

**IDENTIFIKASI MOLEKULER TIGA ISOLAT KHAMIR
TERMOTOLERAN TERPILIH SERTA POTENSINYA
SEBAGAI PENGENDALI HAYATI TERHADAP *Fusarium
oxysporum* f.sp *cubense* PADA TANAMAN BAWANG
MERAH**

Oleh:

AFRIYAGUNG SAPUTRA



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERTANIAN
MALANG
2018**

**IDENTIFIKASI MOLEKULER TIGA ISOLAT KHAMIR
TERMOTOLERAN TERPILIH SERTA POTENSINYA
SEBAGAI PENGENDALI HAYATI TERHADAP *Fusarium
oxysporum* f.sp *cubense* PADA TANAMAN BAWANG MERAH**

**OLEH
AFRIYAGUNG SAPUTRA**

145040207111099

**MINAT STUDI PERLINDUNGAN TANAMAN
PROGRAM STUDI AGROEKOTEKNOLOGI**

SKRIPSI

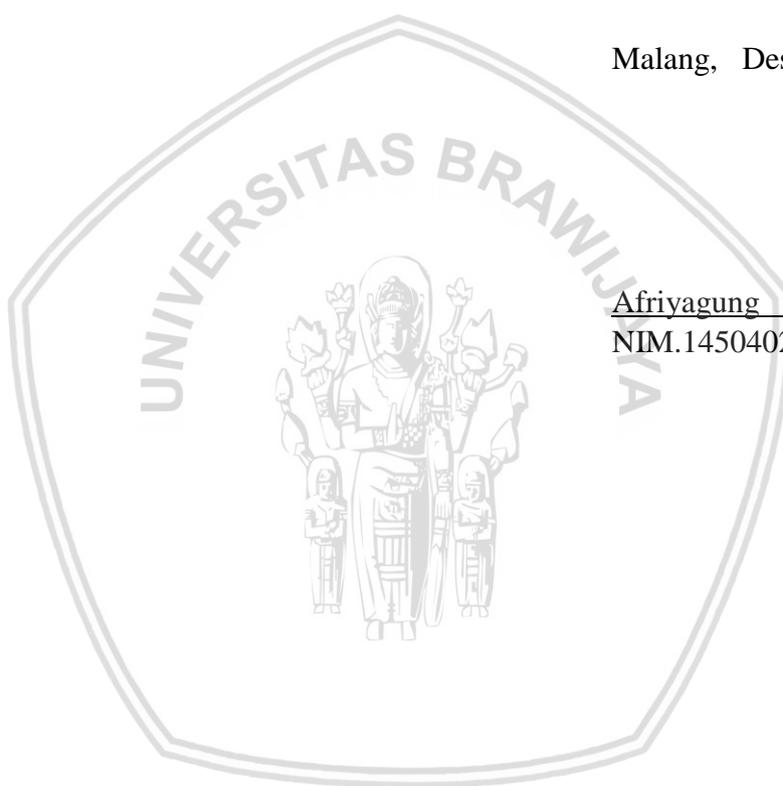
**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
Gelara Sarjana Pertanian Strata Satu (S-1)**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERTANIAN
JURUSAN HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN
MALANG
2018**

PERNYATAAN

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa segala pernyataan dalam skripsi ini merupakan gagasan dan hasil penelitian saya sendiri, dengan bimbingan komisi pembimbing, kecuali yang dengan jelas ditunjukkan rujukannya dalam daftar pustaka. Skripsi ini belum pernah diajukan untuk memperoleh gelar sarjana di suatu Perguruan Tinggi manapun. Semua data dan informasi yang digunakan telah dinyatakan secara jelas dan dapat diperiksa kebenarannya.

Malang, Desember 2018



Afriyagung Saputra
NIM.145040207111099



**Skripsi ini kudedikasikan untuk
(Alm) Ayah & (Almh) Ibuku, serta kedua kakakku
TERIMA KASIH atas doa dan dukungannya**



RINGKASAN

Afriyagung Saputra. 145040207111099. Identifikasi Molekuler Tiga Isolat Khamir Termotoleran Terpilih serta Potensinya sebagai Pengendali Hayati terhadap *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense* pada Tanaman Bawang Merah. Dibawah bimbingan Dr. Anton Muhibuddin, SP., MP. Sebagai Pembimbing Utama dan Antok Wahyu Sektiono, SP., MP. Sebagai Pembimbing Pendamping.

Khamir merupakan mikroba yang mampu memproduksi alkohol atau disebut juga fermentasi melalui glikolisis. Dalam bidang pertanian beberapa khamir mampu digunakan sebagai agen biokontrol. Namun karena keterbatasan sarana dan prasarana banyak peneliti sebelumnya yang mengidentifikasi khamir secara konvensional sehingga tidak menjamin memperoleh identitas khamir yang akurat. Oleh karena itu identifikasi molekuler diperlukan untuk mengetahui identitas khamir secara akurat, sehingga pada penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi khamir secara molekuler dan mengetahui potensi antagonism khamir hasil identifikasi terhadap jamur *Fusarium oxysporum*.

Penelitian dilaksanakan di Bulan Maret – Oktober 2018 di Universitas Yamaguchi, Jepang dan Universitas Brawijaya. Tahapan penelitian dibagi menjadi tiga bagian utama, yaitu 1. Identifikasi khamir, 2. Karakterisasi dan produksi etanol khamir, 3. Uji antagonis. Pertumbuhan khamir menggunakan media cair dan padat *Yeast Peptone Dextroce*(YPD) dengan kandungan 1% yeast 2% peptone 2% dextrose, sedangkan pertumbuhan jamur *F.oxysporum* dan uji antagonis menggunakan *Peptone Dextroce Agar*(PDA).

Hasil identifikasi molekuler khamir yang didapatkan, isolat khamir UB5 memiliki total kemiripan sebesar 99% dengan khamir *Kluyvero marxianus*, isolat khamir UB24 memiliki total kemiripan sebesar 98% dengan khamir *Picchia kudriavzevii*, dan isolat khamir UB35A memiliki kemiripan total 96% dengan khamir *K. marxianus*. Pengujian Fermentasi dibandingkan dengan isolat kontrol yaitu DMKU-3, merupakan khamir termotoleran *Kluyveromyces marxianus* yang berasal dari Thailand. Khamir isolat UB35A menghasilkan produk etanol yang baik. Pada hasil uji antagonisme menunjukkan isolat UB5 memiliki rata-rata nilai penghambatan yang paling tinggi. Namun analisis ragam data menunjukkan hasil keseluruhan pengujian antagonis menunjukkan tidak terdapat penghambatan pertumbuhan jamur *Fusarium oxysporum* oleh isolat khamir pada akhir pengamatan.

SUMMARY

Afriyagung Saputra. 145040207111099. Identify Molecularly Three Selected Thermotolerant Yeast Isolates and Their Biological Control Potential to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubeense* on Shallot. Supervised by Dr. Anton Muhibuddin, SP., MP and Antok Wahyu Sektiono, SP., MP.

Yeast is one of microbes which is capable to produce alcohol. The process called fermentation through glycolysis. In agriculture some yeasts can be used as biocontrol agents. However, due to limited facilities and infrastructures, many yeasts were identified conventionally by previous researchers, so It did not guarantee an accurate yeast identity. Therefore molecular identification is needed to find out the identity of yeast accurately, on this study is aim to identify yeast molecularly and find out the potential of yeast antagonistic activities as a result of identification to *Fusarium oxysporum* fungi.

The research methods are divided into three main parts, 1st. Yeasts identification, 2nd. Yeasts characterization and ethanol production, 3rd. Antagonistic activities. Yeasts were growing on broth and solid Yeast Peptone Dextroce (YPD) media containing 1% yeast 2% peptones 2% dextroses, *F.oxysporum* fungi and antagonistic activities testing were growing on Peptone Dextroce Agar (PDA) media.

Molecular identification showed UB5 yeast isolates had a total similarity of 99% to *Kluyvero marxianus*, UB24 isolates had a total similarity of 98% to *Picchia kudriavzevii*, and UB35A yeast isolates had 96% similarity to *K. marxianus*. Fermentation testing compared to control isolates, DMKU-3, known as thermotolerant yeast of *Kluyveromyces marxianus*. Yeast isolates UB35A produced good value ethanol. The results of the antagonistic activities testing showed strain UB5 has the highest average inhibition value. However, the analysis of various data showed all antagonistic activities testing had no significantly inhibition of growth of *Fusarium oxysporum* fungi by yeast isolates at the end of the observation. Based on ethanol productions and antagonistic activities showed there was a correlation.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis haturkan kepada Tuhan Yang Maha Esa karena-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Identifikasi Molekuler Tiga Isolat Khamir Termotoleran Terpilih Serta Potensinya Sebagai Pengendali Hayati Terhadap *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense* Pada Tanaman Bawang Merah”. Pada kesempatan kali ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kakak-kakak dan keluarga besar saya yang selalu memberi motivasi serta dukungan.
2. Dr. Ir. Ludji Pantja Astuti, MS, selaku ketua jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan.
3. Dr. Anton Muhibuddin, SP., MP, selaku dosen pembimbing utama dalam penyusunan skripsi.
4. Antok Wahyu Sektiono, SP., MP, selaku dosen pembimbing pendamping dalam penyusunan skripsi.
5. PPI-Yamaguchi yang telah memberi dukungan kepada saya.
6. Seluruh sahabat saya yang telah memberikan dukungan dan memotivasi saya dalam penyusunan skripsi.

Semoga skripsi ini dapat memberi manfaat bagi seluruh pembaca yang membutuhkan informasi.

Malang, Desember 2018

RIWAYAT HIDUP

Penulis merupakan putra dari (Alm) Piping Priyatna dan (Almh) Siti Rahmah, lahir di Kota Cimahi 13 April 1996. Memulai Pendidikan dasarnya di SDN Bojong 4, Cianjur, kemudian melanjutkan ke SMPN 8 Cimahi, dan menempuh Sekolah Menengah Atas di SMAN 15 Bandung. Selama menempuh pendidikannya di Universitas Brawijaya, penulis menjadi asisten praktikum mata kuliah Dasar Perlindungan Tanaman, Botani di tahun 2015, dan Bioteknologi di tahun 2016. Penulis melaksanakan kegiatan magang kerja di Balai Karantina Pertanian Kelas I Denpasar di tahun 2017.

Selain aktif dalam kegiatan akademik, penulis aktif dalam kegiatan non akademik. Di Tahun 2015 penulis terlibat dalam acara *Indonesian Fair* di Kobe, Jepang untuk memperkenalkan budaya Indonesia. Penulis tergabung dalam kegiatan Unit Aktivitas Paduan Suara Mahasiswa Universitas Brawijaya (UAPSM UB) dan di tahun 2016-2017 penulis diberikan amanah menjadi pengurus bagian divisi keanggotaan alumni dan anggota biasa. Bersama UAPSM UB penulis meraih prestasi di ajang nasional maupun internasional, yaitu peringkat pertama pada perlombaan 3rd Karangturi Choir Games 2015 Semarang kategori *mix choir*, peringkat pertama kategori *folk song* dan peringkat dua kategori *chamber* pada perlombaan Andrea o Veneracion International Choral Festival Manila 2017, Filipina.

DAFTAR ISI

RINGKASAN	i
SUMMARY	5
KATA PENGANTAR.....	6
RIWAYAT HIDUP	7
DAFTAR GAMBAR.....	10
DAFTAR TABEL	11
LAMPIRAN.....	12
1. PENDAHULUAN.....	Error! Bookmark not defined.
1.1 Latar Belakang	Error! Bookmark not defined.
1.2 Rumusan Masalah	Error! Bookmark not defined.
1.3 Tujuan	Error! Bookmark not defined.
1.4 Manfaat	Error! Bookmark not defined.
2. TINJAUAN PUSTAKA	Error! Bookmark not defined.
2.1 Khamir	Error! Bookmark not defined.
2.1.1 Definisi Khamir	Error! Bookmark not defined.
2.1.2 Morfologi Khamir	Error! Bookmark not defined.
2.2 Media Pertumbuhan Khamir	Error! Bookmark not defined.
2.3 Fermentasi Etanol oleh Khamir	Error! Bookmark not defined.
2.4 Identifikasi Khamir	Error! Bookmark not defined.
2.5 Pemanfaatan Khamir sebagai Agens Pengendalian Hayati.....	Error! Bookmark not defined.
2.6 Jamur Patogen <i>Fusarium oxysporum</i>	Error! Bookmark not defined.
2.7 Mekanisme Antagonis	Error! Bookmark not defined.
3. METODOLOGI PENELITIAN.....	Error! Bookmark not defined.
3.1 Waktu dan Tempat.....	Error! Bookmark not defined.
3.2 Alat dan Bahan.....	Error! Bookmark not defined.
3.2.1 Alat.....	Error! Bookmark not defined.
3.2.2 Bahan	Error! Bookmark not defined.
3.3 Metode Penelitian	Error! Bookmark not defined.
3.4 Persiapan Penelitian	Error! Bookmark not defined.
3.4.1 Identifikasi Khamir	Error! Bookmark not defined.
3.4.2 Karakterisasi khamir	Error! Bookmark not defined.

