

## Keragaman Jenis Khamir Penghasil Etanol yang Diisolasi dari Makanan Fermentasi di Kepulauan Riau

### (Diversity of Ethanol Producing Yeasts Isolated from Fermented Foods in Riau Islands)

I Nyoman Sumerta & Atit Kanti

InaCC, Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI  
Jl. Raya Bogor Jakarta Km 46, Cibinong 16911, Bogor  
Email: atityeast@gmail.com

Memasukkan: April 2016, Diterima: Agustus 2016

#### ABSTRACT

Information on genetic diversity of fermentative yeast which produce ethanol is very crucial in developing biofuel production in Indonesia. Research on ethanol producing yeasts is interest of many scientist. The objective of study was to reveal yeast diversity in Indonesian fermented foods that able to produce ethanol. The sample of fermented foods were collected in the traditional market in Karimun Besar Island, Kepulauan Riau. Yeast isolation was performed using serial dilution with direct plating and enrichment culture with glucose as carbon source. Fifteen of isolates were isolated and identified by amplification of D1/D2 region LSU 26S rDNA. Its ethanol production characteristic was analyzed base on fermentation activity and measurement with gas chromatography for ethanol content. The result revealed that 8 yeast species were found belong to Ascomycetous and grouped into 5 clades which are able to produce ethanol. The highest ethanol production was obtained by *Saccharomyces cerevisiae* Y15Kr107 (3.53%) followed by *Torulaspora delbrueckii* Y15Kr104 (1.63%), *Saccharomyces cerevisiae* Y15Kr093 (1.58%), *Candida glabrata* Y15Kr110 (1.4%), *Torulaspora delbrueckii* Y15Kr103 (1.29%), *Candida glabrata* Y15Kr108 (1%), *Torulaspora globosa* Y15Kr094 (0.92%), *Kodamaea ohmeri* Y15Kr096 (0.61%), and *Pichia kudriavzevii* Y15Kr106 (0.31%) Y15Kr105 (0.21%) Y15Kr109 (0.16%). Other yeasts strains did not produce ethanol but may play different role in fermentation process.

**Key words:** yeast, fermented food, ethanol, Kepulauan Riau

#### ABSTRAK

Informasi tentang keragaman genetik khamir penghasil etanol di Indonesia sangat penting untuk mengembangkan bioenergi di Indonesia. Penelitian khamir penghasil etanol menarik bagi para peneliti. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengungkapkan jenis khamir yang ada pada makanan fermentasi di Indonesia yang mampu menghasilkan etanol. Sampel makanan fermentasi diperoleh dari pasar tradisional Pulau Karimun Besar, Provinsi Kepulauan Riau. Isolasi khamir dilakukan dengan penanaman langsung melalui pengenceran dan menggunakan media pengayaan dari glukosa sebagai sumber karbon. Sebanyak 15 isolat diisolasi dan diidentifikasi melalui amplifikasi daerah D1/D2 LSU 26S rDNA. Karakteristik penghasil etanolnya dianalisis melalui aktivitas fermentasi dan kadar etanolnya diuji menggunakan kromatografi gas. Hasil yang diperoleh yaitu 8 jenis khamir anggota Ascomycetes yang dikelompokkan ke dalam 5 *clade* mampu menghasilkan etanol. Isolat khamir yang mampu menghasilkan etanol paling tinggi yaitu *Saccharomyces cerevisiae* Y15Kr107 (3,53%) diikuti oleh *Torulaspora delbrueckii* Y15Kr104 (1,63%), *Saccharomyces cerevisiae* Y15Kr093 (1,58%), *Candida glabrata* Y15Kr110 (1,4%), *Torulaspora delbrueckii* Y15Kr103 (1,29%), *Candida glabrata* Y15Kr108 (1%), *Torulaspora globosa* Y15Kr094 (0,92%), *Kodamaea ohmeri* Y15Kr096 (0,61%), dan *Pichia kudriavzevii* Y15Kr106 (0,31%); Y15Kr105 (0,21%); Y15Kr109 (0,16%). Sementara isolat khamir lainnya tidak menghasilkan etanol namun mungkin memiliki peran yang berbeda dalam proses fermentasi.

#### PENDAHULUAN

Sejak ratusan tahun, khamir telah dimanfaatkan sebagai *starter* untuk membuat berbagai jenis makanan dan minuman fermentasi beralkohol (Steensels *et al.* 2014) seperti *wine*, bir, tuak, dan tapai. Khamir dalam proses fermentasi

makanan dan minuman berperan mendegradasi substrat untuk membentuk struktur, tekstur serta aroma yang dapat menambah nilai gizi (Jespersen 2003; Aidoo *et al.* 2006; Buenrostro-Figueroa *et al.* 2012; Bourdichon *et al.* 2012; Carrau *et al.* 2015). Peran dari masing-masing jenis khamir pada proses fermentasi merupakan

salah satu pengetahuan untuk membangun sektor industri dan energi. Khamir dari makanan fermentasi pada sektor industri dapat dimanfaatkan sebagai pengembang rasa, pendegradasi busa, enzim, karoten, dan vitamin (Aidoo *et al.* 2006). Sementara di sektor energi, khamir diproyeksikan untuk pengembangan energi terbarukan seperti bioetanol atau biofuel (Basso *et al.* 2008; Buijs *et al.* 2013; Nielsen *et al.* 2013).

