

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KHAMIR ENDOFIT YANG
BERPOTENSI SEBAGAI PENGEMBANG ROTI DARI NIRA TEBU
(*Saccharum Offiicinarum* Linnaeus) DAN BUAH NANGKA
(*Artocarpus heterophyllus* Lamk)**

SKRIPSI

Oleh:

**ROFIATU DAROJAH
NIM. 16620105**



JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG**

2020

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KHAMIR ENDOFIT YANG BERPOTENSI
SEBAGAI PENGEMBANG ROTI DARI NIRA TEBU (*Saccharum
Officinarum* Linnaeus) DAN BUAH NANGKA (*Artocarpus heterophyllus*
Lamk)**

SKRIPSI

Oleh:
ROFIATU DAROJAH
NIM. 16620105

Diajukan Kepada :
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAIS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KHAMIR ENDOFIT YANG BERPOTENSI
SEBAGAI PENGEMBANG ROTI DARI NIRA TEBU (*Saccharum Officinarum*
Linnaeus) DAN BUAH NANGKA (*Artocarpus heterophyllus* Lamk)**

SKRIPSI

Oleh:

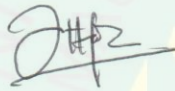
ROFIATU DAROJAH

NIM. 16620105

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk diuji :

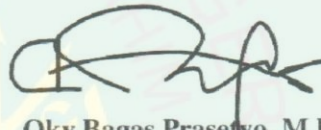
Tanggal 24 November 2020

Dosen Pembimbing I



Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si
NIP. 19650509 199903 2 002

Dosen Pembimbing II



Oky Bagus Prasetyo, M.Pd.I
NIP. 19890113 20180201 1 244

**Mengetahui,
Ketua Program Studi Biologi**



Dr. Evika Sandi Savitri, M. P
NIP. 19741018 200312 2 002

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KHAMIR ENDOFIT YANG BERPOTENSI
SEBAGAI PENCEMBANG ROTI DARI NIRA TEBU (*Saccharum Offiicinarum*
Linnaeus) DAN BUAH NANGKA (*Artocarpus heterophyllus* Lamk)**

SKRIPSI

Oleh:

ROFIATU DAROJAH

NIM: 16620105

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi Dan Dinyatakan
Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan untuk Memperoleh Gelar Sarjana (S.Si)**

Tanggal: Desember 2020

Susunan Dewan Penguji

Penguji Utama : Ir. Liliek Harianie AR, M.P
NIP.196209011998032001

Ketua Penguji : Dr. Nur Kusniyati, M.Si
NIP. 19890816 20160108 2 061

Sekretaris Penguji: Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si
NIP. 19650509 199903 2 002

Anggota Penguji: Okky Bagas Prasetyo, M.Pd.I
NIP. 19890113 20180201 1 244

Tanda Tangan



Mengesahkan,
Ketua Program Studi Biologi

Dr. Evika Sandi Savitri, M. P
NIP. 19741018 200312 2 002

HALAMAN PERSEMBAHAN

Bismillahirrohmanirohim

Dengan segala puja dan puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa dan atas dukungan doa dari orang-orang tercinta, akhirnya skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik dan tepat pada waktunya. Oleh karena itu, dengan rasa banga dan bahagia saya haturkan rasa syukur dan terimakasih saya kepada :

Allah Subhanahu Wa Ta'ala Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang, Maha Mendengar dan Maha Melihat sega doa dan usaha setiap hambanya. Ucap syukur Alhamdulillah tiada henti-hentinya saya ucapkan kepada Allah SWT yang telah memberi kekuatan, kesehatan dan kesabaran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan tepat pada waktunya.

Terimakasih kepada kedua orangtua saya Bapak Abdul Choliq dan Ibu Nurhasanah yang telah memberikan kepercayaan, membesarkan dan mendidik saya dengan penuh kasih sayangnya serta lantunan doa setiap selesai sholat khusus diberikan untuk ana-anaknya, doa yang selalu mengiringi kemanapun saya melangkah, karena tiada kata dan doa yang paling khusyuk selain doa yang terucap dari orangtua.

Terimakasih kepada kakak saya Rizqi Amalia Hidayah dan adek saya Faiqotun Ni'mah atas dukungan moril serta penyemangat selama saya stress untuk menjadi anak yang terus ceria dan menikmati indahnya kebersamaan.

Terimakasih yang rasanya tidak cukup diungkapkan dengan kata-kata kepada Dosen pembimbing saya Ibu Ulfah dan Bapak Oky yang telah memberikan arahan dan bimbingan dari awal pembuatan skripsi sampai selesai. Semoga rahmat dan kasih sayang Allah selalu tercurah pada beliau dan keluarga.

MOTTO

إِنْ أَحْسَنْتُمْ أَحْسَنْتُمْ لِنَفْسِكُمْ

“Jika kamu berbuat baik (berarti) kamu berbuat baik bagi dirimu sendiri”

(QS. Al-Isra:7)



PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Rofiatu Darojah

NIM : 16620105

Jurusan/Fakultas : Biologi/Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Isolasi dan Identifikasi Khamir Endofit Yang Berpotensi Sebagai Pengembang Roti Dari Nira Tebu (*Saccharum officinarum* Linnaeus) dan Buah Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk)

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia dikenakan sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, Oktober 2020

Yang membuat pernyataan,



Rofiatu Darojah
16620105

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai ilmiah untuk menyebutkannya.



Isolasi dan Identifikasi Khamir Endofit Yang Berpotensi Sebagai Pengembang Roti Dari Nira Tebu (*Saccharum Officinarum* Linnaeus) dan Buah Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk)

Rofiatu Darojah, Ulfah Utami, Oky Bagas Prasetyo

ABSTRAK

Khamir merupakan fungi uniseluler. Khamir memiliki beberapa manfaat diantaranya sebagai pengembang roti. Khamir pengembang roti biasa disebut dengan khamir osmotolerant. Isolasi khamir dilakukan pada nira tebu (*Saccharum Officinarum* Linnaeus) dan buah nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat khamir dari nira tebu (*Saccharum Officinarum* Linnaeus) dan buah nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk) yang memiliki kemampuan sebagai pengembang adonan roti. Media yang digunakan pada penelitian ini adalah Yeast Malt Extract Broth (YMB), Yeast Malt Extract Agar (YMEA), Media Fermentasi Karbohidrat, dan Yeast Peptone Glucose (YPG) konsentrasi 50% dan media *Lead acetate*. Proses awal yang dilakukan yaitu isolasi kemudian dipurifikasi sehingga terdapat 2 isolat khamir dengan kode RNT-1 dan RNT-2 dari nira tebu (*Saccharum Officinarum* Linnaeus) serta 3 isolat khamir dengan kode RBN-1, RBN-2, dan RBN-3 dari buah nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk). Khamir diidentifikasi makroskopis dan mikroskopis, isolat RNT-1, RNT-2, RBN-1, RBN-2, dan RBN-3 merupakan filum *Ascomycota* dan sub kelas *Hemiascomycetes*. Khamir endofit tersebut kemudian dilakukan pengujian fermentasi karbohidrat, uji toleransi glukosa 50%, uji flokulasi, uji H₂S, dan uji molekuler. Khamir yang memiliki potensi fermentasi karbohidrat terbaik dilakukan uji lanjut analisa genetika. Berdasarkan hasil uji tersebut menunjukkan isolat RNT-1 dan RNT-2 berpotensi sebagai pengembang adonan roti. Hasil uji molekuler dari RNT-1 memiliki kemiripan dengan *Hanseniaspora opuntiae* (98,02%) dan Isolat RNT-2 memiliki kemiripan dengan *Candida* sp. (97,98%)

Kata Kunci : Khamir endofit, Nira Tebu, Buah Nangka, Fermentasi, Molekuler, Pengembang adonan roti

Isolation and Identification of Endophytic Yeasts That Have Potential to Develop Bread from Sugarcane Juice (*Saccharum Officinarum* Linnaeus) and Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lamk)

Rofiatu Darojah, Ulfah Utami, Oky Bagas Prasetyo

ABSTRAC

Yeast is a unicellular function. Yeast has several benefits including as a bread developer. Baking yeast is commonly called osmotolerant yeast. Yeast isolation was carried out on sugarcane juice (*Saccharum Officinarum* Linnaeus) and jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lamk). This study aims to obtain yeast isolates from sugarcane juice (*Saccharum Officinarum* Linnaeus) and jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lamk) which have the ability to develop bread dough. The media used in this study were Yeast Malt Extract Broth (YMB), Yeast Malt Extract Agar (YMEA), Carbohydrate Fermentation Media, and Yeast Peptone Glucose (YPG) with 50% concentration and Lead acetate media. The initial process carried out was isolation and then purification so that there were 2 yeast isolates with codes RNT-1 and RNT-2 from sugarcane juice (*Saccharum Officinarum* Linnaeus) and 3 yeast isolates with codes RBN-1, RBN-2, and RBN-3 from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lamk). For macroscopic and microscopic identification yeasts, isolates RNT-1, RNT-2, RBN-1, RBN-2, and RBN-3 belong to the Ascomycota phylum and Hemiascomycetes sub-class. The endophytic yeast was then tested for carbohydrate fermentation, 50% glucose tolerance test, flocculation test, H₂S test, and molecular test. Yeast which has the potential for carbohydrate fermentation can be carried out through further genetic analysis. Based on the test results, it shows that RNT-1 and RNT-2 isolates are made as a bread dough developer. The molecular test results of RNT-1 have similarities with *Hanseniaspora opuntiae* (98.02%) and Isolate RNT-2 which have similarities with *Candida* sp. (97.98%)

Keywords: Endophytic yeast, Sugarcane Juice, Jackfruit, Fermentation, Molecular, Bread dough developer

عزل خميرة إندوفيت وتحديدتها كمطور الخبز من عصارة قصب السكر (*Saccharum*)
(*Artocarpus Heterophyllus Lamk*) والكاكايا (*Officinarum Linnaeus*).

رفيعة دراجة، أولفا أوتامي، أوكي باجاس براسيتيو

مستخلص البحث

الخميرة هي الفطر لوحيدة الخلية. ولها فوائد عديدة، منها لتطوير الخبز. هذه الخميرة تسمى عادة بخميرة الأسمنتول. تم إجراء عزل الخميرة على عصارة قصب السكر (*Saccharum Officinarum*) Linnaeus. والكاكايا (*Artocarpus heterophyllus Lamk*). وتهدف هذا البحث إلى الحصول على عزلات الخميرة من عصارة قصب السكر (*Saccharum Officinarum* Linnaeus.) والكاكايا (*Artocarpus heterophyllus Lamk*) التي لها قدرة على تطوير عجينة الخبز. أما الوسائط المستخدمة في هذا البحث فهي خميرة الشعير استخراج المرق (YMB)، وخميرة الشعير استخراج أجار (YMEA)، ووسط تخمير الكربوهيدرات، و 50٪ من جلوكوز بيتون الخميرة (YPG) ووسط خلاص الرصاص. العملية الأولى هي العزل ثم التنقية بحيث توجد هناك عزلتان من الخميرة برمز RNT-1 و RNT-2 من عصارة قصب السكر (*Saccharum Officinarum*) Linnaeus. وثلاث عزلات من الخميرة برمز RBN-1، RBN-2، و RBN-3 من الكاكايا (*Artocarpus heterophyllus Lamk*). تم التحديد على الخميرة عياناً ومجهرياً، وتنتمي العزلات RNT-1، و RNT-2، و RBN-1، و RBN-2، و RBN-3، إلى فئة *Ascomycota phylum* و *Hemiascomycetes* الفرعية. ثم يتم اختبار خميرة إندوفيت لتخمير الكربوهيدرات، واختبار تحمل الجلوكوز بنسبة 50٪، واختبار التلبد، واختبار H_2S ، والاختبار الجزيئي. الخميرة التي لها أفضل إمكانات تخمير الكربوهيدرات سيتم اختبارها المستمر بالتحليل الجيني. تشير نتائج الاختبار أن عزلة RNT-1 وعزلة RNT-2 لديهما القدرة على تطوير عجينة الخبز. تشبه نتائج الاختبار الجزيئي لعزلة RNT-1 بـ *Hanseniaspora opuntiae* (98.02٪)، وعزلة RNT-2 لها أوجه تشابه مع *Candida sp.* (97.98٪).

الكلمات الرئيسية: خميرة إندوفيت، عصارة قصب السكر، كاكايا، تخمير، جزيئي، مطور عجينة الخبز

KATA PENGANTAR

Puji Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah yang telah dilimpahkan_Nya sehingga skripsi dengan judul **“Identifikasi Khamir Endofit Yang Berpotensi Sebagai Pengembang Roti dari Nira Tebu (*Saccharum Officinarum* Linnaeus) dan Buah Nangka (*Artocarpus heterphyllus* Lamk)”** ini dapat diselesaikan dengan baik. Sholawat serta salam semoga tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW yang telah membimbing umatnya menuju jalan kebenaran.

Penyusun skripsi ini tentu tidak lepas dari bimbingan, bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada :

1. Prof. Dr. H. Abd. Haris, M. Ag, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Evika Sandi Safitri, M.Si, selaku Ketua Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si dan Oky Bagus Prasetyo, M.Pd.I., selaku dosen pembimbing yang dengan penuh keikhlasan, dan kesabaran telah memberikan bimbingan dan pengarahan dalam penyusunan skripsi ini.
5. Ir. Liliek Harianie AR, M.P., dan Dr. Nur Kusmiyati, M. Si selaku dosen penguji yang telah memberikan saran, nasehat dan dukungan dalam membenahi skripsi ini menjadi lebih baik.
6. Bapak Didik Wahyudi, M.Si selaku Dosen Wali yang telah memberi dukungan kepada penulis dalam bidang akademik
7. Alm Bapak Romaidi, M.Si, D.Sc, yang telah membantu dalam penelitian ini
8. Seluruh dosen, Laboran Jurusan Biologi dan Staf Administrasi yang telah membantu dan memberikan kemudahan, terimakasih atas semua ilmu dan bimbingannya.
9. Kedua orang tuaku Ibu Nurhasanah dan Bapak Abdul Choliq, dan keluargaku yang selalu memberikan do'a, semangat, serta motivasi kepada penulis sampai saat ini.
10. Terimakasih untuk seluruh petugas keamanan dan kebersihan Fakultas Sains dan Teknologi yang sabar menunggu aktivitas penelitian saya di laboratorium.
11. Semua pihak yang ikut membantu terselesaikannya skripsi ini.

Akhirnya, penulis bisa menyelesaikan skripsi ini, semoga skripsi ini dapat memberi mafaat bagi penulis khususnya, dan bagi para pembaca pada umumnya. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan ilmu yang bermanfaat dan melimpahkan Rahmat dan Ridho-Nya. Amin.

Malang, 25 Oktober 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iv
MOTTO	v
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	vi
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT.....	ix
مخلص البحث	x
KATA PENGANTAR	xi
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
1.5 Batasan Masalah.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Khamir	7
2.1.1 Ciri Umum Khamir	7
2.2 Taksonomi Khamir	8
2.2.1. Filum Ascomycota	9
2.2.1.1 Sub Kelas Hemiascomycetes	9
2.2.1.2 Sub Kelas Archiascomycetes.....	9
2.2.1.3 Sub Kelas Euascomycetes	9
2.2.2. Filum Basidiomycetes	10
2.2.2.1 Sub Kelas Uredinomycetes	10
2.2.2.2 Sub Kelas Heterobasidiomycetes.....	10
2.2.2.3 Sub Kelas Ustilaginomycetes	10
2.3 Tebu (<i>Saccharum Officinarum</i> Linnaeus)	10
2.3.1 Morfologi Tebu (<i>Saccharum Officinarum</i> Linnaeus)	11
2.3.2 Nira Tebu (<i>Saccharum Officinarum</i> Linnaeus).....	11
2.4 Nangka (<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lamk)	13
2.4.1 Morfologi Nangka	13
2.4.2 Buah Nangka.....	14
2.5 Syarat Khamir Sebagai Pengembang Roti.....	15
2.6 Identifikasi Khamir	17
2.6.1 Identifikasi Khamir secara konvensional	17
2.6.2 Identifikasi Khamir secara molekuler	17
BAB III METODE PENELITIAN	19
3.1 Rancangan Penelitian	19

3.2 Waktu Penelitian.....	19
3.3 Alat dan Bahan Penelitian	19
3.3.1 Alat Penelitian	19
3.3.2 Bahan penelitian	20
3.4 Prosedur Penelitian.....	20
3.4.1 Pembuatan Media	20
3.4.1.1 Media YMB (<i>Yeast Malt Extract Broth</i>)	20
3.4.1.2 Media YMEA (<i>Yeast Malt Extract Agar</i>).....	20
3.4.1.3 Media Fermentasikarbohidrat	21
3.4.1.4 Media YPG (<i>Yeast Peptone Glucose</i>)	21
3.4.1.5 Media <i>Lead Acetate</i>	22
3.4.2. Isolasi Khamir.....	22
3.4.3 Purifikasi.....	23
3.4.4 Identifikasi Morfologi Makrokopis dan Mikrokopis.....	23
3.4.5 Uji Potensi Khamir sebagai Pengembang Roti.....	24
3.4.5.1 Uji Fermentasi Karbohidrat	24
3.4.5.2 Uji Toleransi Glukosa 50%	24
3.4.5.3 Uji Flokulasi	25
3.4.5.4 Uji Hidrogen Sulfida	25
3.4.6 Identifikasi Molekuler	25
3.4.6.1 PCR Koloni.....	25
3.4.6.2 Uji Kualitatif Produk PCR.....	26
3.4.6.3 Sequencing.....	26
3.5 Teknik Analisis Data.....	26
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	28
4.1 Hasil Isolasi Khamir Endofit Nira Tebu dan Buah Nangka.....	28
4.1.1 Isolat Khamir RNT-1	31
4.1.2 Isolat Khamir RNT-2	32
4.1.3 Isolat Khamir RBN-1	33
4.1.4 Isolat Khamir RBN-2	34
4.1.5 Isolat Khamir RBN-3	35
4.2. Jenis Khamir Endofit Hasil Uji Potensi Pengembang Roti.....	37
4.2.1 Kemampuan Isolat Khamir dalam Hal Fermentasi Karbohidrat.....	37
4.2.2 Kemampuan Isolat Khamir dalam Uji Toleransi Glukosa 50%	39
4.2.3 Kemampuan Isolat Khamir dalam Uji Flokulasi dan Uji Hidrogen Sulfida.....	40
4.3 Identifikasi Molekuler Jenis Isolat Khamir dengan Kemampuan Uji Potensi Pengembang Roti Terbaik.....	44
BAB V PENUTUP	53
5.1 Kesimpulan	53
5.2 Saran.....	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN.....	63

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Informasi Nilai Gizi dari Nira Tebu per-120 gram	12
Tabel 2.2 Nilai Gizi Buah Nangka per-100 gram	15
Tabel 4.1 Karakter Morfologi Makroskopis khamir Endofit dari Nira Tebu dan Buah Nangka	29
Tabel 4.2 Karakter Morfologi Mikroskopis khamir Endofit dari Nira Tebu dan Buah Nangka	30
Tabel 4.3 Kemampuan Isolat Khamir Endofit Dalam Memfermentasi Karbohidrat setelah 7 Hari Inkubasi	38
Tabel 4.4 Kepadatan optik (600 nm) sel khamir dari nira tebu dan buah nangka pada media glukosa 50% (m/v)	40
Tabel 4.5 Kemampuan khamir endofit dari nira tebu dan buah nangka dalam pembentukan flokulasi	41
Tabel 4.6 Kemampuan khamir endofit dari nira tebu dan buah nangka dalam pembentukan senyawa hidrogen sulfide	43
Tabel 4.7 Hasil BLAST Isolat Khamir	48

DAFTAR GAMBAR

Gambar 4.1 Morfologi Isolat RNT-1 berdasarkan pengamatan makrokopis.....	31
Gambar 4.2 Morfologi Isolat RNT-1 berdasarkan pengamatan mikrokopis	32
Gambar 4.3 Morfologi Isolat RNT-2 berdasarkan pengamatan makrokopis.....	32
Gambar 4.4 Morfologi Isolat RNT-2 berdasarkan pengamatan mikrokopis	33
Gambar 4.5 Morfologi Isolat RBN-1 berdasarkan pengamatan makroskopis dan mikroskopis	34
Gambar 4.6 Morfologi Isolat RBN-2 berdasarkan pengamatan makroskopis dan mikroskopis	35
Gambar 4.7 Morfologi Isolat RBN-3 berdasarkan pengamatan makroskopis dan mikroskopis	36
Gambar 4.8 Kontrol positif dan negatif uji flokulasi	42
Gambar 4.9 Kontrol positif dan negatif uji H ₂ S.....	44
Gambar 4.10 Uji Kualitatif Produk PCR	45
Gambar 4.11 Rekontruksi Pohon Filogenetik RNT-1 dan RNT-2	49

DAFTAR LAMPIRAN

1. Diagram alir penelitian.....	63
2. Identifikasi Molekuler	65
3. Hasil Uji Fermentasi Karbohidrat	66
4. Hasil Uji Toleransi Glukosa dengan Konsentrasi 50%.....	68
5. Hasil Uji Flokulasi	70
6. Hasil Uji H ₂ S.....	72
7. Urutan gen ITS khamir hasil <i>sequencing</i>	74
8. Gambar pick DNA hasil sekuensing pada SeqScanner.....	75
9. Nilai aligment pada proses BLAST di NCBI.....	76
10. Hasil BLAST di NCBI.....	77
11. Hasil aligmentdengan MEGA 10.0	78

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Indonesia adalah negara yang memiliki keanekaragaman hayati yang tinggi. Indonesia juga termasuk negara yang beriklim tropis yang memiliki beragam flora, fauna, maupun mikroorganisme. Mikroorganisme merupakan salah satu keanekaragaman makhluk hidup. Golongan dari mikroorganisme terdapat beberapa macam seperti bakteri, virus, jamur dan protozoa. Golongan mikroorganisme yang melimpah di alam adalah jamur (Aggraini *et al.*, 2019). Jamur terdiri dari 3 macam yaitu jamur berbadan buah besar atau *mushroom*, jamur berbentuk benang atau *molds*, dan jamur bersel satu atau khamir (Hidayat *et al.*, 2016).

Khamir dapat berperan sebagai khamir endofit pada tumbuhan, saprofit, dan beberapa hidup sebagai parasite. Beberapa genus khamir yang ditemukan yaitu Galactomycetes, Saccharomycetes, Candida, Pseudozyma, dan masih terdapat genus khamir yang lain (Intan *et al.*, 2014).. Khamir endofit adalah jenis khamir yang diisolasi dari tanaman. Khamir endofit dapat hidup pada sel tanaman. Khamir endofit memiliki hubungan simbiosis dengan tanaman inangnya dan tidak menimbulkan efek berbahaya pada spesies tanaman inangnya (Gai *et al.*, 2009). Khamir dapat diisolasi dari bagian daun, bunga, batang dan buah.

Khamir memiliki beberapa manfaat. Manfaat Khamir terdapat dalam Al-Quran surat An Nahl ayat 13 yang berbunyi :

وَمَا ذَرَأَا لَكُمْ فِي الْأَرْضِ مُخْتَلِفًا أَلْوَنُهُ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَذَّكَّرُونَ ﴿١٣﴾

Artinya : “dan Dia (menundukkan pula) apa yang Dia ciptakan untuk kamu di bumi ini dengan berlain-lainan macamnya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang mengambil pelajaran” (QS. Nahl (16) : 13)

Berdasarkan ayat di atas menurut Tafsir Jalalayn menjelaskan bahwa

Allah SWT menundukkan pula bagi kalian (apa yang Dia ciptakan) makhluk yang telah Dia ciptakan (untuk kalian di bumi ini) berupa hewan-hewan dan tumbuh-tumbuhan serta lain-lainnya (dengan berlain-lainan warnanya) seperti ada yang merah, kuning, hijau dan lain sebagainya (Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda kekuasaan Allah bagi kaum yang mengingatnya) mengambilnya sebagai pelajaran. Sedangkan menurut Tafsir Ibnu Katsir (Abdullah, 2007) menjelaskan bahwa Allah SWT telah mengingatkan tanda-tanda yang ada di langit dan mengingatkan pula atas apa yang telah diciptakan di bumi, maksud dari pernyataan tersebut yang diciptakan yaitu hewan, tumbuhan dan mikroorganisme termasuk khamir yang memiliki banyak manfaat.