3.4.3 Uji potensi antagonis khamir	Error! Bookmark not defined.
3.4.4 Isolasi jamur patogen	Error! Bookmark not defined.
3.4.5 Purifikasi jamur <i>Fusarium</i>	Error! Bookmark not defined.
3.4.6 Identifikasi jamur <i>Fusarium</i>	Error! Bookmark not defined.
3.5 Pelaksanaan Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
3.5.1 Identifikasi khamir	Error! Bookmark not defined.
3.6 Identifikasi molekuler khamir	Error! Bookmark not defined.
3.6.1 Isolasi DNA genom.....	Error! Bookmark not defined.
3.6.3 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	Error! Bookmark not defined.
3.6.4 Elektroforesis	Error! Bookmark not defined.
3.6.5 Purifikasi DNA	Error! Bookmark not defined.
3.6.6 Elektroforesis	Error! Bookmark not defined.
3.6.7 Persiapan sekuensing	Error! Bookmark not defined.
3.6.8 Karakterisasi Khamir	Error! Bookmark not defined.
3.7 Uji antagonis khamir terhadap jamur <i>Fusarium oxysporum</i>	Error! Bookmark not defined.
3.8 Analisis Data.....	Error! Bookmark not defined.
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	Error! Bookmark not defined.
4.1 Identifikasi Isolat Khamir	Error! Bookmark not defined.
4.1.1 Identifikasi isolat khamir secara makroskopis dan mikroskopis.....	Error! Bookmark not defined.
4.1.2 Identifikasi secara molekuler	Error! Bookmark not defined.
4.2 Karakterisasi Isolat Khamir	Error! Bookmark not defined.
4.2.1 Pertumbuhan adaptasi jangka panjang khamir pada suhu tinggi	Error! Bookmark not defined.
Berdasarkan nilai OD yang didapat, pada inkubasi suhu.....	Error! Bookmark not defined.
4.2.2 Fermentasi alkohol khamir menggunakan metode <i>gas</i>	Error! Bookmark not defined.
4.3 Identifikasi Jamur.....	Error! Bookmark not defined.
4.4 Uji Antagonis Khamir dengan Jamur <i>Fusarium oxysporum</i>	Error! Bookmark not defined.
5. PENUTUP.....	Error! Bookmark not defined.
5.1 Kesimpulan	Error! Bookmark not defined.
5.2 Saran Penelitian	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR PUSTAKA	Error! Bookmark not defined.

LAMPIRAN.....Error! Bookmark not defined.



DAFTAR GAMBAR

Nomor	Teks	Halaman
1.	Mekanisme pembentukan etanol.....	Error! Bookmark not defined.
2.	Peta uji antagonis khamir dengan patogen.....	Error! Bookmark not defined.
3.	Khamir <i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UB5.....	Error! Bookmark not defined.
4.	Khamir <i>Pichia kudriavzevii</i> strain UB24.....	Error! Bookmark not defined.
5.	Khamir <i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UB35A.....	Error! Bookmark not defined.
6.	Elektroforesis hasil isolasi DNA genom.....	Error! Bookmark not defined.
7.	Elektroforesis hasil amplifikasi DNA.....	Error! Bookmark not defined.
8.	Elektroforesis hasil purifikasi DNA.....	Error! Bookmark not defined.
9.	<i>Fusarium oxysporum</i>	Error! Bookmark not defined.
10.	Uji antagonis	Error! Bookmark not defined.



DAFTAR TABEL

Nomor	Teks	Halaman
1.	Nilai OD khamir	Error! Bookmark not defined.
2.	Persentase Produksi Etanol pada Suhu 37 °C	Error! Bookmark not defined.
3.	Persentase Produksi Etanol pada Suhu 40 °C	Error! Bookmark not defined.
4.	Rerata persentase penghambatan <i>F.oxysporum</i>	Error! Bookmark not defined.



LAMPIRAN

Nomor	Teks	Halaman
1.	Gejala <i>Fusarium oxysporum</i>	Error! Bookmark not defined.
2.	Analisis ragam uji antagonis	Error! Bookmark not defined.
3.	Data text file hasil sekuensing	Error! Bookmark not defined.



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Teknologi fermentasi suhu tinggi dengan mikroba termotoleran diharapkan menjadi salah satu teknologi fermentasi generasi di masa depan yang ekonomis, yang dapat mengurangi biaya energi dan produksi karbon dioksida dalam industri fermentasi. Etanol dapat diproduksi secara komersial dengan sintesis kimia atau biosintesis. Sintesis kimia adalah dengan hidrasi etilena (C_2H_4), sedangkan secara biosintesis, dihasilkan melalui proses fermentasi, khamir menggunakan monosakarida sebagai sumber karbon dan kemudian mengkonversi ke etanol melalui glikolisis dalam kondisi anaerobik. Suhu menjadi salah satu faktor yang memengaruhi kemampuan fermentasi khamir secara signifikan, sehingga khamir yang mampu melakukan proses fermentasi pada suhu tinggi diharapkan sebagai mikroba unggulan. Khamir merupakan salah satu mikroorganisme yang memiliki ekologi luas dan mampu hidup di lingkungan yang ekstrim. Indonesia memiliki keragaman khamir karena lingkungannya yang dapat mendukung untuk pertumbuhan khamir.

Banyak peneliti yang mengeksplorasi dan mengidentifikasi khamir dari berbagai sumber yang didapatkannya, seperti buah-buahan, air, tanah, bahkan limbah. Namun karena keterbatasan sarana dan prasarana banyak peneliti sebelumnya yang mengidentifikasi khamir secara konvensional sehingga tidak menjamin memperoleh identitas khamir yang akurat. Oleh karena itu identifikasi molekuler diperlukan untuk mengetahui identitas khamir secara akurat.

Saat ini telah banyak dilakukan penelitian pengujian antagonis beberapa spesies khamir terhadap jamur penyebab penyakit tanaman, dari beberapa penelitian tersebut berhasil didapatkan khamir mampu menekan pertumbuhan jamur patogen tanaman, sehingga pada penelitian ini penulis bermaksud melakukan pengujian potensi antagonisme khamir termotoleran terhadap jamur patogen *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense*. *F.oxysporum* merupakan jamur patogen yang menyebabkan penyakit layu fusarium pada tanaman. Sejauh ini aplikasi fungisida dianggap menjadi jalan yang efektif untuk mengontrol penyakit tanaman. Namun, aplikasi fungisida tidak ramah lingkungan sehingga tidak mendukung untuk sistem

pertanian berlanjut. Oleh karena itu, dibutuhkan penelitian mengenai pengendalian penyakit layu fusarium yang ramah lingkungan.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah khamir termotoleran mampu menghambat pertumbuhan jamur patogen *Fusarium oxysporum*.

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui identitas dan potensi khamir terhadap jamur patogen *Fusarium oxysporum*.

1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi terkait identifikasi molekuler khamir serta mengetahui potensi antagonis yang dimiliki oleh khamir hasil identifikasi terhadap jamur patogen *Fusarium oxysporum*.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Khamir

2.1.1 Definisi Khamir

Khamir adalah organisme eukariotik yang paling sering didefinisikan sebagai jamur uniseluler, meskipun pertumbuhan uniseluler terjadi pada beberapa jamur dan beberapa jenis khamir dapat tumbuh dengan membentuk *pseudo*-hifa atau hifa semu (Mucilli *et al*, 2015). Beberapa khamir merupakan mikroba antagonis golongan fungi, uniseluler eukaryotik yang bersifat saprofit atau parasit serta memiliki antimikroba dan lebih bisa tahan terhadap stress lingkungan (Widiastuti *et al.*,2014).

Khamir bereproduksi secara seksual dan aseksual. Secara seksual, dengan cara membentuk aski atau basidia, dan dikelompokkan ke dalam Askomikota atau Basidiomikota. Sedangkan reproduksi secara aseksual yaitu melalui pembelahan sel sederhana atau dengan cara pelepasan sel tunas dari sel induk. Beberapa jamur terutama khamir tidak membentuk miselium tetapi tumbuh sebagai sel individu yang berkembang dengan tunas atau spesies tertentu dengan cara pembelahan (Rogers, 2011).

2.1.2 Morfologi Khamir

Sel khamir memiliki ukuran yang bervariasi, yaitu dengan panjang 1-5 μm sampai 20 μm dan lebar 1-10 μm . Bentuk sel khamir bermacam-macam, yaitu bulat, oval, silinder atau batang, ogival yaitu bulat panjang dengann salah satu ujung runcing, segitiga melengkung, (*triangular*), botol, apikulat, dan pseudomiselium (Fardiaz, 1985). Menurut (Kavanagh, 2005) Khamir mempunyai ukuran panjang sel berkisar 2-3 μm sampai 20-50 μm dan mempunyai lebar sel 1-10 μm , tidak berflagel, reproduksi secara aseksual yaitu dengan cara *budding* atau *fussion*, atau dapat memproduksi beberapa jenis konidia yang disebut *stalked conidia*, *blastoconidia*, atau *athroconidia*.

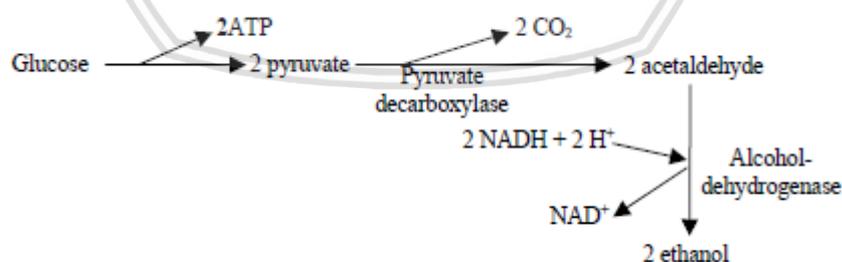
2.2 Media Pertumbuhan Khamir

Media pertumbuhan khamir jangka pendek dapat menggunakan media *yeast extract* dan *maltose* (YM), sedangkan untuk pertumbuhan khamir jangka menengah dan jangka panjang dapat menggunakan media *yeast peptone dextrose*.

Media pertumbuhan khamir setidaknya harus memiliki gula karena khamir akan memanfaatkannya sebagai sumber karbohidrat, seperti contohnya media YM dan YPD. Beberapa khamir dapat merombak maltosa dan dekstrosa atau glukosa yang berada di dalam media tersebut untuk dijadikan energi (Evans, 1996).

2.3 Fermentasi Etanol oleh Khamir

Fermentasi gula menjadi alkohol oleh khamir merupakan salah satu proses penting yang terjadi di industri. Jenis khamir yang umumnya digunakan di industri antara lain adalah *S. cereviceae*, *S. uvarum (carlsbergensis)*, *Sch. pombe* dan *Kluyveromyces*. Khamir memetabolisme glukosa melalui jalur glikolisis. Keseluruhan proses yang terjadi (Gambar 1) diantaranya menghasilkan masing-masing 2 mol etanol, CO_2 dan ATP untuk setiap mol gula yang difermentasi. Sehingga berdasarkan berat maka setiap gram glukosa secara teoritis dapat menghasilkan 51% alkohol. Namun pada kenyataannya rendemen dari proses fermentasi tidak pernah melebihi 90-95% dari nilai teoritisnya. Hal ini berkaitan dengan penggunaan beberapa nutrisi untuk mensintesis biomassa baru dan reaksi lain yang berkaitan dengan pemeliharaan sel. Reaksi samping juga terjadi pada fermentasi (biasanya pada gliserol) yang biasanya mengkonsumsi 4 -5% dari total substrat yang tersedia. Apabila reaksi ini dapat ditiadakan maka akan terjadi penambahan rendemen alkohol sebesar 2,7 % dari total substrat yang digunakan (Roehr, 2001).



Gambar 1. Mekanisme pembentukan etanol dan karbondioksida dalam proses fermentasi.

Daya reduksi NADH yang dihasilkan oleh glikolisis harus ditransfer ke akseptor elektron untuk meregenerasi NAD^+ . Pada fermentasi etanol, produk dekarboksilasi yang dihasilkan bukanlah piruvat melainkan asetaldehid yang

berfungsi sebagai akseptor elektron sementara. Berkaitan dengan glikolisis, fermentasi etanol melibatkan dua reaksi enzimatik tambahan, pertama adalah reaksi katalisis oleh piruvat dekarboksilase dan asam piruvat dekarboksilase yang memiliki tiamin pyrophosphate (TPP) sebagai kofaktor (Ribereau-Gayon *et. al.*, 2000).