Bioetanol merupakan salah satu energi alternatif yang menjanjikan dalam menghadapi krisis energi dimasa depan. Didukung dengan ketersediaan bahan organik seperti selulosa yang melimpah menarik minat peneliti dalam mengembangkan penelitian bioetanol (Olsson & Hahn-Hagerdal 1996; Kuhad *et al.* (2011). Selulosa mampu difermentasi langsung oleh khamir melalui beberapa pendekatan sains (Yanase *et al.* 2010). Karakteristik tersebut membuat khamir sangat potensial untuk produksi etanol. Selain itu, khamir relatif toleran terhadap etanol yang dihasilkan dari pada mikroorganisme lain (D'Amore *et al.* 1990; Dung *et al.* 2012; de Oliva-Neto *et al.* 2013). *Saccharomyces cerevisiae* merupakan salah satu jenis khamir penghasil etanol yang intensif diteliti. Bahkan rekayasa genetik pada *S. cerevisiae* sudah banyak dilakukan untuk meningkatkan produksi atau menghilangkan faktor-faktor yang dapat menurunkan produksi etanol selama fermentasi (Heux *et al.* 2006; Kuhad *et al.* 2011; Yamada *et al.* 2011).

Pemanfaatan khamir penghasil bioetanol untuk sumber energi masa depan telah sukses dilakukan. Seperti yang dilakukan di Brazil, produksi etanol melalui fermentasi khamir pada tebu dapat memenuhi 30-40% kebutuhan energi negara tersebut (Dorfler & Amorim 2007; Basso *et al.* 2008; Kurtzman *et al.* 2011). Hal tersebut menjadikan Brazil sebagai negara penghasil dan pengeksport bioetanol terbesar di dunia (Basso *et al.* 2008; de Oliva-Neto *et al.* 2013). Penelitian mengenai bioetanol di Indonesia sudah beberapa kali dilakukan dalam bentuk *pilot plant*. Seperti dalam mengkaji potensi khamir lokal untuk menghasilkan etanol dari berbagai jenis substrat potensial. Substrat lokal yang sudah diteliti dengan memanfaatkan khamir lokal antara lain umbi *Canna edulis* (Putri & Sukandar 2008); tepung umbi gadung (Hartono & Pagarra 2011); ampas kasar kecap (Putri &

Ardyati 2013); jerami padi (Hayuningtyas *et al.* 2014); umbi singkong (Hawusiwa *et al.* 2015). Pengetahuan potensi tersebut dapat menambah khasanah sumber daya alternatif dalam pembuatan bioetanol.

Pada dasarnya potensi khamir sebagai penghasil etanol di Indonesia sudah cukup banyak diteliti melalui pemanfaatan beberapa substrat alternatif. Namun, secara umum jenis khamir yang dipergunakan masih terbatas pada satu jenis yaitu *S. cerevisiae* atau konsorsium ragi yang diperjualbelikan di pasar. Oleh karena itu, melalui penelitian ini diharapkan dapat menambah khasanah pengetahuan masyarakat Indonesia terkait jenis-jenis khamir lokal yang mampu menghasilkan etanol.

Pada penelitian ini makanan fermentasi lokal Indonesia menjadi target sampel dalam mengisolasi jenis khamir penghasil etanol. Secara umum makanan fermentasi tersebut dibuat melalui industri rumahan yang belum menerapkan standar baku proses produksi sehingga komposisi khamir bervariasi. Sejauh ini khamir dari makanan dan minuman fermentasi beralkohol di Indonesia beberapa telah diidentifikasi seperti pada tapai singkong, peuyeum, oncom dari Jawa Barat (Saono *et al.* 1974), laru dari Nusa Tenggara Timur (Rahmansyah & Kanti 1999), dan brem Bali (Sujaya *et al.* 2004). Namun dalam penelitian ini, sampel makanan fermentasi diperoleh dari pulau terluar Indonesia yaitu Pulau Karimun Besar, Provinsi Kepulauan Riau. Daerah tersebut merupakan daerah perbatasan Semenanjung Malaya yang memiliki banyak jenis makanan fermentasi namun belum pernah diteliti dan dikaji kemampuannya dalam menghasilkan etanol.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Pengambilan sampel dilakukan pada bulan Maret-April 2015 di Pulau Karimun Besar, Batam, Provinsi Kepulauan Riau. Lokasi titik pengambilan sampel dilakukan di pasar tradisional setempat yaitu pada Pasar Bukit Tembak (N: 1° 1' 14", E: 103° 23' 6"), Pasar Maimun (N: 0° 59' 51", E: 103° 25' 13"), dan Pasar Mitra Raya (N: 1° 7' 13", E: 104° 2' 34"). Jenis sampel yang dikoleksi berupa makanan fermentasi tradisional yaitu terasi, tapai ketan, tapai singkong, ragi, dan cincalok.

Isolasi sampel dilakukan di Laboratorium Biosistemik Mikrob, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Teknik isolasi dilakukan melalui dua metode. Metode pertama melalui teknik pengenceran sampel yang ditanam pada media isolasi. Media isolasi yang dipergunakan yaitu RBCA (*Rose Bengal Chloramphenicol Agar*) 32 g/L (Oxoid CM0549) dan PDA (*Potato Dextrose Agar*) 40 g/L (Oxoid CM0139)+*chloramphenicol* 1 g/L. Metode kedua yaitu sampel ditumbuhkan pada media pengayaan dengan komposisi *Yeast Nitrogen Base* (Difco 239210) 26,8 g/L, glukosa 10 g/L, *sodium propionate* 2 g/L (Sigma 1001924056), *chloramphenicol* 1,2 g/L (Sigma C-0378) untuk mengisolasi khamir penghasil etanol. Khamir yang tumbuh dipreservasi melalui penyimpanan metode *deep freezing* suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  pada *gliserol* 10% ditambah dengan *trehalose* 5%.

