



Isolasi dan Identifikasi Khamir Toleran Alkohol dari Molase

Isolation and Identification of Alcohol Tolerant Yeast from Molasses

Nurhayati Nurhayati^{1*}, Jay Jayus¹, Anjas Wida Elistia Rini², Bambang Sugiharto²,
Dedy Eko Rahmanto³

¹Program Studi Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Jember
Jl. Kalimantan No. 37 FTP Jember, Jawa Timur, Indonesia

²Program Studi Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Jember
Jl. Kalimantan No.37 FMIPA Jember, Jawa Timur, Indonesia

³Program Teknik Energi Terbarukan, Jurusan Tehnik, Politeknik Negeri Jember
Jl. Mastrip POBOX. 164 Jember, Jawa Timur, Indonesia

Email : nurhayati.ftp@unej.ac.id *Penulis Korespondensi

Abstract

Yeast can produce alcohol from molasses substrate. During alcohol fermentation, alcohol accumulation can increase the concentration of alcohol. When alcohol concentration reaches more than 8%(v/v), it causes unstable yeast membrane, which then reducing membrane permeability and cell homeostasis. In the research was done to isolate and identify indigenous alcohol tolerant yeast from molasses. Morphology characterization was done by observing colony shape, cell shape and cell budding type, while physiological identification by utilizing API 20C kit test. Molecular identification was performed with PCR and DNA sequencing using ITS1-ITS4 primer. The result showed that two yeast isolates i.e. isolate X and isolate Z had alcohol tolerance character. Based on physiological characteristics, isolate X and Z had similarity with *Candida tropicalis*. The result of DNA sequencing with ITS1-ITS4 primer and blastn program analysis indicated that isolate X was identified as *Candida parapsilosis* strain AUMC 10714 spesies, and isolate Z was identified as *Candida parapsilosis* ZA012 spesies.

Keywords: alcohol, molasses, characterization, tolerant alcohol yeast, PCR, DNA sequencing

Abstrak

Khamir mampu menghasilkan bioetanol dari molases. Selama proses produksi (proses fermentasi) terjadi proses akumulasi alkohol sehingga konsentrasi alkohol semakin meningkat. Konsentrasi etanol yang melebihi 8% (v/v) dapat menyebabkan ketidakstabilan membran yang kemudian dapat menurunkan permeabilitas membran dan homeostasis sel. Penelitian ini dilakukan isolasi dan identifikasi khamir indigenous dari molase yang toleran terhadap alkohol. Karakterisasi morfologi meliputi bentuk koloni, bentuk sel dan tipe pertunasa, sedangkan karakterisasi fisiologis dilakukan dengan kit API 20C. Identifikasi molekuler dilakukan dengan PCR dan sequencing DNA menggunakan primer ITS1-ITS4. Hasil penelitian didapatkan dua isolat khamir yaitu isolat X dan Z yang memiliki potensi toleran terhadap alkohol. Berdasarkan hasil karakteristik fisiologis, isolat X dan isolate Z memiliki kedekatan dengan *Candida tropicalis*. Hasil sequencing DNA dengan primer ITS1-ITS4 dan analisis dengan program blastn menunjukkan bahwa isolat X teridentifikasi sebagai spesies *Candida parapsilosis* strain AUMC 10714 dan isolat Z teridentifikasi sebagai spesies *Candida parapsilosis* ZA012.

Kata Kunci: alkohol, molase, karakterisasi, yeast toleran alkohol, PCR, sekuensing DNA

Diterima: 3 Januari 2022, disetujui: 4 Januari 2022

Pendahuluan

Khamir memiliki peran penting dalam dekomposisi senyawa organik dan dapat digunakan untuk keperluan industri. Beberapa jenis khamir yang digunakan dalam proses fermentasi diantaranya genus *Saccharomyces*, *Shizosaccharomyces*, *Torula*, *Willia*, *Yarrowia* yang masing-masing memiliki karakteristik dan tingkat produktifitas etanol yang berbeda (Rodrigues *et al.*, 2016). Selama proses fermentasi, khamir mengalami berbagai macam stres utamanya akibat peningkatan kadar etanol, dimana kondisi ini kemudian menyebabkan penurunan produksi etanol itu sendiri (Gibson *et al.*, 2007).

Selama proses fermentasi bioethanol, konsentrasi etanol yang dihasilkan terus meningkat pada bejana fermentor. Jayus *et al.*, (2016) melaporkan bahwa fermentasi bioethanol selama empat hari menghasilkan rendemen bioethanol yang menurun. Hal serupa juga terjadi pada khamir osmotoleran yang mengalami penurunan produksi etanol seiring dengan akumulasi jumlah etanol dalam bejana fermentor (Nurhayati *et al.*, 2018). Ketika konsentrasi etanol lebih dari 8% (v/v), lapisan fosfolipid dari membran sel (lipid bilayer) khamir mengalami hiperpolarisasi, yang kemudian menyebabkan penurunan permeabilitas membran dan gangguan homeostasis sel (Lloyd *et al.*, 1993). Efek dari kenaikan konsentrasi etanol terhadap khamir berbeda-beda tergantung pada sifat toleran khamir terhadap etanol (Nakase *et al.*, 1972).

