

Isolasi Khamir Fermentatif dari Batang Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum*. L) dan Hasil Identifikasinya Berdasarkan Sekuens *Internal Transcribed Spacer*

Ika Angraini¹, Rejeki Siti Ferniah¹ dan Endang Kusdiyantini¹

¹Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto, SH Tembalang, Semarang, Indonesia
E-mail: kusdiyantini@yahoo.com

ABSTRAK

Khamir adalah jamur bersel satu yang berperan sebagai epifit, endofit atau parasit. Khamir terbagi menjadi dua yaitu khamir fermentatif dan khamir oksidatif. Khamir fermentatif mampu menghasilkan metabolit primer dan sekunder. Peran khamir fermentatif banyak digunakan dalam bidang industri pangan, kesehatan dan energi, maka perlu dieksplorasi khamir fermentatif dari batang tanaman tebu. Tujuan penelitian ini adalah untuk isolasi khamir fermentatif dari batang tanaman tebu dan identifikasi khamir secara molekuler berdasarkan sekuens *Internal Transcribed Spacer* (ITS). Isolasi khamir epifit dan endofit dilakukan dengan cara *spread plate* dari air rendaman tebu dan jus tebu. Isolasi khamir menggunakan 2 media yaitu PDA dan YGP dengan kloramfenikol. Karakterisasi morfologi dilakukan dengan mengamati karakteristik makroskopik dan mikroskopik. Karakterisasi biokimia dilakukan dengan uji fermentasi karbohidrat dan uji pertumbuhan pada media glukosa 50%. Isolat terpilih diidentifikasi molekuler menggunakan sekuens *Internal Transcribed Spacer* (ITS). Primer yang digunakan yaitu ITS 1 dan ITS 4. Analisis filogenetik menggunakan *Neighbor Joining* dari program MEGA-6. Hasil isolasi diperoleh 7 isolat khamir yang dikarakterisasi secara morfologi dan biokimia. Berdasarkan hasil karakterisasi morfologi dan biokimia yaitu didapatkan 1 isolat terpilih Ed 1B. Isolat khamir terpilih memiliki ciri-ciri yaitu koloni bulat, berwarna putih krem, permukaan mengkilap, elevasi timbul, tepian bergelombang, bentuk sel ovoid, diameter sel 4,74 µm, memiliki *budding*, memfermentasi glukosa dan sukrosa, namun tidak untuk laktosa serta tumbuh dengan baik pada media glukosa 50%. Hasil *Basic Alignment Search Tools* (BLAST) menunjukkan bahwa isolat Ed 1B memiliki homologi 99% dengan spesies *Kodamaea ohmeri*.

Kata Kunci: Tebu (*Saccharum officinarum*. L.), Khamir, Identifikasi Molekuler

ABSTRACT

Yeast is a single-celled fungus that acts as epiphytes, endophytes or parasites. Yeast is divided into fermentative yeast and oxidative yeast. Fermentative yeast can produce primary and secondary metabolites. The role of fermentative yeast is widely used in the food industry, health and energy, so necessary to be explore fermentative yeast from sugarcane stems. The purpose of this study was to isolate fermentative yeast from sugarcane stems and identify molecular yeast based on the Internal Transcribed Spacer sequences (ITS). Isolation of epiphytic and endophytic yeast was carried out by spread plate of water soak sugarcane and sugar cane juice. Yeast isolation using 2 media, PDA and YGP with chloramphenicol. Morphological characterization was carried out by observing macroscopic and microscopic characteristics. Biochemical characterization was carried out by carbohydrate fermentation test and 50% glucose media growth test. Selected isolates were molecularly identified using Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences. Primers used are ITS 1 and ITS 4. Phylogenetic analysis using Neighbor Joining from MEGA-6 program. The results of isolation obtained 7 yeast isolates characterized morphologically and biochemically. The based result of morphology and biochemical characterization were found 1 selected isolate with name Ed 1B. Selected yeast isolate have characteristics are round colonies, creamy white, shiny surface, raised elevation, wavy edges, ovoid cell shape, cell diameter 4,74µm, budding, glucose fermentation and sucrose fermentation, but not for lactose and grow well of 50% glucose media. The results of the Basic Alignment Search Tools (BLAST) are Ed 1B isolates had 99% homology with *Kodamaea ohmeri* species.

Key Words : Sugarcane (*Saccharum officinarum*. L.), Yeast, Molecular Identification

1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara yang memiliki keanekaragaman hayati yang luas baik di daratan maupun di lautan. Keanekaragaman hayati ini meliputi flora, fauna dan mikroorganisme. Berbagai macam makhluk hidup tersebut mampu beradaptasi dengan baik di Indonesia. Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Supriatna (2008), bahwa Indonesia merupakan negara dengan kekayaan keanekaragaman hayatinya. Hal tersebut dikarenakan Indonesia terletak di iklim tropis yang menjadi relung berbagai macam flora, fauna, maupun mikroorganisme. Relung kehidupan tersebut banyak tersebar baik di darat maupun di laut.

Keanekaragaman makhluk hidup yang ada di Indonesia salah satunya adalah mikroorganisme, terdiri dari bakteri, virus, jamur dan protozoa. Salah satu jenis mikroorganisme yang melimpah di alam yaitu jamur. Menurut Hidayat *et al.*, (2016), bahwa jamur terbagi menjadi tiga yaitu *mushroom* (jamur berbadan buah besar), *molds* (jamur yang berbentuk benang), dan khamir (jamur bersel satu).

Khamir merupakan salah satu mikroorganisme yang banyak digunakan dalam dunia industri karena kemampuannya dalam memfermentasi substrat menjadi produk yang bermanfaat bagi manusia. Kemampuan tersebut banyak diaplikasikan dalam bidang pangan, kesehatan dan energi. Peran fermentasi dalam bidang pangan yaitu khamir *Saccharomyces cerevisiae* untuk pembuatan roti. Peran fermentasi dalam bidang kesehatan yaitu khamir mampu menjadi penghasil xylitol yang baik bagi industri farmasi karena xylitol dapat digunakan sebagai pengganti gula bagi penderita diabetes. Peran fermentasi dalam bidang energi yaitu kemampuan khamir dalam mengkonversi gula menjadi etanol sebagai sumber energi terbarukan. Hal ini didukung oleh pernyataan dari Rada dan Kaseie (2017), bahwa *Saccharomyces cerevisiae* menjadi bahan utama dalam pembuatan roti. Menurut Guo *et al.*, (2006), bahwa genus *Candida* merupakan jenis khamir penghasil xylitol yang terkenal untuk aplikasi industri. Menurut Testaw dan Assefa (2014), bahwa bahan bakar terbarukan yang paling umum

digunakan adalah etanol. Khamir *Saccharomyces cerevisiae* mampu menghasilkan etanol sebagai produk fermentasi utamanya.