Proses identifikasi molekuler isolat khamir mengikuti metode Hamby *et al.* (2012) dengan beberapa modifikasi. Ekstraksi DNA menggunakan *lysis buffer* (20 mM Tris-HCl; 5 mM EDTA; 400 mM NaCl; 0,3% SDS) dan melalui pemanasan suhu  $98^{\circ}\text{C}$ . Amplifikasi daerah D1/D2 LSU 26S rDNA pada reaksi PCR menggunakan primer NL1 (5'-CATATCAATAAGCGAAAAG-3') dan NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Kurtzman & Robnett, 1998). Optimasi reaksi PCR yaitu pada  $95^{\circ}\text{C}$  denaturasi awal diikuti 30 siklus reaksi (denaturasi  $95^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, penempelan pada suhu  $55^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, dan pemanjangan pada suhu  $72^{\circ}\text{C}$  selama 60 detik) dilanjutkan pemanjangan akhir pada suhu  $72^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit. Sekuen hasil PCR dikomparasi dengan membandingkan data khamir di basis data GenBank/ DDBJ/EMBL menggunakan program *Basic Local Search Tool* (BLAST) (Altschul *et al.* 1990).

Posisi filogenetik isolat khamir dikomparasi dengan pembandingan dari *type strain* yang telah dirangkum oleh Kurtzman *et al.* (2011) kemudian disejajarkan dengan MUSCLE (*Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*) (Edgar 2004) pada program MEGA (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) versi 6.0. Konstruksi pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbor-Joining* (NJ) (Saitou & Nei 1987). Penentuan jarak filogenetik memakai model *Maximum Composite Likelihood* dengan *bootstrap* 1.000

replikasi. Nilai *bootstrap* pada pohon filogenetik yang kurang dari 50 dihilangkan untuk meningkatkan taraf kepercayaan data konstruksi yang diperoleh.

Kemampuan isolat dalam menghasilkan etanol diuji menggunakan metode Brooks (2008) melalui beberapa modifikasi. Sekitar 1 koloni isolat ditumbuhkan pada 5 mL media dengan komposisi glukosa 20 g/L (Merck K43369737), *yeast extract* 3 g/L, pepton 5 g/L (USB 20048). Kultur diinkubasi selama 48 jam dan isolat yang memiliki kemampuan fermentasi yang baik ditentukan melalui volume gas pada tabung Durham. Isolat selanjutnya dikultur pada media dengan komposisi glukosa 10% selama 72 jam. Semua proses kultur tersebut diulang sebanyak 3 kali. Kadar etanol kemudian dianalisis menggunakan *gas chromatography* (Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra). Preparasi sampel dilakukan dengan sentrifugasi sampel pada kecepatan 17700 x g selama 5 menit dan bagian supernatan selanjutnya digunakan untuk analisis. Kondisi GC yang digunakan untuk analisis yaitu suhu oven sebesar  $115^{\circ}\text{C}$ , suhu injektor  $150^{\circ}\text{C}$ , suhu detektor (FID)  $200^{\circ}\text{C}$ , dan nitrogen sebagai gas perantara (Buckee & Mundy 1993).

## HASIL

### Isolasi dan identifikasi khamir

Sampel makanan fermentasi yang diisolasi memiliki 3 karakteristik. Makanan fermentasi dengan sumber nitrogen yang digunakan sebagai bahan baku yaitu terasi dan cincalok, sumber karbon yaitu tapai singkong dan tapai ketan serta *starter* atau ragi. Hasil isolasi dari 5 tipe sampel diperoleh sebanyak 15 isolat khamir (Tabel 1). Sampel terasi yang diisolasi dengan metode langsung maupun pengayaan tidak ada khamir yang terisolasi. Sementara itu, pada cincalok melalui metode langsung diperoleh sebanyak 2 isolat sedangkan pada metode pengayaan tidak diperoleh isolat khamir. Hasil analisis molekuler daerah D1/D2 LSU 26S rDNA diperoleh sekuen isolat khamir dari makanan fermentasi dengan panjang sekitar 600 bp. Hasil komparasi kelima belas isolat tersebut dengan data base *type strain* GenBank/ DDBJ/EMBL diperoleh homologi data sekuen berkisar 99-100% yang identik dengan 8 jenis.

**Tabel 1.** Perolehan isolat khamir pada makanan fermentasi dan hasil BLASTn

Metode	Sampel	Karakteristik sampel	Jumlah isolat	Kode isolat	Jenis yang identik	
Metode langsung	Terasi	Sumber N	0	-	-	
		Sumber N	2	Y15Kr097 Y15Kr098	<i>Candida zeylanoides</i> <i>Candida zeylanoides</i>	
	Tapai singkong	Sumber C	2	Y15Kr093 Y15Kr094	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Torulaspota globosa</i>	
		Sumber C	2	Y15Kr095 Y15Kr096	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> <i>Kodamaea ohmeri</i>	
	Ragi	Starter	(tidak dilakukan)			
	Metode pengayaan	Terasi	Sumber N	0	-	-
			Sumber N	0	-	-
		Tapai singkong	Sumber C	3	Y15Kr105 Y15Kr106 Y15kr107	<i>Pichia kudriavzevii</i> <i>Pichia kudriavzevii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
				3	Y15Kr108 Y15Kr109 Y15Kr110	<i>Candida glabrata</i> <i>Pichia kudriavzevii</i> <i>Candida glabrata</i>
				3	Y15Kr102 Y15Kr103 Y15Kr104	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i>
Ragi		Starter	3	Y15Kr102 Y15Kr103 Y15Kr104	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i>	
Total			15			