Sel khamir memiliki berbagai mekanisme untuk memperbaiki kerusakan akibat peningkatan konsentrasi etanol, diantaranya: peningkatan ergosterol sebagai respon terhadap ketidakstabilan dan kerusakan membran plasma serta produksi asam amino dan inositol yang dapat meningkatkan stabilitas membran sel (Daum *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2005; Kelley *et al.*, 1988). Peningkatan ekspresi gen trehalose dan *heat shock proteins* (HSPs) yang menstabilkan dan/atau memperbaiki protein yang rusak, serta peningkatan ekspresi gen untuk produksi protein finger zine dan *alcohol sensitive ring/protein* PHD finger I (AsrIp) telah dilaporkan mampu meningkatkan toleransi *S. Cerevisiae* terhadap alkohol (Swan&Watson, 1998; MacPherson *et al.*, 2006; Betz *et al.*, 2004).

Selain *S. cerevisiae*, khamir juga mampu memproduksi bioenergi misalnya *Candida* penghasil enzim lipase untuk produksi bioethanol. Melihat prospek khamir tersebut maka fokus penelitian ini adalah mengisolasi khamir yang toleran terhadap alkohol dari substrat molase, serta melakukan uji identifikasi secara morfologi, fisiologi dan molekuler untuk mendapatkan identitas isolat strain khamir toleran alkohol dari molase, yang kemudian dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan produksi bioenergi etanol.

Metode Penelitian

Isolasi Khamir Toleran Alkohol (KTA)

Sampel molase tetes tebu diperoleh dari Pabrik Gula Jatiroto, Jember. Khamir diisolasi dari sample molase dengan cara diencerkan hingga 14° brix kemudian ditambahkan alkohol 8% v/v dan 20% v/v. Sebanyak 0,1 mL molase disebarkan pada media *Malt Extract Agar* (MEA), selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Isolat yang tumbuh dimurnikan dengan metode gores sinambung sehingga diperoleh kultur tunggal. Media MEA dibuat dengan menambahkan 2% bacto agar pada medium *Malt Extract Broth* (MEB). Media MEB dibuat dengan cara mencampurkan dan melarutkan 3 g ekstrak yeast, 3 g ekstrak maltosa, 5 g pepton, dan 10 g glukosa.

Karakterisasi Morfologi Khamir KTA

Pengamatan makroskopis khamir meliputi warna koloni dan tipe koloni serta pengamatan mikroskopis meliputi bentuk sel dan tipe pertunasan sel khamir menggunakan metode pewarnaan kristal violet. Sel khamir diamati menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000x. Pengamatan bentuk sel dan *budding* sel khamir dilakukan pada khamir usia biakan muda (± 24 jam), dan biakan dewasa (± 48 jam).

Identifikasi Molekuler Khamir KTA (DNA Sequencing)

Tahap isolasi DNA khamir dilakukan menggunakan *Presto Mini gDNA Yeast Kit* (*Geneaid*). Proses isolasi menggunakan buffer sorbitol yang ketika dikombinasikan dengan *zymolase* atau *lyticase* untuk meningkatkan lisis dinding sel khamir atau spesies jamur lain yang mengandung kitin dan polisakarida.

Kualitas dan kuantitas DNA khamir diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm. Kualitas atau tingkat kemurnian DNA yang baik adalah 1,8-2,0 ($1,8 \leq A_{260} \leq 2,0$). Konsentrasi DNA kemudian dihitung menggunakan rumus berdasarkan Seidman & Moore (2000).

PCR dilakukan dengan primer ITS-1 (primer forward) 5' TCCGTAGGT GAACCTGCGG-3' dan ITS-4 (primer reverse) 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White et al., 1990), dimana 25 μ L campuran reaksi terdiri atas 5 μ L 5X KAPA Taq HotStart Buffer (1x concentrated), 1,5 μ L 25 mM MgCl₂, 0,5 μ L 10 mM dNTP Mix, 0,5-1,25 μ L 10 mM primer forward (ITS1), 0,5-1,25 μ L 10 mM primer reverse (ITS4), 0,1 μ L 5 U/ μ L KAPA Taq HotStart DNA Polymerase, dan 2 μ L DNA sampel (5 ng μ L⁻¹), ditambahkan dengan ddH₂O. Pada PCR, tahap predenaturasi dilakukan pada suhu 95°C selama 3 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus: tahap denaturasi suhu 95°C selama 30 detik, tahap annealing suhu 55°C selama 30 detik, tahap extension suhu 72°C selama 2 menit, dan yang terakhir adalah tahap post extension pada suhu 72°C selama 5 menit.