Berdasarkan alasan tersebut, maka diperlukan adanya eksplorasi khamir fermentatif. Khamir fermentatif sering dimanfaatkan sebagai agen penghasil etanol dalam industri. Potensi khamir sebagai penghasil etanol di Indonesia sudah cukup banyak diteliti melalui pemanfaatan beberapa substrat alternatif. Namun, secara umum jenis khamir yang dipergunakan masih terbatas pada satu jenis yaitu *S. cerevisiae* atau ragi yang diperjualbelikan di pasar. Eksplorasi khamir fermentatif dilakukan dengan isolasi dan identifikasi. Isolasi khamir dilakukan dengan memisahkan mikroorganisme dari populasi mikroorganisme lainnya. Khamir fermentatif yang dapat diisolasi dari tanaman tebu mungkin tidak hanya *S. cerevisiae*. Oleh karena itu, melalui penelitian ini diharapkan dapat menambah khasanah pengetahuan masyarakat Indonesia terkait jenis-jenis khamir lokal (Sumerta *et al.*, 2017).

Identifikasi khamir berdasarkan sekuen *Internal Transcribed Spacer* (ITS). Sekuen ITS mengacu pada *spacer* yang merupakan sekuen target untuk dilakukannya identifikasi khamir secara molekuler. Berdasarkan uraian tersebut, pada penelitian ini akan melakukan isolasi dan identifikasi khamir fermentatif dari tanaman tebu secara molekuler.

2. Bahan dan Metode

2.1. Isolasi Khamir

Isolasi dari Jus Batang Tebu/Endofit. Tahap awal dalam isolasi khamir dari jus batang tebu adalah sterilisasi permukaan. Sterilisasi permukaan dilakukan dengan cara batang tanaman tebu hijau yang sehat dan tua yang berukuran 50 cm serta berumur kurang lebih 8 bulan yang dibeli dari pedagang tebu di Desa Pelang Kecamatan Mayong Kabupaten Jepara. Batang tebu dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan tanah liat terlarut. Batang tebu selanjutnya direndam dalam etanol 70% dalam 3 menit, dicuci dengan larutan sodium hipoklorit segar selama 5 menit, dibilas

dengan etanol 70% selama 30 detik dan akhirnya dicuci lima kali dengan aquades steril. Batang tebu selanjutnya dikeringkan di atas tissue steril (Tam *et al.*, 2014). Tahap selanjutnya adalah pembuatan perlakuan kontrol negatif. Kontrol negatif bertujuan sebagai parameter keberhasilan proses sterilisasi permukaan. Keberhasilan sterilisasi permukaan ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan mikroorganisme pada media kontrol. Perlakuan kontrol negatif dilakukan dengan cara mengisolasi khamir dari aquades bilasan terakhir hasil tahap sterilisasi permukaan. Aquades tersebut kemudian diambil sebanyak 50µl dan diisolasi ke media PDA/YGP pada cawan petri. Media selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam (Intan *et al.*, 2014).

Langkah berikutnya adalah pembuatan jus batang tebu. Batang tebu sebanyak 150 gram dikupas dan diiris dengan pisau steril, kemudian diblender dengan 200 ml air. Larutan tebu tersebut selanjutnya disaring menggunakan penyaring steril ke dalam botol steril dalam kondisi aseptik. Sampel larutan batang tebu kemudian disimpan selama 48 jam pada suhu kamar (Obasi *et al.*, 2014).

Jus tebu yang sudah tersedia selanjutnya digunakan untuk isolasi khamir. Jus tebu yang telah disimpan selama 48 jam, diambil 1 ml dilakukan seri pengenceran hingga 10^{-5} dan 10^{-6} menggunakan aquades steril. Isolasi khamir dilakukan dengan mengambil sebanyak 0,5ml larutan dari pengenceran tersebut dan dilakukan dengan metode *spread plate* pada media PDA/YGP dalam keadaan aseptis. Media PDA/YGP telah ditambah kloramfenikol untuk mencegah tumbuhnya bakteri. Media tersebut lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam, kemudian isolat yang terpisah (koloni tunggal), dimurnikan dengan cara distreak kembali pada media agar miring di tabung reaksi (Okwulehie *et al.*, 2010).

Isolasi dari Air Rendaman Batang tebu/Epifit. Isolasi khamir epifit dilakukan dari batang tebu yang sehat dan tua dengan umur kurang lebih 8 bulan, kemudian batang tebu dengan kondisi tanpa dikupas kulitnya dipotong kecil-kecil menggunakan pisau steril. Potongan batang tebu sebanyak 15 gram dimasukkan ke dalam 150 ml aquades steril, kemudian digojok menggunakan *rotary shaker*

dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Air rendaman tebu selanjutnya diencerkan hingga pengenceran 10^{-5} dan 10^{-6} lalu diambil suspensi sebanyak 0,5 ml dan diinokulasikan pada media PDA/YGP dengan metode *spread plate*. Media PDA/YGP telah ditambah dengan kloramfenikol untuk mencegah tumbuhnya bakteri Khamir yang tumbuh kemudian dimurnikan dengan cara digoreskan pada media PDA/YGP miring dan diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam untuk selanjutnya diidentifikasi (Intan *et al.*, 2014).

2.2. Karakterisasi Morfologi dan biokimia

Isolat sebanyak 1 ose ditambahkan dengan 1 tetes *Methylen blue* dan diamati dibawah mikroskop perbesaran 1000x (Widiastutik *et al.*, 2014). Karakterisasi biokimia yang dilakukan pada penelitian ini adalah uji fermentasi karbohidrat dan uji pertumbuhan konsentrasi glukosa 50%.