### Aktifitas fermentasi dan produksi etanol

Aktivitas khamir dalam proses fermentasi dapat dilihat secara kualitatif melalui gas yang terperangkap pada tabung durham. Aktivitas tersebut selanjutnya dikuantifikasi untuk melihat kadar etanol yang dihasilkan. Sebagian besar isolat menunjukkan aktivitas fermentasi (Tabel 2). Hal tersebut berkorelasi dengan variasi persentase volume etanol yang dihasilkan (Gambar 1). Persentase etanol yang paling tinggi dihasilkan oleh *Saccharomyces cerevisiae* Y15Kr107 sebesar 3,32% (v/v) diikuti oleh *Torulaspota delbrueckii* Y15Kr104 sebesar 1,63% (v/v), *S. cerevisiae* Y15Kr093 sebesar 1,58% (v/v), dan *Candida glabrata* Y15Kr110 yaitu 1,4% (v/v). *Saccharomycopsis fibuligera* Y15Kr095, Y15Kr102 dan *Candida zeylanoides* Y15Kr097, Y15Kr098 tidak menghasilkan gas sehingga tidak dihasilkan etanol.

Posisi filogenetik menunjukkan hubungan kekerabatan antar jenis khamir dari makanan fermentasi. Identifikasi sekuen isolat khamir dari makanan fermentasi, dilakukan melalui penyejajaran dengan *type strain* dan *out group* dari anggota Divisi Basidiomycetes hingga terbentuk pohon filogenetik (Gambar 3). Hasil konstruksi filogenetik dari sekuen daerah D1/D2 LSU 26S rDNA tergambar sebanyak 7 *clade* khamir yaitu *Torulaspota*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Nakaseomyces*, *Kurtzmaniella*, *Kodamaea*, dan *Pichia*. Selain itu, pohon filogenetik menunjukkan isolat khamir

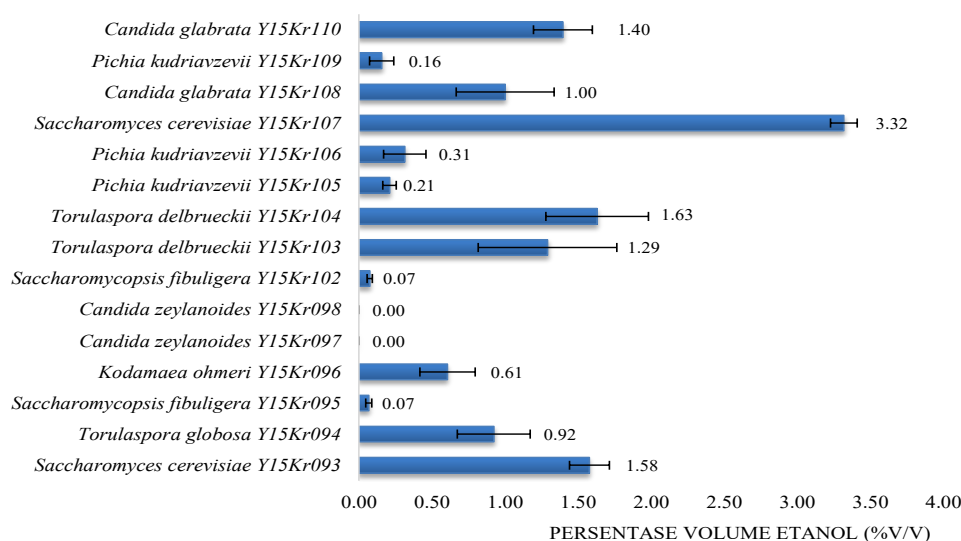
makanan fermentasi teridentifikasi ke dalam 8 jenis yaitu *S. cerevisiae*, *Sm. fibuligera*, *P. kudriavzevii*, *T. globosa*, *T. delbrueckii*, *C. glabrata*, *C. zeylanoides* dan *K. ohmeri* dengan taraf kepercayaan di atas 50%. Selain itu, pohon filogenetik dikonstruksi berdasarkan hasil analisa aktivitas fermentasi dan kemampuan menghasilkan etanol sehingga terbentuk kelompok atau *clade* khamir penghasil etanol. Posisi *clade Saccharomycopsis* dan *Kurtzmaniella* terpisah karena tidak memiliki aktivitas fermentasi dan tidak menghasilkan etanol yang signifikan.

**Tabel 2.** Hasil pengamatan kualitatif aktivitas fermentasi isolat khamir.

No	Kode isolat	Jenis khamir	Aktivitas fermentasi
1	Y15Kr093	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	++
2	Y15Kr094	<i>Torulaspota globosa</i>	++
3	Y15Kr095	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	-
4	Y15Kr096	<i>Kodamaea ohmeri</i>	++
5	Y15Kr097	<i>Candida zeylanoides</i>	-
6	Y15Kr098	<i>Candida zeylanoides</i>	-
7	Y15Kr102	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	-
8	Y15Kr103	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	++
9	Y15Kr104	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	++
10	Y15Kr105	<i>Pichia kudriavzevii</i>	+
11	Y15Kr106	<i>Pichia kudriavzevii</i>	+
12	Y15kr107	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+++
13	Y15Kr108	<i>Candida glabrata</i>	+
14	Y15Kr109	<i>Pichia kudriavzevii</i>	+
15	Y15Kr110	<i>Candida glabrata</i>	++

**Keterangan:** (+) ada aktivitas fermentasi; (-) tidak ada aktivitas fermentasi. Jumlah (+) menggambarkan volume gas pada Durham.