Umumnya suhu optimum untuk pertumbuhan khamir adalah sekitar 25-30° C dan maksimum adalah antara 35-47° C. Namun akan menjadi lebih tinggi ketika digunakan khamir yang toleran suhu. Sedangkan pH optimum adalah sekitar 4-5. Menurut Casida (1968) pH pertumbuhan khamir yang baik adalah pada rentang 3-6. Perubahan pH dapat mempengaruhi pembentukan hasil samping fermentasi. Nilai pH pertumbuhan khamir memiliki korelasi positif dengan pembentukan asam piruvat. Pada pH yang tinggi maka fase lag akan lebih singkat dan aktivitas fermentasi akan meningkat. Pengaruh pH pada pertumbuhan khamir juga bergantung pada konsentrasi gula dan etanol yang terbentuk. Nilai pH dapat diturunkan dengan melakukan penambahan asam sitrat dan untuk menaikkan nilai pH dapat digunakan natrium benzoat. Secara teoritis konversi molekul gula menjadi 2 molekul etanol dan 2 molekul CO₂ menurut persamaan Gay Lussac berikut:



2.4 Identifikasi Khamir

Identifikasi adalah membandingkan isolat yang belum diketahui dengan taksa yang sudah ada untuk menetapkan identitasnya (Barnett *et al.*, 2000).

1. Identifikasi secara Konvensional

Sebagian besar spesies jamur dideskripsikan secara konvensional berdasarkan morfologi. Namun demikian, metode tersebut memiliki kelemahan karena morfologi jamur yang sederhana, sehingga hanya sedikit karakter morfologi yang dapat digunakan untuk identifikasi (Geiser, 2004). Identifikasi isolat khamir secara tradisional didasarkan pada penentuan karakteristik morfologi serta fisiologi dan biokimia. Uji biokimia

merupakan metode identifikasi yang paling luas digunakan untuk identifikasi (Chanprasartsuk *et al*, 2013).

2. Identifikasi secara Molekuler

Teknik molekuler dapat digunakan dalam ilmu taksonomi untuk mengidentifikasi suatu spesies. Pengembangan metode PCR dan analisis sequence DNA turut mendukung penggunaan teknik molekuler dalam identifikasi suatu spesies. Metode identifikasi khamir secara molekuler yang umum digunakan dan terbukti akurat untuk mengidentifikasi hingga tingkat spesies adalah metode sequencing DNA (Kruzman & Fell, 2006). Berikut adalah tahapan-tahapan identifikasi secara molekuler:

a. Isolasi DNA

Prinsip isolasi DNA adalah mendapatkan DNA murni yang tidak tercampur dengan komponen sel lainnya seperti protein dan karbohidrat. Metode isolasi yang digunakan dapat mempengaruhi kualitas dan kuantitas DNA yang dihasilkan (Yamada *et al*, 2002).

b. *Polymerase chain reaction* (PCR)

Proses PCR adalah suatu teknik amplifikasi fragmen DNA yang digunakan secara *in vitro* yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda (Setiawan, 2016). Berikut adalah tahapan-tahapan yang ada dalam proses PCR:

1) Denaturasi

Pada tahap ini, cetakan DNA (*DNA template*) dipanaskan sampai suhu 94 C, sehingga pemisahan DNA untai ganda menjadi tunggal. Kedua untai tunggal tersebut menjadi cetakan bagi untai DNA yang baru.

2) Penempelan (*annealing*)

Di tahap ini, terjadi penempelan kedua primer pada rangkaian komplemen di kedua untai DNA untai tunggal. Proses ini memerlukan suhu sekitar 55 C.

3) Pemanjangan (*extension*)

Setelah primer menempel pada untai cetakan DNA, maka enzim DNA *Taq* polymerase dapat memanjangkan primer dan membentuk untai DNA baru.

c. Elektroforesis

Elektroforesis adalah suatu teknik yang mengukur laju perpindahan atau pergerakan partikel-partikel bermuatan dalam suatu medan listrik. Prinsip kerja dari elektroforesis berdasarkan pergerakan partikel-partikel bermuatan negatif (anion), dalam hal tersebut DNA yang bergerak menuju kutub positif (anode), sedangkan partikel-partikel bermuatan positif akan bergerak menuju kutub negatif. Migrasi elektroforesis DNA melalui gel agarose dipengaruhi oleh faktor ukuran dan konformasi molekul DNA, konsentrasi agarosa, arus listrik, dan suhu. Pewarna *etidium bromide* (EtBr) digunakan untuk alat identifikasi dan mengukur fragmen DNA yang terpisah dalam gel.

d. Sekuensing DNA

Penentuan sekuens nukleotida dalam molekul DNA menggunakan DNA sekuens yang dimulai dari basa nitrogen tertentu dalam untaian DNA dan diakhiri pada basa nitrogen tertentu pula dalam urutan DNA. Data sekuens dapat berupa elektroferogram (grafik yang menunjukkan basa-basa yang terekam pada hasil *sequencing* dengan empat warna yang berbeda) dan *text file* (urutan basa-basa hasil *sequencing*) (Setiawan, 2016).

2.5 Pemanfaatan Khamir sebagai Agens Pengendalian Hayati

Dalam pengendalian penyakit tanaman terdapat beberapa mikroba yang dapat dimanfaatkan sebagai mikroba antagonis. Mikroba antagonis adalah organisme yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba penyebab penyakit pada tanaman seperti jamur patogen. Mikroba antagonis merupakan suatu jasad renik yang dapat menekan, menghambat dan memusnahkan mikroba lainnya. Dengan demikian mikroba antagonis berpeluang sebagai agen hayati dalam pengendalian mikroba penyebab penyakit tanaman (Intan, R., *et al*, 2014).

Beberapa antagonis ragi efektif sebagai agen biokontrol untuk mengendalikan kerusakan jeruk, seperti *Pichia membranefaciens*, *Pichia guilliermondii*, *Candida oleophila*, *Candida fermata*, *Candida sake*, *Candida saitoana* Nakase & Suzuki, *Aureobasidium pullulans*, *Saccharomyces cerevisiae* (Liu Y, 2017). Selain itu beberapa jenis khamir yang memiliki kemampuan sebagai agens pengendali hayati adalah khamir *Rhodotorula* sp yang dieksplorasi dari buah cabai mampu menekan kejadian penyakit pada buah cabai sebesar 42,08%. Khamir *Zygosaccharomyces* sp., *Cryptococcus* sp., dan *Rhodotorula* sp. mampu menekan kejadian penyakit pada buah buncis sebesar 35,66%. Khamir *Metschnikowia* sp. mampu menekan kejadian pada buah stroberi sebesar 54,93% (Puspitasari *et al.*, 2014).

2.6 Jamur Patogen *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum merupakan patogen tanaman yang menyebabkan layu fusarium, termasuk ke dalam golongan Kingdom Mycota, Phylum Deuteromycota, Kelas Deuteromycetes, Ordo Moniliales, Famili Tuberculariaceae, Genus Fusarium, Spesies *Fusarium oxysporum* (Sastrahidayat, 2009). *F.oxysporum* membentuk konidium pada suatu badan yang disebut sporodokium yang dibentuk pada permukaan tangkai atau daun sakit pada tangkai yang telah tua. Jamur ini membentuk banyak mikrokonidium bersel satu atau dua, tidak berwarna (hialin), lonjong atau bulat telur berukuran 6-15 x 2,5-4 μm . Makrokonidium lebih jarang terdapat, berbentuk sabit, bertangkai kecil, hialin, kebanyakan bersekat dua atau tiga (Semangun, 2001).

Gejala penyakit yang ditunjukkan oleh *F.oxysporum* pada umumnya adalah pemucatan pada daun dan tangkai yang merunduk. Daun menguning, pertama kali muncul pada daun tua, selanjutnya daun layu dan mati, dan gejala berlanjut ke daun muda. Satu persatu cabang-cabang mulai terinfeksi. Dalam beberapa minggu penyakit berkembang sangat cepat, pencoklatan pada pembuluh dapat dilihat pada pangkal batang. Keseluruhan tanaman akhirnya terinfeksi, dan biasanya kejadian ini menyebabkan layu pada keseluruhan pada tanaman, hingga akhirnya mati, dan batang kering seperti kayu (Walker, 1952).

2.7 Mekanisme Antagonis

Mekanisme pengendalian dengan agen hayati terhadap jamur patogen tumbuhan secara umum dibagi menjadi tiga macam, yaitu kompetisi terhadap tempat tumbuh dan nutrisi, antibiosis, dan parasitisme (Baker dan Cook, 1982) . Umumnya kematian mikroorganisme disebabkan kekurangan nutrisi, oleh karena itu pengendalian dengan agen hayati salah satunya bertujuan untuk memenangkan kompetisi dalam mendapatkan nutrisi (Berlian, 2013). Mekanisme penghambatan khamir antagonis terhadap kapang patogen dapat terjadi melalui: kompetisi ruang dan nutrien, antibiosis, parasitisme, dan predasi (Pimenta *et al.*, 2007).



3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan di *Biochemistry Laboratory (JYOSEI Laboratory) Old Building Faculty of Agriculture*, Universitas Yamaguchi, Jepang dan Laboratorium Bio Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari hingga Oktober 2018.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri “Toyo Petri schale”, *beaker glass*, timbangan digital “Sartorius L420S”, komputer, panci, tabung reaksi “Pyrex”, botol media “Wheaton”, gelas ukur “Pyrex”, *magnetic stirrer* “HS-50E”, stir bar, autoklaf “Sakura ASV-2402”, mikropipet “Eppendorf”, tip, *microwave* “Toshiba Twin Sensor ER 470JF”, vortex “TM 2000”, *centrifuge* “Himac CF 15RX dan Kubota 3740”, inkubator “Yamato IS42”, elektroforesis “TaKaRa Mupid-eXu”, *Polymerase chain reaction (PCR)* “TaKaRa Thermal Cycler Dice Mini”, *vacuum pumps* “Linicon LV660”, *object glass*, *cover glass*, pipet ukur, bola hisap, oven “Yamato DX 600”, mikroskop, spektrofotometer “Biochrom Libra S12”, kamera, rak media kultur, LAFC, gunting, spidol, sendok, bunsen, korek api, jarum Ose, kompor, *shaker* “Bio-Shaker BR40LF”, *incubator waterbath* “Thermominder mini 80 dan Thermominder 50 mini N”, *microrcentrifuge room suhu* “KR-8000”, kulkas (-22°C) “Biomedical Freezer MDF-U338”, *printgraph* “Bioinstrumen Atto”, *Video graphic printer* “UP-895”, *Scanner* “EPSON GT-X820”, *microtube*, *QIAquick PCR Purification Kit*, *PCR microtube*, *centrifuge room suhu* “Himac CT-15D”, mesin sekuensing “Beckman coulter”.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat khamir UB5 yang berasal dari tanah pinggir sungai Wonokromo, UB24 yang berasal dari buah sirsak, dan UB35A yang berasal dari tape, tanaman bawang merah yang bergejala layu *Fusarium*, *yeast extract powder*, peptone, gula glukosa, *agarose for electrophoresis* 0,9%, akuades, es batu, *sorbitol buffer*, enzim zymolase, *yeast*

resuspension buffer, larutan 10% SDS, larutan 5 M CH₃COOK, phenol chloroform, isopropanol, 10 mg/ml RNase, larutan 3 M, CH₃COONa, larutan TE pH 7,4, *marker for electrophoresis*, 10x *loading buffer*, kertas parafilm, larutan TAE 1x, larutan *Ethidium Bromide* (EtBr), dNTP mix, 10x *ExTaq Buffer*, primer NL 1 10mM, primer NL 4 10 mM, enzim Ex Taq, larutan *PB buffer*, larutan *PE buffer*, larutan *EB buffer*, etanol 99,5%, primer NL 1 1,6 mM, primer NL 4 1,6 mM, etanol 70%, larutan *stop loading solution* (SLS), larutan 3 M sodium asetat (pH 5,2), 100 mM larutan Na-EDTA (pH 7), DNA *template*, DTCS *Quick start master mix*, 20 mg/ml glycogen, *sequence buffer*, *sequence oil*, larutan NaOCl, QIAQuick PCR Purification Kit.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian terdiri dari tiga tahap, yaitu (1). Identifikasi khamir: (a) identifikasi isolat secara makroskopis dan mikroskopis (b) identifikasi molekuler: isolasi DNA, amplifikasi DNA, visualisasi DNA, dan purifikasi DNA (c) persiapan sekuensing: presipitasi etanol dan amplifikasi DNA (d) sekuensing atau pembacaan urutan basa nukleotida menggunakan mesin sekuensing Beckman Coulter dan analisis bioinformatik menggunakan program MEGA 7 dan BLAST. (2). Karakterisasi adaptasi jangka panjang khamir pada suhu tinggi dan uji fermentasi. (3). Uji potensi antagonis khamir: uji pertumbuhan khamir dengan jamur *Fusarium oxysporum* pada media PDA dengan metode *dual culture*.