Uji Fermentasi Karbohidrat. Uji fermentasi dilakukan pada tabung durham. Gula yang digunakan adalah glukosa, sukrosa, dan laktosa. Media untuk uji fermentasi karbohidrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5ml. Isolat khamir sebanyak 1 ose dari media padat yang telah berumur 48 jam diambil lalu diinokulasikan ke dalam media uji fermentasi. Setelah itu dilakukan inkubasi selama 7 hari pada suhu ruang $\pm 28^{\circ}\text{C}$ (Sari *et al.*, 2016). Khamir yang melakukan fermentasi dapat menghasilkan gelembung, dinyatakan tanda (+). Apabila tidak menghasilkan gelembung, maka khamir dinilai tidak menghasilkan fermentasi dinyatakan tanda (-) (Rahmansyah dan Kanti, 1999). Uji fermentasi yang positif ditandai dengan terjadinya perubahan warna media menjadi kekuningan (Widiastutik *et al.*, 2014).

Uji Pertumbuhan konsentrasi glukosa 50%. Uji ini bertujuan untuk menguji khamir tersebut bersifat toleran terhadap tekanan osmosis tinggi (osmotoleran). Kultur isolat khamir umur 48 jam diinokulasikan pada media pertumbuhan yang mengandung 50% glukosa dengan cara goresan di dalam cawan petri, diinkubasikan pada suhu kamar selama 72 jam dan diamati untuk pertumbuhan (Jimoh *et al.*, 2012).

2.3. Identifikasi molekuler

Isolasi DNA khamir dengan metode *cheleating ion exchange (chelex)*. Metode ini dilakukan dengan cara, 3 ose kultur khamir umur 48 jam diinokulasikan kedalam tube yang telah diberi 100 μ L ddH₂O, kemudian ditambahkan saponin 0,5% dalam *phosphat buffer saline* (PBS) sebanyak 1 mL. Sampel diinkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam (*overnight*). Sampel selanjutnya disentrifuge pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Tahapan sentrifuge akan menyebabkan terbentuknya lapisan natan dan supernatan. Lapisan supernatan kemudian dibuang dengan mikropipet untuk menghilangkan saponin tanpa merusak pelet. Proses ini dilakukan dengan hati-hati dan dipastikan pelet DNA masih melekat pada dasar tabung. Langkah selanjutnya yaitu dengan menambahkan PBS 1x sebanyak 1 ml pada sampel. Sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang terbentuk di bagian atas dibuang dengan menggunakan mikropipet. Sampel kemudian ditambahkan ddH₂O sebanyak 100 μ L dan 20 % larutan Chelex sebanyak 50 μ L. Sampel kemudian dididihkan pada air mendidih selama 5 menit, lalu dihomogenkan dengan vortex sekitar 15-30 detik. Sampel lalu dididihkan kembali selama 5 menit, dan dihomogenkan dengan vortex lagi sekitar 15-30 detik. Langkah terakhir yaitu sampel disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan (cairan yang terdapat pada bagian atas) diambil dengan menggunakan mikropipet dan dipisahkan dari pelet (endapan). Supernatan yang mengandung genom DNA kemudian dipindahkan pada mikrotube bersih. Sampel kemudian langsung digunakan untuk proses amplifikasi DNA dan elektroforesis (Santoso *et al.*, 2015).

Pengecekan konsentrasi dan kemurnian DNA menggunakan *Nanodrop*. Konsentrasi dan kemurnian sampel DNA diperiksa menggunakan *Nanodrop 2000* sebanyak 1 μ L (Purnamasari *et al.*, 2012). Sampel DNA dicek kemurnian dan konsentrasinya pada rasio panjang gelombang 260/280 ~ 1,8 untuk DNA dan rasio 260/280 ~ 2,0 untuk RNA (Desjardins dan Conklin, 2010).

Amplifikasi DNA. Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) digunakan untuk amplifikasi DNA khamir. Amplifikasi daerah ITS rDNA dilakukan dengan

pembuatan PCR mix dengan volume 50 μ L yang terdiri dari promega 25 μ L, ddH₂O 12 μ L, Primer *forward* (ITS1) dengan konsentrasi 10 pmol/ μ L sebanyak 4 μ L, Primer *reverse* (ITS4) dengan konsentrasi 10 pmol/ μ L sebanyak 4 μ L, dan sample sebanyak 5 μ L. Amplifikasi DNA dilakukan sebanyak 35 siklus dengan tahapan yaitu pre denaturasi (94°C, 1 menit), denaturasi (94°C, 15 detik), *annealing* (55°C, 15 detik), *Extension* (72°C, 10 detik), *post extension* (72°C, 5 menit) dengan suhu 4°C. Primer yang digunakan pada penelitian ini adalah primer ITS 1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCGG 3') dan ITS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TATGC 3').

Elektroforesis. Proses PCR yang telah selesai selanjutnya dilakukan elektroforesis untuk mengetahui panjang pita DNA target yang diinginkan. Elektroforesis dilakukan dengan cara gel agarosa 1% yang terdiri dari 0,3 gram agarosa dilarutkan dalam 30 ml buffer TBE 1X. Komponen elektroforesis yang digunakan meliputi 5 μ L produk PCR dan 3 μ L *ladder marker* 100bp dimasukkan ke dalam sumuran *gel agarose* 1% yang telah direndam larutan buffer TBE 1x.

Elektroforesis kemudian dilakukan dengan tegangan 100 volt selama 30 menit. DNA akan bermigrasi dari kutub negatif ke kutub positif. Gel selanjutnya direndam dalam EtBr selama 15 menit dan dibilas dengan aquades steril selama 3 menit. Gel kemudian diambil dan dimasukkan dalam *Gel doc*. Hasil *band-band* DNA akan terlihat berpendar pada layar *gel documentation*.

Analisis Sequencing. Produk PCR disekuensing untuk mengetahui jumlah dan urutan basanya melalui jasa PT. Genetika Science Indonesia (Sandy *et al.*, 2015).

Pohon Filogenetik. Pembuatan pohon filogenetik dilakukan menggunakan *software* MEGA 6. Pohon filogenetik direkonstruksi menggunakan *Neighbour joining* dan diuji dengan menggunakan *Bootstrap method* (Sumerta *et al.*, 2017).