Khamir pernah di isolasi dari anggur dan nanas. Sifat-sifat fisiologis dari khamir dapat bermanfaat bagi mikrobiologi industri. Fermentasi gula oleh khamir adalah aplikasi yang telah digunakan sejak dahulu dalam pembuatan roti, *wine*, keju dan yoghurt. Secara umum khamir berada pada tumbuhan yang memiliki substrat gula seperti anggur, pohon maple, bagian bunga dan nira tebu. (Maryam *et al.*, 2017). Menurut Sitepu (2017) khamir dalam adonan roti akan memfermentasikan gula yang terkandung didalamnya. Gula akan dirubah membentuk gas karbondioksida dan alkohol. Gas karbondioksida yang dihasilkan akan terperangkap dalam adonan sehingga adonan roti menjadi mengembang.

Menurut Kurtzman & Fell (1998) Khamir pengembang roti biasa disebut dengan khamir osmotolerant. Menurut Amata (2013) khamir osmotolerant adalah khamir yang mampu tumbuh di lingkungan gula atau garam tinggi. Khamir yang digunakan untuk pengembang roti berasal dari jenis phylum Ascomycetes sub class Saccharomyces, yaitu *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces exiguus*, dan *Saccharomyces rosei*. Menurut Tesfaw (2014) *S. cerevisiae* adalah umumnya dianggap aman untuk dikonsumsi manusia yang meningkatann pemanfaatannya yang lebih menguntungkan lebih dari khamir lainnya. Kemampuan khamir dalam memfermentasi karbohidrat sangat mempengaruhi terhadap pengembangan adonan. Khamir yang selama ini digunakan oleh masyarakat pada umumnya adalah *dry instant yeast* karena kemampuannya untuk mengembangkan adonan

roti yang sangat cepat dan mudah ditemukan dipasaran. Menurut Kong *et al* (2018) Ragi jenis *dry instat yeast* ini didalamnya terdapat khamir *S. cerevisiae*.

Khamir dapat ditemukan pada buah yang kaya akan kandungan gula (Wulandari *et al.*, 2017). Buah Nangka merupakan buah yang memiliki kandungan gula sekitar 60%. Kandungan gula pada buah nangka relatif tinggi yang dapat dijadikan substrat khamir untuk tumbuh (Tejpal and Amrita, 2016). Selain itu kandungan karbohidrat setiap 100 gram mencapai 23,25 gram dan protein sebanyak 1,72 gram (Amalia, 2017). Kandungan gula dan karbohidrat yang relatif tinggi tersebut berpotensi untuk dilakukannya fermentasi. Berdasarkan jenis atau varietasnya nangka dibagi menjadi dua yaitu kultivar lokal dan kultivar unggulan yang merupakan pengembangan dari Thailand. Buah nangka yang diambil dari kultivar lokal dengan varietas nangka salak yang memiliki daging buah yang tebal, memiliki aroma yang tajam dan harum (Suprapti, 2014).

Nira adalah media yang subur untuk pertumbuhan mikroorganisme seperti *Acetobacter acetic* dan sel khamir dari genus *Saccharomyces*. Pada nira yang mengalami fermentasi secara alami, sel khamir dari genus *Saccharomyces* akan lebih aktif pada jenis gula (glukosa) dan menghasilkan alkohol dan gas karbondioksida (Lempang, 2012), maka nira tebu memiliki peluang untuk digunakan sebagai bahan proses fermentasi. Nira tebu diambil dari tanaman tebu varietas PR 12-01. Hal tersebut disebabkan kandungan total padatan terlarutnya tinggi (°Brix) yaitu mencapai 15-21% dan perawatannya yang mudah. Menurut Periadnadi (2018) penelitian yang berkaitan dengan khamir yang memfermentasi nira antara lain *S. cerevisiae*, *S. ellipsoideus*, *Candida tropicalis*, dan *Candida crusei*. Dalam fermentasi nira terdapat mikroorganisme yang dominan yaitu *S. cerevisiae* dan terdapat jenis khamir yang lain seperti *Schizosaccharomyces* sp. Dan *Candida* sp.

Penelitian khamir oleh Oliveira *et al* (2015) telah melakukan isolasi khamir dari buah-buahan dan dapat diketahui beberapa jenis spesies khamir amilolitik antara lain: *Candida parapsilosis*, *C. glabrata*, dan *Rhodotorula*

mucilaginoso. Sedangkan pada penelitian Tan gana *et al* (2014) telah berhasil melakukan isolasi khamir dari beberapa jenis buah dan ditemukan beberapa jenis khamir amiloitik antara lain: *Brandoniozyma complexa*, *Pichia anomala*, *Pseudozyma prolifica*, *Hypopichia burtoni* *Candida wangnamkhiaoensis*, *Kodamaea ohmeri* dan *Debaryomyces nepalensis*.

Khamir dapat diperoleh dengan cara isolasi. Isolasi khamir dengan cara mengambil khamir yang terdapat di alam dan menumbuhkannya pada medium buatan. Isolasi khamir memiliki prinsip kerja dimana memisahkan satu jenis khamir dengan khamir lainnya yang berasal dari campuran bermacam – macam mikroba. Hal tersebut dapat dikerjakan dengan menumbuhkan mikroba dalam suatu media padat dan sel – sel mikroba nantinya akan membentuk suatu koloni sel yang tetap pada tempatnya (Sutedjo, 1996). Isolasi khamir perlu dilakukan untuk mengetahui potensi khamir yang terdapat pada buah nangka dan nira tebu.

Khamir dapat diketahui dengan cara isolasi dan identifikasi. Identifikasi khamir dapat dilakukan baik secara konvensional maupun secara molekuler. Menurut Barnett *et al* (2000) bahwasannya indentifikasi konvensional meliputi morfologi mikroskopik dan makroskopik serta karakter biokimia. Identifikasi konvensional yang meliputi morfologi, fisiologi maupun biokimia memiliki beberapa kelemahan seperti memerlukan waktu pengerjaan yang lama dan dapat menimbulkan kesalahan identifikasi terutama pada spesies yang berkerabat dekat (Geiser, 2004). Hal tersebut juga didukung oleh pendapat Martins *et al* (2008) bahwasannya identifikasi konvensional membutuhkan waktu yang relatif lama, kerja yang cukup intensif dan interpretasi yang subjektif.

Identifikasi khamir secara molekuler dapat menggunakan aplikasi BLAST NCBI. Identifikasi khamir secara molekuler memiliki beberapa kelebihan jika dibandingkan dengan identifikasi secara konvensional yaitu dapat dilakukan secara mudah, cepat dan akurat (Fell *et al.*, 2000). Identifikasi khamir secara molekuler menggunakan analisis sekuens pada daerah ITS (*Internal Transcribed Spacer*) dari rDNA atau DNA ribosomal (Suryaningsih, dkk, 2018). ITS (*Internal Transcribed Spacer*) digunakan sebagai daerah acuan dalam analisis molekuler

khamir, karena daerah ITS dapat mengestimasi keanekaragaman dan identifikasi taksonomi khamir. Selain itu daerah ITS juga dapat dimanfaatkan sebagai daerah atau *region barcode* untuk khamir (Porras *et al.*, 2014).

Berdasarkan latar belakang diatas, penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi khamir dan nira tebu (*Saccharum Offiicinarum* Linnaeus) dan buah nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk) serta melihat potensi nira tebu (*Saccharum Offiicinarum*) dan buah nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk) sebagai pengembang roti.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana karakter dari khamir yang ditemukan pada nira tebu (*Saccharum Offiicinarum* Linnaeus) dan buah nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk) secara makroskopis dan mikroskopis ?
2. Bagaimana kemampuan khamir dari nira tebu (*Saccharum Offiicinarum* Linnaeus) dan buah nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk) dalam uji potensi pengembang adonan roti (uji fermentasi, uji toleransi glukosa 50 %, uji flokulasi dan uji hydrogen sulfida) ?
3. Apa saja spesies khamir yang teridentifikasi secara molekuler yang berpotensi sebagai pengembang adonan roti terbaik ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut

1. Untuk mengetahui karakter dari khamir yang ditemukan pada nira tebu (*Saccharum Offiicinarum* Linnaeus) dan buah nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk) secara makroskopis dan mikroskopis
2. Untuk mengetahui kemampuan khamir dari nira tebu (*Saccharum Offiicinarum* Linnaeus) dan buah nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk) dalam uji potensi pengembang adonan roti (uji fermentasi, uji toleransi glukosa 50 %, uji flokulasi dan uji hydrogen sulfida)
3. Untuk mengetahui spesies khamir yang teridentifikasi secara molekuler yang berpotensi sebagai pengembang adonan roti terbaik

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Penelitian ini dapat memberikan informasi khamir endofit dari nira tebu (*Saccharum Officinarum* Linnaeus) dan buah nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk) yang berpotensi sebagai pengembang roti
2. Penelitian ini dapat diaplikasikan ke dalam bidang mikrobiologi pangan

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Sampel yang digunakan adalah nira tebu (*Saccharum Officinarum* Linnaeus) dan buah nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk)
2. Menggunakan jenis tebu dengan varietas PR 12-01 dan nangka yang digunakan varietas nangka salak
3. Media yang digunakan untuk isolasi khamir adalah Yeast Malt Broth (YMB), Yeast Malt Extract Agar (YMEA), Yeast extract Pepton Glucose (YPG), dan media *Lead acetate*
4. Identifikasi khamir dilakukan dengan cara mengamati khamir secara mikroskopis dan makroskopis
5. Uji biokimia meliputi uji fermentasi karbohidrat, uji toleransi terhadap glukosa, uji H₂S, dan uji flokulasi
6. Identifikasi khamir secara molekuler dengan menggunakan ITS 1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') sebagai *forward primer* dan ITS 4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') sebagai *reverse primer*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Khamir (Yeast)

2.1.1 Ciri Umum Khamir

Khamir merupakan fungi uniseluler yang bereproduksi secara aseksual dan seksual, serta dapat tumbuh pada media buatan. Khamir berperan dalam proses pembuatan roti, bir, dan anggur (*wine*) (Subandi, 2010). Khamir berkembangbiak dengan proses aseksual yang disebut blastospora. Khamir yang berkembangbiak hanya secara aseksual diklasifikasi sebagai Deuteromycetes atau Fungi Imperfecti (Volk, 1993). Khamir dapat melakukan reproduksi aseksual dengan cara bertunas (*Budding*), pembelahan langsung atau dengan hifa. Secara umum, khamir dapat melakukan reproduksi seksual dengan membentuk asci, yang mengandung askospora haploid dengan jumlah bervariasi antara satu hingga delapan askospora. Askospora dapat menyatu dengan nukleus dan dapat membelah dengan pembelahan vegetatif, namun beberapa khamir memiliki askospora yang menyatu dengan askospora lain (Schneiter, 2004).

Khamir dikenal memiliki rentang ekologi yang cukup luas dan mampu hidup pada daerah ekstrem serta umumnya banyak ditemukan pada lingkungan yang memiliki bahan organik tinggi (Jumiyati, 2012). Khamir dapat ditemukan di berbagai buah terutama pada substrat yang kaya gula. Khamir juga telah berhasil diisolasi dari daun, bunga, buah-buahan, biji-bijian, serangga, kotoran hewan dan tanah (Spencer, 1977). Kelompok Khamir dari Saccharomycetales terdapat pada kulit kayu pohon tertentu dan juga terdapat pada buah-buahan serta pada lingkungan dengan kadar gula yang tinggi seperti nektar dan nira (Sampaio, 2008). Secara morfologis, umumnya sel khamir lebih besar dari pada kebanyakan bakteri. Khamir dapat disebut sebagai jamur uniseluler biasanya terlihat sebagai sel yang oval. Ukuran lebarnya berkisar antara 1-5 μm dan panjangnya 5-30 μm atau lebih. Biasanya berbentuk telur, tetapi beberapa ada yang memanjang atau berbentuk bola. memiliki struktur eukariot yang khas, memiliki dinding sel polisakarida yang tebal, merupakan anaerobik fakultatif, ragi *Candida albicans*

membentuk tunas oval dan juga menghasilkan pseudohyphae yang berguna untuk masuk lebih dalam ke jaringan epithelium. Setiap spesies mempunyai bentuk yang khas. Khamir tidak dilengkapi flagel atau organ-organ penggerak lainnya (Subandi,2010).

Khamir juga memiliki sifat endofit. Khamir endofit yaitu khamir yang dapat hidup di dalam jaringan tumbuhan yang sehat (Gai *et al.*, 2009). Khamir endofit dapat diisolasi dari daun, bunga dan buah. Menurut Isaeva *et al* (2010) khamir endofit yang terdapat pada buah dapat bereproduksi secara aktif apabila terjadi pemecahan gula dalam proses pemasakan buah. Beberapa khamir endofit yang telah ditemukan pada penelitian sebelumnya yaitu dari genus *Pichia* yang berasal dari buah (Camatti *et al.*, 2005). *Saccharomyces cerevisiae* dan *Saccharomyces rouxii* pada jus tebu (*Sacharum* sp) (Rashid *et al.*, 2013). *Kodamaea ohmeri* atau *Pichia ohmeri* juga ditemukan pada jus tebu (Anggraini *et al.*, 2019). *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae* B, *Candida apicola* dan *Zygosaccharomyces fermentati* pada buah manga (*Mangifera indica* L.), *Pichia holistii* dan *Zygosaccharomyces bisporus* pada buah papaya (*Carica papaya*), *Issatchenkia orientalis*, *Kluveromyce delphensis*, dan *Candida sorboxylosa* pada buah jeruk (*Cytrus* sp.) (Tsegaye *et al.*, 2016).

2.2 Taksonomi Khamir

Khamir dapat dikelompokkan menjadi 2 kelompok besar yaitu kelas *Ascomycota* dan *Basidiomycota*. *Ascomycota* terdiri dari 3 sub kelas yaitu *Hemiascomycetes*, *Archiascomycetes*, dan *Euascomycetes*. Kelas *Basidiomycota* terdiri dari tiga sub kelas yaitu *Uredinomycetes*, *Heterobasidiomycetes*, dan *Ustilaginomycetes* (Kurtzman & Sugiana, 2001). Khamir dibedakan menjadi dua kelompok berdasarkan fase seksualnya yaitu anamorfik dan teleomorfik. Anamorfik yaitu khamir yang belum diketahui fase reproduksi seksualnya, sedangkan teleomorfik yaitu khamir yang sudah diketahui fase reproduksi seksualnya. Sehingga terdapat kelompok *Ascomycota anamorfik*, *Ascomycota teleomorfik*, *Basidiomycota anamorfik* dan *Basidiomycota teleomorfik*. Contoh khamir *Ascomycota anamorfik* yaitu *Geotrichum*, *Candida* dan *Trigonopsis*. Contoh khamir *Ascomycota teleomorfik* yaitu *Saccharomyces*, *Pichia*,

Schizosaccharomyces. Contoh khamir *Basidiomycota* anamorfik yaitu *Cryptococcaceae* dan *Sporobolomycetaceae*. Contoh khamir *Basidiomycota* telemorfik yaitu *Septobasidiales* dan *Filobasidiales*. Golongan khamir dari kelompok *Ascomycota* dapat menghasilkan reproduksi seksual berupa askospora dan *Basidiomycota* dapat menghasilkan reproduksi seksual berupa basidiospora (Kurtzman dan Fell, 1998)

2.2.1 Filum Ascomycota

2.2.1.1 Sub Kelas Hemiascomycetes

Khamir sub kelas *Hemiascomycetes* memiliki ciri askus yang belum ada lapisan atau belum terbungkus pada askokarp, memiliki dinding sel yang terdiri dari dua lapis yaitu mannan dan glukan. Khamir dari sub kelas ini bereproduksi seksual secara pertunasan (*budding*) (Gandjar *et al*, 2006). Menurut Hammamoto dan Nakase (2000) khamir *Hemiascomycetes* bereproduksi aseksual dengan pembentukan tunas secara holoblastik. Contoh khamir sub kelas *Hemiascomycetes* yaitu *Candida*, *Trisgonopsis*, *Pichia*, dan *Debariomycetes* (Kurtzman and Fell, 1998).

2.2.1.2 Sub Kelas Archiascomycetes

Khamir sub kelas *Archiascomycetes* memiliki ciri dinding sel yang terdiri dari dua lapis dan memiliki askokarps untuk menghasilkan askospora. Khamir ini bereproduksi aseksual secara pembelahan sel (*fission*) (Gandjar *et al*, 2006). Contoh khamir sub kelas *Archiascomycetes* adalah *Schizosaccamycetales*, *Taphrina* dan *Protomyces* (Webster & Weber, 2007).

2.2.1.3 Sub Kelas Euascomycetes

Khamir sub kelas *Euascomycetes* memiliki ciri dinding sel yang didominasi oleh susunan kitin dan glukan. *Euascomycetes* umumnya yaitu *yeast-like fungi* karena dapat menghasilkan banyak hifa. *Euascomycetes* dapat membentuk asci didalam atau diastis askokarp (Hammamoto & Nakase, 2000). Contoh khamir kelas *Euascomycetes* adalah dari genus *Endomyces*, *Osporidium*, dan *Aureobasidium* (Kurtzman dan Fell, 1998).

2.2.2 Filum Basidiomycota

2.2.2.1 Sub Kelas Uredinomycetes

Uredinomycetes memiliki dinding sel yang terdiri dari susunan monosakarida dengan kandungan mannose yang banyak dan sedikit fruktosa dan rhmnosa.. Sub kelas *Uredinomycetes* memiliki ciri septa seperti *micopore* yang memiliki tepi bertingkat (Satyanarayana, 2009). Contoh dari *Uredinomycetes* dari genus *Sporidiobolus* dan *Rhodosporidium* (Fell et al, 2000).

2.2.2.2 Sub Kelas Heterobasidiomycetes

Heterobasidiomycetes memiliki bentuk yang beranekaragam (Weber & Webster, 2007). *Heterobasidiomycetes* memiliki dinding sel dengan komposisi gula seperti glukosa, mannose dan xylose. *Heterobasidiomycetes* memiliki ciri septa *dolipore*(Satyanarayana, 2009). Contoh khamir dari sub kelas *Heterobasidiomycetes* yaitu dari genus *Filobasidiella* dan *Phaffia*.

2.2.2.3 Sub Kelas Ustilaginomycetes

Ustilaginomycetes memiliki dinding sel yang mengandung glukosa, galaktosa , mannose dan tidak mengandung xylose. *Ustilaginomycetes* memiliki ciri septa seperti *micopore* yang memiliki margin bertingkat (Satyanarayana, 2009). Contoh khamir dari sub kelas *Ustilaginomycetes* yaitu dari genus *Schizonela* dan *Sporisorium* (Prilinger & Lopandic, 2015).

2.3 Tebu (*Saccharum Officinarum* Linnaeus)

Sistematika tumbuhan tebu adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae – Tumbuhan
Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Monocotyledoneae
Ordo	: Graminales
Familia	: Gramineae
Genus	: <i>Saccharum</i>
Spesies	: <i>Saccharum officinarum</i> Linnaeus (Tjitrosoepomo ,2004)

Tumbuhan yang potensial untuk menghasilkan bioethanol antara lain tanaman yang memiliki kadar karbohidrat tinggi, seperti tebu, nira, dan bagas (ampas tebu) (Irvan,2015). Nira tebu merupakan cairan hasil perasan yang

diperoleh dari penggilingan tebu yang memiliki warna coklat kehijauan. Nira tebu selain mengandung gula, juga mengandung zat-zat lainnya (zat non gula). Kandungan gula pada nira tebu berbeda-beda, hal tersebut dipengaruhi oleh beberapa hal, yaitu cara pemeliharaan, jenis tebu, iklim, dan umur tebu (Irawan, 2015). Mikroorganisme yang dominan dalam fermentasi nira adalah *Saccharomyces cerevisiae*, disamping jenis khamir yang lain seperti *Schizosaccharomyces* sp dan *Candida* sp serta beberapa jenis bakteri lain (Irmayuni, 2018). Melalui proses fermentasi menggunakan khamir *Saccharomyces Cerevisiae*, nira akan diubah menjadi glukosa dan fruktosa (monosakarida), kemudian monosakarida diubah menjadi etanol dan karbondioksida (Wibowo, 2015).

2.3.1 Morfologi Tebu (*Saccharum Officinarum* Linnaeus)

Tebu (*Saccharum Officinarum* Linnaeus) merupakan salah satu jenis tanaman yang hanya dapat ditanam di daerah yang memiliki iklim tropis (Misran, 2005). Tanaman tebu memiliki bentuk yang tinggi kurus, tidak bercabang dan tumbuh tegak. Tanaman ini memiliki tinggi batang mencapai 3 sampai 5 meter atau lebih. Pada batang tanaman tebu terdapat lapisan lilin berwarna putih dan keabu-abuan. Ruas-ruas pada batang tebu dibatasi oleh buku-buku yang merupakan tempat duduk daun tebu (Wijayanti, 2008).

2.3.2 Nira Tebu (*Saccharum Officinarum* Linnaeus)

Nira tebu adalah cairan hasil perasan yang diperoleh dari penggilingan tebu yang memiliki warna coklat kehijauan. Selain mengandung gula, nira tebu juga mengandung zat-zat non gula seperti protein, pati, dan gula. Kandungan sukrosa dalam batang tebu dapat dipengaruhi oleh cara pemeliharaan, jenis tebu dan umur tebu (Culver, 2008). Nira tebu yang mengandung sukrosa, diperoleh dari proses pencacahan dan penggilingan. Proses ini dimaksudkan untuk mempermudah proses ekstraksi berikutnya. Dalam unit penggilingan tebu, nira terperah keluar, yang tersisa adalah ampas tebu (Kultsum, 2009). Nira tebu mengandung senyawa – senyawa kimia baik untuk proses fermentasi. Komposisi

senyawa kimia pada nira tebu berbeda – beda tergantung jenis tebu, umur tebu dan lokasi penanaman (Purnomo,2000).

Kandungan nira tebu paling banyak didapatkan dari batang tebu yaitu sebesar 82,5 %. Nira tebu memiliki kandungan utama yaitu sukrosa sebanyak 8-21%. Sukrosa atau gula ini termasuk golongan disakarida dengan rumus kimia $C_{12}H_{22}O_{11}$. Sukrosa ini tidak berikatan dengan senyawa lain di dalam tanaman, umumnya terdapat pada tanaman tebu (*Saccharum officinarum*) (Paryanto *et al.*, 1999).

Kondisi dan sifat dari nira tebu akan menentukan sifat dan mutu produk yang didapatkan. Nira memiliki rasa manis dan bau yang harum. Rasa manis pada nira disebabkan oleh bahan-bahan dari jenis gula seperti sukrosa, fruktosa glukosa, dan maltosa. Selain itu, terdapat bahan lain non gula yaitu protein, lemak, air dan pati (Gountara & Wijandi, 1985). Sedangkan menurut Reece (2003) bahwasannya komposisi padatan terlarut dalam nira tebu yaitu terdapat bahan gula seperti sukrosa, glukosa, fruktosa, dan oligosakarida, selain itu terdapat garam organik dan anorganik serta asam organik (asam karboksilat dan asam amino). Bahan-bahan organik yang bukan termasuk gula yaitu protein, pati, polisakarida terlarut, lilin, lemak, dan fosfolipid.

