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 50: 1351-1371.
- Fujita, S., Senda, Y., Nakaguchi, S., & 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.
- Furmani, Rita M., dan Ahearn, Donald G. 1983. *Candida ciferrii and Candida chiropterorum Isolated from Clinical Specimens*. *Journal Of Clinical Microbiology* 18 (5): 1252-1255
- Gandjar, I., Sjamsuridzal, W., & Oetari, A. 2006. *Mikologi Dasar dan Terapan*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Gibson, B.R., Lawrence, S.J., Leclaire, J.P., Powell, C.D., Smart, K.A. 2007. *Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling*. *FEMS Microbiol Rev* 31:535–569.
- Gray, D. Willia. 1941. *Studies on the Alcohol Tolerance of Yeasts*. Oxford: Department of Botany, Miami University.
- Guilliermond, A., Tanner, F.W. 1920 *The Yeasts*. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Harahap, H. 2003. *Karya Ilmiah Produksi Alkohol*. <http://library.usu.ac.id/download/ft/tkimia-hamidah.pdf>. Diakses tanggal 1 November 2015.
- Honig. 1963. *Principle of Sugar Technology*, 56-58. New York: Elsevier Publishing Company.
- Hu, C.K., Bai, F.W., An, L.J. 2005. *Protein amino acid composition of plasma membranes affects membrane fluidity and thereby ethanol tolerance in a self-flocculating fusant of Schizosaccharomyces pombe and Saccharomyces cerevisiae*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 21:809–813.
- James, S.A., & Stratford, M. 2003. *Spoilage yeasts with emphasis on the genus Zygosaccharomyces*. Dalam: Boekhout, T., & Robert, V (eds). 2003. *Yeasts*

in food: Beneficial and detrimental aspects. CFC Press, Boca Raton: 171-192.

James, S.A., Collins, M.D., & Roberts, I.N. 1996. *Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera Zygosaccharomyces and Torulaspora*. International Journal of Systematic Bacteriology 46(1): 189-194.

Jarvis, B. 1978. *Methods for Detecting Fungi in Foods and Beverages*. In *Food and Beverage Mycology*. Ed. Beuchat. L.R. pp. 471-504. Wetsport: AVI Publ. Inc.

Jayus, Nurhayati, Piluharto, B. 2014. *Evaluasi dan Optimasi Produksi Bioetanol oleh Saccharomyces cerevisiae Strain ATCC 9763, FNCC 3210 dan Batan pada Substrat Molases Gula Tebu*. Jember: Universitas Jember.

Judoamidjojo, R. Mulyono. 1990. *Biokonversi*. Bogor: Depdikbud. Dirjen Dikti Pusat Abtar Universitas Bioteknologi.

Jutono. 1972. *Dasar-Dasar Mikrobiologi (Untuk Perguruan Tinggi)*. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press.

Kelley, M.J., Bailis, A.M., Henry, S.A., & Carman, G.M. 1988. *Regulation of phospholipid biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae by inositol. Inositol is an inhibitor of phosphatidylserine synthase activity*. Journal of Biology and Chemistry 263: 18078±18085.

Kreger-van Rij, N.J.W. 1987. *The Yeast : A Taxonomy Study*. Amsterdam : Elsevier Science Publisher B.V.

Kumamoto ,C.A .2002. *Candida biofilms*. Curr Opin Microbiol 5:608–611.

Kurtzman, C.P., & Blanz, P.A. 1998. *Ribosomal RNA/DNA sequence comparison for assesing phylogenetic relationships*. Dalam: Kurtzman, C.P. & J.W. Fell. (eds). 1998. *The yeasts: A taxonomic study*. 4rd ed. Amsterdam : Elsevier. 69-74.

Kurtzman, C.P., & Fell, J.W. 1998. *The Yeast A Taxonomy Study*. New York: Elvesier.

Kurtzman, C.P., & Sagiyaama, J. 2001. *Ascomyceteous Yeast and Yeast Like Taxa*. Dalam: Mc. Laughlin, D.J.,E.G. MgLaughlin, P.A . Lemke. Ed. *The Mycota Vol VIIA*. New York: Springer-verlag. Pp179-200.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W. 2006. *Yeast systematics and phylogeny: implications of molecular identification methods for studies in ecology*. In C. Rosa, & G.