2. Hasil dan Pembahasan

Hasil isolasi khamir diperoleh 7 isolat yaitu, isolat Ep 1A, Ep 1B, Ep 2B, Ep 3B, Ed 1A, Ed 2A, dan Ed 1B. Berdasarkan kedua karakterisasi biokimia, didapatkan satu isolat terpilih yaitu Ed 1B. Isolat Ed 1B dipilih

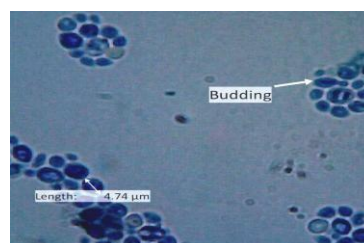
karena mampu menghasilkan gelembung dan perubahan warna paling cepat pada uji fermentasi karbohidrat, serta tumbuh cepat pada media glukosa 50%. Isolat Ed 1B memiliki morfologi makroskopik yaitu bentuk koloni bulat, warna koloni putih krem, elevasi koloni timbul, dan tepian koloni bergelombang. Morfologi mikroskopik diantaranya memiliki bentuk sel ovoid, *budding* dan memiliki diameter sel 4,74 μm . Menurut Kurtzman dan Fell (2011), bahwa mayoritas khamir berwarna dari putih hingga krem. Permukaan koloni khamir di antaranya yaitu berkilau atau kusam, halus, kasar, sektor, terlipat, bergerigi, atau berbulu. Elevasi koloni khamir diantaranya yaitu datar, tertekan di tengah, menonjol dan seperti kubah, atau berbentuk kerucut. Tepian koloni khamir di antaranya yaitu bergelombang, melengkung, *erose*, atau dibatasi oleh hifa. Reproduksi aseksual yang terjadi pada khamir di antaranya yaitu *budding* (tunas), fusi dan produksi ballistoconidia. Sel khamir dapat berbentuk bulat, *subglobose*, *ellipsoid*, *ovoid*, *obovoid*, *silindris*, *botuliform*, *bacilliform*, *elongate*, *apiculate*, *ogival*, *luning*, atau segitiga. Menurut Afshan *et al.*, (2017), bahwa ukuran khamir berdiameter 3-4 μm . Karakteristik makroskopik dan mikroskopik isolat Ed 1B ditunjukkan pada tabel 1

Tabel 1. Hasil pengamatan makroskopik dan mikroskopik isolat Ed 1B

Karakteristik	Morfologi	
	Koloni	Sel
Bentuk Koloni	Bulat	-
Warna koloni	Putih krem	-
Elevasi koloni	Timbul	-
Permukaan koloni	Mengkilap	-
Tepian koloni	Bergelombang	-
Bentuk Sel	-	Ovoid
Reproduksi aseksual	-	<i>Budding</i>
Ukuran sel	-	4,74 μm

Pengamatan mikroskopik dilakukan dengan perbesaran mikroskop 1000x

menggunakan bantuan pewarna *methylene blue*. Sel khamir hidup dapat berwarna transparan karena *methylene blue* tidak dapat menembus membran sel, sedangkan sel khamir yang mati berwarna biru karena *methylene blue* dapat menembus membran sel. Menurut Boyd *et al.*, (2003), bahwa sel hidup mampu mereduksi pewarna, sehingga hanya sel mati yang berwarna biru. Morfologi isolat Ed 1B ditunjukkan gambar 1



Gambar 1. Morfologi sel Ed 1B (4,74 μm) perbesaran 1000x menggunakan pewarna *Methylen Blue*

Isolat yang telah diketahui karakter morfologinya, selanjutnya dikarakterisasi melalui uji biokimia untuk mengetahui kemampuan khamir dalam memfermentasi karbohidrat dan tumbuh pada tekanan osmotik yang tinggi. Karakterisasi biokimia menggunakan uji fermentasi karbohidrat dan uji pertumbuhan pada media glukosa 50%. Hasil karakterisasi biokimia pada isolat Ed 1B ditunjukkan pada tabel 2.

Berdasarkan hasil uji fermentasi karbohidrat, isolat Ed 1B menunjukkan perubahan warna dan adanya gelembung pada media glukosa dan sukrosa saat umur biakan 1-7 hari. Perubahan warna tersebut terjadi saat warna media merah yang berubah menjadi warna kuning dan munculnya gelembung pada tabung durham. Tetapi, perubahan tersebut tidak berlaku pada media yang mengandung laktosa. Media yang mengandung laktosa tidak menunjukkan perubahan warna dan tidak menghasilkan gelembung. Hal ini disebabkan khamir tersebut tidak mampu memfermentasi laktosa, namun mampu fermentasi glukosa dan sukrosa. Ketujuh isolat khamir menunjukkan kemampuan *strongly positive* karena mampu memfermentasi glukosa dan sukrosa selama 7 hari. Menurut Talaro (2012), bahwa munculnya gas dalam tabung durham terjadi

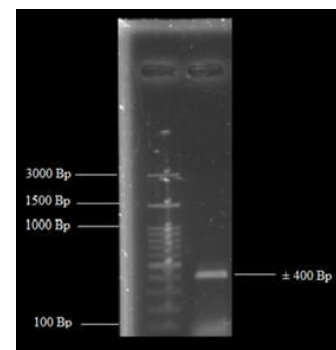
karena adanya proses fermentasi gula menjadi ethanol dan CO₂. Menurut Bhowmik (2011), bahwa jika karbohidrat tertentu (glukosa dan sukrosa) mampu difermentasi oleh aktifitas khamir, dan produk akhirnya yaitu dihasilkannya asam maka menyebabkan indikator *phenol red* berubah warna dari merah menjadi kuning. Jika gas diproduksi bersamaan dengan asam, maka terdapat gelembung pada tabung durham. Jika karbohidrat tidak terfermentasi, maka tidak mampu menghasilkan asam dan gas sehingga *phenol red* tetap berwarna merah. Menurut Giri *et al.*, (2015), bahwa produksi gas dalam tabung itu dianggap sebagai hasil positif dalam memfermentasi gula sementara jika hanya produksi asam dianggap sebagai kemampuan dalam asimilasi karbohidrat. Menurut Kurtzman dan Fell (2011), jika dihasilkannya gas pada tabung durham selama 7 hari, maka reaksi tersebut dianggap sebagai reaksi *strongly positive*.