Tabel 2.1. Informasi Nilai Gizi dari Nira Tebu per 120 gram

Komponen	Jumlah
Lemak Total	0 g
Protein	0 g
Karbohidrat total	14 g
Gula	12 g
Natrium	20 g
Kalium	30 g
Kalsium	3,29 g

Sumber : SNI 3719 : 2014

2.4 Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk)

Sistematika tumbuhan nangka adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae – Tumbuhan
Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Urticales
Familia	: Moraceae
Genus	: Artocarpus
Spesies	: <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lamk (Tjitrosoepomo, 2004)

Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk) merupakan buah populer di daerah tropis terutama di Indonesia, hampir di seluruh wilayah dapat ditemui buah ini (Aggriana, 2017). Nangka dapat melakukan pertumbuhan terbaik terjadi di dataran rendah iklim tropika, dan tanaman ini toleran terhadap suhu yang sedikit lebih rendah. Buah nangka memiliki singkarpus yang lonjong dan sangat besar, beberapa mencapai panjang 70 cm dan diameter 40 cm, dengan bobot hanya sekitar 8-10 kg. Pola pertumbuhan buah nangka yang kauliflorous, yaitu buah terbentuk tunggal atau dalam kelompok yang melekat langsung pada batang atau dahan pohon. Dengan tangkai yang kuat, dan semua buahnya berbiji (Rubatzky, 1998).

2.4.1 Morfologi Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk)

Pohon Nangka berukuran besar yang dapat menghasilkan 150-250 buah dalam satu tahun. Buah Nangka mencapai matang penuh setelah 100 -120 hari. Bagian yang dapat dimakan adalah jaringan perhiasan berwarna kuning yang berdaging dan berair, membungkus biji tunggal yang berpulut. Daging buah nangka memiliki rasa manis dan masam (30% buah dan 5% biji). Nangka memiliki 2 tipe yaitu (1) nangka yang daging buahnya lunak dan lembek dan (2) yang daging buahnya keras. Selain itu, bentuk buah nangka sebagian terbesar oblong dengan permukaan buah berduri gemuk, pendek, tajam dan berbentuk segi delapan (Rubatzky, 1998).

Nangka memiliki daging buah yang sesungguhnya yaitu dengan perkembangan dari tenda bunga, berwarna kuning keemasan apabila masak, berbau harum manis yang keras, berdaging terkadang berisi cairan (nektar) yang manis. Bentuk biji bulat lonjong sampai jorong agak gepeng, panjang 2-4 cm, tertutup oleh kulit biji yang tipis coklat seperti kulit, endocarp yang liat keras keputihan, dan eksokarp yang lunak (Rukmana, 2008).

Buah nangka relatif besar, berbiji banyak dan kulitnya berduri lunak. Setiap biji dibalut oleh daging buah (endocarp) dan eksokarp yang mengandung gelatin. Buah nangka juga merupakan buah majemuk (sinkarpik), yakni berbuga banyak yang tersusun tegak lurus pada tangkai buah (porosnya) membentuk bangunan besar yang kompak dan memiliki bentuk bulat hingga bulat lonjong. Duri buah yang dilihat sebenarnya bekas kepala putiknya. Kulit buah yang berwarna hijau sampai kuning kemerahan. Buah nangka memiliki daging buah tipis hingga tebal yang setelah matang berwarna kuning merah, lunak, manis dan aromanya spesifik (Sunaryono, 2005).

2.4.2 Buah Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk)

Buah nangka mengandung glukosa yang cukup besar. Selain itu buah nangka kaya akan vitamin A yang baik untuk kesehatan mata dan kalium untuk menangkal hipertensi. Buah nangka merupakan salah satu jenis buah yang paling banyak ditanam di daerah tropis. Tanaman ini memiliki umur tanam yang Panjang, dapat mencapai puluhan tahun (Wardhani, 2009).

Daging buah nangka muda (tewel) dapat dimanfaatkan sebagai sayuran yang mengandung albuminoid dan karbohidrat. Secara umum buah nangka mengandung vitamin A, B, dan C, kalsium, kalium, magnesium dan ferum atau zat besi. Kandungan nutrisi dalam buah nangka tergolong relatif tinggi, jika dibandingkan dengan buah-buahan lain. Buah nangka juga memiliki senyawa thiamine, riboflavin, dan niacin. Dalam 100 gram buah nangka terdapat kurang lebih 27,6% karbohidrat, 1,2% protein dan 106 kalori (Kurniati, 2013). Buah nangka mengandung gula alami seperti fruktosa dan sukrosa yang dapat dijadikan sebagai sumber energi dan tidak mengandung lemak jenuh atau kolesterol.

Tabel 2.2 Nilai gizi buah nangka per 100 g

Komponen	Jumlah
Karbohidrat	23,5 g
Protein	1,72 g
Lemak total	0,64 g
Vitamin A	0,073 g
Vitamin C	13,7 g
Vitamin E	0,34 g

Sumber : USDA National Nutrition data base

2.5. Syarat Khamir Sebagai Pengembang Roti

Karbohidrat merupakan sumber energi utama dalam makhluk hidup. Karbohidrat mengandung unsur-unsur senyawa kimia C, H, dan O. Karbohidrat juga terdapat dalam tumbuh-tumbuhan sebanyak 75% (Sastrohamidjojo, 2005). Kandungan molekul gula yang terdapat dalam karbohidrat yaitu glukosa. Pada dasarnya terdapat empat jenis karbohidrat yaitu pertama, monosakarida yang terdiri dari satu molekul gula misalnya glukosa, fruktosa, dan galaktosa. Kedua, disakarida yang terdiri dari dua unit gula, misalnya sukrosa, laktosa dan maltose. Ketiga, oligosakarida yang terdiri dari 3-10 unit gula, misalnya rafinosa, stakiosa dan verbaskosa serta yang keempat yaitu polisakarida yang terdiri dari lebih sepuluh unit gula, misalnya pati, glikogen dan serat (Muchtadi, 2009).

Fruktosa memiliki rumus kimia yang sama dengan glukosa ($C_6H_{12}O_6$) tetapi dalam susunan atom hydrogen dan oksigen pada rantai karbonnya berbeda. Selain itu tingkat kemanisan dari fruktosa 173 lebih manis dibandingkan dengan glukosa yaitu 74 dan sukrosa 100. Selain fruktosa terdapat glukosa yang sering disebut dengan dekstrosa atau gula anggur. Karena glukosa terdapat banyak dalam buah-buahan, sayur-sayuran, madu, sirup, jagung, dan molase (tetes tebu). Jenis karbohidrat lainnya yaitu sukrosa yang memiliki rumus kimia $C_{12}H_{22}O_{11}$. Sukrosa ini terdiri dari satu unit glukosa dan fruktosa. Gula yang diproduksi dari tebu hampir 100% terdiri dari sukrosa, selain itu terdapat gula merah yang berasal dari palma (aren, kelapa) yang mengandung glukosa atau fruktosa dalam jumlah yang tidak banyak (Muchtadi, 2009).

Berdasarkan penelitian Z, Asyikeen *et al* (2012) bahwasannya dalam peran utama ragi roti dalam pengembangan adonan, kapasitas fermentasi menggunakan sumber karbon secara bersamaan dengan produksi karbon dioksida adalah parameter penting untuk pembuatan roti (Benitez *et al.*, 1996). Semua strain ragi yang diuji diidentifikasi sebagai *S. cerevisiae* karena kemampuannya untuk memfermentasi sukrosa, maltosa, fruktosa, glukosa, galaktosa dan rafinosa tetapi tidak pada laktosa.

Berdasarkan Penelitian Z, Asyikeen *et al* (2012) bahwasannya produksi hidrogen sulfida oleh 14 strain *S. cerevisiae* yang terisolasi ditentukan selama fermentasi media asetat timbal (LA). Menurut Henschke dan Lee (1994) melaporkan bahwa properti produksi hidrogen sulfida tidak berguna untuk ragi anggur. Ragi dengan peningkatan produksi hidrogen sulfida tidak diinginkan untuk pembuatan roti karena memberikan rasa dan rasa yang mengganggu kualitas roti. Namun, dalam penelitian ini semua strain ragi menghasilkan hidrogen sulfida termasuk strain ragi komersial. Karena strain komersial menunjukkan produksi hidrogen sulfida yang tinggi (+++ respon intensif), oleh sebab itu strain ragi lainnya dapat diterima sebagai ragi pembuat roti.

Khamir yang dapat tumbuh dalam media dengan konsentrasi glukosa tinggi, maka glukosa yang tersedia 3-20 % diasimilasi dan glukosa yang tersisa digunakan untuk jalur fermentasi. Khamir dari genus *Sacharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Issatchenkia* dan *Kluyveromyces* dapat memfermentasikan glukosa menjadi karbondioksida serta etanol (Gandjar *et al.*, 2006). Ketika proses pemanggangan roti, sangat penting untuk khamir dapat bertahan pada tekanan osmotik minimal. Tekanan osmotik sangat penting dalam menentukan jumlah sel. Apabila terjadi tekanan osmotik sel mati dikarenakan penghilangan molekul air karena modifikasi struktural fosfolipid dan toksisitas yang disebabkan oleh konsentrasi zat terlarut yang tinggi. Oleh sebab itu perlu dilakukan uji pertumbuhan pada media Glukosa dengan tekanan osmotik pada pertumbuhan spesies yang berbeda-beda untuk mengetahui kemampuan pertumbuhan khamir tersebut dalam tekanan osmotik (Karki *et al.*, 2017).

Kemampuan flokulasi dapat diuji pada strain khamir. Menurut Amri *et al* (1982) sel-sel khamir yang memiliki kemampuan untuk flokulasi disebabkan oleh proses adhesi sel dimana karakteristik yang menarik dalam industri pembuatan roti dan pembuatan bir. Berdasarkan penelitian Z, Asyikeen *et al* (2012) menunjukkan hanya galur SMK9 (terisolasi dari lengkung) dan SDB10 (terisolasi dari sirsak) memiliki kemampuan untuk flokulasi. Karakteristik flokulasi ditentukan oleh sel-sel khamir yang saling menempel dan memberikan pemisahan yang mudah dari media padat. Fenomena ini memiliki efek ekonomi pada produksi biomassa khamir karena dapat mengurangi biaya energi sentrifugasi biomassa (Iraj *et al.*, 2002). Selain itu, sifat flokulasi *S. cerevisiae* memastikan kepadatan sel yang tinggi dan volume besar sel yang dipanen dan juga mampu meningkatkan produktivitas etanol selama proses fermentasi (Kevin, 2005)

2.6 Identifikasi Khamir

2.6.1 Identifikasi Khamir Secara Konvensional

Identifikasi khamir secara konvensional dilakukan berdasarkan karakter morfologi dan fisiologi. Karakter morfologi khamir yaitu secara mikroskopik dan makroskopik (Barnet *et al*, 2000). Pengamatan khamir secara mikroskopik meliputi bentuk sel, ukuran sel, tipe pertunasan dan tipe reproduksi secara seksual dan aseksual (Yarrow, 1998). Sedangkan pengamatan secara makroskopik meliputi bentuk, tekstur, warna, permukaan dan elevasi (Suryaningsih, 2018). Identifikasi secara konvensional juga dapat dilakukan berdasarkan fisiologi dan biokimia (Ciardo *et al*, 2006). Menurut Kurtzman *et al* (2003) uji fisiologi dan biokimia yang digunakan untuk identifikasi khamir antara lain adalah kemampuan memfermentasi beragam jenis gula, kemampuan mengasimilasi beragam jenis karbon dan karbohidrat, kebutuhan akan vitamin, pertumbuhan pada suhu tertentu dan uji urease (Barnett *et al*, 2000).

2.6.2 Identifikasi Khamir Secara Molekuler

Identifikasi metode molekuler dengan data sekuen gen dapat dilakukan untuk mengidentifikasi khamir (Kurtzman dan Fell, 2006). Menurut Carlile *et al* (2001) identifikasi molekuler lebih akurat dan efisien daripada identifikasi

konvensional. Kelompok gen yang lebih akurat adalah kelompok gen-gen dari ribosomal DNA (rDNA) (Kurtzman dan Fell, 2003).

Ribosomal DNA adalah suatu daerah dalam nuklear DNA yang mengkode ribosom. Ribosom merupakan organel sel yang berperan dalam sintesis protein dan terdiri dari subunit kecil (18S) dan subunit besar (28S). Urutan nukleotida rDNA berisi dua daerah non-coding (ITS1 dan ITS2) dan gen 5,8S rDNA. Urutan nukleotida pada gen 5,8S rDNA sangat *conserved*, tetapi dua daerah ITS lainnya tidak ditranslasikan menjadi protein dan sangat bervariasi (Articus, K., 2004).

Daerah ITS terdiri atas ITS1 dan ITS2 yang mengapit gen 5,8S. Daerah tersebut pada khamir umumnya berukuran 300-900 bp (Fujita *et al.*, 2001). Daerah ITS juga memiliki tingkat variasi yang tinggi dibandingkan dengan daerah lainnya pada rDNA. Oleh karena itu, analisis sekuen daerah ITS dapat digunakan untuk mengidentifikasi antar spesies khamir yang berkerabat dekat (Ciardo *et al.*, 2006). Menurut Tavanti *et al* (2005) dua spesies baru yaitu *Candida orthopsilosis* dan *Candida metapsilosis* yang dibedakan dari *Candida parapsilosis* berdasarkan analisis sekuen daerah ITS. Kedua spesies tersebut sebelumnya diidentifikasi sebagai *Candida parapsilosis* kelompok I dan II karena memiliki sekuen yang identik.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi eksperimental dengan mengisolasi nira tebu dan buah nangka. Sedangkan rancangan penelitian yang digunakan adalah deskriptif kualitatif. Data yang diperoleh disajikan secara deskriptif meliputi identifikasi makroskopis dan mikroskopis pada khamir, analisis biokimia (uji kemampuan fermentasi karbohidrat, uji toleransi terhadap glukosa 50%, uji flokulasi dan uji produksi H₂S) dan analisis biomolekuler.

3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember tahun 2019 sampai dengan bulan Agustus tahun 2020. Pengambilan sampel tebu dilakukan di Desa Krebet Kecamatan Bululawang Kabupaten Malang dan sampel pengambilan sampel buah nangka dilakukan di Desa Putukrejo Kecamatan Gondanglegi Kabupaten Malang. Penelitian identifikasi morfologi makroskopis dan mikroskopis khamir dilakukan di laboratorium Mikrobiologi. Sedangkan analisis biomolekuler (uji kemampuan fermentasi karbohidrat, uji toleransi terhadap glukosa 50%, uji flokulasi dan uji produksi H₂S) dilakukan di Laboratorium Biokimia. Penelitian isolasi DNA, uji kualitatif produk PCR dilakukan di laboratorium Genetika Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Sedangkan proses sekuensing menggunakan jasa Bioneer Korea Selatan.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung eppendorf dengan kapasitas 50 ml, cawan petri, mikropipet, pipet tetes, pipet volume, jarum ose, drigalski, Erlenmeyer, autoklaf, beaker glass, botol flakon, gelas ukur, *hot plate* dan *stirrer*, bunsen, incubator, *Laminar Air Flow* (LAF), neraca analitik, *centrifuge*, *vortex*, *blue tip*, *yellow tip*, *white tip*, tabung durham, tabung reaksi, mikroskop, *cover glass*, *deck glass*, shaker erlenmeyer, cetakan agar, *microtube*, *elektroforesis*, *geldoc*, *thermal cycler*.

3.3.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah nira tebu (*Saccharum officinarum* Linnaeus) dan buah nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.). Media yang digunakan, *Yeast Malt Broth* (YMB), *Yeast Malt Extract Agar* (YMEA), *Glucose Peptone Yeast* (GPY), *Sodium DL- Lactate*, aquades steril, aluminium foil, tisu, plastik wrap, kertas label, alkohol 70%, CTAB buffer (EDTA, Tris-HCl, NaCl, CTAB, β -mercaptoethanol), chloroform, isoamylalcohol, isopropanol, *ethanol absolute*, ddH₂O, TE buffer, PCR mix, gel Agarose, Marker 1 kb, primer ITS1 dan ITS4, EtBr, dan *loading dye*.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan Media

3.4.1.1 Media *Yeast Malt Broth* (YMB)

Pembuatan media YMB berdasarkan Kurtzman dan Fell (1998). Pembuatan media YMB 1000 ml membutuhkan 3 gram *yeast extract*, 10 gram glukosa, 5 gram peptone, 3 gram *malt extract*, dan 1000 ml aquades. Bahan-bahan yang telah siap kemudian dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer. Tabung erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan aluminium foil. Media kemudian dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* diatas *hotplate*. Media yang telah dihomogenkan kemudian disterilisasi dengan autoklaf dengan suhu 121 °C selama 15 menit. Media YMB yang sudah steril ditambahkan antibiotik *Sodium DL- Lactose* sebagai antibakteri sebanyak 120 μ l (*Biomedical Engineering*, 2015).

3.4.1.2 Media *Yeast Malt Extract Agar* (YMEA)

Pembuatan Media YMEA berdasarkan Kurtzman dan Fell (1998). Pembuatan media YMEA 1000 ml membutuhkan 10 gram glukosa, 3 gram *yeast extract*, 5 gram pepton, 3 gram *malt extract*, 20 gram *microbial agar*, dan 1000 ml aquades. Bahan-bahan yang telah siap kemudian dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer. Tabung erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan aluminium foil. Media kemudian dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* diatas *hotplate*. Media yang telah dihomogenkan kemudian disterilisasi dengan autoklaf dengan suhu 121 °C selama 15 menit. Media YMEA yang sudah steril ditambahkan *Sodium DL-Lactose* sebagai antibakteri sebanyak 120 μ l pada saat suhu media 50

°C (*Biomedical Engineering*, 2015). Kemudian media dihomogenkan. Media tersebut dituangkan ke cawan petri dan ditunggu hingga media padat.

3.4.1.3 Media Fermentasi Karbohidrat

Pembuatan media fermentasi karbohidrat berdasarkan Atlas (2005). Pembuatan 1000 ml media fermentasi karbohidrat membutuhkan 10 gram pepton, 5 gram NaCL, 3 gram *meat extract*, 50 ml *Carbohydrate solution*, dan 10 ml *Andrade's indicator*. Pembuatan media *Carbohydrate solution*, dan *Andrade's indicator* dibuat secara terpisah.

Media *Carbohydrate solution* 100 ml dibuat dengan cara mengencerkan 10 gram gula (glukosa, sukrosa, fruktosa dan laktosa) dalam 100 ml aquades. Selanjutnya media *Carbohydrate solution* disterilisasi menggunakan *autoklaf*. Semua bahan selain *Carbohydrate solution* juga diencerkan dalam 990 ml aquades. sedangkan pembuatan media *Andrade's indicator* 100 ml membutuhkan 0,1 gram *acid fuchsin*, 16 ml NaOH dilarutkan dalam 100 ml aquades (Atlas, 2005). Media *Andrade's indicator* digunakan untuk memberikan warna pada media sehingga dapat dimanfaatkan sebagai indikator perubahan pH. Menurut Giri & Kindo (2015) media *Andrade's indicator* adalah indikator perubahan pH yang dapat melakukan perubahan warna merah pada media fermentasi menjadi merah muda.

Media fermentasi karbohidrat 1000 ml dibuat dengan cara mengencerkan 10 gram pepton, 3 gram *meat extract* dalam 990 ml aquades steril dan ditambahkan 10 ml media *Andrade's Indicator*. Kemudian dihomogenkan dalam erlenmeyer dan dimasak di atas *hotplate* sampai mendidih. Setelah media mendidih media sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi tabung durham. Tabung reaksi dikocok secara perlahan dan pastikan media juga memasuki tabung durham. Tabung reaksi disterilisasi menggunakan *autoklaf*. Setelah media dingin ditambahkan 0,5 ml *Carbohydrate solution* pada setiap tabung reaksi (Atlas, 2005).

3.4.1.4 Media YPG (*Yeast Peptone Glucose*)

Pembuatan media YPG Broth dengan konsentrasi glukosa 50 % (Ali and Mohammed (2014)). Pembuatan media YPG 1000 ml dengan konsentrasi glukosa 50% dibuat dengan mengencerkan 500 gram glukosa, 5 gram peptone, 5 gram *yeast extract* dalam 500 ml aquades. Kemudian disterilisasikan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media tersebut dituangkan ke tabung reaksi.

3.4.1.5 Media *Lead Acetate*

Pembuatan media *Lead Acetate* dibuat mengikuti Karki *et al* (2017). Pembuatan 1000 ml media *Lead Acetate* dengan mengencerkan 40 gram glukosa, 5 gram *yeast extract*, 3 gram peptone, 0,2 gram ammonium sulfat, 1 gram *lead acetate*, 20 gram agar dan 1000 ml aquades. Media kemudian disterilisasi dengan autoklaf dengan suhu 121 °C selama 15 menit.

3.4.2 Isolasi Khamir

Tahap awal dalam isolasi khamir dari nira tebu adalah dengan sterilisasi permukaan. Sterilisasi permukaan batang tebu dipilih yang sehat dan tua dengan ukuran 60 cm serta berumur kurang lebih 8 bulan. Tahap selanjutnya yaitu pembuatan nira tebu. Batang tebu sebanyak 150 gram dibersihkan dari kulitnya dan dipotong dengan ukuran 2x2 cm menggunakan pisau steril, kemudian diblender untuk mendapatkan nira tebu dengan 100 ml aquades steril. Nira tebu tersebut disaring menggunakan penyaring steril ke dalam tabung ependorf steril 25 ml dalam kondisi aseptik. Tahap terakhir yaitu dengan menambahkan media cair YMB dan larutan sukrosa sebanyak 25 ml hingga penuh pada tabung ependorf yang berbeda dan ditambahkan *Sodium DL-Lactose* sebagai antibakteri kemudian ditutup sampai rapat dan dipastikan tidak ada gelembung. Selanjutnya proses fermentasi dan diinkubasi selama 48 jam atau sampai terlihat adanya gelembung pada suhu 27 °C (Anggraini *et al.*, 2019; Watanebe *et al.*, 2016). Proses fermentasi dimulai dengan adanya gelembung udara yang dijadikan sebagai acuan tumbuhnya khamir (Kurtzman dan Fell, 1998).

Isolasi khamir pada Buah Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.) yaitu dengan memotong daging buah nangka dengan ukuran 2x2 cm menggunakan

pisau steril kemudian potongan tersebut dimasukkan kedalam tabung endorf dengan kapasitas 50 ml sampai benar-benar padat kemudian dituangkan media cair YMB dan larutan sukrosa hingga penuh pada tabung endorf yang berbeda dan ditambahkan *Sodium DL-Lactose* setelah itu ditutup sampai rapat dan dipastikan tidak ada gelembung (Watanebe *et al.*, 2016). Kemudian diinkubasi selama 48 jam atau sampai terlihat adanya gelembung udara pada suhu 27 °C. Proses fermentasi dimulai dengan adanya gelembung udara yang dijadikan sebagai acuan tumbuhnya khamir (Kurtzman dan Fell, 1998).

Khamir yang tumbuh pada media YMB dilakukan proses pengenceran agar isolat yang lebih mudah didapatkan. Teknik Pengenceran dimulai dengan pengambilan 1 ml larutan sampel yang ditumbuhkan pada media YMB kemudian dimasukkan ke tabung reaksi yang sudah terdapat larutan aquades steril sebanyak 9 ml. Pengenceran dilakukan dari 10^{-1} hingga 10^{-3} , kemudian dilakukan inokulasi pada media YMEA yang diambil dari pengenceran 10^{-3} sebanyak 200 μ l dengan metode *spread plate* kemudian diinkubasi pada suhu 27°C selama 72 jam (Rashid *et al.*, 2013). Kemudian diamati pertumbuhan koloni khamir dan dilakukan subkultur sampai mendapatkan isolat yang murni.