## Keragaman Jenis Khamir Penghasil Etanol yang Diisolasi dari Makanan Fermentasi



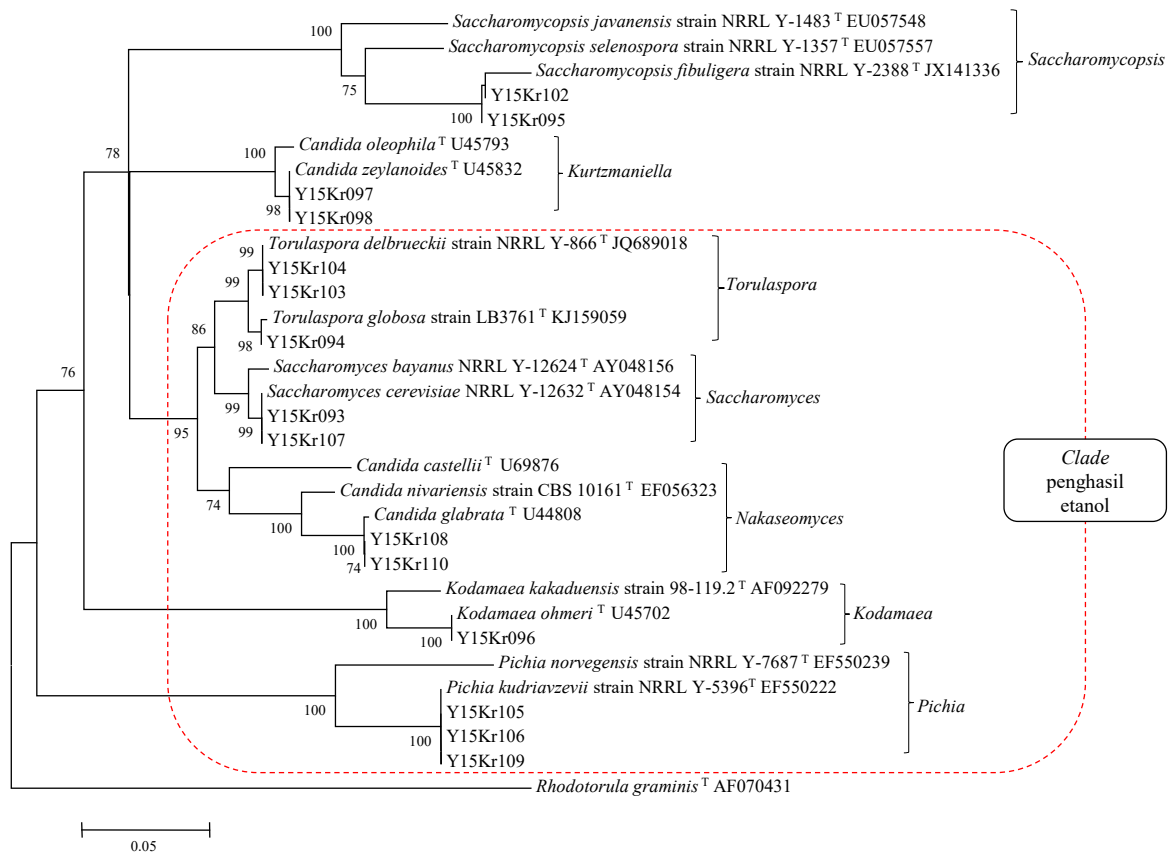
**Gambar 1.** Variasi persentase volume etanol yang dihasilkan isolat khamir makanan fermentasi pada media dengan kadar glukosa 10% selama masa inkubasi 72 jam.

## PEMBAHASAN

Isolasi dan identifikasi khamir pada makanan fermentasi menunjukkan keanekaragaman khamir yang berperan dalam proses fermentasi makanan. Sampel makanan fermentasi yang diisolasi dengan modifikasi metode dasar berpengaruh terhadap jenis khamir yang terisolasi. Seperti metode isolasi dengan pengayaan dapat membantu meningkatkan kemampuan khamir dalam mencapai tujuan yang diinginkan seperti bioetanol (Steensels *et al.* 2014). Khamir secara umum dapat hidup pada substrat yang memiliki kandungan C dan N tinggi atau hanya C yang lebih tinggi (Kurtzman *et al.* 2011). Pada sampel terasi, khamir tidak terisolasi dari dua metode isolasi yang dilakukan sedangkan sampel cinalok terisolasi 2 isolat yang teridentifikasi *C. zeylanoides*. Terasi adalah olahan ikan dan udang yang utamanya difermentasi oleh bakteri proteolitik halofilik pada kadar garam tinggi (Surono & Harsono 1994; Kobayashi *et al.* 2003). Demikian dengan jenis khamir yang terisolasi pada cinalok atau semacam olahan udang tersebut umum ditemukan pada makanan yang berisi daging (Fleet 2011). Hasil isolasi sampel pada tapai singkong dan ketan selaras dengan hasil penelitian sebelumnya oleh Saono *et al.* (1974); Ardhana & Fleet (1989); Kuriyama *et al.* (1997); dan Schwan *et al.* (2007).