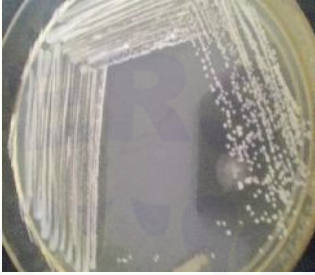





- Péter (Eds.), Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts: The Yeast Handbook (pp. 11-30). New York: Springer.
- Lloyd, D., Morrell, S., Carlsen, H.N., Degn, H., James, P.E.; Rowlands, C.C. 1993. *Effects of growth with ethanol on fermentation and membrane fluidity of Microbiol. Rev.*, Vol 31, No. 5, pp.535-569.
- MacPherson S, Larochelle M. & Turcotte, B. 2006. *A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins*. *Microbiology Molecular Biology Rapid* 70: 583–604.
- Moat, A.G., Foster, J.W., Spector, M.P. 2002. *Microbial physiology*. 4th ed. New York: Wiley-Liss Inc.
- Mursyidin, H. D., & Qurrohman, T. M. 2012. *Kekerabatan Filogenetik 15 Jenis Durian (Durio Spp.) Berdasarkan Analisis Bioinformatik Gen 5.8s Rrna dan ITS Region*. *Jurnal Bioscientiae*. 9, (1), 45-54
- Murtagh, J.E. 1995. *Molasses as a feedstock for Alcohol Production*. <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Vinasse.pdf>
- Nagodawithana, T.W., & K. H. Steinkraus. 1976. *Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of Saccharomyces cerevisiae in "rapid fermentation"*. *Application of Environment Microbiology*. 31:158-162.
- Nakase, Takashi., Fukazawa, Yoshimura., dan Tsuchiya, Takeshi . 1972. *A Comparative Study on Two Forms of Gandida Tropicalis (Cast.) Berkhout*. Japan : Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University. *j. gen. appl. microbiol.*18 (349-363).
- Paturau, M.J. 1969, *By Products of the Cane Sugar Industry, An Introduction Utilization*. Amsterdam : London Elsevier pub.com.
- Phaff, H.J. 1990. *Isolation of yeast from natural resource*. Dalam : Labeda, D.P. (ed.). 1990. *Environmental biotechnology: Isolation of biotechnological organism from nature*. New York: McGraw-Hill Publishing Company 53-77.
- Phaff, H.J., Miller, M.W., Mark, E.M. 1968. *The Life of Yeast*. Massachusett : Harvard Univ. Press, Cambridge.
- Piper, P.W. 1995. *The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap*. *FEMS Microbiol. Lett.* 134, 121-127.

- Rahayu, E.S., & Kuswanto, K.R. 1988. *Teknologi Pengolahan Minuman Beralkohol, PAU Pangan dan Gizi*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Rahayu, K. 1989. *Mikrobiologi Pangan, PAU Pangan*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.
- Rizani, K.Z. 2000. *Pengaruh Konsentrasi Gula Reduksi dan Inokulum (*Saccharomyces cerevisiae*) pada Proses Fermentasi Sari Kulit Nanas (*Ananas comosus L. Merr*) Untuk Produksi Etanol*. Skripsi. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Malang: Universitas Brawijaya.
- Rodrigues, Perrier, Lecomte, Dubreucq, dan Dias. 2016. *Biodiesel production from crude jatropha oil catalyzed by immobilized lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis* in aqueous medium*. Portugal : Elsevier (1224–1229).
- Santra, T., Ghosh, S. K., dan Chakravarty, A. 2014. *Different Methods for DNA Extraction from Yeast-Candida famata Isolated from Toddy*. British Biotechnology Journal 4(1): 64-73.
- Sari, Ni Ketut. 2010. *Pemanfaatan biosolid*. Klaten: Humaniora.
- Seidman, L.A. & C.J. Moore. 2000. *Basic Laboratory Methods for Biotechnology*. London: Prentice Hall.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W. & Azeredo, J. 2011. *Adherence and biofilm formation of non- Candida albicans Candida species*. Trends Microbiol 19, 241–247.
- Sugita, T., Nishikawa, A., Akeda, R., Shinoda, T. 1999. *Identification of medically relevant Trichosporon species based on sequences of Internal Transcribed Spacer regions and construction of a database for Trichosporon identification*. Journal of Clinical Microbiology 37 (6): 1985-1993.
- Swan, T.M., Watson, K. 1998. *Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose*. Australia: School of Biological Science, University of New England, Armidale. FEMS Microbiology Letters 169: 191-197.
- Tao, N., Gao, Y., Liu, Y. 2011. *Isolation and Characterization of a Pichia anomala Strain : A Promising Candidate for Bioethanol Production*. Brazilian Journal of Microbiology (42): 668-675.