Produk PCR kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarose (1%) dengan tegangan 50 Volt selama 60 menit. Penentuan panjang fragmen daerah ITS dilakukan dengan DNA marker ukuran 100 bp. Visualisasi gel hasil elektroforesis diamati menggunakan *Gel*

Documentation System (BIO-RAD) kemudian didokumentasikan menggunakan program *Gel Doc XR*.

Purifikasi produk PCR dilakukan menggunakan *Zymo DNA Clean & Concentrator KitTM* (Zymo Research). Selanjutnya *sequencing* DNA khamir dilakukan dengan metode *Bi-directional Sequencing* menggunakan primer ITS1-ITS4 yang dikirim ke Divisi Laboratorium Genetika, P.T Genetika Science Indonesia, Jakarta. Data *sequencing* dianalisis menggunakan program blastn dan konstruksi pohon filogenetik dibuat dengan metode *neighbour-joining* menggunakan program Phytit (*phylogenetik tree*).

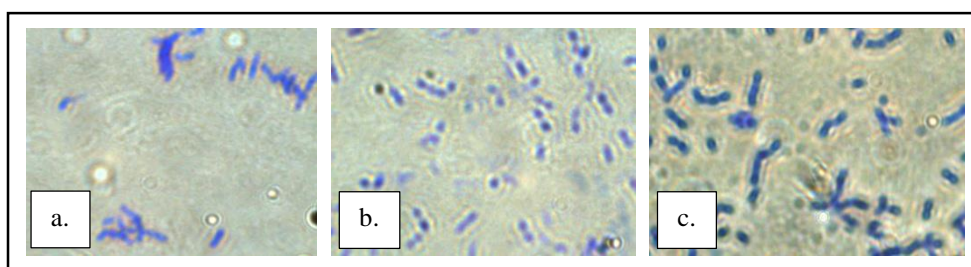
Hasil dan Pembahasan

Isolasi dan Purifikasi Khamir Toleran Alkohol

Tiga isolat khamir toleran alkohol dinotasi dengan X, Y, Z. Karakteristik makroskopisnya pada media MEA seperti ditunjukkan pada Gambar 1 digunakan untuk mendeskripsikan tipe koloni isolat khamir. Selanjut isolat dikoleksi pada media agar miring sebagai kultur indukan. Gambar 2 menunjukkan karakteristik mikroskopis sel isolat X, Y dan Z dan deskripsinya pada Tabel 1.



Gambar 1. Morfologi makroskopis isolat X(a), Y(b), Z(c)



Gambar 2. Morfologi mikroskopis isolat khamir X(a), Y(b), Z(c) pada lama inkubasi 20 jam

Tabel 1. Deskripsi Morfologi Makroskopis dan Mikroskopis Isolat Khamir X,Y dan Z

Isolat khamir	Morfologi makroskopis	Morfologi mikroskopis
X	Bentuk koloni bulat, berwarna putih	Sel berbentuk bulat oval, memanjang, berantai diplo dengan pertunasan multipolar
Y	Bentuk koloni bulat berlendir, warna keruh	Sel berbentuk bulat oval, memanjang, berantai diplo dengan pertunasan multipolar
Z	Bentuk koloni bulat berwarna putih, tepi bergelombang/bergerigi	Sel berbentuk bulat memanjang, berantai diplo dengan pertunasan multipolar

Karakteristik Molekuler DNA Khamir KTA

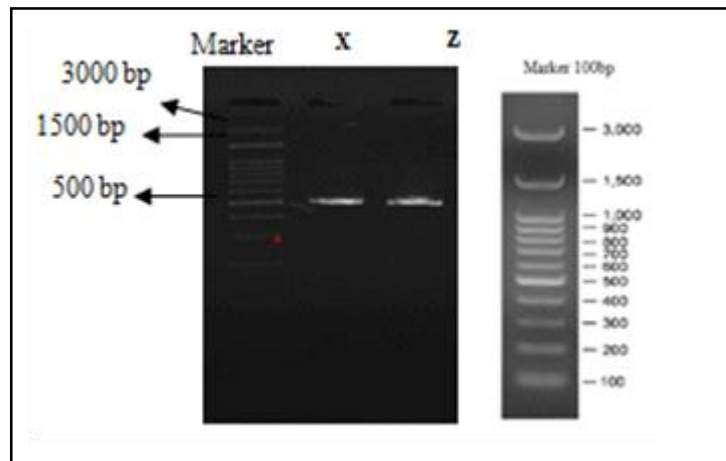
Uji molekuler hanya dilakukan pada dua isolat yakni isolat X dan Z sedangkan isolat Y tidak dilakukan proses uji molekuler. Hal tersebut dikarenakan hasil penelitian terpisah lainnya menunjukkan bahwa isolat Y tidak bisa tumbuh optimum pada suhu fermentasi bioetanol. Sebaliknya, isolat X dan Z memiliki pertumbuhan yang optimal pada uji suhu pertumbuhan dan pH pertumbuhan. Selain itu kedua isolat mampu tumbuh pada molase dengan konsentrasi alkohol 8% v/v, 16% v/v dan