Ragi merupakan nama *starter* yang sering digunakan di Indonesia. Pada sampel ragi tidak dilakukan metode isolasi langsung karena sudah dilakukan pada penelitian sebelumnya. Melalui metode pengayaan diisolasi *Saccharomycopsis fibuligera* dan *T. delbrueckii*. Hasil tersebut menggambarkan jenis khamir pada *starter* makanan fermentasi di Indonesia relatif bervariasi saat dikomparasi dengan penelitian sebelumnya. Umumnya *starter* makanan fermentasi di Indonesia terdapat *Saccharomycopsis fibuligera* (Kuriyama *et al.* 1997; Aidoo *et al.* 2006). Saono *et al.* (1974) melaporkan ragi yang diperjualbelikan pada pasar tradisional di Indonesia jenis khamirnya seperti *Candida guilliermondii*, *Candida humicola*, *C. japonica*, *C. parapsilopsis*, *C. pelliculosa*, *C. solani*; Kuriyama *et al.* (1997) *Sm. fibuligera*, *P. anomala*; dan Barus & Steffysia (2013) *P. kudriavzevii*, *P. Jadini*, disisi lain, Limtong *et al.* (2005) mengungkapkan *starter* minuman beralkohol tradisional di Thailand “loog pang” terdapat jenis khamir yaitu *Saccharomycopsis fibuligera*, *P. anomala*, *P. kudriavzevii*, *P. burtonii*, *P. fabianii*, *S. cerevisiae*, *Candida rhagii*, *C. glabrata*, *T. globosa*, dan *T. delbrueckii*. Variasi pada komposisi jenis khamir setiap *starter* sangat menentukan karakteristik makanan dan minuman fermentasi.

Sebagian besar khamir yang terisolasi pada makanan fermentasi melakukan aktivitas fermentasi dengan menghasilkan persentase etanol yang bervariasi. Jenis khamir yang mampu menghasilkan



**Gambar 2.** Hasil identifikasi isolat khamir penghasil etanol pada pohon filogenetik melalui analisis daerah D1/D2LSU rDNA menggunakan metode *Neighbor-Joining* (NJ).

etanol tergambar dalam konstruksi filogenetik yang hanya mengarah pada Divisi Ascomycetes yaitu lima *clade*. Namun di luar *clade* penghasil etanol, *Saccharomycopsis fibuligera* tidak memiliki aktivitas fermentasi sehingga etanol yang dihasilkan sangat tidak signifikan. Dalam beberapa penelitian disebutkan bahwa *Saccharomycopsis fibuligera* lebih berperan utama dalam mengubah pati menjadi gula sederhana (Kuriyama *et al.* 1997; Limtong *et al.* 2005; Aidoo *et al.* 2006; Fleet 2011). Berbeda dengan *C. zeylanoides* tidak melakukan aktivitas fermentasi dan tidak menghasilkan etanol sehingga perannya dalam proses fermentasi belum diketahui. Fleet (2011) menyatakan jenis khamir tersebut bersifat oportunistik sehingga sering menjadi kontaminan pada makanan dan juga dapat bertahan pada kondisi suhu yang rendah.

Dalam penelitian ini, *S. cerevisiae* Y15Kr107 menghasilkan etanol yang paling tinggi dibandingkan dengan isolat lainnya. Hal tersebut didukung oleh karakteristik *S. cerevisiae*, melalui modifikasi

genetik, dapat memproduksi etanol dalam kondisi oksigen terbatas dan juga mampu memanfaatkan kondisi tersebut untuk tumbuh (Heux *et al.* 2006; Merico *et al.* 2007); toleran terhadap etanol yang dihasilkannya (D'Amore *et al.* 1990; de Oliva-Neto *et al.* 2013); dapat direayasa genetik dan rekayasa metabolik (Kuhad *et al.* 2011; Buijs *et al.* 2013; Nielsen *et al.* 2013). Karakteristik tersebut menjadi perhatian khusus bagi para peneliti bioetanol dan dewasa ini penelitian tentang *S. cerevisiae* lebih cenderung ke arah modifikasi genetik dan metabolik.

Jenis khamir lain penghasil etanol yang diisolasi dari makanan fermentasi yaitu *T. delbrueckii*, *T. globosa*, *P. kudriavzevii*, *K. ohmeri*, dan *C. glabrata*. Jenis khamir tersebut tidak menghasilkan etanol dalam persentase yang tinggi namun perannya dapat mendukung proses fermentasi dan organoleptik produk. Keberadaan *T. delbrueckii* dilaporkan dapat memberikan aroma pada makanan fermentasi (Azzolini *et al.* 2012) dan mampu memfermentasi substrat dengan

kandungan gula tinggi (Fleet 2011). Sementara itu *C. glabrata* adalah khamir yang selama proses fermentasi mampu menghasilkan alkohol dalam kondisi anaerob dan toleran terhadap laktat (Watanabe *et al.* 2008). Khamir termotoleran seperti *P. kudriavzevii* (Yuangsaard *et al.* 2013) dan *T. globosa* (Dung *et al.* 2012) mampu memproduksi etanol. Yuangsaard *et al.* (2013) melaporkan bahwa *P. kudriavzevii* dapat melakukan fermentasi pada media yang suhunya mencapai 45<sup>o</sup> C sedangkan *T. globosa* dapat bertahan pada produksi alkohol yang tinggi (Fleet 2011). Sementara *K. ohmeri* merupakan informasi baru terkait jenis khamir yang diisolasi pada tapai ketan dan menghasilkan etanol.

## KESIMPULAN

Khamir yang diisolasi dari makanan fermentasi beragam dan sebanyak 6 jenis khamir yang teridentifikasi merupakan anggota Ascomycetes mampu menghasilkan etanol yaitu *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida glabrata*, *Torulaspora globosa*, *Kodamaea ohmeri*, and *Pichia kudriavzevii*. Isolat *S. cerevisiae* Y15Kr107 adalah jenis khamir yang menghasilkan etanol paling tinggi yaitu sebesar 3,53% (v/v). Selanjutnya khamir tersebut dapat digunakan untuk penelitian energi terbarukan berbasis bioethanol.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Kegiatan Eksplorasi Pulau terluar dari Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) pada tahun anggaran 2015. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Yeni Yuliani, Mia Kusmiati, dan Ismu Purwaningsih atas asistensinya selama penelitian berlangsung serta Dr. Puspita Lisdiyanti atas bimbingannya selama penulisan.