- Toharisman, A., & Santoso, H. 1999. *Mutu bahan baku dan preparasi medium. Dalam Pelatihan Teknologi Alkohol*. Pasuruan: Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia.
- Triwibowo, Yuwono. 2005. *Biologi Molekuler*. Jakarta: Erlangga.
- Umbreit, Wayne W. 1959. *Advances In Applied Microbiology, Vol. 1*. New Jersey : Rutgers University.
- Viljoen, B.C., Knox M.A., De jager, H.P., A-Hattingh, L. 2003. *Development of Yeast Population During Processing and Ripening of Blue Veined Chesse*. Department of Microbial, Biochemical and Food Technology: University of Free State. Bloemfontein 9300.
- Washington, J. A. 1981. *Laboratory Procedures in Clinical Microbiology*. New York : Springer- Verlag New York Inc.
- Wayman, M., & Parekh, S.R. 1990. *Biotechnology of Biomass Conversion*. Institute of Biology : Open University Press.
- White, T.J., Bruns, T., Lee,S., Taylor,J. 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes or phylogenetics*. In: *PCR Protocols: a guide to methodes and applications*. (Innis MA, Gefland DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). New York USA. Academic Press : 315-322.
- Yarrow, D. 1998. *Methods for the isolation, maintenance and identification of yeast*. Dalam: Kurtzman, C.P. & Fell, J.W (eds.). 1998. *The Yeasts : A taxonomic study*. 4th ed. Amsterdam: Elsevier (77-100).
- You, K. M., Rosenfield, C.L., Knipple, D.C. 2003. *Ethanol tolerance in the yeast Saccharomyces cerevisiae is dependent on cellular oleic acid content*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1499–1503.
- Yudianto, A., & Djuma'ali, 2007, *Menimbang Kelayakan Bioetanol sebagai Pengganti Bensin*, [http ://www.indobiofuel.com](http://www.indobiofuel.com). Diakses tanggal 1 November 2015.
- Zuehlke, Jesse M., Childs, Bradford C., & Edwards, Charles G. 2015. *Evaluation of Zygosaccharomyces bailii to Metabolize Residual Sugar Present in Partially-Fermented Red Wines*. USA: School of Food Science, Washington State University.

LAMPIRAN-LAMPIRAN

LAMPIRAN A. Purifikasi Isolat Khamir KTA

Nama Isolat	Metode Streak Kuadran	Kultur Stock
Isolat X		
Isolat Y		
Isolat Y		

LAMPIRAN B. Nilai absorbansi dan Persentase Tumbuh Khamir KTA pada Uji Suhu Pertumbuhan Optimal

Isolat	Suhu Inkubasi khamir	Persentase tumbuh khamir berdasarkan nilai OD pada lama inkubasi 8 jam, 24 jam, 32 jam dan 48 jam									
		0 jam	8 jam	24 jam	32 jam	48 jam					
Isolat X	10 ⁰ C		0,21	10,5%	0,131	6,55%	0,273	13,65%	0,177	8,85%	(++)
	20 ⁰ C		0,472	23,6%	0,959	47,95%	0,995	49,75%	1,34	67%	(++++)
	30 ⁰ C	0,192	0,782	39,1%	1,215	60,75%	1,18	59%	1,346	67,3%	(++++)
	37 ⁰ C		0,692	34,6%	0,937	46,85%	1,089	54,45%	1,118	55,9%	(++++)
	40 ⁰ C		0,032	1,6%	0,040	1%	0,373	17,65%	0,394	18,7%	(-)
Isolat Y	10 ⁰ C		0,056	2,8%	0,036	1,8%	0,047	2,35%	0,056	2,8%	(-)
	20 ⁰ C		0,056	2,8%	0,042	2,1%	0,049	2,45%	0,06	3%	(+)
	30 ⁰ C	0,015	0,041	2,05%	0,035	1,75%	0,046	2,3%	0,042	2,1%	(+)
	37 ⁰ C		0,031	1,55%	0,097	4,85%	0,041	2,05%	0,051	2,55%	(+)
	40 ⁰ C		-	-	0,052	2,6%	0,569	28,45%	0,619	30,95%	(++++)
Isolat Z	10 ⁰ C		0,028	1,4%	0,077	3,85%	0,042	2,1%	0,051	2,55%	(-)
	20 ⁰ C		0,051	2,55%	0,088	4,4%	0,075	3,75%	0,715	35,75%	(++)
	30 ⁰ C	0,03	0,073	3,65%	0,276	13,8%	0,73	36,5%	1,224	61,2%	(+++)
	37 ⁰ C		0,075	3,75%	0,08	4%	0,154	7,7%	0,731	36,55%	(++)
	40 ⁰ C		0,064	3,2%	0,515	25,75%	0,857	42,85%	1,532	76,6%	(++++)