3.4 Persiapan Penelitian

3.4.1 Identifikasi Khamir

a. Pembuatan media cair dan media padat untuk pertumbuhan isolat khamir

Media pertumbuhan yang digunakan pada penelitian ini adalah *Yeast peptone dextrose* (YPD) agar dan cair. Komposisi media 100 ml YPD cair adalah 1 gram *yeast extract powder*, 2 gram pepton, 2 gram glukosa, dan 100 ml aquades, sedangkan untuk media YPD agar komposisi sama dengan YPD cair tetapi ditambah 1,5 gram agar.

Langkah pembuatan media dimulai dengan menyiapkan alat dan bahan. *Beaker glass* berukuran 100 ml. Komposisi bahan-bahan di atas ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik, kemudian

dicampurkan bersama aquades kecuali glukosa, karena jika dicampurkan bersamaan pada tahap selanjutnya yaitu proses sterilisasi menggunakan autoclave, larutan akan mengalami reaksi *browning* sehingga pada proses pencampuran awal glukosa dipersiapkan secara terpisah. Proses pencampuran larutan dilakukan dengan menggunakan *plate magnetic stirrer*, jika bahan-bahan telah larut, larutan dipindahkan ke botol media dan disterilisasi menggunakan *autoclave*.

Setelah proses sterilisasi glukosa dicampurkan ke dalam larutan *yeast extract powder* dan pepton, larutan dihomogenkan dengan cara diaduk secara manual. Jika campuran bahan sudah terlihat larut, media agar dituangkan ke dalam cawan Petri dan apabila tekstur media telah memadat, media disimpan di lemari pendingin.

b. Perbanyak Khamir

Perbanyak khamir dilakukan pada media cair dan media padat. Perbanyak pada media padat mengacu pada metode yang dilakukan oleh Suprayogi *et al.* (2015), yaitu dengan metode streak sebanyak 3 sisi pada media YPD agar yang telah dibuat. Kultivasi dilakukan dengan cara diinkubasi pada suhu 30 °C selama 48 jam, sedangkan perbanyak pada media YPD cair mengacu pada metode yang dilakukan Suprayogi *et al.* (2015), yaitu dengan cara diambilnya koloni sel tunggal yang telah tumbuh pada media YPD agar, sel dimasukkan ke dalam 5 ml YPD cair dan diinkubasi pada suhu 30 °C dan dibawah kecepatan shaker sebesar 180 rpm selama 18-20 jam.

3.4.2 Karakterisasi khamir

a. Pembuatan media cair dan media padat untuk pertumbuhan isolat khamir

Mengacu kepada metode Suprayogi *et al.* (2015). Komposisi media 100 ml YPD cair adalah 1 gram *yeast extract powder*, 2 gram pepton, 2 gram glukosa, dan 100 m aquades, sedangkan untuk media YPD agar komposisi sama dengan YPD cair tetapi ditambah 1,5 gram agar.

Langkah pembuatan media dimulai dengan menyiapkan alat dan bahan. *Beaker glass* berukuran 100 ml. Komposisi bahan-bahan di atas

ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik. Kemudian dicampurkan bersama aquades kecuali glukosa, karena jika dicampurkan bersamaan pada tahap selanjutnya yaitu proses sterilisasi menggunakan autoclave, larutan akan mengalami reaksi *browning* sehingga pada proses pencampuran awal glukosa dipersiapkan secara terpisah. Proses pencampuran larutan dilakukan dengan menggunakan *plate magnetic stirrer*, jika bahan-bahan telah larut, larutan dipindahkan ke botol media dan disterilisasi menggunakan *autoclave*.

Setelah proses sterilisasi glukosa dicampurkan ke dalam larutan *yeast extract powder* dan pepton, larutan dihomogenkan dengan cara diaduk secara manual. Jika campuran bahan sudah terlihat larut, media agar dituangkan ke dalam cawan Petri dan apabila tekstur media telah memadat, media disimpan di lemari pendingin.

b. Perbanyak isolat pada media padat

Perbanyak mengacu pada metode yang dilakukan oleh Suprayogi *et al.* (2015), yaitu dengan metode streak sebanyak 3 sisi pada media YPD agar yang telah dibuat. Perbanyak dilakukan dengan cara diinkubasi pada suhu 30 °C selama 48 jam.

c. Pembuatan media untuk pengujian fermentasi

Dalam satu botol *flask* media mengandung 10 gram tepung tapioka, 2 gram pepton, 6,2 gram *yeast extract*, dan dilarutkan ke dalam 80 ml aquades. Setelah seluruh bahan dilarutkan di dalam *flask*, media disterilisasi menggunakan autoclave. Di samping itu larutan enzim amilase disiapkan, 0,24 gram enzim dilarutkan ke dalam 120 ml aquades, dimana nantinya larutan enzim ini akan dituangkan sebanyak 20 ml ke dalam *flask* media yang telah disterilisasi.

3.4.3 Uji potensi antagonis khamir

a. Pembuatan media padat untuk pertumbuhan isolat

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media PDA. Pembuatan media mengacu pada Nurlala *et al.* (2016). Komposisi yang dibutuhkan untuk membuat 1000 ml media diperlukan 39 gram PDA instan.

Cara pembuatannya adalah 1000 ml aquades dituangkan ke dalam *beaker glass* berukuran 1000 ml. Kemudian masukan 39 gram bubuk media PDA dan dilarutkan. Setelah media larut selanjutnya media dimasukkan ke dalam botol media lalu disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C tekanan 2 atm selama 20 menit. Media yang telah jadi dituangkan ke dalam cawan Petri dan disimpan pada suhu ruang.

3.4.4 Isolasi jamur patogen

Tanaman bawang merah yang memiliki gejala terserang penyakit layu fusarium diisolasi menggunakan metode Shofiana *et al.* (2015). yaitu sampel tanaman yang terindikasi gejala layu fusarium dicuci menggunakan NaOCl selama 1 menit. Kemudian direndam di dalam alkohol 1 menit sebanyak 2 kali ulangan. Setelah itu sampel dibilas menggunakan alkohol. Keringkan sampel di atas tisu steril. Setelah kering, potongan sampel ditanam di dalam cawan Petri media PDA selama 5-7 hari.

3.4.5 Purifikasi jamur *Fusarium*

Jamur yang telah diisolasi dipurifikasi untuk mendapatkan biakan murni. Cara kerja mengacu pada metode Shofiana *et al.* (2015) yaitu jamur yang telah diisolasi diambil dan dipisahkan ke dalam media PDA yang baru dengan menggunakan jarum Ose. Apabila jamur yang tumbuh masih ditemukan jamur lainnya, maka harus dilakukan purifikasi kembali.

3.4.6 Identifikasi jamur *Fusarium*

Identifikasi dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis untuk memastikan apakah jamur patogen yang didapatkan sesuai dengan yang diharapkan atau tidak. Pengamatan makroskopis meliputi pengamatan morfologi koloni, sedangkan pengamatan mikroskopis dengan cara melihat hifa, melihat adanya *clamp connection*, warna hifa, bentuk hifa menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100 x.

Langkah kerja identifikasi mengacu pada metode Shofiana *et al.* (2015) yaitu menyiapkan *object glass*, sedikit bagian media PDA diambil menggunakan jarum Ose, bertujuan memberikan nutrisi pada saat preparasi. Kemudian jamur patogen diambil menggunakan jarum Ose dan diletakkan pada

object glass bersamaan dengan media PDA yang sebelumnya telah diletakkan dan ditutup dengan *cover glass*. Selanjutnya melihat jamur secara mikroskopis menggunakan mikroskop.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Identifikasi khamir

a. Identifikasi morfologi khamir secara makroskopis dan mikroskopis

Sebelum dilakukan identifikasi molekuler, khamir terlebih dahulu diidentifikasi secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis meliputi pengamatan morfologi koloni yang tumbuh pada media agar berupa warna, tekstur, tepi permukaan, dan tepi koloni. Pengamatan secara mikroskopis dilakukan terhadap bentuk sel, tipe reproduksi, miselium, pseudohifa, spora, dan pembelahan sel (Kurtzman *et al.*, 2011).

Langkah kerja identifikasi secara mikroskopis mengacu pada metode Talukder *et al.* (2016), yaitu kultur dari tabung reaksi diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam *microtube*, disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm pada suhu 4 °C selama 5 menit. Supernatan dibuang dan disentrifugasi kembali dengan kondisi sentrifugasi yang sama dengan sebelumnya. Setelah itu sisa residu dari media dibuang sampai hanya tersisa pellet, kemudian ditambah 1ml akuades steril lalu divortex. Selanjutnya kultur diletakkan pada *object glass* dan ditutup dengan *cover glass*. *Cover glass* disquash untuk menghilangkan gelembung di bawah *cover glass*. Tahap terakhir yaitu mengamati khamir secara mikroskopis menggunakan mikroskop yang diamati dengan perbesaran lensa 400x.

3.6 Identifikasi molekuler khamir

3.6.1 Isolasi DNA genom

Sel khamir diambil sebanyak 3 ml (masing-masing 1,5 ml) dan dilakukan sebanyak dua kali. Sel pelet dikoleksi dengan menggunakan sentrifuge sebesar 5000 rpm pada suhu 4 °C selama 5 menit. Sentrifuge diulangi dua kali (dari setiap kultur sel yang diambil sebanyak 1,5 ml). Sel pellet disuspensi menggunakan 500 µl sorbitol buffer dan ditambahkan 0,1 µl. Sel

diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit di dalam *waterbath*. Setelah itu disentrifuge dengan kecepatan sebesar 14000 rpm pada suhu 4 °C selama 1 menit. Sel pellet dikoleksi dan diresuspensi menggunakan 500 µl *yeast resuspension buffer*, ditambahkan 50 µl SDS 10% dan langsung diinversi secara cepat, kemudian diinkubasi pada suhu 65 °C selama 30 menit di dalam *waterbath*. Setelah proses inkubasi, kultur sel ditambahkan 200 µl 5 M CH₃COOK (Potasium asetat) dan diinkubasi di dalam es selama 45-60 menit. Selanjutnya, sampel disentrifuge dengan kecepatan sebesar 14000 rpm pada suhu 4 °C selama 5 menit.

Supernatan dipindahkan ke dalam *microcentrifuge tube* yang baru, ditambahkan isopropanol sebanyak volume yang sama dengan supernatan yang telah dipindakan dari tube yang sebelumnya ke tube yang baru. Setelah itu sel diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang dan disentrifuge dengan kecepatan sebesar 14000 rpm pada suhu 4 °C selama 5 menit. DNA yang mengendap dikoleksi dan residu isopropanol dibuang dengan menggunakan pipet. Setelah itu dikeringkan menggunakan dryer selama 5-10 menit. Jika sudah, sel dilarutkan dengan cara ditambahkan 150 µl larutan TE pH 7,4. Selanjutnya ditambahkan 3 µl 10mg/ml RNase dan diinkubasi kembali pada suhu 37 °C selama 30 menit di dalam *waterbath*.

Setelah diinkubasi sel ditambahkan 30 µl 3 M Na-asetat (NaOAc) pH 7 dan dihomogenkan, ditambahkan kembali isopropanol sebanyak 200 µl dan dihomogenkan. Seperti tahapan sebelumnya sel disentrifuge dengan kecepatan sebesar 14000 rpm pada suhu 4 °C selama 5 menit. DNA yang mengendap dikoleksi dan residu isopropanol dibuang dengan menggunakan pipet. Setelah itu dikeringkan menggunakan dryer selama 5-10 menit, dan tahapan terakhir yaitu pelarutan DNA dengan cara ditamhakkannya 50 µl larutan TE pH 7,4.

3.6.2 Elektroforesis

Terdiri dari dua tahapan, pertama adalah persiapan gel agarose, tahapan kedua adalah proses elektroforesis itu sendiri.

Pembuatan gel agarose adalah dengan komposisi 0,9 gram agarose dalam 100 ml larutan 1 M TAE. Agarose ditimbang sebanyak 0,9 gram dan dimasukkan ke dalam 100 ml larutan 1 M TAE, dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Kemudian dipanaskan menggunakan *microwave*, setelah hangat gel agarose dituangkan ke dalam cetakan.