Uji biokimia juga dilakukan dengan uji pertumbuhan pada media *Yeast Glucose Pepton* (YGP) dengan kadar glukosa 50%. Uji ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan khamir untuk hidup dan tumbuh pada media dengan kadar gula yang tinggi. Berdasarkan pengamatan selama 3 hari pada suhu ruang, dapat disimpulkan bahwa isolat mampu hidup dan tumbuh pada media dengan kadar glukosa 50%. Menurut Lasmini (2016), bahwa khamir yang mampu hidup pada media glukosa 50% tersebut bersifat toleran terhadap tekanan osmosis tinggi (osmotoleran). Menurut Bubnova *et al.*, (2014), bahwa osmotoleran adalah kemampuan untuk bertahan hidup pada lingkungan dengan tekanan osmotik tinggi.

Identifikasi molekuler pada isolat Ed 1B diawali dengan melakukan ekstraksi DNA dengan metode *chelex*. Kemurnian dan konsentrasi DNA pada isolat Ed 1B diukur dengan menggunakan *nanodrop 2000* pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm, sehingga didapatkan hasil bahwa konsentrasinya sebesar 182,7 ng/μl dan kemurniannya sebesar 1,70. Menurut Isci *et al.*, (2012), bahwa nilai kemurnian DNA berkisar pada 1,8-2,0. Jika rasio lebih dari 2,0 menunjukkan adanya kontaminasi RNA, namun bila rasio dibawah 1,8 menunjukkan adanya kontaminasi protein. Menurut Hikmatyar *et al.*, (2015), bahwa DNA

berkualitas baik berdasarkan uji nanodrop memiliki konsentrasi di atas 100 ng/μL.

Primer yang digunakan adalah primer universal yaitu ITS 1 dan ITS 4. Amplifikasi DNA dilakukan dengan PCR sebanyak 35 siklus. Hasil PCR dianalisis menggunakan gel agarosa 1 % dan *ladder marker* 100Bp. Hasil elektroforesis divisualisasikan dengan menggunakan *gel documentation*. Hasil elektroforesis ditunjukkan pada gambar 2.



Gambar 2. Hasil amplifikasi daerah ITS isolat Ed 1B dengan konsentrasi gel agarose 1% dan Marker 100bp. Keterangan: 100bp: Marker 100bp, 1: Isolat Ed 1B

Panjang pita DNA isolat Ed 1B adalah 383 Bp. Berdasarkan panjang pita tersebut, maka dapat diketahui bahwa isolat Ed 1B merupakan khamir karena memiliki panjang pita DNA >380 Bp. Menurut Korabecna *et al.*, (2003), bahwa hasil amplifikasi fragmen daerah ITS khamir menggunakan primer ITS1 dan ITS4 memiliki ukuran sekitar 380 hingga 900 Bp. Hasil *sequencing* digabungkan melalui analisis *contig* dengan melihat *chromatographic*. Hasil *contig* pada program MEGA 6 ditunjukkan gambar 3.

```
TGATCCTCCGTAGGGTGAACCTGCGGAAGGAT
CATTAACATAATATTCTTACACACTGTTTTTTA
CAACAAAACAAATCTATCTAAAAACAATCTTT
ACAAGAAATTCTTAAACCTTCAACAACGGATC
TCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
AATGCGATACGTAATACGAATCGCAGCTCTCGG
AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCAT
TGGGTATTCCCAATGGTATGCTTGTGTTGAGCGA
ATACTTCCCTAATCCTCACGGATTGTATTGTGT
TGCACGAAAATAATGACGACAGTACTCTACAAA
ACGGTACCGTCAGTACACTCATTTTTTTCTCTCA
AATCAAGTAGGACTACCCGCTGAACCTAAGCAT
ATCAATAAGCCGGAGGAAA
```

Gambar 3. Urutan nukleotida hasil *contig forward ITS1* dan *reverse ITS4*

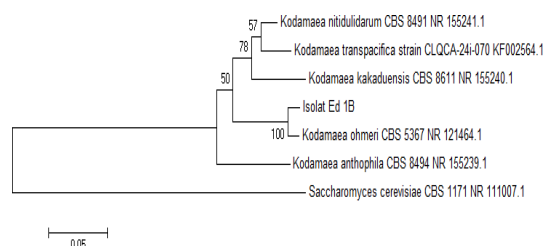
Hasil *sequencing* yang sudah diketahui urutan nukleotidanya kemudian dianalisis dengan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Analisis BLAST bertujuan untuk mengetahui tingkat homologi spesies pada isolat Ed 1B. Menurut Haddad *et al.*, (2014), bahwa urutan asam nukleat dari gen 18S rDNA dibandingkan dengan yang tersedia dalam database GenBank menggunakan BLAST untuk mencari sekuens terkait. Semua *sequence* yang berhubungan dibandingkan hingga kesamaan atau kemiripan *sequence* yang tinggi. Hasil BLAST ditunjukkan tabel 3.

Tabel 3. Hasil analisis homologi BLAST

De scription	ax score	otal score	uery Cover	value	dent
<i>Kodamaea ohmeri</i> CBS 5367	17	17	00%	.0	9%
<i>Kodamaea nitidulidarum</i> CBS 8491	68	68	00%	e-129	8%
<i>Kodamaea kakaduensis</i> CBS 8611	60	60	00%	e-127	7%
<i>Kodamaea transpacific strain</i> CLQCA-24i-070	42	42	6%	e-121	8%
<i>Kodamaea anthophila</i> CBS 8494	29	29	00%	e-117	6%

Sequence from type material digunakan dalam taksonomi karena mempunyai tingkat kepercayaan yang tinggi. Isolat Ed 1B memiliki kesamaan *sequence* hingga 99% dengan species *Kodamaea ohmeri*. Hal ini menunjukkan bahwa isolat Ed 1B merupakan anggota dari spesies *Kodamaea ohmeri*. Menurut Federhen (2014), bahwa *Sequence from type material* adalah bagian penting dari GenBank yang mana dapat memiliki tingkat kepercayaan yang sangat

tinggi dalam identifikasi taksonomi. Menurut Stamps *et al.*, (2012), bahwa *sequence* dibandingkan dengan database publik menggunakan *software* (perangkat lunak) nukleotida yaitu *software* BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Strain khamir dengan *sequence Identity* 99% atau lebih tinggi dari itu, maka dianggap sebagai spesies yang sama. Pohon filogenetik isolat Ed 1B dengan *Neighbor-joining* ditunjukkan ditunjukkan pada gambar 4.