3.4.3 Purifikasi

Purifikasi dilakukan dengan melakukan subkultur sampai mendapatkan isolat yang murni. Sebelum purifikasi dilakukan perbanyakkan isolat pada koloni yang terpilih dengan cara mengambil isolat khamir dari media YMEA dengan jarum ose steril kemudian jarum ose yang sudah ada isolatnya dimasukkan ke tabung flakon yang telah berisi media YMB sebanyak 3 ml. Selanjutnya di shaker dengan kecepatan 160 rpm selama 7 x 24 jam dengan suhu ruang. Kemudian diinokulasi dengan teknik *spread plate* pada cawan petri yang sudah berisi media YMEA dan diinkubasi selama 48 jam pada 27°C. Kemudian dilakukan kultur pada media YMEA dengan *streak kuadran plate* dan diinkubasi selama 48 jam pada 27°C. Setelah koloni terpisah dilakukan inokulasi pada media YMEA miring pada suhu 27°C selama 48 jam. Setelah mendapatkan kultur murni dapat dilakukan identifikasi (Widiastutik dan Nur, 2014 ; Cyriacus dan Kingsley, 2010).

3.4.4 Identifikasi Morfologi Makroskopis dan Mikroskopis

Identifikasi morfologi makroskopis dilakukan dengan buku acuan *The Yeast Taxonomic Study* (Kurtzman dan Fell, 1998). Identifikasi secara makroskopis yang diamati yaitu bentuk, warna, tekstur, tepian dan permukaan koloni (elevasi). Pengamatan dilakukan pada biakan berumur 48 jam ditumbuhkan dalam media YMEA pada suhu ruang (20-25 °C).

Identifikasi morfologi mikroskopis dilakukan dengan buku acuan *The Yeast Taxonomic Study* (Kurtzman dan Fell, 1998). Teknik pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan teknik apusan kering yaitu isolat khamir diletakkan pada *deck glass* dan ditetaskan aquades steril. Kemudian diamati dibawah mikroskop dengan awal perbesaran 4x10 sampai 100x10 dengan melihat ukuran, bentuk dan reproduksi aseksual sel khamir.

3.4.5 Uji Potensi Khamir Sebagai Pengembang Roti

3.4.5.1 Uji Fermentasi Karbohidrat

Uji fermentasi karbohidrat adalah uji gula dengan menggunakan beberapa macam jenis gula. Jenis gula yang digunakan penelitian ini terdiri dari glukosa, sukrosa, fruktosa, dan laktosa. Uji fermentasi karbohidrat sebagai tolak ukur proses identifikasi khamir. Uji fermentasi karbohidrat menggunakan isolat khamir yang diambil berusia 48 jam sebanyak 100 µl dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan fermentasi karbohidrat dengan konsentrasi masing-masing 10% dan dimasukkan tabung durham, kemudian diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruangan dan diamati perubahannya setiap hari (Harley & Prescott, 2002).

Uji fermentasi karbohidrat akan mengidentifikasi adanya fermentasi karbohidrat menjadi etanol jika media berwarna merah dan disertai adanya gelembung dan apabila terjadi perubahan warna merah menjadi merah muda mengidentifikasi khamir telah menghasilkan asam karena terjadi fermentasi gula (Atlas, 2005). Tabung durham berfungsi menangkap gelembung yang mengidentifikasikan adanya proses fermentasi yang dilakukan oleh khamir.

3.4.5.2 Uji Toleransi Glukosa 50%

Isolat yang dapat melakukan fermentasi karbohidrat dilakukan uji pertumbuhan pada media glukosa dengan konsentrasi 50% (m/v). Uji pertumbuhan pada media *Yeast Extract Peptone Glucose* (YPG) dengan konsentrasi tersebut dilakukan dengan memasukkan isolat khamir ke dalam tabung reaksi yang telah berisi media YPG menggunakan jarum ose, kemudian diinkubasi pada suhu 25°C selama 48 jam (Ali & Khan, 2014). Kemudian diamati nilai kepadatan khamir menggunakan Spektrofotometer UV-vis dengan Panjang gelombang 600 nm selama 24 jam sekali dan media pertumbuhan sebagai blank (Priya *et al.*, 2016). Khamir yang mampu hidup dalam kondisi larutan glukosa tinggi ditandai dengan adanya proses fermentasi.

3.4.5.3 Uji Flokulasi

Uji flokulasi menurut Maryam *et al* (2017) Isolat khamir diinokulasikan dalam 10 ml *Yeast extract Peptone Glucose* (YPG) dan diinkubasi pada inkubator shaker dengan kecepatan 140 rpm dan suhu 30 °C selama 3 hari untuk mengamati flokulasi yang terbentuk. Isolat khamir yang telah diinkubasi, disentrifugasi pada *sentrifuge* dengan kecepatan 500 rpm selama 60 menit. Hasil yang diamati adalah adanya endapan pada media. Menurut Vesterpen *et al* (2001) khamir yang membentuk endapan dibawah menunjukkan hasil akhir fermentasi dan khamir yang dapat menghasilkan endapan dari uji flokulasi memiliki keuntungan untuk produksi ragi komersial untuk pengembang roti karena lebih mudah dipisahkan dari media tanpa ada proses filtrasi.

3.4.5.4 Uji Hidrogen Sulfida

Uji Hidrogen Sulfida menurut Ono (1991) dilakukan dengan menumbuhkan isolat khamir pada media *Lead Acetate* dengan metode tusuk pada bagian dasar median dengan jarum enten. Kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 7 hari. Apabila menghasilkan warna hitam , maka positif memproduksi hydrogen sulfida.

3.4.6 Identifikasi Molekuler

3.4.6.1 PCR Koloni

Isolasi dan pemurnian DNA khamir adalah salah satu kunci keberhasilan dalam identifikasi molekuler. Penelitian ini menggunakan metode *direct* PCR. Metode *direct* PCR ini merupakan metode yang sederhana dan spesifik. Metode *direct* PCR yaitu menggunakan sel khamir langsung sebagai template, tanpa ekstraksi dan pemurnian DNA sebelum PCR (Mirhendi *et al.*, 2007).

Amplifikasi ITS rDNA dilakukan dengan mengambil satu koloni khamir menggunakan ose steril kemudian dimasukkan ke dalam mikrotube. Selanjutnya ditambahkan PCR mix 25 µl [DNA *template* 1 µl, primer *forward* 1 µl, primer *reverse* 1 µl, ddH₂O 7,5 µl, PCR mix 12,5 µl]. Primer yang digunakan adalah ITS 1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') sebagai *forward primer* dan ITS 4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') sebagai *reverse primer*. Kemudian mikrotube ditutup sampai rapat dan dihomogenkan menggunakan spindown. Setelah homogen, mikrotube diletakkan ke dalam cetakan PCR dan siap untuk diamplifikasi. Amplifikasi dimulai dengan denaturasi awal pada suhu 94° C selama 7 menit (1 siklus), dilanjutkan dengan 30 siklus yang terdiri dari *denaturasi* 94° C selama 45 detik, *annealing* 56° C selama 60 detik, dan *elongasi* 72° C selama 60 detik. Terakhir post extension 72° C selama 7 menit (Rahmawati *et al.*, 2017).

3.4.6.2 Uji Kualitatif Produk PCR

Uji kualitatif produk PCR dilakukan untuk mengetahui kualitas DNA setelah dilakukannya amplifikasi DNA. Uji kualitatif produk PCR ini menggunakan *elektroforesis horizontal*. Uji ini dilakukan sesudah PCR. Konsentrasi gel *agarose* yang digunakan sesudah PCR adalah 1,5%. Proses *elektroforesis* membutuhkan waktu 30 menit dengan tegangan sebesar 70 volt. Setelah proses *elektroforesis*, gel *agarose* divisualisasi menggunakan *Geldoc* (Ausubel *et al.*, 1995).

3.4.6.3 Sequencing

Hasil amplifikasi dilanjutkan dengan proses *sequencing* menggunakan jasa Bioneer Korea Selatan. Kemudian hasil *sequencing* diolah menggunakan software

Seqscanner dan dianalisis menggunakan NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Kemudian data sekuens isolat disejajarkan dengan sekuens fungi pembanding yang didapatkan dari *GenBank* NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Selanjutnya disejajarkan dengan program Mega. Selanjutnya fasta hasil penyejajaran diimport ke dalam MEGA 10.0 untuk mendapatkan model substitusi terbaik yang digunakan untuk analisis pohon filogenetik. Kemudian dibuat pohon filogenetik menggunakan metode algoritma Neighbor Joining (NJ). Program BLAST (Basic Local Allignment Search Tools) berfungsi seabagai program analisis penyejajaran (Rahmawati *et al.*, 2014).

3.5 Teknik Analisis Data

Teknik analisis data dilakukan secara deskriptif berupa pengamatan makroskopis dan mikroskopis serta uji biokimia sebagai agen pengembang roti. Analisis data hasil sekuensing selanjutnya dibaca dengan Sequence Scanner 1.0. Kecocokan ITS dengan Query yang diperoleh dari *Gene Bank* diketahui dengan program BLAST pada NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Kemudian pembuatan atau rekontruksi pohon filogenetik menggunakan program MEGA 10.0.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Jenis Khamir Endofit Hasil Isolasi Pada Nira Tebu (*Saccharum officinarum* Linnaeus) dan Buah Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk) Berdasarkan Karakter Morfologi

Isolasi dan identifikasi khamir endofit telah berhasil dilakukan dengan mendapatkan 5 isolat khamir. Isolat khamir yang berasal dari nira tebu (*Saccharum officinarum* Linnaeus) berjumlah 2 isolat dengan kode RNT-1 dan RNT-2 , sedangkan isolat khamir yang berasal dari buah nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk) berjumlah 3 isolat dengan kode RBN-1, RBN-2 dan RBN-3. Isolat khamir yang telah ditemukan tersebut memiliki keanekaragaman karakter berdasarkan morfologinya baik secara makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi secara makroskopis dan mikroskopis mengacu pada buku *The Yeast : A Taxonomix Study* (Kurtzman & Fell, 1998). Identifikasi makroskopis meliputi tekstur, warna, permukaan, bentuk, elevasi dan tepi, sedangkan untuk identifikasi mikroskopis meliputi bentuk sel, ukuran sel dan reproduksi aseksual.

Berdasarkan hasil identifikasi makroskopis (Tabel 4.1) isolat khamir endofit pada nira tebu dan buah nangka termasuk dalam filum *Ascomycota* karena isolat khamir yang didapatkan memiliki warna putih dan krem. Menurut Fell *et al* (1998) filum *Ascomycota* merupakan kelompok khamir yang tidak memiliki pigmen warna sehingga koloninya berwarna putih-krem. Sedangkan menurut Webster dan Weber (2007) khamir dari filum *Basidiomycota* memiliki pigmen warna kuning, orange, merah dan merah muda karena khamir dari filum *Basidiomycota* mengandung karotenoid.

Tabel 4.1 Morfologi Makroskopis Khamir Endofit dari Nira Tebu (*Saccharum officinarum* Linnaeus) dan Buah Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk)

No.	Kode Isolat	Bentuk	Tekstur	Warna	Permukaan	Elevasi	Tepi
1.	RNT-1	Tidak beraturan	Butyrous	Putih	Halus	Tidak rata	Tidak Rata
2.	RNT-2	Bulat	Butyrous	Putih-Krem	Timbul	Tidak rata	Tidak Rata
3.	RBN-1	Tidak beraturan	Butyrous	Putih-krem	Halus	Timbul	Tidak rata
4.	RBN-2	Tidak beraturan	Kering	Putih-krem	Halus	Rata	Tidak rata
5.	RBN-3	Bulat	Butyrous	Putih-krem	Halus	Rata	Tidak rata

Keterangan : RNT : Isolat khamir dari nira tebu

RBN : Isolat khamir dari buah nangka

Berdasarkan pengamatan secara mikroskopis (Tabel 4.2) pada reproduksi aseksual pada 5 isolat khamir yaitu dengan cara pertunasan (*Budding*). Reproduksi aseksual dengan pertunasan (*Budding*) termasuk dalam sub kelas *Hemiascomycetes*. Menurut Hammamoto dan Nakase (2000) Sub kelas *Hemiascomycetes* reproduksi aseksualnya dengan membentuk tunas secara holobastik (*Budding*).

Perbedaan ukuran ini dipengaruhi oleh umur sel dan kondisi lingkungan selama pertumbuhan. Menurut Fardiaz (1992) sel khamir mempunyai ukuran yang bervariasi yaitu dengan panjang 1-5 mikrometer hingga 20 mikrometer dan lebar 1 sampai 10 mikrometer. Menurut Suryaningsih (2018) khamir memiliki ukuran yang bervariasi, biasanya memiliki diameter 3-4 mikrometer dan ada yang mencapai 40 mikrometer.

Tabel 4.2 Morfologi Mikroskopis Khamir Endofit dari Nira Tebu (*Saccharum officinarum* Linnaeus) dan Buah Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk)

No.	Kode Isolat	Bentuk Sel	Reproduksi aseksual	Ukuran Sel ($p \times l$) (μm)
1.	RNT-1	Oval	Pertunasan bipolar	5,29 x 3,58
2.	RNT-2	Oval	Pertunasan bipolar	3,42 x 2,00
3.	RBN-1	Oval lonjong	Pertunasan monopolar	6,22 x 3,17
4.	RBN-2	lonjong	Pertunasan monopolar	7,11 x 3,59
5.	RBN-3	lonjong	Pertunasan monopolar	8,45 x 2,78

Keterangan : RNT : Isolat khamir dari nira tebu

RBN : Isolat khamir dari buah nangka

Berdasarkan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis isolat khamir memiliki karakter yang berbeda. Hal ini sesuai dengan firman Allah SWT pada Al-Qur'an surat Thaaha ayat 53 sebagai berikut :

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ
أَنْزُوجًا مِّن نَّبَاتٍ شَتَّى ۝۳

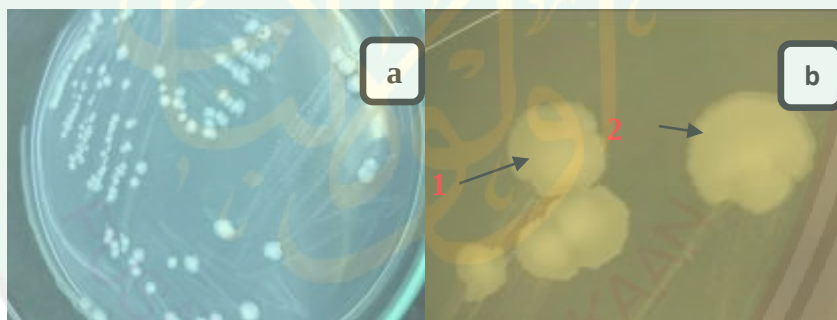
Artinya : “Yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan Yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka Kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam” [Ta Ha:53]

Menurut Tafsir Al-Muyassar (2010) lafad *أَنْزُوجًا مِّن نَّبَاتٍ شَتَّى* (maka Kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dan tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam) makna dari arti ayat tersebut bahwa telah diciptakan berbagai jenis tumbuhan yang berbeda-beda. Sedangkan menurut Tafsir Al-Misbah (2002) maksud dari arti ayat tersebut bahwa penumbuhan aneka tumbuhan dengan bermacam-macam jenis bentuk dan rasanya itu merupakan hal yang sungguh menakjubkan lagi membuktikan betapa agung penciptaan-Nya.

Tumbuhan yang dimaksud dapat diartikan sebagai khamir ataupun fungi. Hal ini dapat dilihat dari hasil isolasi dan identifikasi khamir bahwa keanekaragaman khamirsangat bermacam-macam. Sama hal-nya keanekaragaman ini dapat diibaratkan dari segi morfologi koloni yang meliputi bentuk,tekstur, warna, permukaan, elevasi, tepian koloni, bentuk sel, ukuran sel, dan reproduksi aseksualnya yang beragam.

4.1.1 Isolat khamir RNT-1

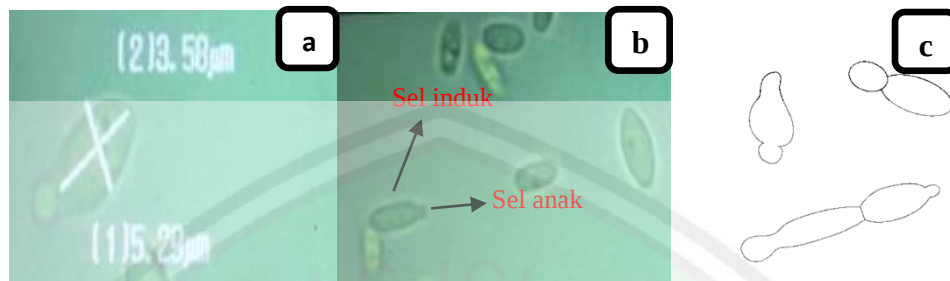
Berdasarkan hasil karakterisasi khamirisolat RNT-1 pada nira tebu secara makroskopis disajikan pada gambar 4.1 a dan b memiliki bentuk yang tidak beraturan, teksturnya butyrous, memiliki warna putih, permukaannya halus, memiliki elevasi dan tepi yang tidak rata yang disajikan pada gambar 4.1b dan 2b. Isolat khamir RNT-1 tidak mengalami pigmentasi warna, hal ini merupakan ciri dari filum *Ascomycota*. Menurut Webster dan Weber (2007) Khamir dari filum *Ascomycota* umumnya tidak memiliki pigmen warna sehingga warna koloni khamir membentuk warna putih dan krem .



Gambar 4.1 a) Morfologi Koloni Makroskopis Isolat RNT-1, b) Morfologi Koloni Makroskopis Isolat RNT-1 (perbesaran 1 kali) ,1b) Elevasi , 2b) Tepi

Hasil karakterisasi khamir secara mikroskopis dengan perbesaran 1000x pada gambar 4.2a menunjukkan bahwa sel khamir memiliki bentuk oval dengan ukuran diameter sel khamir (panjang x lebar) yaitu 5,29 μm x 3,58 μm . Reproduksi aseksual isolat khamir RNT-1 dengan pertunasan bipolar (*bipolar budding*) (gambar 4.2b). Menurut Periadnadi (2018) sifat khas dari khamir yaitu dengan pembelahan sel yang terjadi secara aseksual dengan membentuk tunas. Isolat khamir RNT-1 termasuk sub kelas *Hemiascomycetes*. Menurut

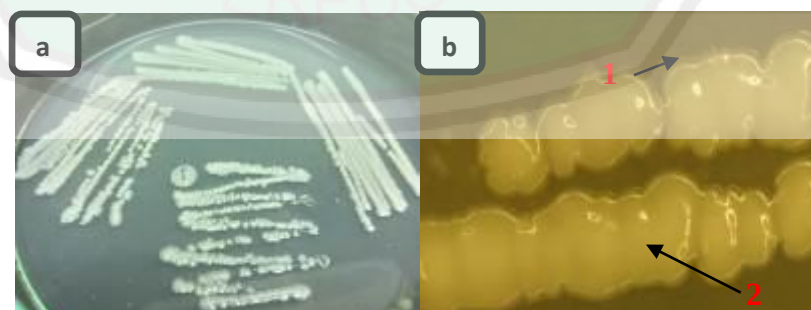
Hammamoto dan Nakase (2000) Sub kelas *Hemiascomycetes* reproduksi aseksual dengan pembentukan tunas secara holobastik (*Budding*).



Gambar 4.2 a) Sel isolat RNT-1 perbesaran 1000x, b) Pertunasan sel bipolar isolat RNT-1, c) Pertunasan bipolar (Kurtzman & Fell, 1998)

4.1.2 Isolat khamir RNT-2

Berdasarkan gambar 4.3 a dan b merupakan hasil dari pengamatan makroskopis isolat khamir dari nira tebu yang telah dilakukan isolasi selama 48 jam dengan suhu 28°C dengan media YMEA. Isolat RNT-2 memiliki bentuk koloni bulat dan tepi yang tidak rata. Memiliki warna putih-krem dengan elevasi timbul dan teksturnya butyrous (gambar 4.3a). Koloni khamir ini tidak mengalami pigmentasi warna sehingga warna yang dihasilkan putih-krem. Menurut Webster dan Weber (2007) khamir dari filum *Ascomycota* umumnya tidak memiliki pigmen warna sehingga koloni khamir membentuk warna putih dan krem. Sedangkan, khamir dari filum *Basidiomycota* umumnya memiliki warna kuning, orange, merah dan merah muda karena khamir ini mengandung karotenoid.



Gambar 4.3 a) Morfologi Koloni Makroskopis Isolat RNT-2, b) Morfologi Koloni Makroskopis Isolat RNT-2 (perbesaran 1 kali), 1b) tepi, 2b) elevasi

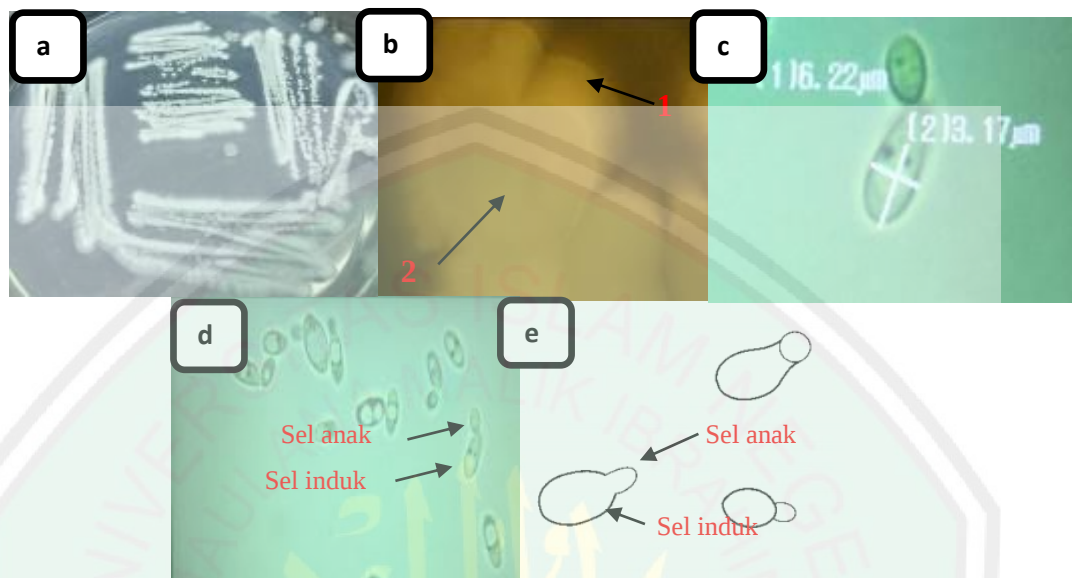
Berdasarkan hasil pengamatan morfologi mikroskopis dengan perbesaran 1000x pada gambar 4.4a menunjukkan bahwa sel khamir memiliki bentuk oval dengan ukuran diameter ($p \times l$) sel khamir $3,42 \mu\text{m} \times 2,00 \mu\text{m}$. Reproduksi aseksual isolat khamir RNT-2 dengan pembentukan tunas bipolar (*bipolar budding*) (gambar 4.4b). Menurut Kurtzman and Fell (1998) reproduksi vegetatif khamir dengan *bipolar budding cell* termasuk dalam kelas *Ascomycetes*, tunas bipolar (*bipolar budding*) adalah pertunasan dari kedua kutub sel khamir. Isolat khamir RNT-2 termasuk sub kelas *Hemiascomycetes* dalam filum *Ascomycota* karena ciri khamir sub kelas ini memiliki ciri reproduksi aseksual dengan pembentukan tunas (*budding*) (gambar 4.4c).



Gambar 4.4 a) Sel isolat RNT-2 perbesaran 1000x, b) Pertunasan sel isolat RNT-2 c) Pertunasan bipolar (Kurtzman & Fell, 1998)

4.1.3 Isolat khamir RBN-1

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi makroskopis (gambar 4.5b) koloni isolat RBN-1 dengan perbesaran 1 kali memiliki bentuk tidak beraturan dengan tekstur seperti mentega (*butyrous*). Warna koloni putih-krem dengan bentuk permukaan halus serta elevasi yang tidak rata. Menurut Webster dan Weber (2007) Khamir dari filum *Ascomycota* umumnya tidak memiliki pigmen warna sehingga warna koloni khamir membentuk warna putih dan krem. Menurut Fell *et al* (2001) khamir dari kelas *Ascomycetes* umumnya memiliki warna yang tidak mencolok sehingga cenderung memiliki warna putih dan krem, sedangkan khamir dari kelas *Basidiomycetes* memiliki warna koloni yang lebih terang sehingga memiliki warna seperti merah, merah muda, orange.