Tahap berikutnya yaitu pencampuran bahan-bahan, yaitu isolat genom, 10x loading dye buffer, dan TE 1x pH 8. Larutan TE 1x pH 8 diambil sebanyak 2 μ l dan dipindahkan di atas fial film. Larutan TE 1x dicampur dengan loading dye buffer sebanyak 1 μ l. Selanjutnya bahan isolat genom diambil sebanyak 2 μ l dan dicampurkan dengan larutan TE 1x pH 8 dan loading dye buffer yang telah dicampurkan sebelumnya.

Setelah semua bahan tercampur, larutan dipindahkan dari atas fial ke dalam sumuran gel agarose yang telah diletakkan ke dalam mesin elektroforesis hingga terendam larutan TAE 1x. Pada bagian sumuran yang paling ujung disisakan sebagai tempat *marker* sebanyak 3 μ l, dan setelah semua sampel diletakkan serta *marker* pada sisi sumuran yang paling ujung, mesin elektroforesis dinyalakan dengan kekuatan listrik 100 V selama 40 menit.

3.6.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Sebelum masuk ke dalam tahapan mesin PCR, terlebih dahulu bahan-bahan dipersiapkan untuk pembuatan mix yang akan dicampurkan dengan sampel yang telah didapatkan. Pembuatan mix untuk 1 sampel isolat genom diperlukan 37,75 μ l aquades steril, 5 μ l 10x Tag Buffer, 4 μ l dNTP, 1 μ l Primer F, 1 μ l primer R, dan 0,25 μ l Ex Taq yang dicampurkan ke dalam *PCR tube* dan dihomogenkan dengan cara *dispind down*. Setelah bahan mix tercampur, 1 μ l sampel isolat genom dicampurkan dengan larutan mix dan dihomogenkan dengan cara yang sama, yaitu *dispind down*.

Kemudian tahap berikutnya adalah proses PCR, sampel diletakkan di dalam mesin PCR. Pengaturan kondisi PCR yang dilakukan adalah sebagai berikut: 98 °C pra denaturasi, 98 °C denaturasi, 52 °C annealing, 72 °C

elongasi, 72 °C final elongasi, dan kondisi terakhir yaitu penyimpanan pada suhu 4 °C. Proses PCR dilakukan sebanyak 35 kali ulangan.

3.6.4 Elektroforesis

Langkah kerja elektroforesis dilakukan seperti pada langkah kerja sub sub bab 3.6.2.

3.6.5 Purifikasi DNA

Produk hasil amplifikasi dimasukkan ke dalam *microtube* dan ditambah 245 µl larutan PB buffer, disentrifuge dengan kecepatan 13000 rpm selama 1 menit dua kali ulangan. Residu buffer dibuang, setelah itu ditambahkan 750 µl PE buffer, disentrifuge kembali dengan kondisi yang sama dan setelahnya residu dibuang. Dipindah ke *microtube* ukuran 1,5 ml dan dicampurkan dengan 30 µl larutan EB buffer. Diinkubasi selama 5 menit, selanjutnya tahap terakhir disentrifuge dengan kecepatan 13000 rpm selama 1 menit.

3.6.6 Elektroforesis

Langkah kerja elektroforesis dilakukan seperti pada langkah kerja sub sub bab 3.6.2.

3.6.7 Persiapan sekuensing

a. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Sebelum masuk ke tahapan sekuensing, sampel hasil purifikasi diamplifikasi menggunakan primer *forward* atau *reverse*. Proses PCR mengacu pada metode Ali *et al.* (2016) yaitu dengan kondisi PCR sebagai berikut: 96 °C pra denaturasi, 96 °C denaturasi selama 10 detik, 52 °C annealing selama 30 detik, 72 °C elongasi selama 1 menit 35 detik, 72 °C final elongasi 5 menit, dan kondisi terakhir yaitu penyimpanan pada suhu 4 °C dengan jangka waktu tak terhingga.

Seperti persiapan proses amplifikasi sebelumnya yaitu terlebih dahulu bahan-bahan dipersiapkan untuk pembuatan mix yang akan dicampurkan dengan sampel yang telah didapatkan dari hasil purifikasi. Pembuatan mix untuk 1 sampel diperlukan 4 µl aquades steril, 1 µl DTCS *master mix*, 1 µl primer NL 1 1,6 mM, 1 µl primer NL 4 1,6 mM, seluruh bahan dicampurkan ke dalam *PCR tube* dan dihomogenkan dengan cara

dispind down. Setelah bahan mix tercampur, DNA *template* dicampurkan dengan larutan mix dan dihomogenkan dengan cara yang sama, yaitu *dispind down*. Kemudian tahap berikutnya adalah proses PCR, sampel diletakkan di dalam mesin PCR. Proses PCR dilakukan sebanyak 35 kali ulangan.

b. Presipitasi etanol (*Ethanol Precipitation*)

Langkah kerja mengacu pada Standar Operasional Prosedur (SOP) laboratorium. Produk purifikasi disentrifugasi menggunakan *microcentrifuge room suhu* kemudian dipindah ke *microtube* berukuran 1,5 ml. Setelah itu ditambahkan 1 μ l larutan 3 M sodium asetat (pH 5,2), 1 μ l larutan 100 mM EDTA (pH 8,0), dan 0,5 μ l glycogen. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm pada suhu 4 °C selama 15 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan 30 μ l dengan etanol 99,5% pada suhu ruangan lalu dihomogenkan. Sampel disentrifugasi kembali dengan kondisi sentrifugasi yang sama dengan sebelumnya, supernatant dibuang kembali dan ditambahkan 100 μ l etanol 70 % pada suhu ruangan. Kemudian sampel disentrifugasi untuk yang terakhir pada proses presipitasi ini, yaitu dengan kondisi kecepatan 14.000 rpm pada suhu 4 °C selama 5 menit. Supernatan dibuang dan sampel dikeringkan menggunakan *vacuum pumps* selama 10 menit lalu dibungkus menggunakan *aluminium foil* dan disimpan pada suhu 4 °C.

b. Sekuensing

Proses pembacaan untai nukleotida DNA menggunakan mesin sekuensing Backman Counter.

3.6.8 Karakterisasi Khamir

a. Uji pertumbuhan isolat pada media YPD cair

Koloni tunggal khamir yang tumbuh pada media YPD agar dilakukan perbanyakan ke dalam 5 ml media YPD cair di dalam *bench clean*.

b. Adaptasi jangka panjang pada suhu tinggi

Khamir yang telah dilakukan perbanyakan pada media YPD cair, diinkubasi di dalam inkubator dengan kondisi suhu awal 37 °C pada kecepatan agitasi 180 rpm. Setiap satu minggu sekali isolat khamir

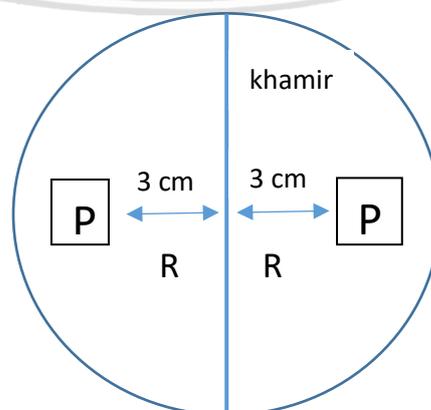
dilakukan peremajaan ke media yang baru dan setiap dua minggu sekali suhu inkubator dinaikkan 1 °C.

c. Uji produksi alkohol

Khamir yang telah dilakukan perbanyakan pada media YPD cair makan akan dilakukan pengukuran OD untuk menyeragamkan kultivasi pada media tapioka yang telah disiapkan di dalam *flask*. Setelah OD diseragamkan, isolat khamir dikultivasi pada media larutan tapioka dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30 °C dan juga dibuat ulangan berikutnya yang diinkubasi pada suhu 40 °C. Pada jam ke 6, 12, 24, 36, dan 48, isolat khamir dikoleksi untuk menghitung hasil produksi alkohol yang dihasilkan menggunakan metode *gas chromatograph*.

3.7 Uji antagonis khamir terhadap jamur *Fusarium oxysporum*

Pengujian antagonis dilakukan secara *in vitro*. Uji antagonis isolat khamir dengan jamur patogen *Fusarium oxysporum*. Terdapat 4 perlakuan termasuk 1 perlakuan kontrol sebagai pembanding. Pengujian antagonis menggunakan metode oposisi langsung (Gambar 2) mengacu pada Shofiana *et al.* (2015). Khamir digoreskan sebanyak 1 kali secara tegak lurus menggunakan jarum ose pada bagian tengah media PDA agar di dalam cawan petri. Kemudian isolat murni patogen diambil menggunakan jarum ose dan diinokulasi pada bagian sisi goresan khamir dengan jarak \pm 3 cm, setelah itu media diinkubasi pada suhu ruang dan diamati selama 7 hari dengan cara mengukur lebar zona hambat khamir terhadap jamur patogen *F.oxysporum* setiap harinya.



Gambar 1. Peta uji antagonis khamir dengan patogen

Presentase tingkat hambat relatif terhadap patogen dihitung dengan rumus mengacu pada Begum *et al.* (2008), rumusnya adalah sebagai berikut:

$$THR = \frac{dk-dp}{dk} \times 100\%$$

Dimana THR adalah presentase tingkat hambatan relatif terhadap pertumbuhan patogen, **dk** adalah Jumlah jari-jari (r1+r2) koloni patogen tanpa perlakuan khamir (kontrol), dan **dp** adalah Jumlah jari-jari (r1+r2) koloni patogen yang diberi perlakuan khamir.

3.8 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif kualitatif. Penelitian ini terbagi menjadi 3 tahap, yaitu identifikasi, uji fermentasi khamir dan uji antagonis. Isolat diidentifikasi sampai tingkat spesies menggunakan metode bioinformatika *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dalam jaringan pada alamat website <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

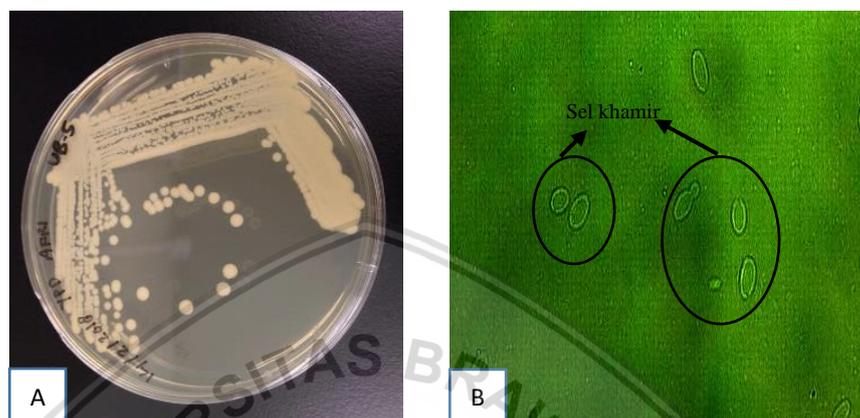
Data yang diperoleh dari uji antagonis khamir dengan jamur patogen *Fusarium oxysporum* akan dianalisis menggunakan analisis ragam (ANOVA) dan jika terdapat hasil nilai yang berbeda nyata pada pengujian antagonis, analisis akan dilanjutkan dengan uji perbandingan Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf kesalahan 5%.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Identifikasi Isolat Khamir

4.1.1 Identifikasi isolat khamir secara makroskopis dan mikroskopis

a. *Kluyveromyces marxianus* strain UB5.

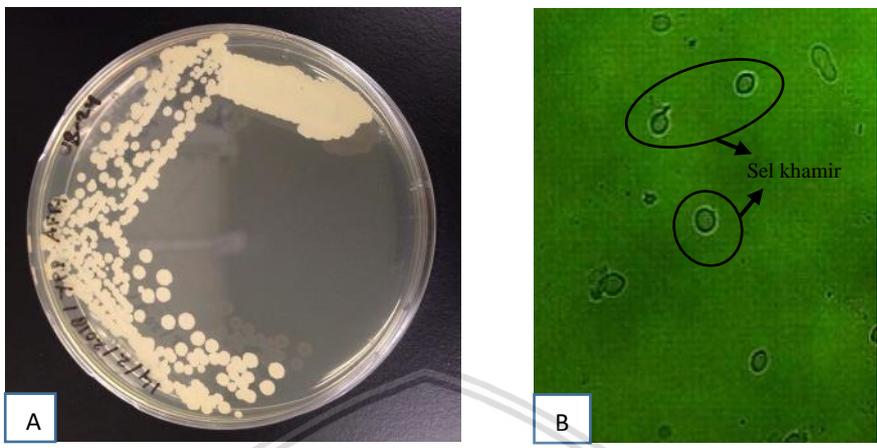


Gambar 1. Khamir *Kluyveromyces marxianus* strain UB5. A: koloni khamir umur 3 hari pada media YPD, B: sel khamir pada perbesaran 400x.