Gambar 4. Pohon filogenetik dengan menggunakan *Neighbor-joining* dengan uji *bootstrap* 1000.

Isolat Ed 1B memiliki nilai bootstrap 100 dengan species *Kodamaea ohmeri* CBS 5367. Hal ini menunjukkan bahwa isolat Ed 1B memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat dengan *Kodamaea ohmeri* CBS 5367. Nilai bootstrap 100 menunjukkan bahwa dalam 1000 kali ulangan, terbentuk 1000 pohon yang sama. Menurut Dharmayanti (2011), bahwa analisis bootstrap adalah metode yang menguji seberapa baik set data model. Nilai bootstrap ditunjukkan pada angka yang terletak pada cabang-cabang pohon filogenetika. Jika nilai bootstrap rendah maka sekuens seharusnya dikeluarkan dari analisis untuk mendapatkan sebuah pohon filogenetika yang dapat dipercaya. Menurut Lamey (2009), bahwa cabang kelompok yang didukung lebih dari 70% atau 75%, maka dapat dipercaya.

Isolat khamir Ed 1B memiliki kemiripan dengan species *Kodamaea ohmeri* terletak pada morfologi isolat dan fisiologisnya pada uji biokimia. *Kodamaea ohmeri* merupakan nama lain dari *Pichia ohmeri*. Menurut Sharma *et al.*, (2018) Genus *Kodamaea* sebelumnya ditempatkan di bawah genus *Pichia* tetapi kemudian dipisahkan karena pertimbangan jarak genetiknya berdasarkan sekuens RNA ribosomal 18S dan

26S dan hanya tujuh spesies yang ditempatkan di bawah genus *Kodamaea* termasuk *K. anthophila*, *K. kakaduensis*, *K. ohmeri*, *K. laetipori*, *K. nitidulidarum*, *K. transpacificae*, *K. Meredithae*. Menurut Yamada *et al.*, (1995), bahwa *Kodamaea ohmeri* secara filogenetis dipisahkan dari genus *Pichia*. Berdasarkan data sekuens dan karakteristik fenotipik maka diusulkan genus baru yaitu *Kodamea*. Nama genus *Kodamaea* digunakan untuk menghormati Dr. Kenkichi Kodama dengan studinya tentang sistematika khamir pada genus *Pichia* dan genus terkait lainnya. Perbandingan morfologi dan biokimia dari isolat Ed 1B dengan spesies *Kodamaea ohmeri* (*Pichia ohmeri*) ditunjukkan tabel 4.

Tabel 4. Perbandingan morfologi dan biokimia Isolat Ed 1B dengan *Kodamaea ohmeri* (*Pichia Ohmeri*)

Karakter	Isolat Ed 1B	Kemiripan dengan <i>Kodamaea ohmeri</i> (<i>Pichia ohmeri</i>)
Bentuk koloni	Bulat	Bulat (Sharma <i>et al.</i> , 2018)
Warna koloni	Putih krem	Putih (Kurtzman dan Fell, 1998)
Elevasi koloni	/Timbul	Timbul (Sharma <i>et al.</i> , 2018)
Permukaan koloni	Mengkilap	Buram (Sharma <i>et al.</i> , 2018)
Tepian koloni	Bergelombang	Regular (Sharma <i>et al.</i> , 2018)
Bentuk sel	Ovoid	Ovoid (Sharma <i>et al.</i> , 2018)
Diameter sel	4,47 µm	-
Reproduksi aseksual	Budding	Budding (Sharma <i>et al.</i> , 2018)
Fermentasi glukosa	+	+ (Kurtzman dan Fell, 1998)
Fermentasi sukrosa	+	+ (Kurtzman dan Fell, 1998)
Fermentasi laktosa	-	-
Pertumbuhan pada konsentrasi glukosa 50%	+	+ (Mycobank, 2018)

Isolat khamir Ed 1B merupakan isolat khamir endofit yang berasal dari jus batang tanaman tebu yang telah difermentasi. Isolat ini mampu hidup di kadar gula tinggi seperti jus tebu. Jus tebu yang telah difermentasi merupakan salah satu sumber terbaik untuk mengisolasi khamir. Menurut Obasi *et al.*, (2017), bahwa populasi khamir dalam produk melibatkan berbagai proses biokimia yang dilakukan oleh khamir untuk memanfaatkan gula sederhana yang ada dalam produk

pertanian. Ada sumber yang berbeda untuk isolasi spesies khamir yang sebagian besar dari makanan asam. Di antaranya adalah jus jeruk dan jus tebu yang dianggap sebagai sumber terbaik. Menurut Tikka *et al.*, (2013), bahwa khamir pada umumnya terdapat pada sampel yang kaya dengan gula seperti daun, bunga, buah manis, eksudat pohon, dan biji-bijian.

Penemuan spesies *Kodamaea ohmeri* telah didukung oleh penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa spesies *Kodamaea ohmeri* dapat diisolasi dari beberapa buah dan jus buah yang telah difermentasi diantaranya adalah buah pisang, buah jeruk terfermentasi, coklat terfermentasi dan kopi terfermentasi. Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Gana *et al.*, (2014), bahwa khamir yang diisolasi dari permukaan buah pisang salah satunya adalah *Kodamaea ohmeri*. Menurut Masoud *et al.*, (2004), bahwa *Pichia ohmeri* merupakan salah satu khamir dari hasil fermentasi kopi. Menurut Obasi *et al.*, (2014), bahwa *Kodamaea ohmeri* adalah spesies yang diisolasi dari hasil fermentasi jus jeruk yang sehat. Menurut Koffi *et al.* (2017), bahwa terdapat 11 species yang telah diidentifikasi dari fermentasi coklat, diantaranya yaitu *Kodamaea ohmeri*.

Studi ini membuktikan bahwa spesies *Kodamaea ohmeri* telah ditemukan pada jus tebu terfermentasi. Hal ini berbeda dengan penelitian referensi sebelumnya yaitu spesies khamir yang ditemukan dari isolasi jus tebu adalah *Saccharomyces cerevisiae* dan *Saccharomyces rouxii*. Perbedaan ini bisa disebabkan oleh beberapa hal yaitu cara isolasi, media isolasi, dan tebu yang digunakan. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Khattab *et al.*, (2016), bahwa spesies yang ditemukan dari jus tebu adalah *Saccharomyces cerevisiae*. Menurut Rashid *et al.*, (2013), bahwa spesies *Saccharomyces cerevisiae* dan *Saccharomyces rouxii* telah berhasil diisolasi dari jus tebu terfermentasi.