## DAFTAR PUSTAKA

Aidoo, KE., MJR. Nout, & PK. Sarkar. 2006. Occurrence and Function of Yeasts in Asian Indigenous Fermented Foods. *FEMS Yeast Research*, 6(1): 30–39.

Altschul, SF., W. Gish, W. Miller, EW. Myers & DJ. Lipman. 1990. Basic Local Alignment

Search Tool. *Journal Molecular Biology*. 215: 403-410.

Ardhana, MM. & GH. Fleet. 1989. The Microbial Ecology of Tape Ketan Fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 9: 157-165.

Azzolini, M., B. Fedrizzi, E. Tosi, F. Finato, P. Vagnoli, C. Scrinzi, & G. Zapparoli. 2012. Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. *European Food Research and Technology*. 235: 303–313.

Barus, T. & Steffysia. 2013. Genetic Diversity of Yeasts From Ragi Tape Starter for Cassava and Glutinous Rice Fermentation from Indonesia Internal Transcribed Spacer (ITS) region. *Merit Research Journal of Food Science and Technology*. 1(3): 031-035.

Basso, LC., HV. de Amorim, AJ. de Oliveira & ML. Lopes. 2008. Yeast Selection for Fuel Ethanol Production in Brazil. *FEMS Yeast Res.* 8: 1155–1163.

Bourdichon, F., S. Casaregola, C. Farrokh, JC. Frisvad, ML. Gerds, WP. Hammes, & J. Harnett. 2012. Food Fermentations: Microorganisms with Technological Beneficial Use. *International Journal of Food Microbiology*. 154(3): 87–97.

Brooks, AA. 2008. Ethanol Production Potential of Local Yeast Strains Isolated from Ripe Banana Peels. *African Journal of Biotechnology*. 7(20): 3749-3752.

Buckee, GK. & AP. Mundy. 1993. Determination of Ethanol In Beer By Gas Chromatography (Direct Injection)-Collaborative. *Journal of the Institute of Brewing*, 99: 381-384.

Buenrostro-Figueroa, JJ., A. Carolina, C. Flores-gallegos, R. Rodríguez-Herrera, H. Garza-Toledo, & CN. Aguilar. 2012. Identification of Yeast Isolated from Sotol (*Dasyliirion* spp.) Natural Fermentation. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de de Coahuila*. 4(8): 18–23.

Buijs, NA., V. Siewers & J. Nielsen. 2013. Advanced Biofuel Production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Opinion in Chemical Biology*. 17: 480-488.

- Carrau, F., C. Gaggero, & PS. Aguilar. 2015. Yeast Diversity and Native Vigor for Flavor Phenotypes. *Trends in Biotechnology*, 33(3): 1-7.
- D'Amore, T., CJ. Panchal, I. Russell & GG. Stewart. 1990. A Study of Ethanol Tolerance in Yeast. *Critical Reviews in Biotechnology*, 9(4): 287-304.
- Dorfler, J. & HV. Amorim. 2007. Applied Bioethanol Technology in Brazil. *Zuckerindustrie*. 132(9): 694-697.
- Dung, NTP., P. Thanonkeo, & HX. Phong. 2012. Screening Useful Isolated Yeasts for Ethanol Fermentation at High Temperature. *International Journal of Applied Science and Technology*. 2(4): 65-71.
- Edgar, RC. 2004. MUSCLE: A Multiple Sequence Alignment Method with Reduced Time and Space Complexity. *BMC Bioinformatics*. 5: 113.
- Fleet, GH. 2011. Yeast Spoilage of Foods and Beverages. Dalam: Kurtzman, CP, Fell, JW, Boekhout, T. *The Yeast: A Taxonomy Study 5th Edition*. USA: Elseiver. 53-64.
- Hamby, KA., A. Hernández, K. Boundy-Mills, & FG. Zalom. 2012. Associations of Yeasts with Spotted-Wing Drosophila (*Drosophila suzukii*; Diptera: Drosophilidae) in Cherries and Raspberries. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(14): 4869-4873.
- Hartono & H. Pagarra. 2011. Analisis Kadar Etanol Hasil Fermentasi Ragi Roti pada Tepung Umbi Gadung (*Dioscorea hispida* Dennst) Terhadap Kadar Etanol. *Bionature*. 12(2): 82-86.
- Hawusiwa, ES., AK. Wardani & DW. Ningtyas. 2015. Pengaruh Konsentrasi Pasta Singkong (*Manihot esculenta*) dan Lama Fermentasi Pada Proses Pembuatan Minuman Wine Singkong. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3(1): 147-155.
- Hayuningtyas, SK., Sunarto & SLA. Sari. 2013. The Production of Bioethanol from Rice Straw (*Oryza sativa*) by Acid Hydrolysis and Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioteknologi*. 11: 1-4.
- Heux, S., JM. Sablayrolles, R. Cachon & S. Dequin. 2006. Engineering a *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast That Exhibits Reduced Ethanol Production during Fermentation Under Controlled Micro-oxygenation Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(9): 5822-5828.
- Jespersen, L. 2003. Occurrence and Taxonomic Characteristics of Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Predominant in African Indigenous Fermented Foods and Beverages. *FEMS Yeast Research*. 3: 191-200.
- Kobayashi, T., M. Kajiwara, M. Wahyuni, T. Kitakado, N. Hamada-Sato, C. Imada, & E. Watanabe. 2003. Isolation and Characterization of Halophilic Lactic Acid Bacteria Isolated from Terasi Shrimp Paste: A Traditional Shrimp Seafood Product From Indonesia. *Journal Genetics Applied Microbiology*. 49: 279-286.
- Kuhad, RC., R. Gupta, YP. Khasa, A. Singh & YHP. Zhang. 2011. Bioethanol Production from pentose Sugars: Current Status and Future Prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 15: 4950-4962.
- Kuriyama H, D. Sastraatmadja, Y. Igosaki, K. Watanabe, A. Kanti & T. Fukatsu. 1997. Identification and Characterization of Yeast Isolated from Indonesian Fermented Food. *Mycoscience*. 38: 441-445.
- Kurtzman, CP., JW. Fell & T. Boekhout. 2011. *The Yeast: A Taxonomy Study 5th Edition*. USA: Elseiver B.V.
- Kurtzman, CP. & CJ. Robnett. 1998. Identification and Phylogeny of Ascomycetous Yeasts From Analysis of Nuclear Large Subunit (26S) Ribosomal DNA Partial Sequences. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. 73(4): 331-371.
- Limtong, S., S. Sintara & P. Suwannarit. 2005. Yeast Diversity in Thai Traditional Alcoholic Starter. *Kasetsart Journal*. 36 (2): 149-158.
- Merico, A., P. Sulo, J. Piskur & C. Compagno. 2007. Fermentative Lifestyle in Yeasts Belonging to the *Saccharomyces* Complex. *Febs Journal*, 274: 976-989.
- Nielsen, J., C. Larsson, A. van Maris & J. Pronk. 2013. Metabolic Engineering of Yeast for Production of Fuels and Chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*,