Berdasarkan pengamatan makroskopis yang dilakukan, isolat khamir UB5 memiliki ciri-ciri berbentuk koloni tunggal bulat, berwarna putih kekuningan dengan tekstur yang padat, dan permukaan koloni mengkilap. Hasil inkubasi selama 3 hari pada suhu 30 °C khamir tumbuh membentuk garis yang padat, koloni khamir memiliki elevasi datar, sedangkan pengamatan mikroskopis menunjukkan khamir memiliki ciri-ciri sel berbentuk bulat agak panjang, sel khamir berupa tunggal maupun berpasangan.

Mengacu pada Kurtzman *et al.* (2011) khamir *K.marxianus* memiliki ciri-ciri bentuk sel yang bervariasi, yaitu bulat, bulat telur, terkadang silinder. Sel dapat berupa sel tunggal, berpasangan, atau rantai, bereproduksi dengan cara pertunasan multilateral, dan permukaan mengkilap. Ciri-ciri tersebut memiliki ciri-ciri yang ditunjukkan pada isolat UB 5 melihat dari hasil identifikasi baik secara makroskopis maupun mikroskopis.

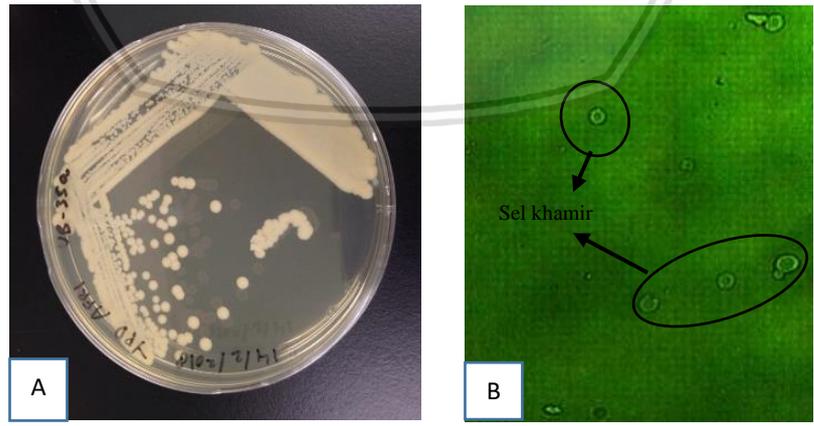
b. *Pichia kudriavzevii* strain UB24



Gambar 2. Khamir *Pichia kudriavzevii* strain UB24, A: koloni khamir umur 3 hari pada media YPD, B: sel khamir pada perbesaran 400x.

Berdasarkan hasil pengamatan makroskopis isolat khamir UB24 setelah diinkubasi tiga hari pada suhu 37 °C memiliki ciri-ciri makroskopis sebagai berikut, bentuk koloni bulat, permukaan koloni mengkilap, berwarna putih kekuningan dan elevasi datar. Ciri-ciri makroskopis yang dimiliki sebenarnya tidak jauh berbeda dengan isolat khamir UB5 dan UB35A. Namun Isolat khamir UB24 memiliki koloni tunggal yang lebih rapat dibandingkan isolat khamir UB5 dan UB35A.

c. *Kluyveromyces marxianus* strain UB35A

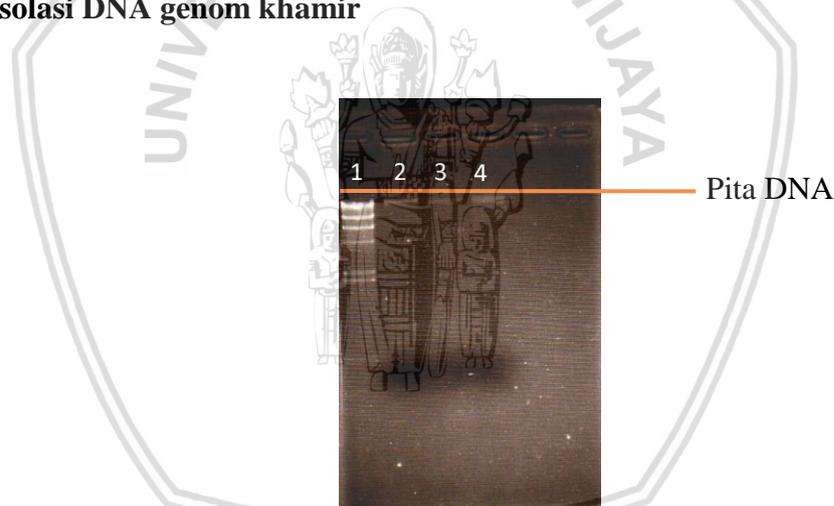


Gambar 3. Khamir *Kluyveromyces marxianus* strain UB35A. A: koloni khamir umur 3 hari pada media YPD, B: sel khamir pada perbesaran 400x.

Berdasarkan pengamatan makroskopis, isolat khamir UB35A ini memiliki ciri-ciri yang sama dengan isolat khamir UB5, yaitu koloni yang mengkilap, berbentuk bulat, koloni khamir berwarna putih kekuningan, elevasi datar (Gambar 5), sedangkan pengamatan mikroskopis menunjukkan khamir memiliki ciri-ciri sel berbentuk bulat agak panjang, sel khamir berupa tunggal maupun berpasangan (Gambar 5). Ciri-ciri yang ditemukan setelah isolat khamir UB35A diinkubasi selama 3 hari pada suhu 30 °C sesuai dengan pernyataan Kurtzman (2011) bahwa khamir *K.marxianus* memiliki ciri-ciri koloni yang berwarna putih, bentuk koloni bulat, permukaan koloni yang mengkilap, dan bertepi rata, sedangkan secara mikroskopis sel berbentuk bulat telur, sel tunggal atau berpasangan, dan bertunas secara multilateral.

4.1.2 Identifikasi secara molekuler

a. Isolasi DNA genom khamir



Gambar 4. Elektroforesis hasil isolasi DNA genom. (1) *marker* DNA, (2) isolat khamir UB5, (3) isolat khamir UB24, (4) isolat khamir UB35A.

Berdasarkan hasil fotograf elektroforesis yang dilakukan, ketiga gen isolat khamir berpendar pada fotograf (Gambar 6) sehingga dilakukan perlakuan tahap selanjutnya, yaitu amplifikasi DNA. Pada elektroforesis hasil isolasi genom pita DNA berpendar. Isolat khamir UB24 berpendar, tetapi terlihat tipis. Hal ini tidak menjadi masalah karena tahapan selanjutnya DNA akan diamplifikasi sehingga akan memperjelas tampilan visual pada saat dilakukan elektroforesis, pita DNA yang berpendar akan

lebih jelas. Menurut Pradipta (2012) pita DNA yang tipis tidak menjadi masalah karena pada hasil isolasi telah terdapat DNA yang diinginkan sehingga stok DNA yang dibuat tersebut dapat dilakukan proses amplifikasi.

Pada dasarnya, isolasi genom ini merupakan uji kualitatif, bukan uji kuantitatif karena kita hanya melihat apakah terdapat gen dari hasil isolasi yang kita lakukan.

b. Amplifikasi DNA

Hasil isolasi genom yang didapatkan, dilakukan proses amplifikasi DNA, yaitu penggandaan untai DNA agar untai DNA terlihat lebih jelas pada hasil metode elektroforesis. Proses visualisasi amplifikasi DNA ini menggunakan media yang sama dengan proses visualisasi isolasi genom dan purifikasi DNA yaitu menggunakan media agarose 0,9% dengan metode elektroforesis.



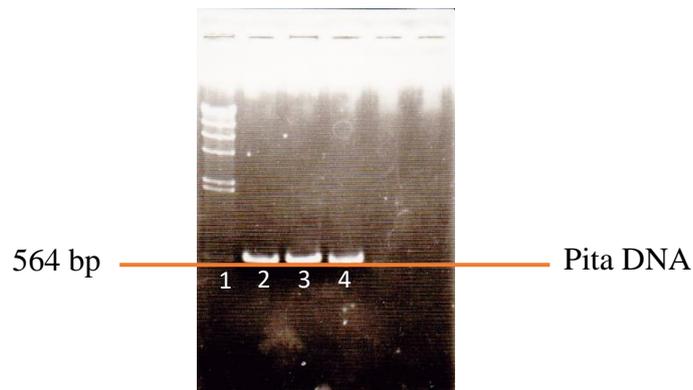
Gambar 5. Elektroforesis hasil amplifikasi DNA. (1) *marker* DNA, (2) isolat khamir UB5, (3) isolat khamir UB24, (4) isolat khamir UB35A.

Berdasarkan hasil elektroforesis (Gambar 7) menunjukkan semua pita DNA berpendar dengan jelas. Hasil visualisasi yang baik tersebut dapat disebabkan beberapa faktor. Menurut Pakpahan (2015) proses migrasi DNA yang baik dipengaruhi beberapa faktor yaitu ukuran molekul DNA, voltase yang digunakan dan konsentrasi gel agarosa yang digunakan. Hasil visualisasi amplifikasi DNA dengan menggunakan metode elektroforesis

menunjukkan nilai pita DNA yang berada pada ukuran marker 564 bp. Selanjutnya dilakukan proses pemurnian DNA dari kontaminan.



c. Purifikasi DNA



Gambar 6. Elektroforesis hasil purifikasi DNA. (1) *marker* DNA, (2) isolat khamir UB5, (3) isolat khamir UB24, (4) isolat khamir UB35A.

Proses purifikasi DNA dilakukan untuk mendapatkan hasil DNA yang lebih murni, dan hasil fotograf elektroforesis yang dilakukan pita DNA berpendar. Menurut Sandy (2015) pemurnian DNA dimaksudkan untuk mendapatkan DNA murni yang bebas dari kontaminan. Berdasarkan hasil elektroforesis (Gambar 8), pita DNA memiliki ukuran 564 bp. Menurut Fujita *et al.* (2001) pada umumnya khamir memiliki ukuran 300-900 bp untuk dilakukan ke tahap sekuensing, sedangkan Fatchiyah *et al.* (2011) berpendapat bahwa ukuran target amplifikasi biasanya kurang dari 1.000 bp atau 1 kbp karena hasil amplifikasi lebih dari 1 kbp kan rentan terhadap *inhibitor* yang mempengaruhi kerja enzim DNA polymerase dan waktu yang diperlukan lebih lama dibandingkan dari biasanya.

d. Sekuensing DNA

. Pada tahap proses sekuensing dilakukan dengan penambahan primer *forward* dan *reverse* yang sama dengan primer yang digunakan pada proses amplifikasi PCR. Hasil sekuensing DNA berupa elektroferogram (grafik yang menunjukkan basa-basa yang terekam hasil pembacaan mesin sekuensing) dan *text file* (urutan basa-basa yang terekam pada hasil pembacaan mesin sekuensing). Data sekuensing berupa *text file* dapat digunakan untuk mencari identitas suatu isolate dengan mencari homologi *sequence* spesies terdekatnya pada data *sequence* dalam database (Hall, 2004). Selain itu, data *sequence* juga dapat digunakan untuk melihat hubungan kekerabatan berdasarkan pohon filogeni.

Hasil sekuensing DNA ini digunakan untuk proses pencarian homologi sekuens melalui alamat situs database program sekuens DNA yang bernama BLAST.

e. Analisis Bioinformatika

1. Analisis hasil program MEGA 7

Data hasil sekuensing dengan menggunakan mesin Beckman dilihat menggunakan aplikasi yang bernama MEGA 7. Data yang diperoleh dari MEGA 7 kemudian digunakan untuk pencarian homolog atau kemiripan spesies isolat menggunakan program BLAST. Program MEGA 7 dapat digunakan juga untuk membuat pohon filogenik yang menunjukkan kekerabatan isolat khamir dengan sekuens-sekuens yang terdapat pada daftar program BLAST.

2. Analisis hasil BLAST

Program BLAST digunakan untuk mengidentifikasi khamir. Analisis dari program BLAST memberikan informasi mengenai khamir yang mempunyai kemiripan dengan urutan DNA sampel yang digunakan. Berdasarkan hasil data yang diperoleh, isolat khamir UB5 memiliki total kemiripan sebesar 99% dengan khamir *Kluyvero marxianus*, isolat khamir UB24 memiliki total kemiripan sebesar 98% dengan khamir *Picchia kudriavzevii*, dan isolat khamir UB35A memiliki kemiripan total 96% dengan khamir *K. marxianus*. Mengacu pada hasil analisis program BLAST, hasil yang didapatkan sudah dapat dikatakan baik karena memiliki persentase kemiripan yang tinggi dan nilai *max score* yang tinggi juga. Menurut Sandy (2015) hasil analisis BLAST yang baik yaitu jika hasil analisis memiliki nilai *max score* yang tinggi (>700) dan nilai *E-value* yang rendah yaitu 0.