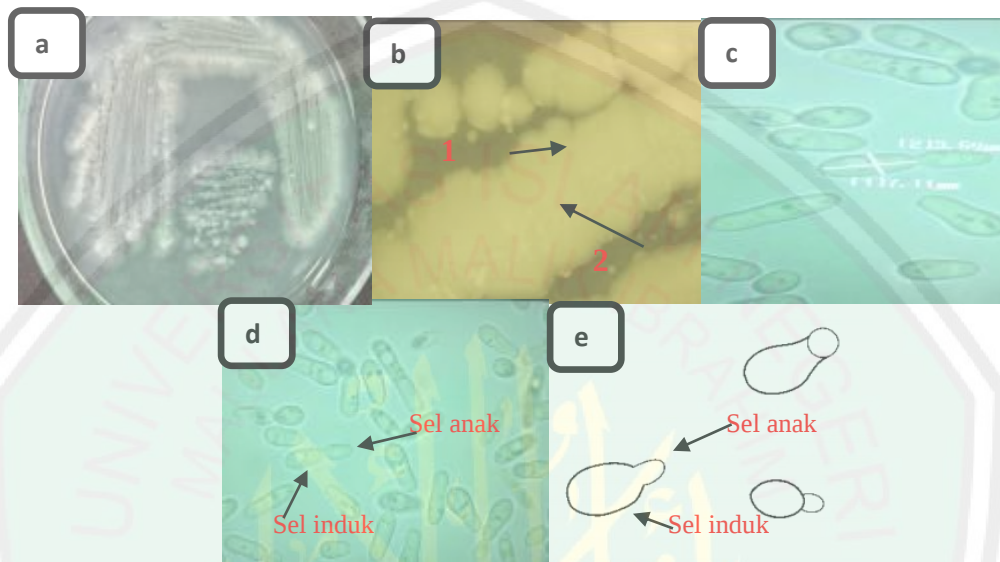
Gambar 4.5 a) Morfologi Koloni Makroskopis Isolat RBN-1, b) Morfologi Koloni Makroskopis Isolat RBN-1 (perbesaran 1 kali) (1b) tepi dan 2b) elevasi), c) Sel isolat RBN-1 perbesaran 1000x, d) Pertunasan isolat RBN-1, e) Pertunasan monopolar (Kurtzman & Fell, 1998)

Morfologi mikroskopis (gambar 4.5c) dari isolat RBN-1 adalah memiliki bentuk sel oval-lonjong dengan ukuran diameter ($p \times l$) sel khamir $6,22 \mu\text{m} \times 3,17\mu\text{m}$. Isolat RBN-1 melakukan reproduksi aseksual secara *monopolar budding* (gambar 4.3d). Berdasarkan kemiripan bentuk diduga isolat RBN-1 ini termasuk dalam sub kelas *Hemiascomycetes* dalam filum *Ascomycota*, Menurut Kurtzman and Fell (1998) *monopolar budding* adalah pertunasan (*Budding*) yang hanya ada pada satu kutub sel induk.

4.1.4 Isolat khamir RBN-2

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi makroskopis (gambar 4.6b) koloni isolat RBN-2 dengan perbesaran 1 kali memiliki bentuk tidak beraturan dengan tekstur yang kering. Warna koloni putih-krem dengan bentuk permukaan halus serta elevasi yang tidak rata. Menurut Webster dan Weber (2007) Khamir

dari filum *Ascomycota* umumnya tidak memiliki pigmen warna sehingga warna koloni khamir membentuk warna putih dan krem.



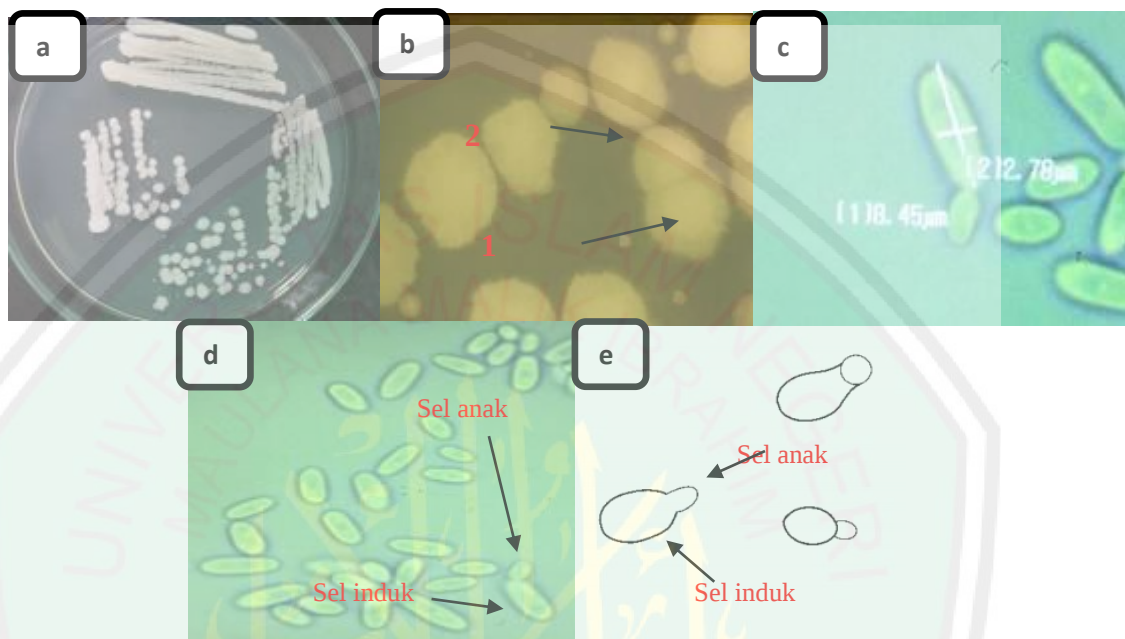
Gambar 4.6 a) Morfologi Koloni Makroskopis Isolat RBN-2, b) Morfologi Koloni Makroskopis Isolat RBN-2 (perbesaran 1 kali) (1b) tepi dan 2b) elevasi), c) Sel isolat RBN-2 perbesaran 1000x, d) Pertunasan isolat RBN-2, e) Pertunasan monopolar (Kurtzman & Fell, 1998)

Hasil karakteristik secara mikroskopis (gambar 4.6d) dari isolat RBN-2 adalah memiliki bentuk sel lonjong dengan ukuran diameter ($p \times l$) $7,11 \mu\text{m} \times 3,59 \mu\text{m}$. Isolat RBN-2 melakukan reproduksi vegetatif secara *monopolar budding* (gambar 4.6d). *Budding* pada sel induk khamir ini membentuk tunas atau sel anak yang ukurannya lebih kecil. Menurut Kurtzman and Fell (1998) *monopolar budding* adalah pertunasan (*Budding*) yang hanya ada pada satu kutub sel induk. Isolat RBN-2 termasuk sub kelas *Hemiascomycetes*, karena khamir dari sub kelas *Hemiascomycetes* memiliki ciri reproduksi aseksual dengan pembentukan tunas (*Budding*) (gambar 4.6e).

4.1.5 Isolat khamir RBN-3

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi makroskopis (gambar 4.7b) koloni isolat RBN-3 dengan perbesaran 1 kali memiliki bentuk tidak beraturan

dengan tekstur yang kering. Warna koloni putih-krem dengan bentuk permukaan halus serta elevasi yang tidak rata. Menurut Webster dan Weber (2007) Khamir dari filum *Ascomycota* umumnya tidak memiliki pigmen warna sehingga warna koloni khamir membentuk warna putih dan krem.



Gambar 4.7 a) Morfologi Koloni Makroskopis Isolat RBN-3, b) Morfologi Koloni Makroskopis Isolat RBN-3 (perbesaran 1 kali) (1b) tepi dan 2b) elevasi), c) Sel isolat RBN-3 perbesaran 1000x, d) Pertunasan isolat RBN-3, e) Pertunasan monopolar (Kurtzman & Fell, 1998)

Morfologi mikroskopis (gambar 4.7d) dari isolat RBN-3 adalah memiliki bentuk sel lonjong dengan ukuran diameter ($p \times l$) $8,45 \mu\text{m} \times 2,78 \mu\text{m}$. Menurut Pelczar (2005) sel khamir (*yeast*) mempunyai ukuran yang bervariasi yaitu dengan panjang $1-5 \mu\text{m}$ sampai $20-50 \mu\text{m}$ dan lebar $1-10 \mu\text{m}$. Perbedaan ukuran sel khamir ini dipengaruhi oleh umur sel dan kondisi lingkungan selama pertumbuhan. Isolat RBN-3 melakukan reproduksi vegetative secara *monopolar budding* (gambar 4.7e). Berdasarkan kemiripan bentuk diduga isolat RBN-3 ini termasuk dalam sub kelas *Hemiascomycetes* dalam filum *Ascomycota*. Menurut Fell *et al* (2001) kelas *Ascomycota* merupakan kelas yang tidak memiliki pigmen warna sehingga koloninya berwarna putih-krem.

Khamir dari filum Basidiomycota umumnya memiliki pigmen warna yang terang seperti kuning, orange, merah dan merah muda karena khamir ini mengandung karotenoid. Sedangkan untuk khamir filum Ascomycota umumnya tidak memiliki pigmen warna sehingga warna koloni khamir cenderung warna putih dan krem (Webster dan Weber, 2007).

4.2 Jenis Khamir Endofit Hasil Uji Potensi Pengembang Roti

4.2.1 Kemampuan Isolat Khamir dalam Hal Fermentasi Karbohidrat

Uji fermentasi karbohidrat dari 5 isolat khamir yang berhasil diisolasi dari nira tebu dan buah nangka, dalam penelitian ini dilakukan uji fermentasi dengan sumber karbohidrat glukosa, sukrosa, fruktosa, dan laktosa. Pemilihan keempat jenis gula ini berdasarkan jenis gula monosakarida. Gula monosakarida merupakan gula sederhana yang mudah diuraikan oleh khamir. Penelitian ini dilakukan dengan dua kali pengulangan pada masing-masing isolat (lampiran 3). Hasil fermentasi karbohidrat ditandai dengan warna merah muda yang menggunakan indikator warna *Andrade's Indicator* dan terbentuknya gelembung. Menurut Kurtzman dan Fell (1998) munculnya gelembung pada tabung durham pada umur biakan 7 hari termasuk reaksi yang *strongly positive*.

Berdasarkan tabel 4.3 isolat khamir memiliki kemampuan yang berbeda dalam melakukan fermentasi karbohidrat. Isolat RBN-1, RBN-2 dan RBN-3 pada jenis gula sukrosa dan laktosa tidak memunculkan gelembung pada tabung durham (lampiran 3). Menurut Aggraini (2019) apabila tidak menghasilkan gelembung, maka khamir dapat dinilai tidak mampu melakukan fermentasi yang dinyatakan dengan tanda (-). Sedangkan pada isolat RNT-1, RNT-2, RBN-1, RBN-2, dan RBN-3 terjadi perubahan warna pada media fermentasi menjadi merah muda, serta terjadi pembentukan gelembung pada jenis gula glukosa dan fruktosa. Isolat khamir yang mampu menghasilkan gelembung selama tujuh hari menandakan fermentasi yang kuat dan terkait pertumbuhan sel khamir. Tetapi perubahan tersebut tidak terjadi pada gula laktosa. Menurut Karkie (2017) bahwa khamir yang digunakan sebagai pengembang roti tidak mampu melakukan fermentasi pada laktosa.

Tabel 4.3 Kemampuan khamir dalam memfermentasi karbohidrat setelah 7 hari inkubasi

No	Kode Isolat	Uji fermentasi gula											
		Glukosa			Sukrosa			Fruktosa			Laktosa		
		warna	gas	pH	warna	gas	pH	warna	gas	pH	warna	gas	pH
1.	Kontrol Negatif	Merah	-	7	Merah	-	7	Merah	-	7	Merah	-	7
2.	RNT-1	Merah muda	++	5	Merah muda	-	4	Merah muda	++	8	Merah	-	4
3.	RNT-2	Merah muda	++	5	Merah muda	++	4	Merah muda	++	5	Merah	-	6
4.	RBN-1	Merah muda	++	5	Merah	-	7	Merah muda	++	5	Merah	-	8
5.	RBN-2	Merah muda	-	8	Merah muda	-	5	Merah muda	-	9	Merah	-	7
6.	RBN-3	Merah muda	++	5	Merah muda	-	8	Merah muda	++	5	Merah	-	8

Keterangan : ++ = terdapat gelembung, - = tidak terdapat gelembung (Kurtzman & Fell, 1998) , RNT = Isolat khamir dari nira tebu, RBN = Isolat Khamir dari Buah Nangka

Produksi asam pada media fermentasi karbohidrat ditandai dengan perubahan warna merah menjadi merah muda (Harley dan Presscott, 2002), tetapi tidak terjadi perubahan pada media yang mengandung laktosa. Menurut Anggraini (2019) khamir tidak mampu memfermentasi media yang mengandung laktosa.

Pengamatan nilai pH ini dilakukan untuk mengetahui produk akhir berupa asam asetat atau etanol. Apabila produk berupa asam asetat maka ditandai dengan penurunan nilai pH dan etanol apabila terjadi peningkatan pada nilai pH. Berdasarkan pengamatan nilai pH pada kelima isolat khamir (tabel 4.3) terdapat

peningkatan dan penurunan nilai pH. Peningkatan dan penurunan nilai pH terjadi karena produk akhir yang dihasilkan berbeda yang disebabkan oleh jenis mikroorganisme yang terlibat. Menurut Harley & Prescott (2002) karbohidrat dapat difermentasi menjadi sejumlah produk akhir yang berbeda tergantung oleh mikroorganisme yang terlibat.

Berdasarkan tabel 4.3 Jenis gula glukosa dari isolate RBN-2 menghasilkan produk akhir berupa etanol sedangkan RNT-1, RNT-2, RBN-1, dan RBN-3 berupa asam asetat. Jenis gula sukrosa dari isolat RBN-3 berupa etanol sedangkan RBN-1 tidak mengalami fermentasi karbohidrat. Jenis gula fruktosa produk akhir dari isolat RNT-1 dan RBN-2 berupa etanol sedangkan isolat RNT-2, RBN-1 dan RBN-3 menghasilkan produk akhir berupa asam asetat. Jenis gula laktosa pada isolat RNT-1 berupa asam asetat. Menurut Okafor (2007) hasil akhir fermentasi karbohidrat oleh khamir yaitu melepaskan karbondioksida dan menghasilkan asam asetat yang ditandai dengan menurunnya nilai pH (>7), sedangkan penghasil etanol ditandai dengan peningkatan nilai pH (<7). Menurut Giri dan Kindo (2015) perubahan pH menjadi asam menunjukkan asimilasi karbohidrat.

4.2.2 Kemampuan Isolat Khamir dalam Uji Toleransi Glukosa 50%

Berdasarkan tabel 4.4 laju pertumbuhan sel khamir yang diukur menggunakan UV-Vis Spektrofotometer pada absorbandi 600 nm. Menurut Oslen *et al* (2010) laju pertumbuhan sel khamir dapat diukur menggunakan kerapatan optik dengan panjang gelombang 600 nm. Uji toleransi glukosa konsentrasi 50% ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan isolat khamir yang mampu tumbuh pada konsentrasi gula 50%. Hal tersebut dapat dilihat dari inkubasi 24 jam ke inkubasi 48 jam pada suhu 30 °C. Menurut Akbar (2019) konsentrasi sel diketahui dengan mengukur kerapatan optik menggunakan UV-Vis Spektrofotometer pada absorbandi 600 nm.

Pengamatan terhadap uji toleransi glukosa konsentrasi 50% pada isolat RNT-1 dan RNT-2 mengalami peningkatan dari inkubasi 24 jam ke 48 jam, begitu juga pada buah nangka mengalami peningkatan nilai optik yaitu pada isolat RBN-1, RBN-2 dan RBN-3. Nilai tertinggi yaitu ditunjukkan pada isolat khamir

RNT-1. Kemudian RBN-2, RBN-3, RNT-2 dan terendah adalah isolat khamir RBN-1. Peningkatan nilai optik menandakan bahwa sel khamir mampu tumbuh pada media glukosa tinggi. Sehingga dapat dimanfaatkan sebagai pengembang adonan roti. Pada penelitian Karki (2017) isolat khamir yang diisolasi dari ragi komersial terjadi penurunan pada konsentrasi glukosa 50% (m/v). Hal ini dapat menunjukkan bahwa isolasi khamir endofit dari nira tebu dan buah nangka menghasilkan hasil yang baik dan dapat dimanfaatkan sebagai pengembang roti.

Tabel 4.4 Nilai kepadatan optik (600 nm) sel khamir dari nira tebu dan buah nangka pada media glukosa 50% (m/v)

No	Kode Isolat	Glukosa 50% (m/v)	
		24 jam	48 jam
1.	Kontrol negatif	0,000	0,000
2.	RNT-1	0,134	0,510
3.	RNT-2	0,073	0,139
4.	RBN-1	0,010	0,028
5.	RBN-2	0,078	0,24
6.	RBN-3	0,015	0,172

Keterangan : RNT = Isolat khamir dari nira tebu
RBN = Isolat khamir dari buah nangka

Khamir yang dapat hidup pada kadar gula tinggi biasanya dapat dimanfaatkan sebagai pengembang roti. Menurut Struyf (2017) khamir yang hidup pada kadar gula tinggi 20-50% tergolong khamir osmotoleran yang dapat dimanfaatkan sebagai pengembang roti. Khamir yang dapat dimanfaatkan untuk pengembang roti yaitu khamir yang mampu tumbuh pada uji toleransi glukosa karena proses pengembangan adonan roti terdapat beberapa jenis gula. Menurut Cabonetto *et al* (2018) dalam adonan, ada tiga sumber yaitu gula alami dalam tepung (termasuk glukosa, sukrosa, fruktosa dan maltosa) sukrosa yang dapat ditambahkan oleh pembuat roti maltosa yang dilepaskan oleh pemecahan amilolitik pati.

4.2.3 Kemampuan Isolat Khamir dalam Uji Flokulasi dan Uji Hidrogen Sulfida

Uji flokulasi dilakukan bertujuan untuk mengetahui isolat khamir yang mampu membentuk sedimentasi atau *flok* pada media. Menurut Soares (2010) kata *flok* berasal dari Bahasa latin *floccus* yaitu tumpukan wool. Sel yang memiliki kemampuan untuk membentuk *flok* disebut *flokulan*, sedangkan yang tidak memiliki kemampuan untuk membentuk *flok* disebut *powdery*. Flokulasi terjadi pada akhir fermentasi dengan adanya pembentukan sedimentasi pada bagian bawah media (Vestrepen *et al*, 2003). Menurut Asyiken (2013) karakteristik dari flokulasi ditentukan oleh sel-sel khamir yang berawal dari saling menempel kemudian dapat secara mudah melakukan pemisahan di medium *broth*, sehingga didapatkan sel khamir yang murni yang dapat diproduksi sebagai ragi komersil dibidang industri. Hasil pengujian flokulasi menunjukkan bahwa dua isolat khamir dari nira tebu dan satu isolat khamir dari buah nangka mengalami pembentukan endapan pada dasar media. Dari lima isolat yang di uji flokulasi , tiga diantaranya dapat membentuk *flokulan* yaitu isolat RNT-1, RNT-2 dan RBN-3 (Lampiran 6). Ketiga isolat tersebut menghasilkan flokulasi yang paling banyak. *Flok* yang terbentuk (*flokulan*) ini nantinya akan dimanfaatkan sebagai agen sel khamir yang ditambahkan dalam adonan roti.

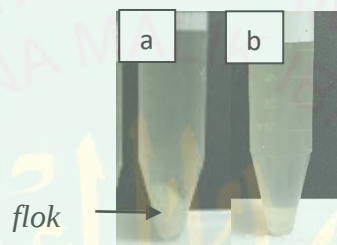
Tabel 4.5 Kemampuan khamir endofit nira tebu dan buah nangka dalam pembentukan flokulasi

No	Kode Isolat	Pembentukan Flokulasi
1.	Kontrol negatif	-
1.	RNT-1	+
2.	RNT-2	+
3.	RBN-1	-
4.	RBN-2	-
5.	RBN-3	+

Keterangan : RNT = Isolat khamir dari nira tebu
RBN = Isolat khamir dari buah nangka

- + = terbentuk *flok*
- = tidak terbentuk *flok*

Isolat khamir yang mampu membentuk *flok* menunjukkan kemampuannya yang bagus dalam memisahkan antara media dengan khamir tanpa proses filtrasi tambahan (gambar 4.8a). Menurut Vestrepen *et al* (2003) tujuan dari pembentukan *flok* pada khamir yaitu agar dapat bertahan hidup pada kondisi yang mencekam sehingga dapat dilakukan penyimpanan ketika tidak tersedia media pertumbuhan.



Gambar 4.8 a) Kontrol positif dari uji flokulasi yang ditandai dengan pembentukan *flok* , b) Kontrol negatif dari uji flokulasi

Tahap berikutnya yaitu pengujian hidrogen sulfida pada isolat khamir menggunakan media *lead acetate*. Media *lead acetate* ini reaksi positifnya jelas dan mudah dibaca oleh karena itu dalam penelitian ini menggunakan media tersebut. Hasil pengujian hidrogen sulfida menunjukkan bahwa 2 isolat dari nira tebu RNT-1 dan RNT-2 tidak menghasilkan senyawa hidrogen sulfida karena tidak terbentuk warna hitam pada media. Menurut Maryam (2017) bahwa strain khamir yang tidak memproduksi H_2S dapat direkomendasikan sebagai kandidat khamir terbaik dalam pembuatan adonan roti. Isolat dari buah nangka RBN-1, RBN-2, dan RBN-3 dapat menghasilkan senyawa hidrogen sulfida yang ditandai dengan terbentuknya warna hitam pada media (lampiran 5). Hal ini menunjukkan bahwa isolat terbaik dalam pengujian hidrogen sulfida adalah RNT-1 dan RNT-2. Menurut Karki (2017) Isolat khamir yang menghasilkan H_2S tinggi dapat memberikan aroma dan rasa yang tidak enak sehingga dapat mempengaruhi kualitas dari roti. Menurut Florin *et al* (1993) kadar H_2S yang dapat diterima pada roti yaitu berkisar ($>10\mu\text{mol/g}$ atau 1 mg/g). Sedangkan menurut Fereirra *et al*

(2002) kandungan H_2S pada makanan yang dapat diasimilasi berkisar 245- 289 mg/liter. Hal tersebut menunjukkan bahwa kadar H_2S dapat diterima oleh produk pangan dengan melihat ambang batas maksimumnya.

Tabel 4.6 Kemampuan khamir endofit nira tebu dan buah nangka dalam pembentukan senyawa hidrogen sulfida

No	Kode Isolat	Produksi H_2S
1.	Kontrol Negatif	-
2.	RNT-1	-
3.	RNT-2	-
4.	RBN-1	+
5.	RBN-2	+
6.	RBN-3	+

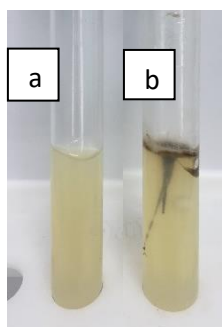
Keterangan : RNT = Isolat khamir dari nira tebu

RBN = Isolat khamir dari buah nangka

+ = ada perubahan

- = tidak ada perubahan (tetap)

Isolat khamir yang tidak menghasilkan hidrogen sulfida memiliki koloni berwarna putih, sedangkan isolat khamir yang menghasilkan hidrogen sulfida memiliki warna koloni yang bervariasi mulai dari coklat muda sampai hitam, tergantung pada intensitas produksinya (Karki *et al.*, 2017). Hal tersebut ditunjukkan oleh gambar 4.9b yaitu kontrol positif dari uji hidrogen sulfida yang berarti isolat khamir menghasilkan hidrogen sulfida yang ditandai dengan warna hitam.