- 24: 398–404.
- de Oliva-Neto, P., C. Dorta, AFA. Carvalho, VMG. de Lima & DF. da Silva. 2013. The Brazilian Technology of Fuel Ethanol Fermentation-Yeast Inhibition Factors and New Perspectives to Improve the Technology. *Dalam*: A. Méndez-Vilas, Ed. *Materials and Processes for Energy: Communicating Current Research and Technological Developments*. Formatex. 371-379.
- Olsson, L. & B. Hahn-Hagerdal. 1996. Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates of Ethanol Production. *Enzyme and Microbial Technology*. 18: 312-331.
- Putri, LSE. & D. Sukandar. 2008. Konversi Pati Ganyong (*Canna edulis* Ker.) Menjadi Bioetanol melalui Hidrolisis Asam dan Fermentasi. *Biodiversitas*. 9(2): 112-116.
- Putri, WSE. & T. Ardyati. 2013. Potensi Ampas Kasar Kecap sebagai Bahan Dasar Pembuatan Etanol. *Jurnal Biotropika*. 1 (1): 38-42.
- Rahmansyah, M. & A. Kanti. 1999. Isolat-Isolat Khamir Dari Minuman Tradisional Laru di Nusa Tenggara Timur. *Berita Biologi*. 4(5): 255-263.
- Saitou, N. & M. Nei. 1987. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4): 406–25.
- Saono, S., I. Gandjar, T. Basuki & H. Karsono. 1974. Mycoflora of Ragi and Some Other Traditional Fermented Foods of Indonesia. *Annales Bogorienses*. 5(4): 187-204.
- Schwan RF., EG. Almeida, MAG. Souza-Dias & L. Jespersen. 2007. Yeast Diversity in Rice-Cassava Fermentations Produced by the Indigenous Tapirap People of Brazil. *FEMS Yeast Research*. 7(6): 966–72.
- Steensels, J., T. Snoek, E. Meersman, MP. Nicolino, K. Voordeckers, & KJ. Verstrepen. 2014. Improving Industrial Yeast Strains: Exploiting Natural and Artificial Diversity. *FEMS Microbiology Reviews*. 38(5): 947–95.
- Sujaya, IN., NS. Antara, T. Sone, Y. Tamura, WR. Aryanta, A. Yokota, K. Asano, & F. Tomita. 2004. Identification and Characterization of Yeasts in Brem, A Traditional Balinese Rice Wine. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 20: 143–150.
- Surono, IS. & A. Hosono. 1994. Microflora and Their Enzyme Profile in Terasi Starter. *Bioscience Biotechnology Biochemical*, 58 (6): 1167-1169.
- Watanabe, I., T. Nakamura, & J. Shima. 2008. A Strategy to Prevent The Occurrence of *Lactobacillus* Strains Using Lactate-Tolerant Yeast *Candida glabrata* in Bioethanol Production. *J. Ind Microbiol Biotechnol*. 35: 1117–1122.
- Yanase, S., T. Hasunuma, R. Yamada, T. Tanaka, C. Ogino, H. Fukuda & A. Kondo. 2010. Direct Ethanol Production from Cellulosic Materials at High Temperature Using the Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus* Displaying Cellulolytic Enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 88: 381–388.
- Yamada, R., N. Taniguchi, T. Tanaka, C. Ogino, H. Fukuda & A. Kondo. 2011. Direct Ethanol Production from Cellulosic Materials Using a Diploid Strain of *Saccharomyces cerevisiae* with Optimized Cellulase Expression. *Biotechnology for Biofuels*. 4: 1-8.
- Yuangsaard, N., W. Yongmanitchai, M. Yamada, & S. Limtong. 2013. Selection and Characterization of a Newly Isolated Thermotolerant *Pichia kudriavzevii* Strain for Ethanol Production at High Temperature from Cassava Starch Hydrolysate. *Antonie van Leeuwenhoek*. 103: 577–588.