Keterangan :

(-) = tidak tumbuh (+) = tumbuh tidak optimal (++) = tumbuh kurang optimal
 (+++) = tumbuh cukup optimal (++++)= tumbuh sangat optimal

LAMPIRAN C. Nilai Absorbansi dan Persentase Tumbuh Khamir KTA pada Uji pH Optimal Pertumbuhan

Isolat	pH Inkubasi khamir	Persentase tumbuh khamir berdasarkan nilai OD pada lama inkubasi 8 jam, 24 jam, 32 jam dan 48 jam									
		0 jam	8 jam	24 jam	32 jam	48 jam					
Isolat X	3	0,115	0,16	11,42%	0,61	43,57%	0,902	51,28%	0,718	64,42%	(++++)
	4	0,115	0,224	17,23%	0,546	42%	1,044	80,30%	1,222	94%	(+++++)
	5	0,089	0,299	10,67%	0,896	32%	1,056	37,71%	1,298	46,35%	(+++)
	6	0,153	0,254	11,54%	0,931	42,3%	1,158	52,63%	1,333	60,59%	(++++)
Isolat Y	3	0,019	0,06	4,28%	0,037	2,64%	0,036	2,57%	0,036	2,57%	(+)
	4	0,029	0,034	2,6%	0,034	2,6%	0,042	3,23%	0,044	3,38%	(++)
	5	0,043	0,032	1,142%	0,032	1,142%	0,049	1,75%	0,016	0,57%	(-)
	6	0,035	0,038	1,72%	0,035	1,59%	0,068	3,09%	0,043	1,95%	(-)
Isolat Z	3	0,038	0,034	2,42%	0,065	4,64%	0,258	18,42%	0,645	46,07%	(+++)
	4	0,039	0,033	2,53%	0,156	12%	0,493	37,92%	1,033	79,46%	(++++)
	5	0,037	0,033	1,17%	0,196	7%	0,513	18,3%	0,952	34%	(+++)
	6	0,043	0,205	9,31%	0,591	26,86%	0,614	27,90%	0,67	30,45%	(+++)

Keterangan :

(-) = tidak tumbuh

(+) = tumbuh tidak optimal

(++) = tumbuh kurang optimal

(+++)= tumbuh cukup optimal

(++++)= tumbuh sangat optimal

Keterangan : Prosentase (%) kemampuan tumbuh khamir dihitung dengan rumus

$$\% \text{ populasi khamir} = [(OD \text{ sampel} - OD \text{ blanko}) / OD \text{ blanko}] \times 100\%$$

(OD = *Optical Density*/ Nilai Absorbansi)

Contoh :

- Uji suhu pertumbuhan

OD blanko = 0,020

- Prosentase populasi khamir isolat X pada suhu 30°C dengan waktu inkubasi 8 jam

$$\% \text{ populasi khamir} = [(OD \text{ sampel} - OD \text{ blanko}) / OD \text{ blanko}] \times 100\%$$

OD sampel= 0,802 , maka $[(0,802 - 0,020) / 0,020] \times 100\% = 39,1\%$

- Uji pH pertumbuhan







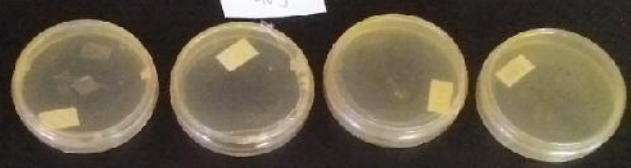
OD blanko (pH 3= 0,014); (pH 4= 0,013); (pH 5= 0,028); (pH 6= 0,022)








- Prosentase populasi khamir isolat X dengan inkubasi suhu 30°C pada media MEB pH 4 dengan waktu inkubasi 8 jam








$$\% \text{ populasi khamir} = [(OD \text{ sampel} - OD \text{ blanko}) / OD \text{ blanko}] \times 100\%$$

OD sampel= 0,237 , maka $[(0,237 - 0,013) / 0,013] \times 100\% = (0,224 / 0,013) \times 100\% = 17,23\%$