Gambar 4.9 a) Kontrol negatif dari uji H₂S, b) Kontrol positif dari uji H₂S

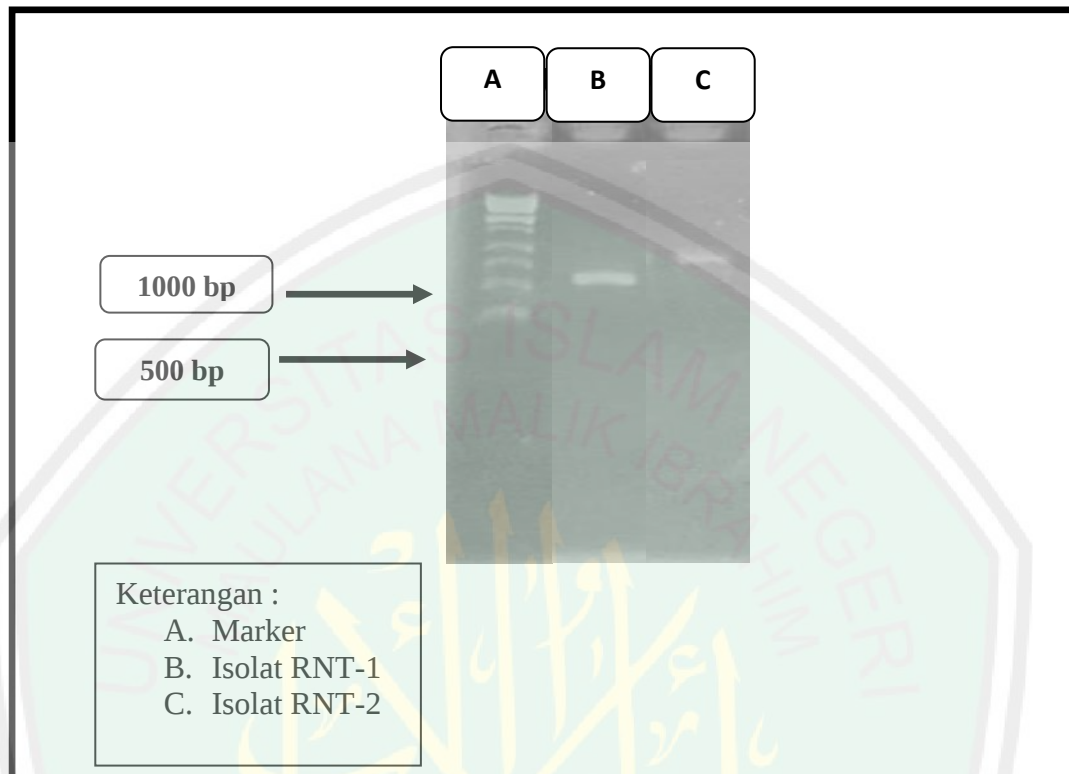
4.3 Identifikasi Molekuler Jenis Isolat Khamir dengan Kemampuan Uji Potensi Pengembang Roti Terbaik

Identifikasi khamir endofit dari nira tebu (*Saccharum officinarum* Linnaeus) menggunakan DNA target daerah ITS. Daerah ITS merupakan *region conserved* sehingga cocok untuk digunakan identifikasi spesies khamir. Menurut James & Stratford (2003) daerah ITS rDNA memang digunakan dalam identifikasi spesies khamir yang memiliki kekerabatan sangat dekat atau yang biasa disebut sebagai *closely related species*.

Identifikasi molekuler dilakukan pada dua isolat terbaik dalam uji pengembang roti yaitu uji fermentasi karbohidrat. Kedua isolat khamir yang terpilih yaitu dengan kode RNT-1 dan RNT-2. Identifikasi molekuler ini bertujuan untuk mengetahui spesies dari isolat khamir dan mempermudah pengaplikasian khamir sebagai pengembang roti. Identifikasi molekuler pada isolat RNT-1 dan RNT-2 ini tidak dilakukan dengan ekstraksi DNA tetapi dilakukan dengan menggunakan isolat khamir secara langsung tanpa ekstraksi yang digunakan sebagai sampel atau DNA template dan pemurnian DNA sebelum PCR. Metode tersebut merupakan metode *direct PCR*. Menurut Swaran (2012) metode ini memiliki dampak yang lebih baik pada kualitas DNA jika dibandingkan dengan melalui ekstraksi. *Direct PCR* dapat mengurangi kesalahan *human errors* dan kontaminasi. Menurut Sunarno (2013) pemanfaatan *direct PCR* sebagai metode diagnostik yang cepat, mudah serta terjangkau.

Isolasi DNA sebagai *template* untuk reaksi PCR berhasil dilakukan yang ditunjukkan oleh hasil elektroforesis dari produk PCR daerah ITS rDNA. Hasil elektroforesis menunjukkan adanya pita tunggal untuk semua sampel khamir (Gambar 4.10). Hal tersebut menunjukkan bahwa daerah ITS rDNA dari seluruh isolat telah berhasil teramplifikasi menggunakan primer ITS1 dan ITS4 dengan kondisi PCR sesuai dan konsentrasi *template* DNA yang cukup. Menurut Korabecna (2003) hasil amplifikasi fragmen daerah ITS khamir menggunakan primer ITS1 dan ITS4 memiliki ukuran sekitar 380 hingga 900 bp. Hasil analisis

program Mega 10 merupakan urutan nukleotida hasil *contig forward* ITS1 dan *reverse* ITS4 (lampiran 11). Hasil analisis BLAST ditunjukkan pada Tabel 4.7



Gambar 4.10 Uji Kualitatif Produk PCR

Allah SWT berfirman di dalam Al Qur'an surat Al Furqaan ayat 2 yang berbunyi :

الَّذِي لَهُ مُلْكُ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَلَمْ يَكُنْ لَهُ شَرِيكٌ فِي الْمُلْكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا ۝

Artinya : “yang kepunyaan-Nya-lah kerajaan langit dan bumi, dan Dia tidak mempunyai anak, dan tidak ada sekutu bagi-Nya dalam kekuasaan(Nya), dan dia telah menciptakan segala sesuatu, dan Dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya. [Al Furqan:2]

Menurut Al-Jazairi (2006) kalimat *فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا* adalah “Dia (Allah) telah menetapkan suatu ukuran dengan serapi-rapinya tanpa ada cela.” Menurut tafsir Al-Qurtubi (2009), kalimat *فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا* maksudnya adalah “menetapkan segala

sesuatu dari apa yang diciptakan-Nya sesuai dengan hikmah yang diinginkan-Nya, dan segala sesuatu berjalan sesuai dengan ketentuan-Nya.” Menurut Travers (2015) bahwa DNA adalah salah satu material kehidupan yang berperan penting bagi makhluk hidup. Memiliki susunan yang terstruktur memberikan DNA sebagai pusat informasi.

Hasil gel elektroforesis produk PCR (gambar 4.10) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan ukuran daerah ITS rDNA pada masing-masing isolat khamir. Panjang pita DNA isolat RNT-1 dan RNT-2 terletak diantara 500 hingga 1000 bp, maka dapat diketahui bahwa isolat RNT-1 dan RNT-2 merupakan khamir karena memiliki panjang pita DNA lebih dari 380 bp. Menurut Irinyi *et al* (2015) daerah (region) ITS pada khamir memiliki panjang antara 300 hingga 900 bp.

Hasil gel elektroforesis produk PCR dapat terlihat dengan jelas bahwa panjang pita DNA berada pada kisaran 500 bp hingga 1000 bp. Sedangkan hasil baca dari SeqScanner menunjukkan bahwa pasang basa (bp) sekuens RNT-2 berjumlah 430. Hal ini dapat disebabkan oleh proses *sequencing* sehingga terjadi munculnya banyak None (N) yang tidak diperlukan pada basa nukleotida hingga menyebabkan jumlahnya berkurang.

Hasil *sequencing* ini dibaca dengan bantuan software SeqScanner (lampiran 7). Hasil dari SeqScanner menunjukkan bahwa sekuen RNT-1 terdapat warna ungu, kuning dan merah. Warna kuning dan merah pada basa nukleotida menandakan bahwa hasil kurang bagus. Sedangkan hasil SeqScanner pada sekuen RNT-2 menunjukkan hasil yang bagus yang ditandai dengan warna ungu yang terdapat pada basa nukleotida. Menurut Claverie (2007) bahwa warna ungu yang terdapat pada kromatogram hasil *sequencing* menandakan *peak* intensitas yang tinggi, warna kuning menandakan *peak* intensitas menengah dan warna merah menandakan *peak* intensitas yang rendah. Berdasarkan hasil sekuensing yang dibaca menggunakan Sequence scanner menunjukkan grafik yang terdiri dari 4 warna dengan puncak-puncak yang tinggi (Lampiran 8).

Hasil *sequencing* yang telah dibaca dengan bantuan software SeqScanner kemudian dilakukan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) untuk menganalisis kemiripan sekuens yang terdapat pada web NCBI. Tabel 4.6

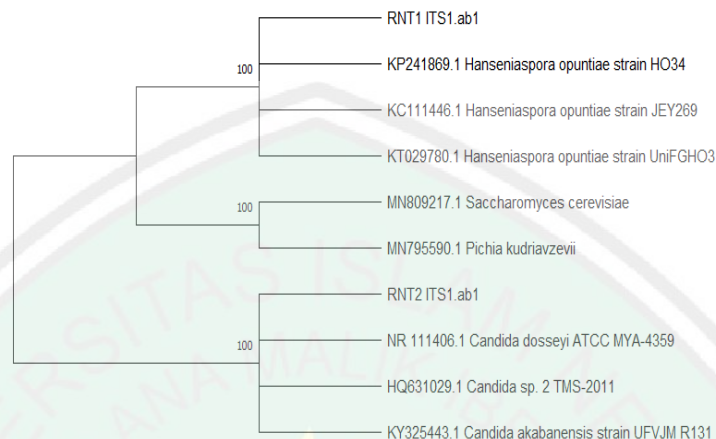
diketahui bahwa urutan basa dari sampel RNT-1 dengan kode *sequence* ID KT029780.1 memiliki kemiripan dengan *Hanseniaspora opuntiae* (lampiran 10) dengan presentase kemiripan identifikasi forward adalah 98,02%. Pada sampel RNT-2 memiliki kemiripan dengan *Candida* sp. (lampiran 10) dengan presentase kemiripan identifikasi forward 97,98%. Isolat RNT-2 memiliki presentase <98% sehingga menyebabkan tingkat kemiripan sampai genus *Candida* pada *sequence* ID HQ631029.1. Menurut Kwasna (2008) Nilai *max identity* sebesar 99% menunjukkan bahwa isolat dianggap sebagai spesies yang sama. Sedangkan homologi $\geq 97\%$ menunjukkan bahwa isolat yang dibandingkan berada pada genus yang sama dan homologi antara 89-93% menunjukkan family yang berbeda.

Tabel 4.7 Hasil blast isolat khamir

No	Kode Isolat	Hasil Blast			
		Nama Spesies	Ident	Seq Id	Panjang bp
1.	RNT-1	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> strain UniFGHO3	98,02%	KT029780.1	769
2.	RNT-2	<i>Candida</i> sp. 2 TMS-2011	97,98%	HQ631029.1	430

Hasil BLAST *sequence* kemudian dilakukan rekontruksi pohon filogenetik (gambar 4.11). Menurut Li *et al* (1999) tujuan dari rekontruksi pohon filogenetik yaitu untuk mengkonstruksi dengan tepat hubungan antara organisme dan mengestimasi perbedaan yang terjadi dari satu nenek moyang kepada keturunannya. Sebelum dilakukan rekontruksi filogenetik, maka dilakukan pensejajaran *alligment* menggunakan software Mega 10.0.

Rekontruksi pohon filogenetik ini menggunakan metode algoritma *Neighbour Joining* (NJ) dengan 1000 *Bootstrap*. Menurut Kumar (2000) secara umum metode *Neighbour Joining* (NJ) telah digunakan dalam merekonstruksi pohon filogenetik karena dapat menggunakan dataset yang besar dengan waktu yang cepat serta memiliki keakuratan yang tinggi



Gambar 4.11 Rekontruksi Pohon Filogenetik RNT-1 dan RNT-2

Berdasarkan hasil rekontruksi pohon filogenetik, diketahui bahwa diperoleh tiga grup. Dapat diketahui bahwa hasil rekonstruksi pohon filogenetik pada sekuens RNT-1 dan RNT-2 terlihat terdapat dalam grup klad yang berbeda. Sekuens *Pichia kudriavzevii* dan *Saccharomyces cerevisiae* digunakan sebagai *outgroup* yang menandakan adanya perbedaan dengan ingroup, meskipun dalam satu kingdom.

Hasil rekontruksi pohon filogenetik muncul nilai setiap titik (node) percabangan. Isolat RNT-1 memiliki nilai 100 pada percabangannya. Nilai tersebut adalah nilai *bootstrap*. Nilai *bootstrap* dilakukan untuk mengevaluasi kestabilan cabang. Isolat RNT-1 memiliki nilai bootstrap 100 dengan spesies *Hanseniaspora opuntiae* strain HO34, *Hanseniaspora opuntiae* strain JEY269, dan *Hanseniaspora opuntiae* strain UniFGHO3. Hal ini menunjukkan bahwa isolat RNT-1 memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat dengan *Hanseniaspora opuntiae* strain HO34, *Hanseniaspora opuntiae* strain JEY269, dan *Hanseniaspora opuntiae* strain UniFGHO3. Menurut Anggraini (2019) nilai bootstrap 100 menunjukkan bahwa dalam 1000 kali ulangan, terbentuk 1000 pohon yang sama. Pada pohon filogenetik apabila nilai *bootstrap* berkisar 70%-

90% maka dapat dikatakan nilainya stabil, sedangkan apabila nilai *bootstrap* <70% maka dapat dikatakan nilainya rendah. Menurut Rosidiani *et al* (2013) Apabila nilai *bootstrap* diantara 70-100 maka peluang terjadinya perubahan susunan klad adalah rendah. Sebaliknya menurut Simpson (2000) apabila nilai *bootstrap* kurang dari 70 maka peluang terjadinya perubahan susunan klad adalah tinggi, sehingga ketika dilakukan analisis, percabangan dan pohon yang dibentuk dapat berubah-ubah.

Spesies khamir yang ditemukan pada uji molekuler adalah *Hanseniaspora opuntiae* dan *Candida* sp. Berdasarkan penelitian Liu *et al* (2010) *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia terricola* dan *Hansenia opuntiae* berpotensi sebagai pengembang roti yang ditemukan pada kulit jeruk keprok. Berdasarkan penelitian Boboye (2009) khamir dari genus *Hanseniaspora* dapat menyebabkan adonan roti mengembang. Hal ini menunjukkan selain menyebabkan adonan mengembang, aktivitas khamir ini juga berpengaruh terhadap tekstur adonan yang difermentasi. Menurut Corriher (2001) bahwa adanya proses fermentasi yang dipengaruhi oleh CO₂ menyebabkan adanya rongga pada adonan.

Khamir yang ditemukan dari isolat RNT-2 yaitu *Candida* sp. Berdasarkan karakteristiknya dari hasil uji biokimia (uji fermentasi, uji H₂S, uji glukosa 50% dan uji flokulasi) berpotensi sebagai pengembang roti. Menurut penelitian Boboye (2009) khamir dari genus *Candida* berpotensi sebagai pengembang roti yang dilihat dari kemampuan adonan mengembang serta dari tekstur dan aroma. Hal ini disebabkan oleh konsentrasi karbohidrat yang relatif tinggi yang digunakan untuk menyediakan media nutrisi yang sesuai, serta mendukung pertumbuhan dan keberadaan khamir dalam memfermentasi singkong. Selain itu adanya proses fermentasi yang dipengaruhi oleh CO₂ dapat menyebabkan adonan muncul rongga-rongga.

Hasil penelitian tentang khamir yang berpotensi sebagai pengembang roti, dapat dijadikan bahan renungan bagi orang-orang yang berfikir. Sesungguhnya Allah SWT telah menciptakan manusia yang diharapkan menggunakan akalanya untuk berfikir dan mengkaji segala sesuatu yang ada dilangit dan bumi, karena

tidak ada satupun ciptaan Allah SWT yang sia-sia. Sebagaimana firman Allah SWT dalam QS. Ali-Imran (3) 190-191 yang berbunyi :

رَّنْ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِأُولِي الْأَلْبَابِ ۚ
الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا
خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ۝١٩١

Artinya :“ *Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka."*

Sesungguhnya Allah telah memberikan anugerahnya kepada manusia dengan menciptakan sebagai kekayaan alam yang dapat dimanfaatkan. Bukan hanya itu, Allah SWT juga menciptakan telah manusia yang berakal. Seperti pada lafadz لِأُولِي الْأَلْبَابِ yang berarti “*Terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal*”. Menurut Tafsir Al-Qurthubi (2008) ini merupakan salah satu fungsi akal yang diberikan kepada seluruh manusia, yaitu agar mereka dapat menggunakan akal tersebut untuk merenungi tanda-tanda yang Allah SWT berikan. Dan yang Allah SWT berikan / ciptakan ini tidak ada yang sia-sia. Seperti pada lafadz رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا yang berarti “*Ya Tuhan Kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia*”. Menurut tafsir Al- Madinah Al Munawwarah (2015) Allah SWT tidak menciptakan ini dengan sia-sia, tetapi Allah SWT menciptakannya sebagai tanda dari kekuasaan-Nya.

Allah SWT juga memerintahkan hambanya untuk melakukan amal saleh seperti mencari tau potensi dari nira tebu dan buah nangka dalam

mengembangkan adonan roti. Sebagaimana firman Allah SWT dalam QS. Kaffi ayat 88 yang berbunyi :

وَأَمَّا مَنْ ءَامَنَ وَعَمِلَ صَالِحًا فَلَهُ جَزَاءٌ أَحْسَنُ ۖ وَسنَقُولُ لَهُ مِنْ أَمْرِنَا يُسْرًا ۝۸۸

Artinya : *“Adapun orang-orang yang beriman dan beramal saleh, maka baginya pahala yang terbaik sebagai balasan, dan akan kami titahkan kepadanya (perintah) yang mudah dari perintah-perintah kami”*

Menurut Tafsir Al-Muyassar (2010) kalimat وَعَمِلَ (dan beramal) yakni berbuat amalan dan صَالِحًا (saleh) yakni amal dari buah keimanannya. Maksud dari arti ayat tersebut yaitu Allah telah menjanjikan kepada hambanya yang beramal shaleh dipermudah jalannya untuk beramal shaleh. Amal shaleh yang dimaksud adalah berbuat sesuatu yang bermanfaat bagi bersama. Salah satunya adalah untuk menemukan jenis khamir sebagai pengembang adonan roti. Sehingga penelitian ini diharapkan manusia dapat menggunakan akalanya untuk meneliti alam serta penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat dan tercatat sebagai perbuatan baik.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Berdasarkan karakter morfologi makroskopis dan mikroskopis didapatkan lima isolat khamir yang diisolasi dari nira tebu (*Sacharum officinarum* L.) (RNT-1, RNT-2) dan buah nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk) (RBN-1, RBN-2, dan RBN-3). Berdasarkan pengamatan secara morfologi kelima isolat khamir memiliki kemiripan dengan sub kelas *Hemiascomycetes* termasuk filum *Ascomycota*.
2. Berdasarkan kemampuan khamir dari nira tebu dan buah nangka memiliki potensi yang baik sebagai agen pengembang adonan roti. Sedangkan terdapat dua isolat yang unggul dalam memfermentasikan karbohidrat yaitu isolat khamir RNT-1 dan RNT-2
3. Berdasarkan Analisa genetika diketahui bahwa isolat RNT-1 memiliki kemiripan dengan *Hanseniaspora opuntiae* strain UniFGHO3 (98,02%) dan isolat RNT-2 dengan *Candida* sp 2 TMS-2011 (97,98%)

5.2 Saran

Saran pada penelitian ini adalah dapat dilakukan uji lanjut pada isolat khamir nira tebu dan buah nangka untuk diaplikasikan langsung sebagai agen pengembang adonan roti.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah. 2007. *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 3*. Diterjemahkan oleh Ghoffar, M. Abdul. Jakarta : Pustaka Imam Asy-syafi
- Akbar, Galih Pertiwi., Endang Kusdiyantini dan Wijarnaka. 2019. Isolasi dan Karakterisasi secara morfologi dan Biokimia Khamir dari Limbah Kulit Nanas Madu (*Ananas comosus* L.) untuk Produksi Bioetanol. *Berkala Bioteknologi*. Vol.2, No.2
- Ali,Naiman Mir and Mohammed Mazharuddin Khan. 2014 screening, Identification and Characterization of Alcohol Tolerant Potential Bioethanol Producing Yeast. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*. Vo.2, No.1
- Amata, I.A. 2013. Yeast a single cell protein : Characteristics and metabolism. *International Journal Of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. Volume-4 , Issue-1
- Amri, M. A., Bonaly, R., Duteutre, B. and Moll, M. 1982. Yeast flocculation: influence of nutritional factors on cell wall composition. *Journal of Genetic Microbiology* 128: 2001-2009.
- Anggraini, I., Ferniah, R. S., & Kusdiyantini, E. 2019.Isolasi Khamir Dari Batang Tanaman Tebu dan Identifikasinya Berdasarkan Sekuens *Internal Transcribed Spacer*. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBI)*, 6(1), 39
- Anggriana, anna., Muhardi dan Rostiati. 2017. Karakteristik Buah Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk) Siap Saji Yang Dipasarkan Di Kota Palu. *E-J. Agrotekbis* 5 (3) : 278-283
- Al-Qarni, ‘Aidh Abdullah bin, al-Tafsir al-Muyassar, Maktabah Obeikan, Riyadh, 2010.
- Arifin, Suyanto Zaenal. 2015. Description Of Turus Jackfruit (*Artocarpus integra* Merr) Superior Local Fruit From Magelang, Central Java. *Seminar Nasional Universitas PGRI Yogyakarta*
- Articus, K. 2004. Phylogenetic Studies In Usnea (Parmeliaceae) And Allied Genera. Doctoral Dissertation. Acta Universitatis Upsaliensis
- Asyikeen, Noroul., Ma’aruf, A.G., Sahilah, A.M., Mohd. Khan, A. and Wan Aida, W.M. 2013. A new source of *Saccharomyces cerevisiae* as a leavening agent in bread making. *International Food Research Journal* 20(2): 967-973
- Atlas, R. M. 2005. *Media For Environmental Microbiology Second Edition*. CRC Press. Boca Ranto

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. 1995. *Short Protocols in Molecular Biology*. Canada: John Wiley & Sons Inc.
- Azavedo, Joao Lucio ., Walter Maccheroni Jr., Jose Odair Pereira., Welington Luiz de Araujo. 2000. Endophytic microorganisms : a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol.3, No.1
- Barnett, J. A., Payne, R. W., and Yarro, D. 2000. *Yeasts: Characteristics And Identification*. Cambridge University Press.
- Biomedical Engineering. 2015. Preparation Of Culture Media, Agar Plates, Antibiotics And General Necessities. Netherlands: Endhoven University of Technology.
- Boboye, B and I Dayo- Owoyemi. 2009. Comparative Evaluation of the Sensory Properties of Doughs Fermented with Yeast Isolated from Orange. *Biotechnology* 8(3) :389-392
- Boboye, B and I Dayo-Owoyemi. 2009. Evaluation of Dough Sensory Properties Impacted by Yeasts Isolated from Cassava. *Journal of Applied Sciences*. 9(4):771-776,2009
- Camatti-Sartori, V., da Silva-Ribeiro, R. T., Valdebenito-Sanhueza, R. M., Pagnocca, F. C., Echeverrigaray, S., & Azevedo, J. L. 2005. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple(*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. *Journal of Basic Microbiology*, 45(5), 397–402.
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C., and Gooday, G. W. 2001. *The Fungi*. Gulf Professional Publishing
- Ciardo, D. E., Schar, G., Bottger, E. C., Altwegg, M., and 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.
- Claverie, J.M & Notredame, C. 2007. **Bioinformatics for Dummies** (2nd)
- Corriher, S. 2001. Yeast crucial role in bread making. *Fine Cooking*, 43:80-81
- Culver, C.A. 2008. *Color Quality of Fresh and Processed Foods*. American Chemical Society, Washington, DC
- Cyriacus, I., and Kingsley, N. 2010. Fungi associated with deterioration of soursop (*Anona muricata* Linn.) fruits in Abia State, Nigeria. *African Journal of Microbiology Research*, 4(3), 143-146.
- Dorfler, J. & HV. Amorim. 2007. Applied Bioethanol Technology in Brazil. *Zuckerindustrie*. 132(9): 694–697.