24% v/v, serta mampu memproduksi alkohol dengan waktu inkubasi optimal masing-masing isolat (Fitriyah *et al.*, 2018). Dengan pertimbangan tersebut maka hanya isolat X dan Z yang dilanjutkan untuk proses identifikasi secara molekuler.

Hasil ekstraksi DNA isolat X dan Z diukur menggunakan spektrofotometer nanodrop. Nilai kemurnian DNA yang sesuai untuk dilanjutkan tahapan PCR adalah $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$. Hasil penghitungan nanodrop DNA isolat X dan Z ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Penghitungan Nanodrop DNA Isolat X dan Z

Isolat	Volume (µl)	Konsentrasi (ng/µl)	A260/A280	A260/A230
X	30	78,5	1,70	1,15
Z	30	359,7	1,67	1,24



Gambar 3. Hasil dokumentasi gel elektroforesis hasil PCR isolat X dan Z

Berdasarkan hasil pengukuran dengan nanodrop diketahui bahwa ekstraksi DNA isolat khamir X dan Z diperoleh DNA yang cukup murni dimana ratio A260/A280 mendekati angka standar. Selanjutnya dilakukan PCR menggunakan primer ITS1 dan ITS4 yang merupakan primer spesifik gen pengkode rDNA yang sering digunakan untuk proses identifikasi khamir hingga tingkat spesies karena pada gen ini banyak terjadi mutasi yang menjadikan urutan nukleotidanya bervariasi antar spesies. Hasil PCR ditunjukkan melalui gambar hasil elektroforesis (Gambar 3).

Pada Gambar 3 terlihat bahwa DNA hasil PCR isolat X dan Z memiliki ukuran sekitar pada 500 bp. Umumnya tiap jenis khamir memiliki ukuran fragmen ITS yang berbeda. Ukuran fragmen ITS untuk isolat khamir berkisar antara 300 bp-900 bp (Fujita et al., 2001). Berdasarkan perhitungan, *sequence* DNA yang dapat dihasilkan oleh primer ITS1 dan ITS4 memiliki ukuran sekitar 600 bp, sehingga data hasil elektroforesis produk PCR isolat X dan Z mendekati ukuran fragmen perhitungan.

Purifikasi produk PCR menggunakan metode Zymo DNA Clean & Concentrator Kit™, selanjutnya DNA murni tersebut dilakukan pembacaan *sequencing* DNA menggunakan metode Bi-directional *Sequencing*. Metode tersebut dikenal dengan *doublex sequencing* yang merupakan metode menggunakan dua strand DNA berasal dari plasmid atau produk PCR yang disequencing secara bersamaan dengan kombinasi primer forward dan primer reverse (ITS1 dan ITS4) dimana masing-masing primer telah dilabel dengan pewarna yang berbeda.