LAMPIRAN D. Kemampuan Tumbuh Isolat Khamir X,Y,Z terhadap Konsentrasi Alkohol 8%, 16%, 24%

Isolat khamir	Perlakuan Konsentrasi Alkohol pada Media Pertumbuhan Khamir pada lama inkubasi 24 jam dan 48 jam	Populasi tumbuh khamir pada media MEA dengan perlakuan konsentrasi alkohol 8%, 16% dan 24% pada lama inkubasi 24 jam dan 48 jam (Pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7})
X	Jam ke 0	
	8% (24 jam)	
	8% (48 jam)	
	16% (24 jam)	
	16% (48 jam)	
	24% (24 jam)	
	24% (48 jam)	

Isolat khamir	Perlakuan Konsentrasi Alkohol pada Media Pertumbuhan Khamir pada lama inkubasi 24 jam dan 48 jam	Populasi tumbuh khamir pada media MEA dengan perlakuan konsentrasi alkohol 8%, 16% dan 24% pada lama inkubasi 24 jam dan 48 jam (Pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7})
	Jam ke 0	
Y	8% (24 jam)	
	8% (48 jam)	
	16% (24 jam)	
	16% (48 jam)	
	24% (24 jam)	
	24% (48 jam)	

Isolat khamir	Perlakuan Konsentrasi Alkohol pada Media Pertumbuhan Khamir pada lama inkubasi 24 jam dan 48 jam	Populasi tumbuh khamir pada media MEA dengan perlakuan konsentrasi alkohol 8%, 16% dan 24% pada lama inkubasi 24 jam dan 48 jam (Pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7})
Z	Jam ke 0	
	8% (24 jam)	
	8% (48 jam)	
	16% (24 jam)	
	16% (48 jam)	
	24% (24 jam)	
	24% (48 jam)	

LAMPIRAN E. Populasi Khamir Selama Inkubasi 24 jam dan 48 jam pada Media Molasses dengan Konsentrasi Alkohol 8%v/v, 16% v/v dan 24% v/v.

Isolat khamir dengan perlakuan konsentrasi alkohol pada media pertumbuhan	Populasi tumbuh khamir (cfu/ml) dan persentase kemampuan tumbuh khamir (%) dengan perlakuan penambahan konsentrasi alkohol 8%v/v, 16%v/v, 24%v/v pada media tumbuh (molasses 14 ^o brix)										
	0 jam		cfu/ml	24 jam		cfu/ml	% kemampuan tumbuh	48 jam		cfu/ml	% kemampuan tumbuh
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶		10 ⁻⁴	10 ⁻⁵			10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		
Isolat X 8%	60	53	1,02x10 ⁸	340	76	3,78x10 ⁷	37%	78	2	0,72x10 ⁵	7,1%
16%				375	63	3,98x10 ⁷	39%	11	4	0,13x10 ⁷	1,27%
24%				43	33	0,69x10 ⁷	6,7%	4	2	0,05x10 ⁷	0,49%
Isolat Y 8%	49	35	0,76x10 ⁸	225	18	2,20x10 ⁷	28%	300	2	2,74x10 ⁷	36%
16%				184	123	2,79x10 ⁷	36%	203	103	2,78x10 ⁷	36%
24%				4	4	0,07x10 ⁷	0,9%	63	59	1,1x10 ⁷	14%
Isolat Z 8%	71	63	1,21x10 ⁸	(10 ⁻⁵) 51	(10 ⁻⁶) 38	0,8x10 ⁸	66%	36	30	0,6x10 ⁷	4,9%
16%				105	90	1,77x10 ⁸	146%	25	2	0,18x10 ⁷	1,48%
24%				76	59	1,22x10 ⁸	100%	21	3	0,21x10 ⁸	1,7%

Keterangan : Prosentase (%) kemampuan tumbuh khamir dihitung dengan rumus

$$\% \text{ tumbuh} = N_t/N_0 \times 100\%$$

(N_t = populasi tumbuh khamir pada waktu ke-t ; N_0 = populasi tumbuh khamir pada waktu ke-0)

Contoh:

- Prosentase (%) kemampuan tumbuh khamir isolat X pada molasses konsentrasi 8% waktu inkubasi 24 jam

* (dihitung dahulu nilai cfu/ml khamir isolat X pada jam ke 0 (N_0))

$$(60 + 53) / [(1 \times 1) + (1 \times 0,1)] \times 10^{-6} \text{ (seri pengenceran terbesar)} = 113 / 1,1 \times 10^{-6} = 1,02 \times 10^8$$