Spesies *Kodamaea ohmeri* diketahui mampu memfermentasi glukosa dan sukrosa, sehingga spesies ini termasuk dalam jenis khamir fermentatif. Semua khamir fermentatif mampu menghasilkan etanol atau alkohol dengan kadar yang bervariasi bergantung pada spesiesnya. Menurut Periadnadi *et al.*, (2018), bahwa khamir yang bersifat fermentatif,

sebanyak 70% dari glukosa di dalam substrat akan diubah menjadi karbondioksida dan alkohol, sedangkan sisanya 30% tanpa adanya nitrogen akan diubah menjadi produk simpanan sebagai cadangan yang akan digunakan kembali melalui fermentasi jika glukosa di dalam medium sudah habis.

Beberapa studi menyatakan bahwa *Kodamaea ohmeri* memiliki potensi dalam menghasilkan etanol atau alkohol. Menurut Sumerta dan Kanti (2017), bahwa etanol yang dihasilkan oleh *Kodamaea ohmeri* pada media dengan kadar glukosa 10% selama masa inkubasi 72 jam sebesar 0,61% (V/V). Menurut Takrama et al., (2015), bahwa persentase alkohol yang diproduksi oleh *Kodamaea ohmeri* diantaranya yaitu 80% alkohol dari liter pertama awal distilasi (*First Liter Distillate*) dan 47% alkohol setelah fermentasi selesai (*Bulked distillate*).

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa telah ditemukan isolat khamir yang berhasil diisolasi dari batang tanaman tebu. Identifikasi secara molekuler menunjukkan bahwa isolat Ed 1B merupakan spesies dari *Kodamaea ohmeri* atau *Pichia ohmeri*.

Daftar Pustaka

- Afshan, N., Jan, M., Hamid, M., Nawaz, B., Jabeen, D., Ashraf, A., Alam, S. 2017 Isolation and Characterization of Indigenous Yeast Species from Yoghurt and Sugarcane Juice for Production of Bio-ethanol. *PSM Microbiology* 2(1): 9-14
- Bhowmik, G. 2011. *Ana Techniqs in Biotechnology*. Tata McGraw Hill Education Private Limited, New Delhi : 92 – 93
- Boyd, A. R., Gunasekera, T. S., Attfield, P. V., Simic, K., Vincent, S. F., Veal, D. A. 2003. A Flow-Cytometric Method For Determination Of Yeast Viability And Cell Number In A Brewery. *FEMS Yeast Research* 3
- Bubnová, M., Zemančíková, J., And Sychrová, H. 2014. Osmotolerant Yeast Species Differ In Basic Physiological Parameters And In Tolerance Of Non-Osmotic Stresses. *Yeast* 31: 309–321.
- Dharmayanti, N. L. P. I. 2011. Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *Wartazoa* 21(1)
- Desjardins, P., Conklin, D. 2010. NanoDrop Microvolume Quantitation Of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments and Thermo Fisher Scientific*
- Federhen, S. 2015. Type material in the NCBI Taxonomy Database. *Nucleic Acids Research*.
- Gana, N. H. T., Mendoza, B. C., And Monsalud, R. G. 2014. Isolation, Screening and Characterization of Yeasts with Amyloytic, Lipolytic, and Proteolytic Activities from the Surface of Philippine Bananas (*Musa spp.*). *Philippine Journal of Science* 143 (1): 81-87
- Giri, S., Kindo, M. J. 2015. Evaluation Of Five Phenotypic Tests In The Identification Of *Candida* Species. *National Journal Of Laboratory Medicine* 4(4): 13-18
- Guo, C., Zhao, C., He, P., Lu, D., Shen, A and Jiang, N. 2006. Screening and characterization of yeasts for xylitol production. *Journal of Applied Microbiology*
- Haddad, R., Alemzadeh, E., Ahmadi, A. R., Hosseini, R., Moezzi, M. 2017. Identification of Chlorophyceae based on 18S rDNA sequences from Persian Gulf. *Iran. J Microbiol* 6(6): 437-442
- Hidayat, N., Wignyanto, Sumarsih, S., Putri, A. I. 2016. *Mikologi Industri*. UB Press, Surabaya
- Hikmatyar, M. F., Royani, J. I., Dasumiati. 2015. Isolasi Dan Amplifikasi DNA Keladi Tikus (*Thyponium Flagelliform*) Untuk Identifikasi Keragaman Genetik. *J Biotechnol Bios Indon* 2(2): 42-48
- Intan, R.M.T., Cholil, A., Sulistyowati, L. 2014. Potensi Antagonis Jamur Endofit dan Khamir Pada Tanaman Pisang (*Musa accumunata*) Terhadap Jamur *Mycosphaerella musicola* Penyebab Penyakit Bercak Kuning Sigatoka. *Jurnal HPT* 2(4)
- Isci, B., Yildirim, H. K., Altindisli, A. 2014. Evaluation of Methods for DNA