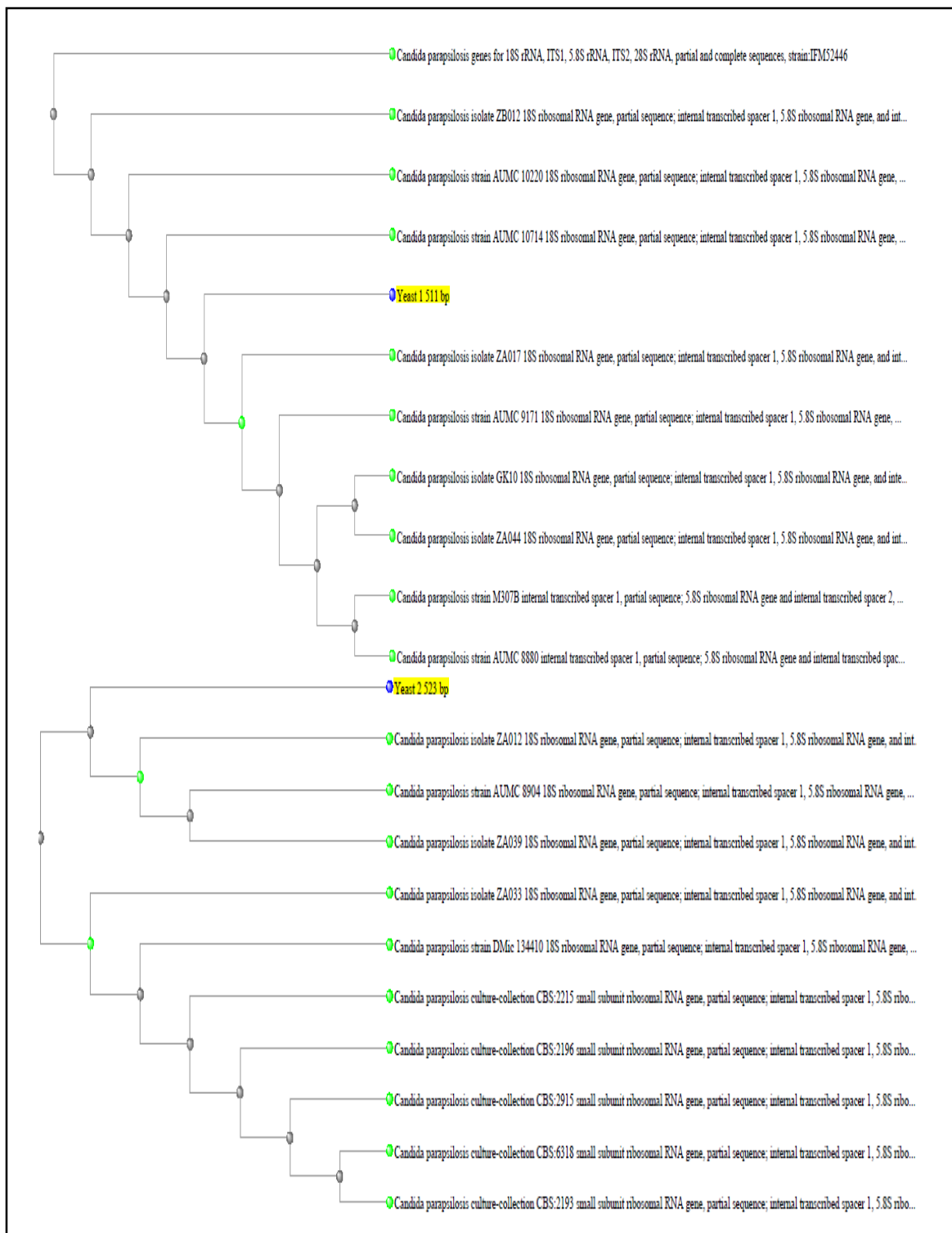
Data hasil *sequencing* menunjukkan bahwa panjang *sequence* isolat X yang dideteksi dengan pasangan primer ITS1-ITS4 adalah 511 bp, sedangkan panjang *sequence* isolat yang terdeteksi dengan pasangan primer ITS1-ITS4 adalah 523 bp (Tabel 3). Data hasil *sequencing* tersebut kemudian dimasukkan ke dalam program blastn untuk mengetahui jenis dan strain isolat khamir, serta persentase kekerabatannya.

Berdasarkan data hasil blast didapatkan bahwa baik isolat X maupun isolat Z teridentifikasi sebagai *Candida parapsilosis*, namun dengan strain yang berbeda. Isolat X merupakan *Candida parapsilosis* strain AUMC 10714, sedangkan isolat Z merupakan *Candida parapsilosis* ZA012. Kedua isolat yang teridentifikasi sebagai *Candida parapsilosis* strain AUMC 10714 dan *Candida parapsilosis* ZA012 memiliki homologi *sequence* sebesar 100%. Berdasarkan data tersebut dibuat pohon kekerabatan/pohon filogenetik yang ditunjukkan pada Gambar 4.

Gambar 4. menunjukkan bahwa kedudukan isolat X dengan panjang *sequence* 511 bp letaknya berdekatan dengan kedudukan dari *Candida parapsilosis* strain AUMC 10714, letak isolat Z dengan panjang *sequence* 523 bp kedudukannya berdekatan dengan *Candida parapsilosis* ZA012 sehingga homologi *sequence* masing-masing isolat tersebut adalah 100% karena letaknya sangat berdekatan dalam satu pohon filogenetik tersebut. Calderone (2002) telah melaporkan bahwa ada beberapa khamir yang toleran terhadap alkohol, di antaranya adalah *Candida* sp. Namun pada tubuh manusia, beberapa khamir strain *Candida* sp dapat menyebabkan penyakit yang disebut *candidiasis* (Amrutkar et al., 2013; Chadha & Padhi, 2016).