4.2 Karakterisasi Isolat Khamir

4.2.1 Pertumbuhan adaptasi jangka panjang khamir pada suhu tinggi

Tabel 1. Nilai OD khamir

a. Nilai OD khamir pada suhu 37 °C

	Nilai OD pada Suhu 37 °C								
	0 hsi			7 hsi			14 hsi		
	UB5	UB24	UB35A	UB5	UB24	UB35A	UB5	UB24	UB35A
Ulangan 1	0,1	0,1	0,1	10,2	6,9	12,4	13,9	9,6	10,5
2	0,1	0,1	0,1	11,5	14,2	14,1	14	8,42	11,2
3	0,1	0,1	0,1	8,5	6,0	5,8	10,0	10,5	12,7
4	0,1	0,1	0,1	7,1	9,5	10,5	12,0	9,92	9,6
5	0,1	0,1	0,1	8,3	9,1	10,0	13,7	10,04	11,2
6	0,1	0,1	0,1	10,4	14,4	10,9	9,0	10,1	11,8
7	0,1	0,1	0,1	11,4	10	9,7	12,3	9,5	10,1
8	0,1	0,1	0,1	11,9	9,8	16,6	12,3	8,3	10,5
9	0,1	0,1	0,1	10,4	10,3	10,3	11,6	9,24	9,5
10	0,1	0,1	0,1	12,7	5,6	8,3	12	9,6	11,1

b. Nilai OD khamir pada suhu 38 °C

	Nilai OD pada Suhu 38 °C								
	0 hsi			7 hsi			14 hsi		
	UB5	UB24	UB35A	UB5	UB24	UB35A	UB5	UB24	UB35A
Ulangan 1	0,1	0,1	0,1	12,5	11,8	8,3	14,9	14,7	12,3
2	0,1	0,1	0,1	10,6	12,7	11,3	12,9	17,4	14,8
3	0,1	0,1	0,1	9,3	8,9	12,8	15	12,4	15,6
4	0,1	0,1	0,1	11,7	9,2	13,2	17,5	17,1	13,4
5	0,1	0,1	0,1	11,9	8	12,9	13,7	14,4	15,9
6	0,1	0,1	0,1	13,4	9,8	9,8	16,6	12,8	16,7
7	0,1	0,1	0,1	13,8	9,1	11,8	17,3	12,5	16,3
8	0,1	0,1	0,1	12,2	9,9	10,2	16,5	15,2	14,1
9	0,1	0,1	0,1	14,3	10,5	10,6	13	15,7	13,7
10	0,1	0,1	0,1	13,2	7,1	11,1	16,7	15,3	13,9

c. Nilai OD khamir pada suhu 39 °C

Nilai OD pada Suhu 39 °C						
	0 hsi			7 hsi		
	UB5	UB24	UB35A	UB5	UB24	UB35A
Ulangan	0,1	0,1	0,1	15,46	11,4	14,18
1						
2	0,1	0,1	0,1	13,78	11,58	14,48
3	0,1	0,1	0,1	16,3	10,68	17
4	0,1	0,1	0,1	15,08	10,52	16,32
5	0,1	0,1	0,1	13,86	9,88	15,26
6	0,1	0,1	0,1	16,96	7,82	16,58
7	0,1	0,1	0,1	17,64	10,28	15,66
8	0,1	0,1	0,1	12,58	11,18	12,7
9	0,1	0,1	0,1	14,38	12,04	16,62
10	0,1	0,1	0,1	15,2	11,2	11,42

Isolat khamir diperbanyak pada media YPD cair, mulai diinkubasi pada suhu 37 °C dengan kecepatan agitasi 180 rpm, setiap seminggu sekali sel-sel khamir dikultivasi pada media yang baru atau biasa disebut kegiatan peremajaan. Kemudian setiap dua minggu sekali suhu dinaikkan sebesar 1 °C. Sebelum dilakukan peremajaan pada media baru, sel-sel khamir diukur terlebih dahulu nilai *optical density* (OD) atau kerapatan selnya menggunakan alat spektrofotometer, sehingga didapat dari nilai-nilai OD setiap minggunya dimulai khamir diinkubasi pada suhu 37 °C sampai minggu terakhir pengamatan yaitu pada suhu 39 °C (Tabel.1). Pada saat akan dilakukan peremajaan, sel-sel khamir dilakukan penyamaan nilai OD terlebih dahulu agar pertumbuhan awal khamir seragam.

Berdasarkan nilai OD yang didapat, pada inkubasi suhu 37 - 39 °C terdapat kerapatan sel-sel khamir selama pengujian adaptasi jangka panjang ini. Nilai-nilai yang didapatkan sangat bervariasi, bahkan nilai OD pada pertumbuhan di suhu 39 °C paling tinggi. Dengan adanya nilai kerapatan sel ini diasumsikan bahwa khamir memanfaatkan glukosa yang ada pada media YPD sehingga mampu

bertahan hidup adaptasi jangka panjang ini. Menurut Sukumaran *et al.* (2005) glukosa berguna sebagai sumber energi yang digunakan untuk membentuk komponen sel yang dibutuhkan oleh khamir. Selain itu pertumbuhan khamir dipengaruhi oleh fisiologis dan metabolisme khamir itu sendiri, dimana khamir percobaan yang diuji coba merupakan khamir termotoleran sehingga khamir dapat tumbuh pada lingkungan dengan suhu tinggi. Rahmana *et al.* (2016) menyatakan faktor seperti fisiologis sel dan metabolisme sel yang berbeda-beda pada tiap genus juga dapat menjadi penyebab kemampuan tumbuh *yeast* pada tiap genus berbeda-beda. Faktor lain yang juga mempengaruhi adalah lamanya waktu penyimpanan kultur isolat yang dapat menyebabkan nutrisi di dalam medium.

4.2.2 Fermentasi alkohol khamir menggunakan metode *gas chromatograph*

Hasil dari keseluruhan menunjukkan produksi etanol dengan konsentrasi yang bervariasi. Pada uji fermentasi ini isolat khamir UB5, UB24, dan UB35A dibandingkan dengan isolat khamir kontrol, yaitu DMKU-3.

a. Fermentasi pada suhu 37 °C

Sel-sel khamir diinkubasi dan dikoleksi pada jam ke-12, 24, dan 48 untuk melihat pada jam beberapa sel khamir memproduksi etanol secara optimum

Tabel 2. Persentase Produksi Etanol pada Suhu 37 °C

Produksi Etanol pada Suhu 37 °C (%)			
ISOLAT	-Jam setelah inkubasi (jsi)		
	12 jsi	24 jsi	48 jsi
DMKU-3	4,33	4,12	3,99
UB5	3,84	4,40	4,82
UB24	3,68	4,69	3,10
UB35A	3,89	4,28	4,54

Uji fermentasi dengan menggunakan metode *gas chromatograph* pada suhu 37 °C keseluruhan isolat menunjukkan hasil etanol yang baik pada jam ke 12. Glukosa yang terkandung dalam pati singkong berkisar 8,3 % sehingga hasil produksi etanol seharusnya tidak melebihi 4,15 % atau 50% dari kandungan glukosa yang terdapat pada media. Pada jam ke 24 produksi etanol sudah mulai tinggi, terutama isolat UB5 dan UB24, sehingga data sudah kurang dapat diterima. Namun pada jam ke 48 produksi etanol isolat UB24 turun kembali

sedangkan isolat UB5 semakin tinggi. Berdasarkan hasil uji fermentasi pada suhu 37 °C, dari keseluruhan isolat khamir dibandingkan dengan isolat khamir kontrol, isolat khamir UB35A memiliki produksi etanol yang paling baik, ditunjukkan dengan hasil etanol pada jam ke 12 begitupun jam ke 24, karena hasil yang tidak begitu tinggi melebihi nilai maksimum produksi etanol yang seharusnya.

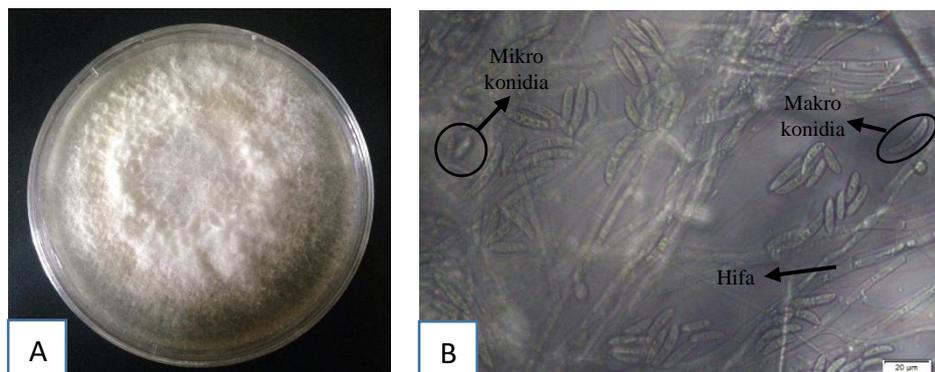
b. Fermentasi pada suhu 40 °C

Hasil fermentasi (Tabel. 3) pada suhu 40 °C didapatkan nilai yang sangat tinggi, bahkan melebihi kondisi nilai maksimum etanol yaitu berkisar 4,1- 4,3 %. Pada jam ke 12 keseluruhan isolat khamir memiliki nilai di atas 4 % kecuali isolat UB24 memiliki nilai etanol sebesar 3,88 %. Begitupun pada jam ke 36, seluruh khamir menghasilkan etanol diatas 4 %, tetapi nilai etanol isolat kontrol dan UB24 menghasilkan etanol melebihi kondisi nilai maksimum. Pada jam ke 48 produksi etanol bisa dikatakan baik karena mendekati nilai maksimum. Hasil yang bervariasi ini diasumsikan karena pemanfaat gula yang berbeda-beda oleh khamir. Gula yang terdapat pada media akan dimanfaatkan khamir baik untuk pertumbuhannya maupun sebagai bahan primer untuk proses fermentasi. Hal ini dikukung oleh pernyataan Rahmana *et al.* (2016) bahwa gula dalam medium pertumbuhan *yeast*, selain digunakan pertumbuhan selnya juga digunakan untuk menghasilkan metabolit primer berupa etanol pada proses fermentasi.

Tabel 3. Persentase Produksi Etanol pada Suhu 40 °C

Produksi etanol pada Suhu 40 °C (%)			
STRAIN	-Jam setelah inkubasi (jsi)		
	12 jsi	36 jsi	48 jsi
DMKU-			
3	4,79	4,42	3,96
UB5	4,67	4,33	3,90
UB24	3,88	4,42	3,75
UB35A	4,32	4,03	3,66

1.3 Identifikasi Jamur

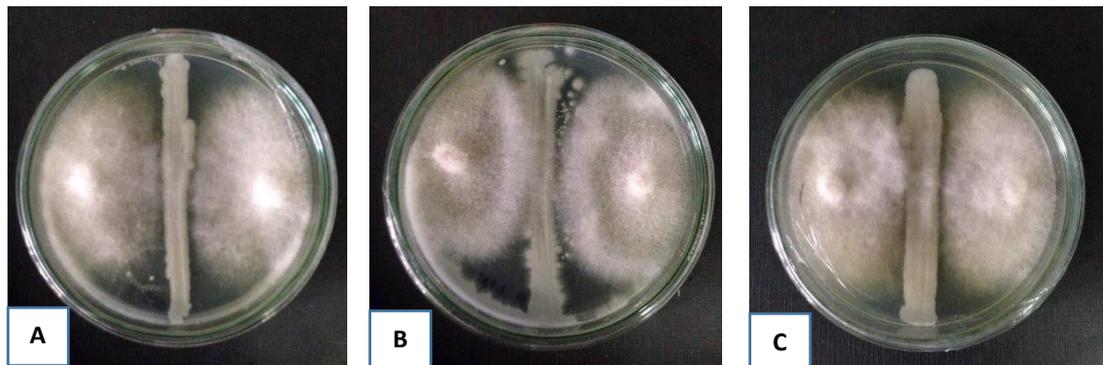


Gambar 7. *Fusarium oxysporum*. A: koloni jamur umur 7 hari pada media PDA, B: morfologi jamur.

Jamur patogen didapatkan dari tanaman bawang merah di perkebunan daerah Karangploso, Malang. Jamur *F.oxysporum* dilakukan isolasi, pemurnian dan diidentifikasi apakah isolat tersebut merupakan jamur *F.oxysporum* atau bukan. Berdasarkan hasil identifikasi baik secara makroskopis maupun mikroskopis jamur yang didapatkan merupakan jamur patogen *F.oxysporum*.