*Prosentase (%) kemampuan tumbuh khamir isolat X pada molasses konsentrasi 8% waktu inkubasi 24 jam

$$(340 + 76) / 1,1 \times 10^{-5} \text{ (seri pengenceran terbesar)} = 452 / 1,1 \times 10^{-5} = 3,78 \times 10^7$$

$$\% \text{ tumbuh} = N_t/N_0 \times 100\%$$

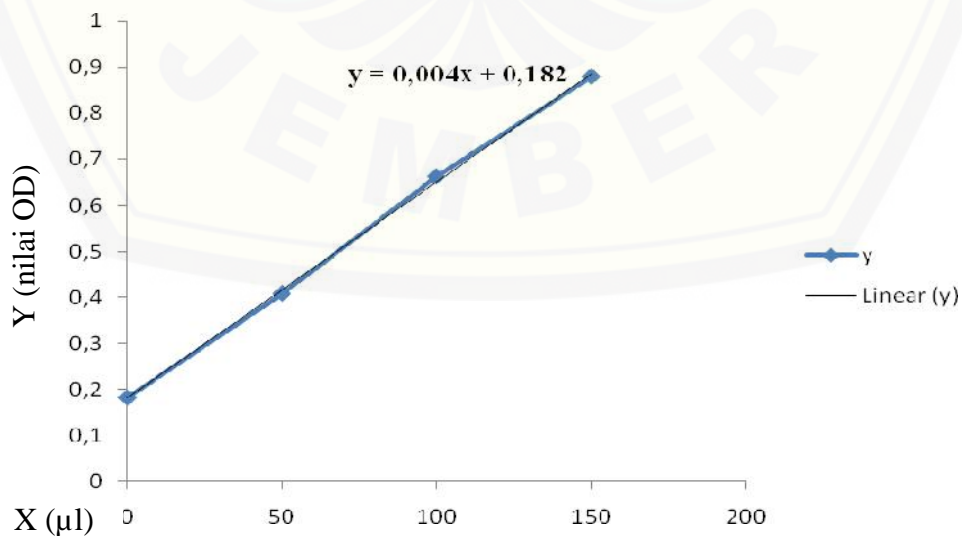
$$(3,78 \times 10^7 (N_t) / 1,02 \times 10^8 (N_0)) \times 100\% = 37\%$$

LAMPIRAN F. KEMAMPUAN PRODUKSI ALKOHOL KHAMIR KTA

F.1. Nilai Absorbansi Larutan K₂Cr₂O₇ + Alkohol Bebas yang Dilepaskan oleh Isolat Khamir pada Media *Molasses* Selama Waktu Inkubasi 24 jam dan 48 jam

Isolat khamir	Perlakuan konsentrasi alkohol yang ditambahkan pada media pertumbuhan khamir	Nilai absorbansi isolat khamir pada lama waktu inkubasi khamir jam ke..	
		24 jam	48 jam
X	8%	0,782	0,795
	16%	0,765	0,786
	24%	0,766	0,778
Y	8%	0,785	0,794
	16%	0,790	0,789
	24%	0,753	0,793
Z	8%	0,798	0,785
	16%	0,786	0,788
	24%	0,779	0,752



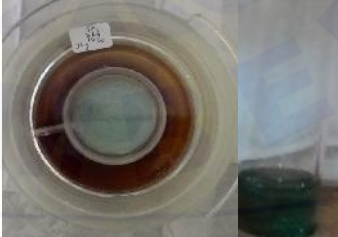

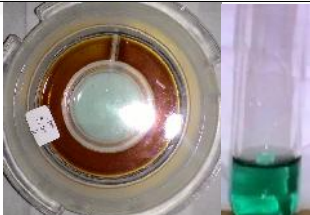

F.2 Kurva Standart Alkohol




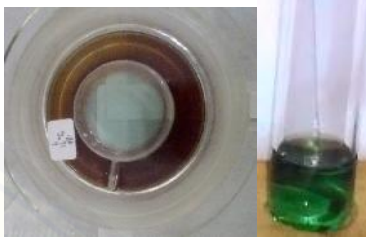


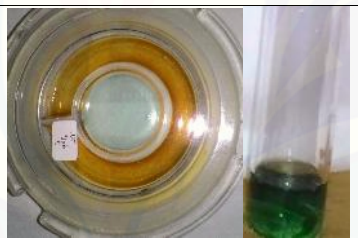
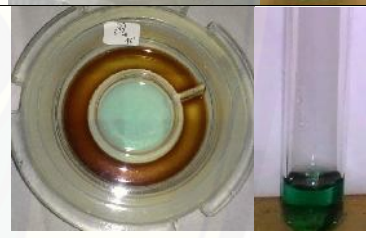