Tabel 3. Hasil *Sequencing* Isolat X dan Z dengan Primer Forward-Reverse (ITS1-ITS4) Menggunakan Metode *Bi-directional Sequencing*

Isolat	Hasil <i>sequencing</i> (titik temu 2 sekuen)					
Isolat X (511 bp)	1	CTGCGGAAG TACACATGTG	GATCATTACA	GAATGAAA	TGCTTAACTG	CATTTTTTCT
	61	TTTTCTTTT GCCAGAGATT	TTTGAAAAC	TTGCTTTGGT	AGGCCTTCTATATGGGGCCT	
	121	AAACTCAACC CTTTCAACAA	AAATTTTATT	TAATGTCAAC	CGATTATTTA	ATAGTCAAAA
	181	CGGATCTCTT TAATATGAAT	GGTTCTCGCA	TCGATGAAGA	ACGCAGCGAA	ATGCGATAAG
	241	TGCAGATATT GTATTCCAAA	CGTGAATCAT	CGAATCTTTG	AACGCACATT	GCGCCCTTTG
	301	GGGCATGCCT TTGAGCGATA	GTTTGAGCGT	CATTTCTCCC	TCAAACCCTC	GGGTTTGGTG
	361	CGCTGGGTTT TTTCCACTCA	GCTTGAAAGA	AAGGCGGAGT	ATAAACTAAT	GGATAGGTTT
	421	TTGGTACAAA ACTACCCGCT	CTCCAAAAC	TCTTCCAAAT	TCGACCTCAA	ATCAGGTAGG
	481	GAACTTAAGC ATATCAATAA GCCGGAGGAAA				
Isolat Z (523 bp)	1	TCCTTCCGTA TAACTGCATT	GGGGAACCTG	CGGAAGGATC	ATTACAGAAT	GAAAAGTGCT
	61	TTTTCTTACA CTTCTATATG	CATGTGTTTT	TCTTTTTTTG	AAAACCTTGC	TTTGGTAGGC
	121	GGGCCTGCCA TATTTAATAG	GAGATTAAAC	TCAACCAAAT	TTTATTTAAT	GTCAACCGAT
	181	TCAAAACTTT AGCGAAATGC	CAACAACGGA	TCTCTGGTT	CTCGCATCGA	TGAAGAACGC
	241	GATAAGTAAT CACATTGCGC	ATGAATTGCA	GATATTCGTG	AATCATCGAA	TCTTTGAACG
	301	CCTTTGGTAT ACCCTCGGGT	TCCAAAGGGC	ATGCCTGTTT	GAGCGTCATT	TCTCCCTCAA
	361	TTGGTGTTGA ACTAATGGAT	GCGATACGCT	GGGTTTGCTT	GAAAGAAAGG	CGGAGTATAA
	421	AGGTTTTTTC CCTCAAATCA	CACTCATTGG	TACAACTCC	AAAACCTTCT	CCAAATTCGA
481	GGTAGGACTA CCCGCTGAAC TTAAGCATAT CAATAAGCGG AGG					



Gambar 4. Pohon filogenetik isolat X (*Candida parapsilosis* strain AUMC 10714) (a) dan isolat Z (*Candida parapsilosis* ZA012) (b)

Taksonomi *Candida parapsilosis* tergolong dalam Filum *Ascomycota*, Subfilum *Saccharomycotina*, Kelas *Saccharomycetes*, Ordo *Saccharomycetales*, Family *Saccharomycetaceae*, Genus *Candida*, Spesies *Candida parapsilosis*. Karakteristik *Candida*

parapsilosis yakni memiliki bentuk sel oval, elips; sel berpasang-pasang/ berantai pendek/ berkerumun; dapat membentuk pseudohifa; spora aseksual adalah blastospora yang terbentuk pada pseudomiselia; tipe pertunasan sel multipolar. Pada umumnya 65% spesies

Candida mampu tumbuh pada suhu 37°C atau lebih (Silva *et al.*, 2009) termasuk *Candida parapsilosis* strain AUMC 10714 (isolat X) yang mampu tumbuh optimal hingga suhu 37°C dan *Candida parapsilosis* ZA012 (isolat Z) yang mampu tumbuh optimal pada suhu 40°C. *Candida parapsilosis* umumnya memiliki kemampuan asimilasi dan fermentasi. Fermentasi yang dapat dilakukan yaitu fermentasi glukosa, galaktosa dengan hasil bervariasi untuk sukrosa dan maltosa. Kemampuan asimilasi *Candida parapsilosis* meliputi asimilasi galaktosa, sukrosa, D-xilosa, ribitol, D-mannitol, maltosa, trehalosa, L-arabinosa, gliserol, dan D-glusitol, namun tidak mampu mengasimilasi nitrat. Selain itu, *Candida parapsilosis* mampu juga tumbuh pada sorbosa, D-ribosa, asam laktat, asam suksinat, asam sitra, dan media tanpa vitamin.