- Doyle, JJ. Doyle JL. 1987. A Rapid DNA Isolation from Small Amount of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemycall Bulletin* . 19 : 11-15
- Fardiaz, D. S. 1992. *Mikrobiologi Pangan 1*. Jakarta: PT. Gramedia
- Fell, J. W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., and Statzell-Tallman, A. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(3), 1351-1371.
- Fell, J. W., T. Boekhout, A. Fonseca, J.P. Sampaio. 2001. Basidiomycetous Yeast, in *Systematic and Evolution Microbiology*. Springer, Heidelberg, Berlin
- Ferreira, A. Mendes., A. Mendes-Faia and C. Leao. 2002. Survey of Hydrogen Sulphide Production by Wine Yeast. *Journal of Food Protection*. Vol.65, No.6
- Florin, Timothy H.J., Graeme Neale., Sara Goretski., and John H. Cummings. 1993. The Sulfate of Foods and Beverages. *Journl of food composition and analysis*
- Fujita, S. I., Senda, Y., Nakaguchi, S., and Hashimoto, T. 2001. Multiplex PCR Using Internal Transcribed Spacer 1 And 2 Regions For Rapid Detection And Identification Of Yeast Strains. *Journal of clinical microbiology*, 39(10), 3617-3622.
- Gai, C. S., Lacava, P. T., Maccheroni, W., Glienke, C., Araújo, W. L., Miller, T. A., & Azevedo, J. L. 2009. Diversity of endophytic yeasts from sweet orange and their localization by scanning electron microscopy. *Journal of Basic Microbiology*, 49(5), 441-451
- Gandjar, L dan Sjamsuridzal. 2006. *Mikologi Dasar dan Terapan*. Yogyakarta : Yayasan Obor Indonesia
- Geiser, D.M. 2004. Practical *Fungal Species Recognition Using MolecularPhylogenetics*. In : Watanabe, M.M., Suzuki, K and Seki, T. 2004. *Innovative Roles Of Biological Resource Centers: Proceedings Of TheTenth International Congress For Cultures Collections Tsukuba*. Japan Society for Culture Collections and World Federation for Culture Collections, Tsukuba: 89-92.
- Giri, S and Kindo, AJ. 2015. A review of *Candida* species causing blood. *J. Med. Microbiol.* 30 (2012) 270–278.
- Hamamoto, M & Nakase T. 2000. Phylogenetic analysis of the ballistoconidiumforming yeast genus *Sporobolomyces* based on 18S rDNA sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50(3): 1373-1380
- Harley, J. P. and L. M. Prescott. 2002. *Laboratory Exercise in Microbiology*. 5th edition. New York: McGraw-Hill Education.

- Hidayat N., Wignyanto., Sumarsih S., Putri, Al. 2016. *Mikologi Industri*. Surabaya : UB Press
- HiMedia. Adrade's Indicator. 2015. <http://himedialabs/TD/I001.pdf>
- Intan, Rizatul Maela Tri., Abdul Cholil dan Lilik Sulistyowati. 2014. Potensi Antagonis Jamur Endofit dan Khamir Pada Tanaman Pisang (*Musa accumunata*) Terhadap Jamur *Mycosphaerella musicola* Penyebab Penyakit Bercak Kuning Sigatoka. *Jurnal HPT*. Vol.2, No. 4
- Iraj, N. Giti, E. and Lila, A. 2002. Isolation of a flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* and investigation of its performance in the fermentation of beet molasses to ethanol. *American Journal of Biomass and Bioenergy* 23: 481-486
- Irawan, Septyan andri, Sentosa Ginting, Tering Karo – Karo. 2015. Pengaruh Perlakuan Fisik Dan Lama Penyimpanan Terhadap Mutu Minuman Ringan Nira Tebu. *J.Rekayasa Pangan dan Pert*. Vol.3, No. 3
- Irinyi, Laszlo *et al.* 2015. International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database-the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Medical Mycology*. Vol. 00, No. 00
- Irmayuni, Endang, Nurmila, Andi Sukainah. 2018. Eketivitas Air Nira Lontar (*Borassusflabellifer*) sebagai Bahan Pengembang Adonan Kue Apem. *Jurnal Pendidikan Teknologi Pertanian*. Vol.4
- Irvan, Popphy Pratiwi, dan Bambang Trisakti. 2015. Pembuatan Bioetanol Dari Tepung Ampas Tebu Melalui Proses Hidrolisis Termal dan Fermentasi : Pengaruh PH, Jenis Ragi, dan Waktu Fermentasi. *Jurnal Teknik Kimia USU*. Vol.4, No.2
- James, S.A. & M. Stratford. 2003. Spoilage yeast with emphasis on the genus *Zygosaccharomyces*. Dalam : Boekhout, T. & V. Robert (eds). 2003. *Yeast in food*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge : 171- 191
- Jumiyati, Siti Harnina Bintari, dan Ibnul Mubarak. 2012. Isolasi dan Identifikasi Khamir Secara Morfologi Di Tanah Kebun Wisata Pendidikan Universitas Negeri Semarang. *Biosantifika*. Vol.4. No.1
- Kevin, K. 2005. *Fungi : Biology and Appllications*. England : John Wiley and Sons
- Karki, Tika B., Parash Mani Timilsina., ArchanaYadav., Gyanu Raj Pandey., Yogesh Joshi., Sahansila Bhujel., Rojina Adhikari and Katyayanee Neupane. 2017. Selection and Characterization of Potential Baker's Yeast from Indigenous Resources of Nepal. *Biotechnology Research International*
- Kevin, K. 2005. *Fungi: Biology and Applications*, p. 257. England: John Wiley

and Sons, Ltd.

- Kong, Ching Ting., Chin Wai Ho, Jin Wei Alvin Ling, Azwan Lazim, Shazrul Fazry & Seng Joe Lim. 2018. Chemical Changes and Optimisation of Acetous Fermentation Time and Mother of Vinegar Concentration in the Production of Vinegar-like Fermented Papaya Beverage. *Sains Malaysiana* 47(9)
- Korabecna M. 2003. The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): Its biological meaning and application in medical mycology. *Commun Curr Res Educ Top Trends in Appl Microbiol.* 2:783-787
- Kumar, Sudhir., Sudhindra R. Gadagkar. 2000. Efficiency of the Neighbor-Joining Method in Reconstructing Deep and Shallow Evolutionary Relationships in Large Phylogenies. *J. Mol Evol* 51:544-553
- Kurtzman, C. P. 1998. *Pichia* EC Hansen emend. **The Yeasts**. Fourth Edition. (pp. 273-352).
- Kurtzman, C. P. & Fell, J. W. 1998. Definition, classification and nomenclature of the yeasts. **The Yeasts**. Fourth Edition. (pp. 3-5).
- Kurtzman, C. P., and Piškur, J. 2006. Taxonomy And Phylogenetic Diversity Among The Yeasts. In *Comparative Genomics* (pp. 29-46). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kurtzman, C.P. 2011. Recognition of Yeast from Gene Sequence Comparisons. *The Open Applied Informatics Journal.* 5 : 20-29
- Kurtzman, C.P. 2011. *Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeast*. USA: Elsevier B.V
- Kwasna, H., Geoffrey L. Bateman., Elaine Ward. 2008. Determining species diversity of microfungal communities in forest tree roots by pure-culture isolation and DNA sequencing. *Applied Soil ecology* 40 : 44-56
- Li, Shuying, D. K. Pearl and H. Doss. 1999. Phylogenetic Tree Construction Using Markov Chain Monte Carlo. *Journal of the American Statistical Association.* Vol. 95.No.450
- Liu, I. H., & Cho, D.G. 2010. Chemistry of bread aroma: A review. *Food Science and Biotechnology*, 19(3), 575-582
- Martins, L. F. Montero-Lomeli, M. Masuda, C. A. Fortes, F. S. Previato, J. O. & Mendonça-Previato, L. 2008. Lithium-mediated suppression of morphogenesis and growth in *Candida albicans*. *FEMS yeast research.* 8(4): 615-621.

- Maryam, Balarabe Musa ., Sani Sambo Datsugwai Mohammed., Orukotan Abimbola Ayodeji. 2017. Screening of Fermentative Potency of Yeast Isolats from Indigenous Sources for Dough Leavening. *International Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 2, No.1
- Miki, B. L. A., Poon, N. H. James, A. P. and Seligy, V. L. 1982. Repression and induction of flocculation interaction *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 150: 890-900.
- Mirhendi, H., Diba, K., Rezaei, A., Jallalizand, N., Hosseinpur, L., & Khodadadi, H. 2007 Colony-PCR Is a Rapid and Sensitive Method for DNA Amplification in Yeasts. *Iranian Journal of Publick Health*. 36(1):40-44
- Misran, Erni. 2015. Industri Tebu Menuju Zero Waste Industry. *Jurnal Teknologi Proses*. Vol.4. No.2
- Muchtadi, D.M.S. 2009. *Karbohidrat Pangan Dan Kesehatan*. Bandung: Alfabeta.
- Nielsen, J. Larsson, C. van Maris, A. & Pronk, J. 2013. Metabolic engineering of yeast for production of fuels and chemicals. *Current opinion in biotechnology*. 24(3):398-404.
- Obasi BC, Whong CMZ., Ado SA, Abdullahi IO. 2014. Isolation and identification of yeast associated with fermented orange juice. *Int J Eng Sci* 3:64-69
- Obasi BC, Whong CMZ, Ado SA, Abdullahi IO. 2017. Leavening ability of some wild yeasts and the mutant species isolatd from fermented orange juice in bakery product (bread). *FUW Trends In Sci Tech J* 2:596-608
- Okafor, N. 2007. *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*, edisi 1, Science Publisher, New Hampshire, United State of America
- Oliveira APA, De Silvestre MA, Alves-prado HF, Rodrigues A, Fossa M, Fonseca GG, & Leite RSR. 2015. Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid state fermentation and evaluation of the catalytic properties of enzymatic extracts. *Afr. J. Biotechnol*. 14(14): 1215–1223.
- Olsen B, Murakami CJ, Kaeberlein M. 2010. YODA: software to facilitate high-throughput analysis of chronological life span, growth rate, and survival in budding yeast. *BMC Bioinformatics* 11:141
- Ono, Bun-Ichiro., Nobuya Ishii., Shizu Fujino and Isao Aoyama. 1991. Role of Hydrosulfide Ions (HS⁻) in Methylmercury Resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Enviromental Microbiology*
- Pelczar, M.J dan E.C.S Chan. 2013. *Dasar-dasar Mikrobiologi Jilid 2*. Jakarta : UI Press

- Periadnadi., Sari, Diah Kharisma dan Nurmiati. 2018. Isolasi dan Keberadaan Khamir Potensial Pemfermentasi Nira Aren (*Arenga Pinnata* Merr.) dari Dataran Rendah dan Dataran Tinggi di Sumatera Barat. *Bioeksperimen*. Vol.4 N0.1
- Priya, Sundarajana., Sangeeta Sheety and Shigyan Aniket. 2016. Screening and Characterization of Bioethanol Producing Yeast. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 86 (1)
- Porras-Alfaro, A., Liu, K. L., Kuske, C. R., and Xie, G. (2014). From genus to phylum: large-subunit and internal transcribed spacer rRNA operon regions show similar classification accuracies influenced by database composition. *Applied and environmental microbiology*, 80(3), 829-840.
- Quraish Shihab, *Tafsir Al-Misbah*.2002. Jakarta : Lentera Hati
- Rahmawati, F.C., Kusdiyantini, E dan Budiharjo, A. 2017. Isolasi dan Identifikasi Molekuler Khamir Dari Molase Serta Kemampuannya Dalam Produksi Etanol. *Jurnal Biologi*. 6 (4) : 89-88
- Rashid, A.N.M. Mamun., Biplab Kumar Dash., Md. Nurul Abadin Chowdhury., Momtaz Fatima Waheed and Md. Kamruzzaman Pramanik. 2013. Exploration of Potential Bake's Yeast from Sugarcane Juice : Optimization and Evaluation. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 16 (13) : 617-623
- Rosidiani, Erta Puri., Estri Laras Arumningtyas, dan Rodliyati Azrianingsing. 2013. Analisis Variasi Genetik *Amorphophallus Muelleri* Blume dari Berbagai Populasi di Jawa Timur Berdasarkan Sekuen Intron trnl. *Floribunda* 4(6)
- Rubatzky, Vincent E dan Mas Yamaguchi. 1998. *Sayur dunia 1 : Prinsip, Produksi, dan Gizi*, jilid I. Bandung : Penerbit ITB
- Rukmana. 2008. *Budi Daya Nangka*. Yogyakarta : Kanisius
- Sampaio, F. C, *et al*. 2008. Screening of Filamentous Fungi for Production of Xylitol from D-Xylose. *Brazilian Journal of Microbiology*
- Sastrohamidjojo, H. 2005. *Kimia Organik Stereokimia, Karbohidrat, Lemak Dan Protein*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Satyanarayana, and Kunze. 2009. *Yeast Biotechnology : Diversity and Application*. New Delhi : Springer
- Schneider, R. 2004. *Genetics, Molecular and Cell Biology of Yeast*. University of Friburgensis.
- Simpson, MG. 2006. *Plant Systematics*. Elsevier Academic Press. San Diego, California

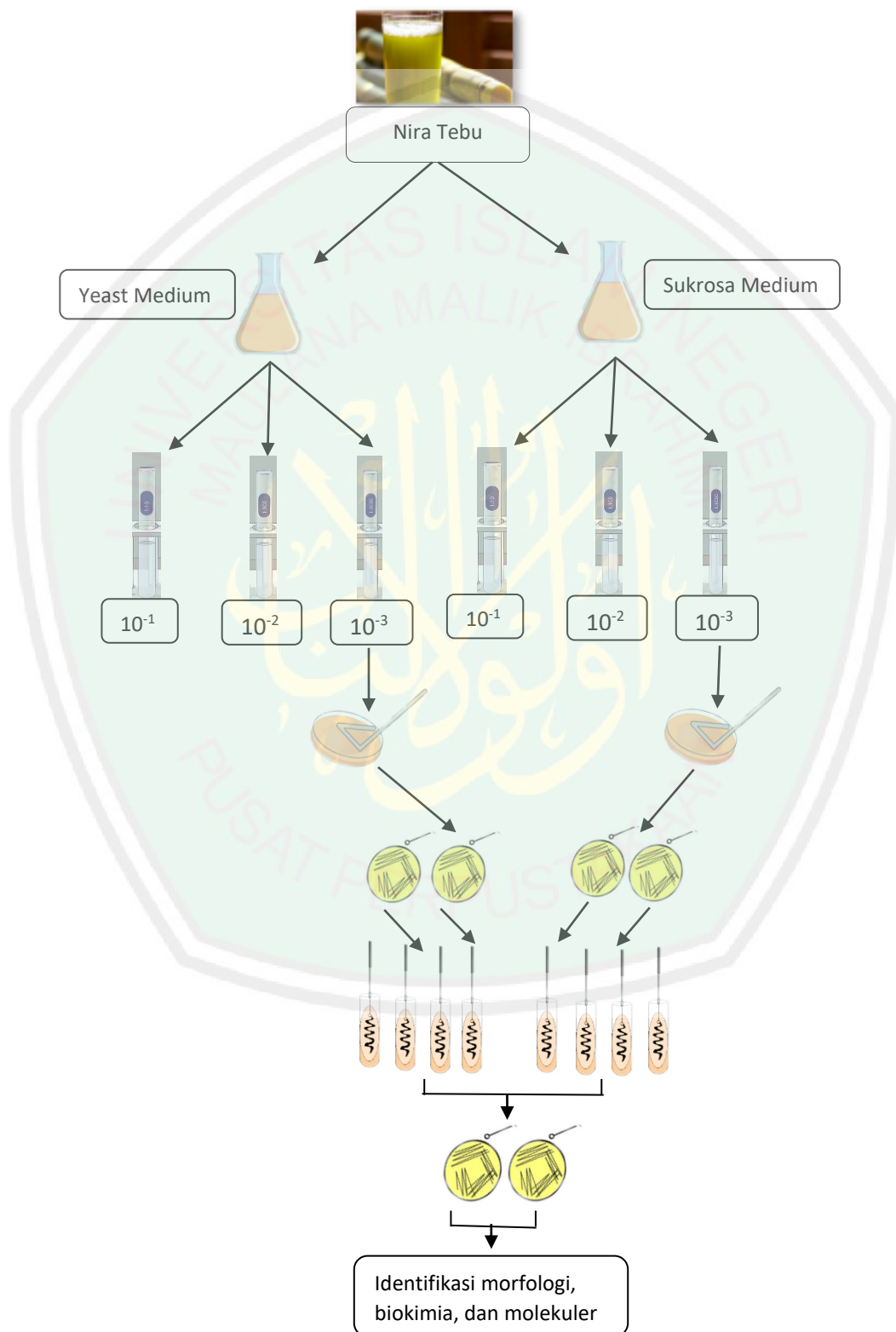
- Soares, Eduardo. 2010. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Journal Applied Microbiology* ISSN 1364-5072
- Spencer, J. F. T. and D. M. Spencer. (1997). *Yeasts in Natural and Artificial Habitats*. SpringerVerlag :Berlin.
- Steensels, J. Snoek, T. Meersman, E. Nicolino, M. P. Voordeckers, K. & Verstrepen, K. J. 2014. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS microbiology reviews*. 38(5): 947-995.
- Struyf, Nore., Eva Van der Maelen, Sami Hemdane, and Joran Verspreet, Kevin J. Verstrepen, and Christophe M. Courtin. Bread Dough and Baker's Yeast: An Uplifting Synergy. 2017. *Institute of Food Technologists*. Vol.16
- Subandi, Dr. H.M, dan Drs.. Ir., MP. 2010. *Mikrobiologi (Perkembangan, Kajian dan Pengamatan dalam Perspektif Islam)*. Bandung: PT. Remaja Rosdakarya
- Sunaryo. 2005. *Berkebun 21 Jenis Tanaman Buah*. Jakarta : Penebar Swadaya
- Suryaningsih, V., Ferniah, R. S., dan Kusdiyantini, E. 2018. Karakteristik Morfologi, Biokimia, Dan Molekuler Isolat Khamir Ik-2 Hasil Isolasi Dari Jus Buah Sirsak (*Annona muricata* L.). *Jurnal Biologi*, 7(1), 18-25.
- Suprpti, I. M. L. 2004. *Teknologi Tepat Guna Buah Nangka*. Kanisius.
- Sutedjo, M. 1996. *Mikrobiologi Tanah*. Jakarta : Rineka Cipta
- Swaran, Yuvaneswari Chandramoulee and Lindsey Welch. 2012. A comparison between direct PCR and extraction to generate DNA profiles from samples retrieved from various substrates. *Forensic Science International : Genetics* 6(407-412)
- Tan Gana NHT, Mendoza BC, & Monsalud RG. 2014. Isolation, screening, and characterization of yeasts with amyolytic, lipolytic, and proteolytic activities from the surface of philippine bananas (*Musa spp.*). *Philipp. J. Sci.*
- Tavanti, A., Davidson, A. D., Gow, N. A., Maiden, M. C., & Odds, F. C. 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *Journal of clinical microbiology*, 43(1), 284292.
- Tejpal A & Amrita P. 2016. Jackfruit: A health boon. *Int. J. Res. Ayurveda. Pharm.* Vo.7, No.3
- Tjitrosoepomo, Gembong. 2004. *Taksonomi Tumbuhan*. Yogyakarta : Universitas Gadjah Mada Press
- Verstrepen K.J, G. Derdelinckx, H. Verachtert *et al.* 2003. Yeast Flocculation : What Brewers Should Know. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol.61 (3)

- Volk, W.A and M.F. Wheeler. 1993. *Mikrobiologi Dasar. Edisi Kelima. Jilid 1*. Jakarta : Penerbit Erlangga.
- Wardhani, Dwi.A., Agnes dan Dyani Prasastu. 2009. Pengaruh Baker Yeast terhadap pembuatan ethanol dari buah nangka sortiran.
- Watanabe, M. Uchida, N. Fujita, K. Yoshino, T. & Sakaguchi, T. 2016. Bread and Effervescent Beverage Productions with Local Microbes for the Local Revitalization. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*. 6(3):381-384.
- Webster J & Weber RWS. 2007. *Introduction to Fungi. Third Edition*. New York: Cambridge University Press.
- Wibowo, Feri, Chairul, Irdoni S. 2015. Pengaruh Kecepatan Pengaduk dan Waktu Fermentasi Terhadap Konsentrasi Bioetanol Pada Fermentasi Nira Nipah Kental Menggunakan *Saccharomyces Cerevisiae*. *JOM FTEKNIK*. Vol.2, No.2
- Wijayanti, W. A. 2008. Pengelolaan tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) di Pabrik Gula Tjoekir PTPN X, Jombang, Jawa Timur; Studi kasus pengaruh bongkar ratoon terhadap peningkatan produktivitas tebu. *Jurnal Agronomi dan Hortikultura*. Vol.4. No.5
- Wulandari, Tria Putri., Daila Sukmawati., Tri Handayani Kurniati. 2017. Isolasi dan Seleksi Khamir Amilolitik Asal Buah Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). *Bioima*. Vol.13, No.1
- Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of Yeast. In Kurtzman, C.P. and J.W. Fell. *The Yeast, a Taxonomic Study*. 4th edition. Amsterdam: Elsevier
- Yulianti, Titiek. 2012. Menggali Potensi Endofit untuk meningkatkan Kesehatan Tanaman Tebu Mendukung Peningkatan Produksi Gula. *Perspektif* . Vol. 11, No.2