F.3 Kadar Alkohol Isolat Khamir X,Y,Z Selama Waktu Inkubasi 24 jam dan 48 jam

Nilai Kadar Alkohol (%)					
Isolat khamir	Perlakuan Alkohol	Jumlah alkohol (μ l) dan kadar alkohol (%) pada lama waktu inkubasi			
		24 jam		48 jam	
X	8%	150 μ l	15%	153,25 μ l	15,3%
	16%	145,75 μ l	14,6%	151 μ l	15,1%
	24%	146 μ l	14,6%	149 μ l	14,9%
Y	8%	150,75 μ l	15,1%	153 μ l	15,3%
	16%	152 μ l	15,2%	151,75 μ l	15,2%
	24%	142,75 μ l	14,3%	152,75 μ l	15,3%
Z	8%	154 μ l	15,4%	150,75 μ l	15,1%
	16%	151 μ l	15,1%	151,5 μ l	15,2%
	24%	149,25 μ l	14,9%	142,5 μ l	14,3%

F.4 Uji Produksi Alkohol Isolat X,Y,Z dengan Metode Cawan Conway

Isolat	Konsentrasi Alkohol	Gambar	
		24 jam	48 jam
X	8%		
	16%		
	24%		

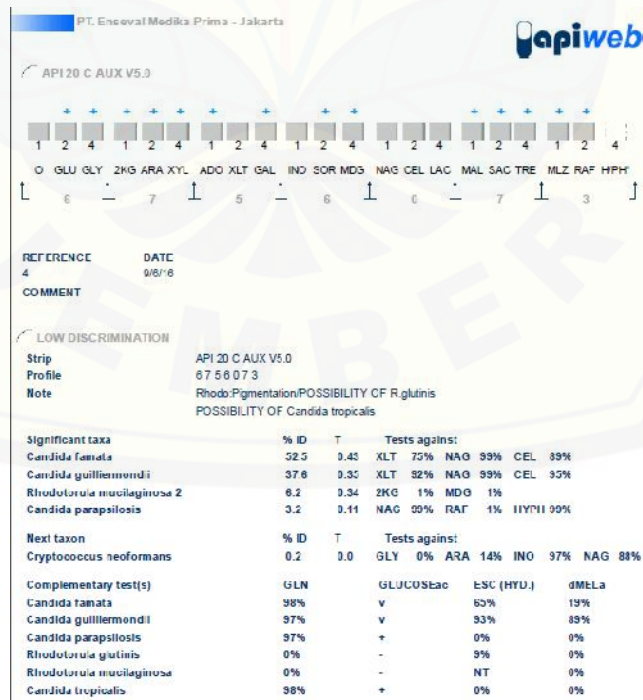
Y	8%		
	16%		
	24%		
Z	8%		
	16%		
	24%		

LAMPIRAN G. Uji kit API 20C Isolat X,Y,Z Selama Inkubasi 72 jam

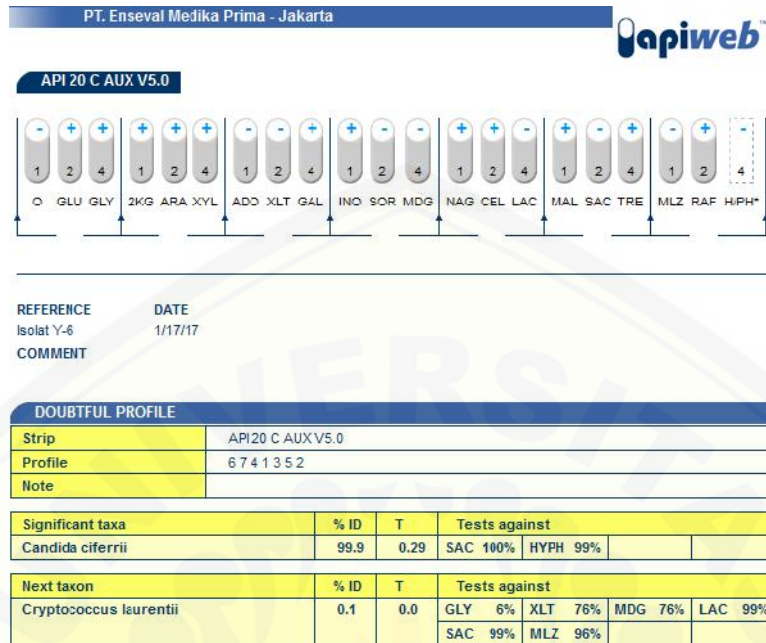


LAMPIRAN G.1. Hasil Analisis Apiweb

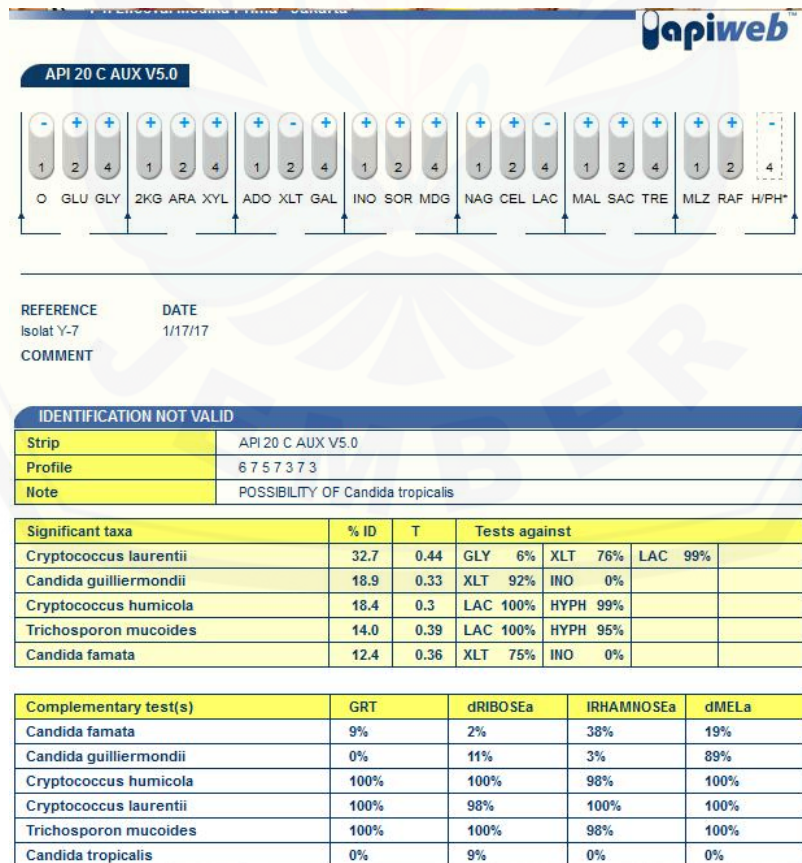
1. Hasil Apiweb Isolat X



2. Hasil Apiweb Isolat Y



3. Hasil Apiweb Isolat Z



LAMPIRAN H. Analisis blast Hasil Sequencing Isolat X Dan Z Menggunakan Primer ITS1-ITS4

1. Hasil blast Isolat X (*Candida parapsilosis* strain AUMC 10714)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Candida parapsilosis strain AUMC 10714 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal trans	922	922	100%	0.0	100%	KX376268.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Candida parapsilosis strain AUMC 10220 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal trans	922	922	100%	0.0	100%	KU255846.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Candida parapsilosis isolate ZB012 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcriber	921	990	99%	0.0	100%	GQ280303.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Candida parapsilosis strain AUMC 9171 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal trans	917	917	100%	0.0	99%	KU200441.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Candida parapsilosis isolate ZA017 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcriber	917	917	100%	0.0	99%	GQ280289.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Candida parapsilosis genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete	917	917	99%	0.0	99%	AB109224.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Candida parapsilosis strain AUMC 8880 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribos	915	915	99%	0.0	99%	KU176112.1

2. Hasil blast Isolat Z (*Candida parapsilosis* ZA012)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Candida parapsilosis isolate ZA012 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe	944	944	100%	0.0	100%	FJ662412.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Candida parapsilosis strain AUMC 6904 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal trans	940	940	99%	0.0	100%	KU095857.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Candida parapsilosis isolate ZA033 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe	939	939	100%	0.0	99%	FJ662414.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Candida parapsilosis isolate ZA039 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe	937	937	100%	0.0	99%	FJ662416.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Candida parapsilosis strain DMic 134410 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tran	935	935	99%	0.0	99%	KX833099.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Candida parapsilosis culture-collection CBS:2193 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequi	933	933	99%	0.0	99%	KY102320.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Candida parapsilosis culture-collection CBS:6318 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequi	933	933	99%	0.0	99%	KY102319.1