Candida parapsilosis strain AUMC 10714 mampu mengasimilasi D-glukosa, gliserol, kalsium 2-keto-glukonat, L-arabinosa, D-xilosa, adonitol, D-galaktosa, D-sorbitol, D-glukopiranosida, D-maltosa, D-sakarosa, D-trehalosa, D-melezitosa, dan D-raffinosa. Sedangkan *Candida parapsilosis* ZA012 mampu mengasimilasi D-glukosa, gliserol, Kalsium 2-keto-glukonat, L-arabinosa, D-xilosa, adonitol, D-galaktosa, inositol, D-sorbitol, Metil-D-glukopiranosida, N-Asetil-glukosamin, D-cellobiosa, D-maltosa, D-sakarosa, D-trehalosa, D-melezitosa, D-raffinosa (Fitriyah *et al.*, 2018).

Saat ditumbuhkan pada agar Chrom, koloni *Candida parapsilosis* berwarna putih. Saat ditumbuhkan pada media SDA, koloni *Candida parapsilosis* berwarna putih agak coklat muda dan mengkilat serta pinggiran koloni rata atau berkerut/berombak (Silva *et al.*, 2009). Sifat koloni ini juga dimiliki oleh *Candida parapsilosis* strain AUMC 10714 yang memiliki koloni berwarna putih dengan tepi rata, sedangkan *Candida parapsilosis* ZA012 yang memiliki koloni berwarna putih dengan tepi agak berombak/bergerigi.

Candida parapsilosis memiliki kemampuan membentuk biofilm (Kumamoto, 2002). Silva *et al.* (2009) juga menunjukkan bahwa *C. Parapsilosis*, *C. tropicalis* dan *C. Glabrata* mampu memproduksi biofilm. *C. Parapsilosis* membentuk biofilm pada media dengan kandungan glukosa dan konsentrasi lipid yang tinggi, dimana biofilm yang terbentuk tipis, kurang terstruktur dan terdiri

atas kumpulan blastospora. Pada umumnya kandungan biofilm terdiri atas karbohidrat, protein, fosforus dan heksosamin. Kondisi lingkungan seperti komposisi media, pH dan ketersediaan oksigen pada tiap strain maupun spesies akan mempengaruhi pembentukan biofilm dan kandungannya. Misalnya, kandungan *C. parapsilosis* sebagian besar terdiri atas karbohidrat dan kandungan proteinnya lebih rendah dibandingkan biofilm yang dimiliki *C. glabrata* dan *C. tropicalis*.

Rodrigues *et al.* (2016) mengemukakan bahwa enzim lipase/ acyltransferase dari *Candida parapsilosis* (CpLIP2) yang termobilisasi oleh dua senyawa sintetik (Accurel MP 1000 dan Lewatit VP OC 1600) digunakan sebagai katalis untuk memproduksi biodiesel dengan metode transesterifikasi minyak jatropha, serta metanol dalam sistem lipid/cairan. Peran penting *C. parapsilosis* yang lainnya adalah sebagai biokatalis untuk reaksi derasemisasi untuk berbagi jenis alkohol (alifatik dan aromatik), α dan β ester hidroksi, α -hidroksi propargilic ester, alkohol allylic, etanol aril, hidroksi alifatik β (ester), dan reduksi asimetrik dari ptokhiral keton, dan senyawa karbon lain. Biotransformasi tersebut dibawa dengan kemoregio yang tinggi serta stereospesifikasi menggunakan sel yang termobilisasi, enzim terpurifikasi dan rekombinan protein dari *C. parapsilosis* (Chadha *et al.*, 2016). Amrutkar *et al.* (2013) menyatakan bahwa stereoinversi dari etanol (S)-1-(1-naphthyl) ke etanol (R)-1-(1-naphthyl) dapat dilakukan dengan biokatalisis *Candida parapsilosis*. *Candida parapsilosis* mempengaruhi sistem redox yang dibutuhkan untuk keperluan stereoinversi alkohol sekunder. Kondisi reaksi seperti suhu, waktu, pH, pelarut organik, dan lain-lain secara signifikan mempengaruhi proses streoinversi. Suhu optimum yang diperlukan untuk proses stereoinversi yang optimal adalah suhu 30°C.

Peran *Candida parapsilosis* sebagai biokatalis produksi biodiesel, pembentukan berbagai jenis alkohol, reaksi stereoinversi alkohol sekunder menandakan bahwa *Candida parapsilosis* berpotensi dalam pembentukan bioetanol. *C. parapsilosis* yang memiliki toleransi tinggi terhadap alkohol akan sangat berguna sebagai biokatalis berbagai macam reaksi yang berhubungan dengan pembentukan alkohol atau etanol.