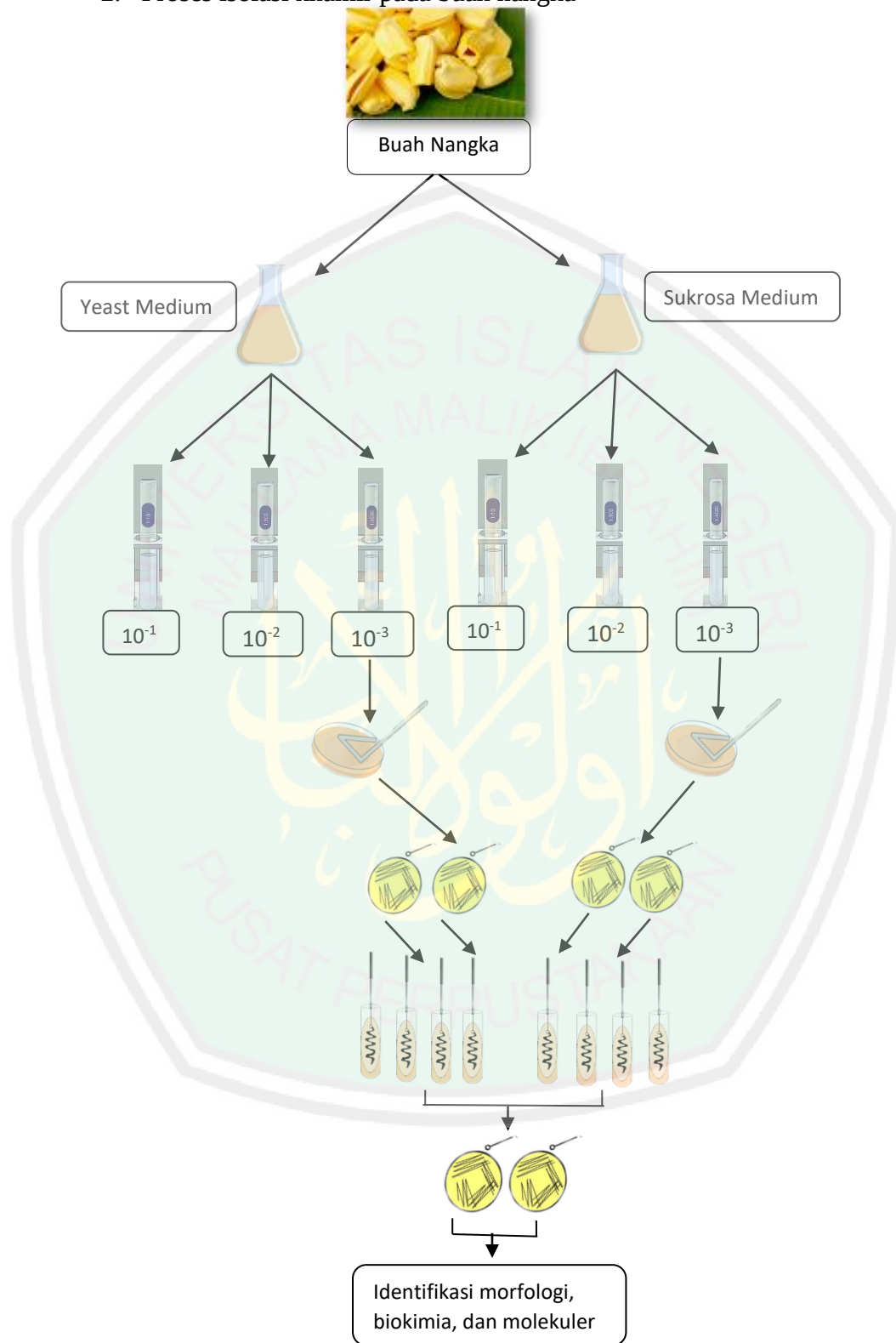
LAMPIRAN

Lampiran 1 : Diagram alir penelitian

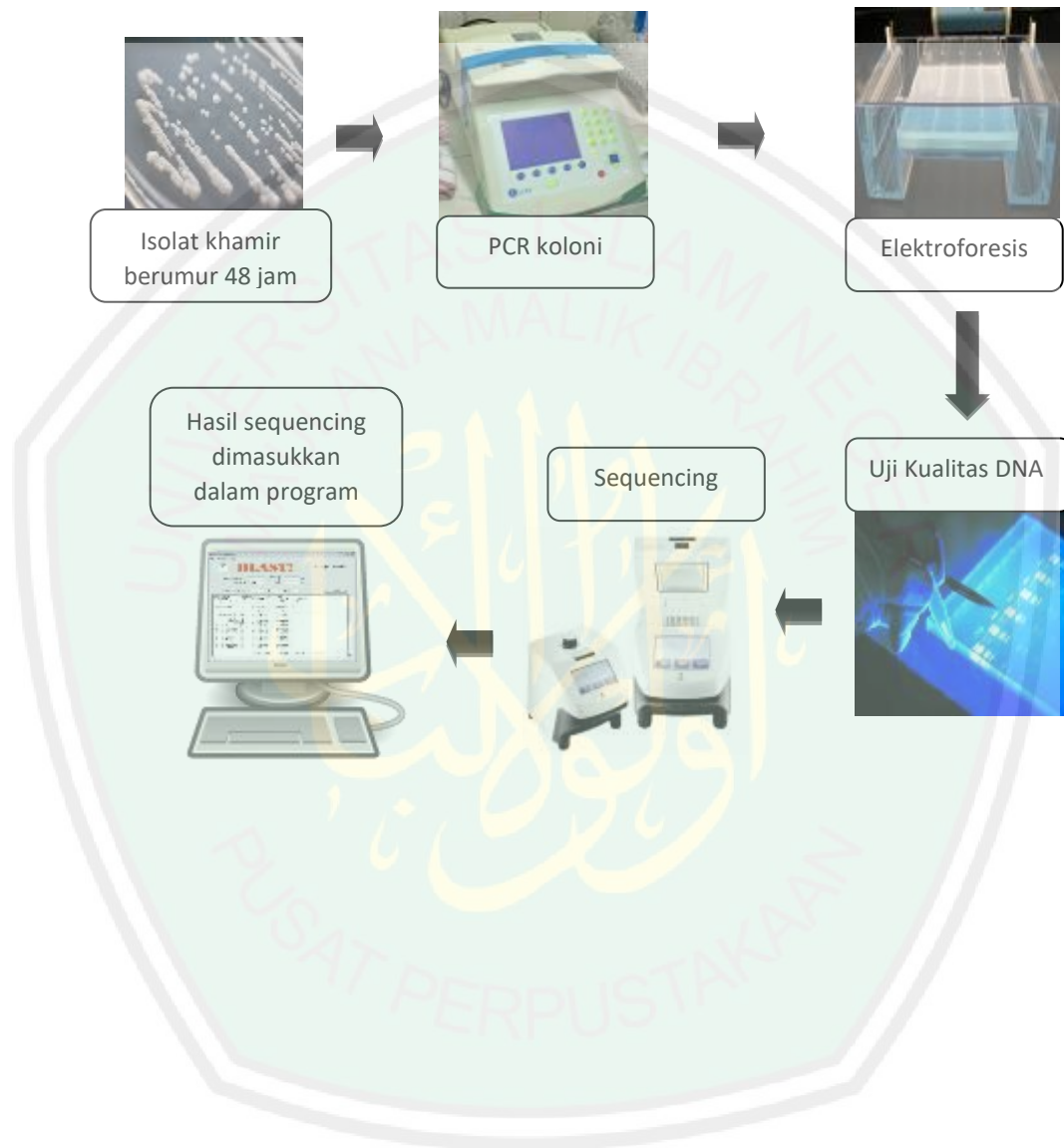
1. Proses isolasi khamir pada nira tebu



2. Proses isolasi khamir pada buah nangka



Lampiran 2 : Identifikasi molekuler



Lampiran 3 : Hasil Uji Fermentasi Karbohidrat (glukosa,sukrosa,fruktosa, dan laktosa)

Keterangan (-) : warna media tetap (merah) dan tidak ada gelembung udara

(+) : warna media berubah (merah menjadi merah muda) dan terdapat gelembung udara

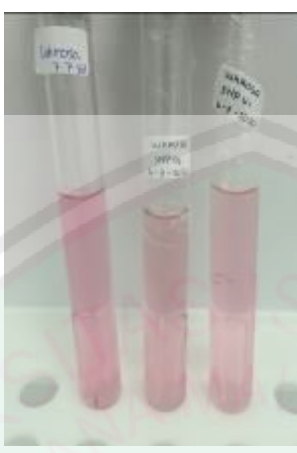
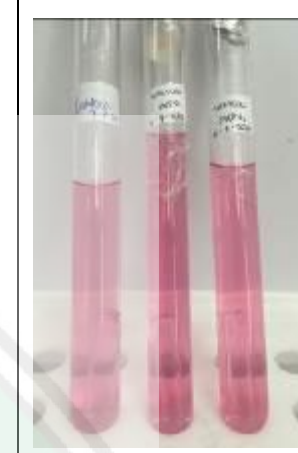
1. Isolat khamir RNT-1

Glukosa	Sukrosa	Fruktosa	Laktosa
			

2. Isolat khamir RNT-2

Glukosa	Sukrosa	Fruktosa	Laktosa
			

3. Isolat khamir RBN-1

Glukosa	Sukrosa	Fruktosa	Laktosa
			

4. Isolat khamir RBN-2

Glukosa	Sukrosa	Fruktosa	Laktosa
			

5. Isolat khamir RBN-3

Glukosa	Sukrosa	Fruktosa	Laktosa
			

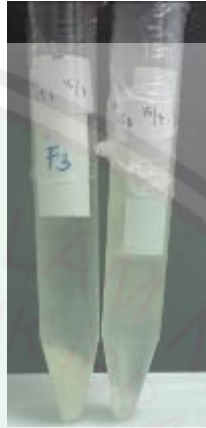
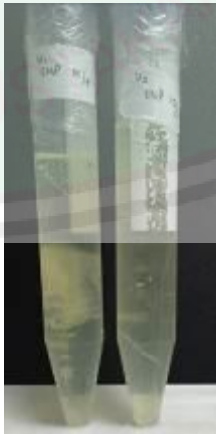
Lampiran 4 : Hasil Uji Toleransi Glukosa dengan Konsentrasi 50%

No.	Kode Isolat	Gambar
1.	RNT-1	
2.	RNT-2	
3.	RBN-1	
4.	RBN-2	

5.	RBN-3	
----	-------	--

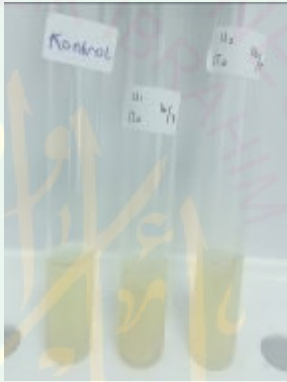


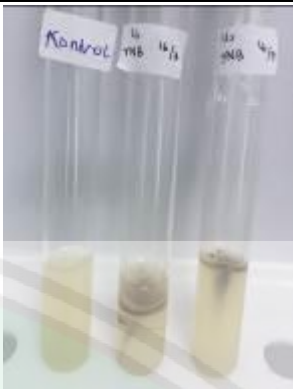
Lampiran 5 : Hasil Uji Flokulasi

No.	Kode Isolat	Gambar
1.	RNT-1	
2.	RNT-2	
3.	RBN-1	

4.	RBN-2	
5.	RBN-3	

Lampiran 6 : Hasil Uji H₂S

No.	Kode Isolat	Gambar
1.	RNT-1	
2.	RNT-2	
3.	RBN-1	
4.	RBN-2	

5.	RBN-3	
----	-------	--



Lampiran 7 : Urutan gen ITS khamir hasil *sequencing*

1. Isolat khamir RNT-1

```

1  TATGGCTAGC TACGAGCGGA AGAAGATGCT CGAGTTCCTG TTGAGATCTT TTACAATAA GTGATCTTT ACTGGAGATG TGCCTTAAT TCGCTGCTT CATTAGAGTG TCGCAGTAGA 120
121 AGTAGCTCTG CTTGAATCTC AGTCAACGTT TACACACATT GGAGTTTTTT TACTTTAATT TAAATCTTC TGCCTTGAAT CGAAGGTTT AAGGCAAAA ACAACACAA ACAATTTTAT 240
241 TTTATTATAA TTTTAAAC TAAACAAAA TTCTTAACGG AATTTTAAAT ATAATTAAA ACCTTCAAGA ACAGGCTCT TGTCTCTGC ATCGATGAG AACGTAGCGA ATTGCGATTA 360
361 GTATTGTGAA TTGCAGATAC TGTGAATCA TTGAATTTT GAACGCACAT TGCGCCCTTG ACATCTCA AGGGCATGCC TGTGTAGCG TCAATTCCT CTCAAAAAT AATTTTTTAT 480
481 TTTTGGTTT TGGCGATAC TCAAGGTTAG CTGAAATTG GAGACTGTT CAGCTTTTT TAAATCGACA CTTAGCTTGT TTGAGAGCG TTTCTCCTT GTAGGTATG TATGGATTTA 600
601 TCGTTTATC TTTACAAAGG AATGTTAT TACCTTAGG CCAAGGTTG GTTTTATTA TCAATAGTT TGACTTCAA TCAAGTAGGA TTACCGGTT AATTAGGA TCCCTAAGG 720
721 GGGAAAGGAA AA

```

2. Isolat khamir RNT-2

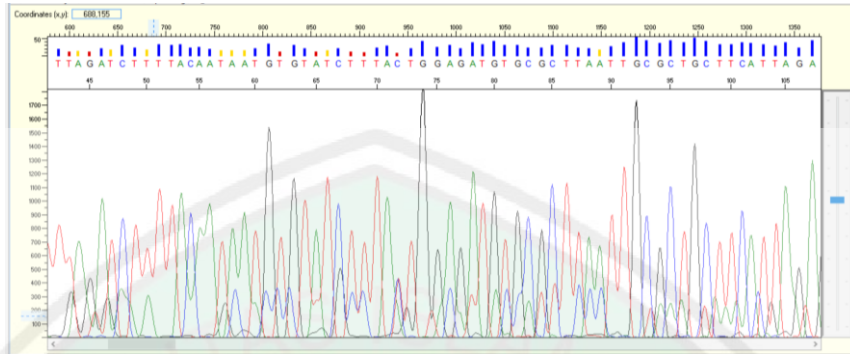
```

1  CTCAAGTCCA ATTGCTAGC TACTTCAGCA TGTTTTGA GACACAAAT TAATTTCTT TTTTCAATG TTTTATAAT AAAACCTTC AACACGGAT TCTTGGTTC TCGCATCGAT 120
121 GAAGAAGCGA GCGAATTGG ATACGTAATA TGACTTGCAG AGTGAATCA TTGAATCTT GAGCGACAT TCGCCTTGA GGTATTCCT AAGGATGCC TGTGTAGCG TCGCTCTT 240
241 TCAAAACCTTA GGGTTGGCT TTGCTCCGA AATATTAGA TCTAATGCA TACGTTTCT TTAATCGAA TTCTTCCCC TCAATCGGG TAAGACTAC CCGTAACCT AAGCATATCA 360
361 GTAACTTGC GCAAG

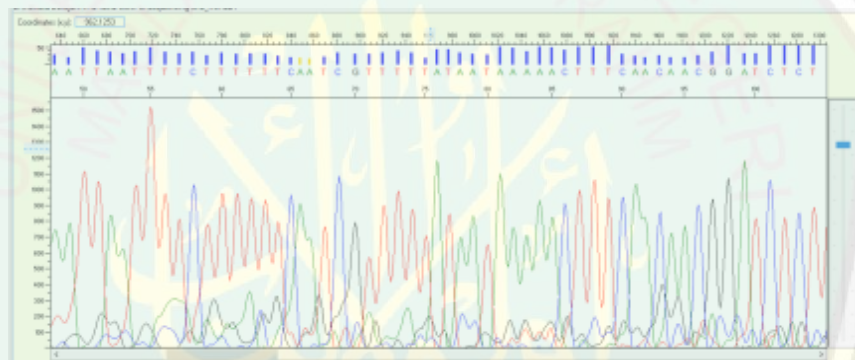
```

Lampiran 8 : Gambar pick DNA hasil sekuensing pada SeqScanner

1. Isolat khamir RNT-1

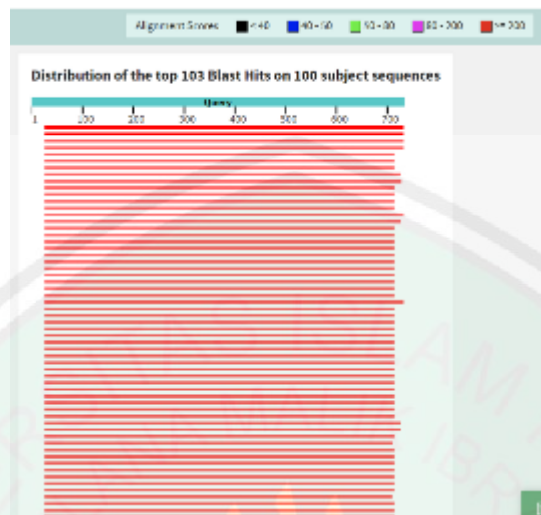


2. Isolat khamir RNT-2



Lampiran 9 : Nilai alignment pada proses BLAST di NCBI

1. Isolat khamir RNT-1



2. Isolat khamir RNT-2



Lampiran 10 : Hasil BLAST di NCBI

1. Isolat khamir RNT-1

	Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Hanseniaspora opuntiae strain UniFGHO3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed sp...	Hanseniaspora...	1227	1227	96%	0.0	98.02%	769	KI029780.1
☒	Hanseniaspora opuntiae strain HO34 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer ...	Hanseniaspora...	1227	1227	96%	0.0	98.02%	784	KP241869.1
☒	Hanseniaspora opuntiae strain JEY269 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed space...	Hanseniaspora...	1227	1227	96%	0.0	98.02%	1964	KC111446.1
☒	Hanseniaspora opuntiae strain SM10UFAM small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal tran...	Hanseniaspora...	1221	1221	96%	0.0	97.88%	3092	MN268780.1
☒	Hanseniaspora opuntiae strain EB2016-37 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RN...	Hanseniaspora...	1218	1218	93%	0.0	98.69%	724	MN378463.1
☒	Hanseniaspora opuntiae strain EB2016-88 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RN...	Hanseniaspora...	1218	1218	93%	0.0	98.69%	723	MN378452.1
☒	Hanseniaspora opuntiae strain EB2016-38 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RN...	Hanseniaspora...	1218	1218	93%	0.0	98.69%	721	MN378431.1
☒	Hanseniaspora uvarum isolate B-WHX-12-14 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal...	Hanseniaspora...	1218	1218	95%	0.0	98.14%	724	KC544511.1
☒	Hanseniaspora opuntiae 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial) s...	Hanseniaspora...	1218	1218	95%	0.0	98.01%	749	FM199951.1
☒	Hanseniaspora opuntiae strain EB2016-91 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RN...	Hanseniaspora...	1216	1216	93%	0.0	98.69%	724	MN378464.1
☒	Hanseniaspora opuntiae strain EB2016-66 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RN...	Hanseniaspora...	1216	1216	93%	0.0	98.69%	722	MN378441.1
☒	Hanseniaspora opuntiae strain EB2016-65 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RN...	Hanseniaspora...	1216	1216	93%	0.0	98.69%	721	MN378433.1

2. Isolat khamir RNT-2

	Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Candida sp. 2 TMS-2011 voucher SC13d100p7-5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal tran...	Candida sp. 2...	599	599	92%	4e-167	97.98%	430	HO631029.1
☒	[Candida] akabanensis strain UEVJM_R131 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosoma...	[Candida] aka...	595	595	91%	5e-166	97.69%	347	KY325443.1
☒	[Candida] akabanensis culture CBS-5039 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal tra...	[Candida] aka...	593	593	92%	2e-165	97.69%	821	KY101828.1
☒	[Candida] akabanensis culture CBS-7879 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal tra...	[Candida] aka...	593	593	92%	2e-165	97.69%	774	KY101827.1
☒	Candida akabanensis strain CBS 5039 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RN...	[Candida] aka...	593	593	92%	2e-165	97.69%	903	EU100744.1
☒	[Candida] dosseyi ATCC MYA-4359 ITS region: from TYPE material	[Candida] doss...	592	592	91%	7e-165	97.69%	392	NR_111406.1
☒	[Candida] dosseyi culture CBS-10313 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcr...	[Candida] doss...	586	586	90%	3e-163	97.67%	401	KY102054.1
☒	Candida intermedia strain PAL3 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene...	[Candida] inter...	584	584	88%	1e-162	98.50%	364	KP860054.1
☒	[Candida] blattae culture CBS-9871 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcrib...	[Candida] blattae	575	575	92%	7e-160	96.83%	655	KY101970.1
☒	Candida dosseyi isolate LEV47 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1...	[Candida] doss...	573	573	91%	2e-159	96.82%	391	KJ381481.1
☒	[Candida] ATCC MYA-4360 ITS region: from TYPE material	[Candida] blattae	573	573	91%	2e-159	96.82%	391	NR_111407.1
☒	Candida sp. GA3M06 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and intern...	Candida sp. G...	560	560	91%	2e-155	96.22%	341	FJ873592.1
☒	Candida sp. GA2M03 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and intern...	Candida sp. G...	560	560	91%	2e-155	96.22%	342	FJ873590.1
☒	Candida sp. GA5M02 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and intern...	Candida sp. G...	553	553	90%	3e-153	96.18%	337	FJ873594.1
☒	Candida sp. LCF-75 strain ND1M71 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA g...	Candida sp. L...	544	544	87%	2e-150	96.66%	328	JO601933.1

Lampiran 11 : Hasil aligment dengan MEGA 10.0

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrev	
1. MN809217.1_Saccharomyces_cerevisiae	CGATACGTAATATGAATTGCAGACGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGCATGCC
2. RNT2_TSI.ab1	CGATACGTAATATGAATTGCAGACGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGCATGCC
3. RNT1_TSI.ab1	CGATAAGTAATGTGAATTGCAGACGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGCATGCC
4. KT029780.1 Hanseniaspora opuntiae strain UniFGH03	CGATAAGTAATGTGAATTGCAGACGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGCATGCC
5. KC111446.1 Hanseniaspora opuntiae strain JEY269	CGATAAGTAATGTGAATTGCAGACGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGCATGCC
6. KP241069.1 Hanseniaspora opuntiae strain HO34	CGATAAGTAATGTGAATTGCAGACGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGCATGCC
7. HQ631029.1 Candida sp. 2 TMS-2011	CGATACGTAATATGAATTGCAGACGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGCATGCC
8. NR_111406.1 Candida dosseyi ATCC MYA-4359	CGATACGTAATATGAATTGCAGACGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGCATGCC
9. KY325443.1 Candida akabensis strain UFVJM_R131	CGATACGTAATATGAATTGCAGACGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGCATGCC
10. MN795590.1 Pichia kudriavzevii	CGATACGTAATATGAATTGCAGACGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGCATGCC





KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

Form Checklist Plagiasi

Nama : Rofiatu Darojah
NIM : 16620105
Judul : ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KHAMIR ENDOFIT YANG
BERPOTENSI SEBAGAI PENGEMBANG ROTI DARI NIRA TEBU (*Saccharum
Officinarum* L.) DAN BUAH NANGKA (*Artocarpus heterophyllus* Lamk)

No	Tim Checkplagiasi	Skor Plagiasi	TTD
1	Azizatur Rohmah, M.Sc		
2	Berry Fakhry Hanifa, M.Sc		
3	Bayu Agung Prahardika, M.Si	22 %	



Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi

Dr. Evika Sandi Savitri, M. P.
NIP.19741018 200312 2 002



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933, Fax. (0341) 558933

KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Rofiatu Darojah
NIM : 16620105
Program Studi : S1 Biologi
Semester : Ganjil TA-2020/2021
Pembimbing : Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si
Judul Skripsi : Isolasi dan Identifikasi Khamir Endofit Yang Berpotensi Sebagai Pengembang Roti Dari Nira Tebu (*Saccharum Officinarum* L.) dan Buah Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk)

[illegible]

Pembimbing Skripsi,

Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si
NIP. 19650509 199903 2 002

Malang, 27 Oktober 2020
Ketua Jurusan,

Dr. Evika Sandi Savitri, M. P
NIP.19741018 200312 2 002



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
JURUSAN BIOLOGI

R. Ganjyama No. 50 Madang 65144 Telp: (0541) 5589933, Fax: (0541) 5589533

KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Rofiatu Darojah
NIM : 16620105
Program Studi : S1 Biologi
Semester : Ganjil TA-2020/2021
Pembimbing : Oky Bagas Prasetyo, M.Pd.I
Judul Skripsi : Isolasi dan Identifikasi Khamir Endofit Yang Berpotensi Sebagai Pengembang Roti Dari Nira Tebu (*Saccharum Officinarium* L.) dan Buah Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk)

[illegible]

Pembimbing Skripsi.



Oky Bagas Prasetyo, M.Pd.I
NIP. 19890113 20180201 1 244

Malang, 26 Oktober 2020

Kewirausahaan



Dr. Evika Sandi Savitri, M. P
NIP.19741018 200312 2 002