- Extraction from Must and Wine. *J Inst Brew* 120: 238–243
- Jimoh, S.O., Ado, S. A., Ameh, J. B., Whong, C. M. 2012. Osmotolerance and Fermentative Pattern of Brewer's Yeast. *World J Life Sci. and Medical Research* 2(2): 59
- Khattab, S. M. R., Hadi, A. M. A., Dahab, N. F. A., Atta, O. M. 2016. Isolation, Characterization, and Identification of Yeasts Associated with Foods from Assiut City, Egypt. *BMRJ* 13(1): 1-10
- Koffi, O., Samagaci, L., Goualie, B., Niamke, S. 2017. Diversity of Yeasts Involved in Cocoa Fermentation of Six Major Cocoa-Producing Regions in Ivory Coast. *European Scientific Journal* 13(30)
- 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. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*
- Kurtzman, C.P., and Fell. 2011. *The Yeast A Taxonomy Study. Biodiversity and Ecophysiology of Yeast*. Springer-verlag, Berlin
- Lamey, P., Selemi, M., and Vandamme, A. M. 2009. *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Cambridge University Press, UK.
- Lasmini, T. 2016. Isolasi Dan Identifikasi Khamir Penghasil Asam Indol Asetat Dari Rhizosfer Anggrek Tanah Pecteilis Susannae (L.) Rafin. *Jurnal Ipteks Terapan*
- Masoud, W., Cesar, L. B., Jespersen, L., And Jakobsen, M. 2004. Yeast involved in fermentation of Coffea arabica in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast* 21: 549–556
- Mycobank. 2018. *Kodamaea ohmeri*. <http://www.mycobank.org/BioloMICS>. 31 Agustus 2018
- Obasi, B. C., Whong, C. M. Z., Ado, S. A., and Abdullahi, I. O. 2017. Leavening Ability Of Some Wild Yeasts And The Mutant Species Isolated From Fermented Orange Juice In Bakery Product (Bread). *FUW Trends In Science & Technology Journal* 2(1)
- Obasi, B.C., Whong, C. M. Z., Ado, S. A., and Abdullahi, I.O. 2014. Isolation and Identification Of Yeast Associated With Fermented Orange Juice. *The International Journal Of Engineering And Science (IJES)* 3 (9): 64-69
- Okwulehie, Cyriacus, I., Alfred, Kingsley, N. 2010. Fungi Associated With Deterioration Of Sour-Sop (*Anona muricata*. linn) Fruits In Abia State, Nigeria. *African Journal Of Microbiology Research* 4 (3): 143-146
- Periadnadi., Sari, D. K., Nurmianti. 2018. Isolasi dan Keberadaan Khamir Potensial Pemfermentasi Nira Aren (*Arenga Pinnata* Merr.) dari Dataran Rendah dan Dataran Tinggi di Sumatera Barat. *Bioeksperimen* 4(1) : 29-36
- Purnamasari, M. I., Prihatna, C., Gunawan, A.W., dan Suwanto, A. 2012. Isolasi dan Identifikasi Secara Molekuler *Ganoderma* spp. yang Berasosiasi dengan Penyakit Busuk Pangkal Batang di Kelapa Sawit. *Jurnal Fitopatologi Indonesia* 8(1)
- Rada, A. H., dan Kasaie, Z. 2017. A Comparative Study On Different Methods For The Evaluation Of Baker's Yeast Bioactivity. *International Journal Of Food Properties* 20(1): 100–106
- Rahmansyah, dan Kanti, A. 1999. Isolat-Isolat Khamir dari Minuman Tradisional Laru Di NTT. *Berita Biologi* 4(5)
- Rashid, A. N. M. M. O., Dash, B. K., Chowdhury, N. A. 2013. Exploration of Potential Baker's Yeast From Sugarcane Juice: Optimation and Evaluation. *Pakistan Journal Of Biological Sciences*. 16(13): 617-623
- Sandy, Y.A., Djauhari, S., Sektiono, A. W. 2015. Identifikasi Molekuler Jamur Antagonis *Trichoderma harzianum* Diisolasi dari Tanah Pertanian di Malang Jawa Timur. *Jurnal HPT* 3(3).
- Santoso, Yahya, Suryaningtyas, N. H., Rahayu, K. S. 2015. Deteksi mikrofilaria *Brugia malayi* pada nyamuk *Mansonia* spp dengan pembedahan dan metode PCR di Kabupaten Tanjung Jabung Timur. *Aspirator* 7(1):29-35
- Sari, R.M.T., Saputro, T. B., Muhibuddin, A. 2016. Uji Potensi Fermentasi Etanol Yeast Tanah yang Diisolasi dari Metode Budidaya Sdn di Daerah Batu Jawa

- Timur. *Jurnal Sains dan Seni ITS* 5(2): 2337-3520
- Sharma, S., Arora, A., Sharma, P., Singh, S., Nain, L., And Paul, D. 2018. Notable Mixed Substrate Fermentation By Native *Kodamaea ohmeri* Strains Isolated From *Lagenaria siceraria* Flowers And Ethanol Production On Paddy Straw Hydrolysates. *Chemistry Central Journal* 12:8
- Stamps, J. A., Yang, L. H., Morales, V. M., Mills, K. L. B. 2012. *Drosophila* Regulate Yeast Density and Increase Yeast Community Similarity in a Natural Substrate. *Plos One* 7 (7)
- Sumerta, I.N., Kanti, A. 2017. Keragaman Jenis Khamir Penghasil Etanol yang Diisolasi dari Makanan Fermentasi di Kepulauan Riau. *Jurnal Biologi Indonesia* 13(1): 61-69
- Takrama, J. F., Kumi, W. O., Otoo, G., Addo, K., and Camu, N. 2015 Optimization of Cocoa Pulp Juice Fermentation with Yeast Starter Cultures of Cocoa Heap Fermentations. *Journal of Agricultural Science and Food Technology* 1 (3): 22-33
- Talaro, K. P., dan Barry, C. 2012. *Foundations In Microbiology*. MC Graw-Hill Companies, New York.
- Tam, H.M., Diep, C. N. 2014. Isolation, characterization and identification of endophytic bacteria in sugarcane (*Saccharum* spp. L.) cultivated on soils of the Dong Nai province, Southeast of Vietnam. *American Journal of Life Sciences* 2(6): 361-368
- Tesfaw, A., Assefa, F. 2014. Current Trends in Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*: Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture, and Immobilization. *Hindawi Publishing Corporation International Scholarly Research Notices*
- Tikka, C., Osuru, H. P., Atluri, N., Raghavulu, P. C. V., Yellapu, N. K., Mannur, I. S., Prasad, U. V., Aluru, S., Varma, N., And Bhaskar, M. 2013. Isolation and characterization of ethanol tolerant yeast strains. *Bioinformation* 9(8): 421-425
- Widiastutik, N., Alami, N. H. 2014. Isolasi dan Identifikasi Yeast dari Rhizosfer *Rhizopora mucronata* Wonorejo. *Jurnal Sains dan Seni Pomits* 3(1): 2337-3520
- Yamada, Y., Suzuki, T., Matsuda, M., And Mikata, K. 1995. The Phylogeny of *Yamadazyma ohmeri* (Etchells Et Bell) Billon-Grand Based On The Partial Sequences of 18S And 26S Ribosomal RNAs: The Proposal of *Kodamaea* Gen. Nov. (*Saccharomycetaceae*). *Biosci Biotech Biochem* 59 (6): 1172-1174