Kesimpulan

Terdapat dua isolat indigenus molases yang bersifat toleran alkohol yakni isolat X dan Z. Isolat X teridentifikasi sebagai *Candida parapsilosis* strain AUMC 10714. Isolat Z teridentifikasi sebagai *Candida parapsilosis* strain ZA012. Untuk selanjutnya dapat dilakukan penelitian terkait produksi bioethanol baik sebagai alkohol Kesehatan maupun energi terbarukan dengan menggunakan kedua jenis isolat tersebut sebagai starternya.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Universitas Jember yang telah mendanai penelitian ini melalui Program Penguatan Penelitian Tahun 2015-2020. Terima kasih pula disampaikan kepada PT. Genetika Indonesia yang telah membantu jasa analisis sekuensing serta kepada teknisi CDAST Universitas Jember.

Daftar Pustaka

- Amrutkar, S. M., Banoth, Linga., & Banerjee, U.C. (2013). One-pot synthesis of (R)-1-(1-naphthyl)ethanol by stereoinversion using *Candida parapsilosis*. *Tetrahedron Letters* 54(25): 3274–3277.
- Betz, C., Schlenstedt, G., & Bailer, S.M. (2004). Asr1p, a novel yeast ring / PHD finger protein, signals alcohol stress to the nucleus. *Journal of Biology and Chemistry* 279: 28174–28181.
- Calderone, R.A. (2002). *Candida and Candidiasis*. ASM Press. Washington.
- Chadha, V.P., & Padhi. (2016). *Candida parapsilosis*: A versatile biocatalyst for organic oxidation-reduction reactions. *Bioorganic Chemistry* 68: 187-213.
- Daum, G., Lees, N.D., Bard, M., & Dickson, R. (1998). Cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 1471-1510.
- Fitriyah, I., Sugiharto, B., & Jayus, J. (2018). Isolation and Identification of Osmophilic Yeasts Isolated from Molasses Sugarcane as Bioethanol Starter. *Advances in Engineering Research* 172
- Fujita, S., Senda, Y., Nakaguchi, S., & Hashimoto, T. (2001). Multiplex PCR using Internal Transcribed Spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *Journal of Clinical Microbiology* 39 (10): 3617-3622.
- Gibson, B.R., Lawrence, S.J., Leclaire, J.P., Powell, C.D., & Smart, K.A. (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol Rev* 31:535-569.
- Hu, C.K., Bai, F.W., & An, L.J. (2005). Protein amino acid composition of plasma membranes affects membrane fluidity and thereby ethanol tolerance in a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Chinese Journal of Biotechnology* 21: 809-813.
- Jayus, J., Mayzuroh, A., Arindhani, S., & Caroenchai, C. (2016). Studies on bioethanol production of commercial baker's and alcohol yeast under aerated culture using sugarcane molasses as the media. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 9: 493-499.
- Kelley, M.J., Bailis, A.M., Henry, S.A., & Carman, G.M. (1988). *Regulation of phospholipid biosynthesis* in *Saccharomyces cerevisiae* by inositol. Inositol is an inhibitor of phosphatidylserine synthase activity. *Journal of Biology and Chemistry* 263: 18078-18085.
- Kumamoto, C.A. (2002). *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol* 5: 608-611.
- Lloyd, D., Morrell, S., Carlsen, H.N., Degn, H., James, P.E. & Rowlands, C.C. (1993). Effects of growth with ethanol on fermentation and membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 9(8): 535-569.
- MacPherson S, Larochelle M. & Turcotte, B. (2006). A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiology Molecular Biology Rapid* 70: 583–604.
- Nakase, Takashi., Fukazawa, Yoshimura., & Tsuchiya, Takeshi. (1972). A Comparative Study on Two Forms of *Gandida Tropicalis* (Cast.) Berkhout. *The journal of General and Applied Microbiology* 18(5): 349-363.
- Nurhayati, N., Sugiharto, B., Fitriyah, I., & Jayus, J. (2018). Isolation and Identification of Osmophilic Yeasts Isolated from Molasses Sugarcane as Bioethanol Starter. *Advances in Engineering Research* 17: 223-228.

- Rodrigues, J., Perrier, V., Lecomte, J., Dubreucq, E., & Ferreira-Dias, S., (2016). Biodiesel production from crude jatropha oil catalyzed by immobilized lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis* in aqueous medium. *Bioresource Technology* 218: 1224–1229.
- Seidman, L.A. & C.J. Moore. (2000). *Basic Laboratory Methods for Biotechnology*. Prentice Hall. London.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W. & Azeredo, J. (2011). Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol* 19(5): 241–247.
- Swan, T.M., & Watson, K. (1998). Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. *FEMS Microbiol Lett.* 169(1): 191-198.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes or phylogenetics. In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., & White, T.J., (Eds.), *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (pp. 315-322). Academic Press. New York.