Hasil pengamatan yang dilakukan setelah jamur ditumbuhkan selama 7 hari memiliki ciri-ciri makroskopis koloni berwarna putih, hifa berserabut halus seperti kapas, tepi koloni yang rata, miselia rapat dan tebal, sedangkan ciri-ciri mikroskopis yang dimiliki yaitu hifa bersekat dan hialin, konidia berbentuk seperti bulan sabit. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Watanabe (2002) bahwa jamur *F.oxysporum* memiliki konidofor hialin, sederhana, pendek. Begitupun Agrios (1996) yang menyatakan ciri-ciri makroskopis jamur patogen penyebab layu ini mulanya berwarna putih, kemudian kuning, sampai merah, dimana pernyataan ini sesuai dengan ciri-ciri yang ditemukan penulis pada saat jamur tumbuh pada media PDA.

4.4 Uji Antagonis Khamir dengan Jamur *Fusarium oxysporum*



Gambar 8. Uji antagonis khamir terhadap jamur *Fusarium oxysporum* umur 7 hari setelah inokulasi pada media PDA. A: isolat khamir UB5, B: isolat khamir UB24. C: isolat khamir UB35A.

Berdasarkan hasil uji antagonis yang diperoleh menunjukkan bahwa keseluruhan isolat khamir tidak mampu menghambat pertumbuhan *F.oxysporum*, hasil ini terlihat secara visual dan juga melalui analisis sidik ragam pada taraf kesalahan 5% (Tabel 4).

Tabel 4. Rerata persentase penghambatan *F.oxysporum* oleh khamir

Perlakuan	Rerata persentase penghambatan <i>F.oxysporum</i> (%) hari ke-						
	1	2	3	4	5	6	7
Kontrol	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
UB5	48,96 ±0,14 c	33,33 ±0,27 b	21,72 ±0,17 a	27,78 ±0,44 c	27,21 ±0,49 c	32,47 bc ±0,65	25,56 ±1,00 a
UB24	36,38 ±0,24 b	32,05 ±0,66 b	17,42 ±0,53 a	28,00 ±0,82 c	22,45 ±1,02 bc	25,86 ±1,30 b	-9,38 ±1,42 a
UB35A	4,17 ±0,50 a	10,90 ±0,72 a	5,56 ±0,79 a	10,74 ±1,07 b	13,88 ±0,99 b	18,10 ±0,76 b	10,56 ±0,86 a

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa isolat khamir UB5 memiliki nilai hambat yang paling besar. Namun hasil yang non signifikan ditunjukkan dari perhitungan uji antagonis tersebut. Pada hari ke 6, hampir keseluruhan pertumbuhan jamur *F.oxysporum* menutupi pertumbuhan isolat khamir, tidak adanya zona bening, dan dari hari ke hari tidak terlihat penghambatan pertumbuhan jamur *F.oxysporum*. Menurut Kalogiannis *et al.* (2006) mekanisme kompetisi ruang dan nutrient terjadi apabila khamir berusaha memperoleh ruang dan nutrient terbatas ketika ditumbuhkan bersamaan cendawan patogen, sedangkan dari hasil

pengamatan khamir didapatkan tumbuh tetapi tidak memenuhi atau menekan pertumbuhan jamur *F.oxysporum*.

Khamir yang digunakan pada uji antagonis ini telah mengalami penyimpanan selama 2 bulan pada suhu rendah (± 10 °C), sehingga sel-sel khamir mengalami dormansi, proses metabolisme khamir tidak sebaik ketika awal-awal khamir ditumbuhkan. Julistiono (2001) mengatakan bahwa penyimpanan sel khamir pada suhu rendah dapat memperlambat proses metabolisme, kemudian terjadinya berbagai proses kerusakan fisiologi sel akibat terbentuknya kristal es yang dapat merobek membran sel.



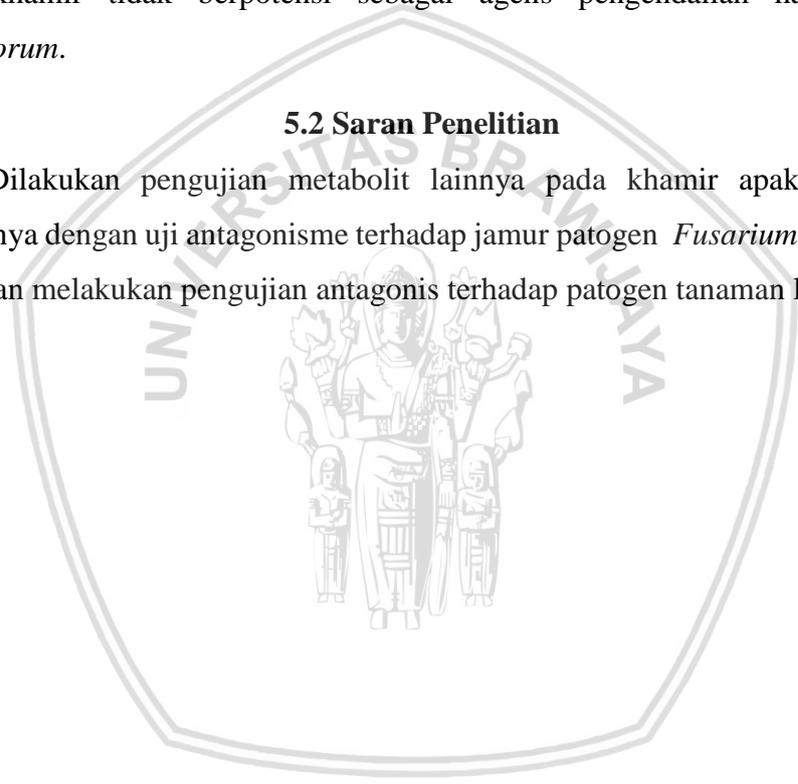
5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Hasil identifikasi yang telah dilakukan, isolat khamir UB5 dan UB35A diketahui sebagai spesies khamir *Kluyveromices marxianus*, sedangkan isolat khamir UB24 sebagai khamir *Pichia kudriavzevii*. Pada uji antagonis khamir hasil identifikasi terhadap *Fusarium oxysporum* yang memiliki nilai tingkat hambat relatif tertinggi adalah isolat khamir UB5. Namun hasil perhitungan analisis ragam keseluruhan pengujian antagonis menunjukkan tidak berbeda nyata sehingga khamir-khamir tidak berpotensi sebagai agens pengendalian hayati jamur *F.oxysporum*.

5.2 Saran Penelitian

Dilakukan pengujian metabolit lainnya pada khamir apakah terdapat korelasinya dengan uji antagonisme terhadap jamur patogen *Fusarium oxysporum*. Kemudian melakukan pengujian antagonis terhadap patogen tanaman lainnya.



DAFTAR PUSTAKA

- Agrios, G. N. 1996. Plant Pathology. New York. Academic Press.
- Ali, M. N., Khan, M. M.. 2014. Screening, Identification, and Characterization of Alcohol Tolerant Potential Bioethanol Producing Yeast. Journal Current Research in Microbiology and Biotechnology. 2(1): 316-324.
- Barnett, J. A., Payne, R. W., Yarrow, D. 2000. Yeasts: Characteristics and Identification. Cambridge University Press. Cambridge.
- Berlian, I., Setyawan, B., Hadi, H. 2013. Jurnal Mekanisme Antagonisme *Trichoderma* Spp. Terhadap Beberapa Patogen Tular Tanah. No 32(2), 74 – 82.
- Casida, J. R. 1968. Industrial Microbiology. John Wiley and Sons Inc. New York.
- Chanprasartsuk, O., Ch. Prakitchawattana, dan R. Sanguaneekul. 2013. Comparison of Methods for Identification of Yeast Isolated during Spontaneous Fermentation of Freshly Crushed Pineapple Juice. Journal Agriculture of Science Technology. 15: 1479-1490.
- Evans, I. 1996. Yeast Protocol-Method in Cell and Molecular Biology. London. Humawa Press.
- Fadhilah, S., Wiyono, S., Surahman, M. 2014. Pengembangan Teknik Deteksi Fusarium Patogen Pada Umbi Benih Bawang Merah (*Allium ascalonicum*) di Laboratorium [Development of Detection Technique for Fusarium Pathogen on Seedling Shallot (*Allium ascalonicum*) Bulb at Laboratorium]. Journal Horticulture. 24(2): 171-178.
- Fardiaz, S. 1985. Mikrobiologi Pangan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat antar Universitas Pangan dan Gizi. IPB. Bogor.
- Fujita, S., Y. Senda, S. Nakaguchi. T, Hashimoto. 2001. Multiplex PCR Using Internal Transcribed Spacer 1 and 2 Regions for Rapid Detection and Identification of Yeast Strains. Journal of Clinical Microbiology.
- Hall, B. G. 2004. Phylogenetic Trees Made Easy : A how to manual 2nded. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts.
- Intan, R. 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. Volume 2 nomor 4.
- Julistiono, H. 2001. Toksisitas Gliserol atau Sukrosa pada Sel Khamir *Saccharomyces cerevisiae* yang Disimpan pada Suhu Rendah Beku. Jurnal Berita Biologi 5 (4):387-394.

- Kaewkrajay, C., Dethoup, T., Limtong, S. 2014. Ethanol Production from Cassava Using A Newly Isolated Thermotolerant Yeast Strain. *Journal Science Asia*. 40 (2014): 268-277.
- Kalogiannis, S., Tjamos, S. E., Stergiou, A. Antoniou, PP. Ziogas, B. N. & Tjamos, E. C. 2006 Selection and Evaluation of Phyllosphere Yeasts as Biocontrol Agents Against Grey Mould of Tomato. *Eur. Journal of Plant Pathology*. Vol. 116,
- Kavanagh, K. 2005. *Fungi Biology and Application*. John Wiley & Sons Ltd.
- Kurtzman, C. P., J. W. Fell, T. Boekhout, dan V. Robert. 2011. *The Yeast a Taxonomy Study Chapter 7: Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeast*. Elsevier.
- Liu, Y., Zhou, Y., Yao, X., Deng, L., Zeng, K . 2017. Isolation, identification and in vitro screening of Chongqing orangery yeasts for the biocontrol of *Penicillium digitatum* on citrus fruit. *Jurnal Biological control*. 110 (2017) 18–24.
- Mucilli, S., Restuccia, C. 2015. Bioprotective Role for Yeast. *Journal Microorganism* 3:588-611.
- Nurlela., L. Hakim. A. Ulim. 2016. Efektivitas Beberapa Agen Antagonis dan Cara Aplikasinya untuk Menekan Pertumbuhan *Sclerotium rolfsii* pada Tanaman Kedelai *Glycine max* L. Merrill. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Unsyiah*. 1(1): 155-167.
- Ohya, Y., Sese, J., Yukawa, M. 2005. High Dimensional and Large Scale Phenotyping of Yeast Mutant. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102 (52): 19015-20.
- Pakpahan, S. E. 2015. Pengujian Konsentrasi Gel Agarosa 15 dan 1,2 % pada Elektroforesis DNA *Mycobacterium tuberculosis*. *Jurnal Kesehatan Rajawali* 5 (9): 19-23.
- Pimenta, R.S., Silva, F. L., Silva, P. B. Morais, D. T., Braga, C. A., Rosa., A., Correa Jr. (2007). Biological Control Of *Penicillium italicum*, *P. digitatum* and *P. expansum* By The Predacious Yeast *Saccharomycopsis schoenii* On Oranges. *Braz. Journal of Microbiol*: 85-90.
- Pradipta, Y. 2012. Studi Molekuler untuk Menentukan Kekekabatan Genus *Singiber* Varietas Zerumbet. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

- Puspitasari, A. E., A. L. Abadi, L. Sulistyowati. 2014. Potensi Khamir sebagai Agens Pengendali Hayati Patogen *Colletotrichum* sp. pada Buah Cabai, Buncis, dan Stroberi. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan*. 2 (3): 92-101.
- Rahmana, S., Nurhatika, S., Muhibuddin, A. 2016. Uji Potensi Fermentasi Etanol Beberapa Yeast yang Diisolasi dari Daerah Malang, Jawa Timur dengan Metode SDN (Soil Drive Nutrient). *Jurnal Sains dan Seni ITS*. Vol. 5, No.2, (2016) 2337-3520.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubordieu, D., Doneche, B., and Lonvaud, A. 2000. *Handbook of Enology (Vol.1): The Microbiology of Wine and Vinifications*. Chichester: John Wiley & Sons.
- Roehr, M. 2001. *The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications*. Chichester: Wiley-VCH. 232
- Rogers, K. 2011. *Fungi, Algae, and Protist (Biochemistry, Cell. And Life)*. Britannica Educational Publishing. New York.
- Sandy, Y. A. 2015. Identifikasi Molekuler Jamur Antagonis *Trichoderma harzianum* Diisolasi dari Tanah Pertanian di Jawa Timur. Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang.
- Sastrahidayat, I. R. 2009. *Ilmu Jamur (mikologi)*. Karya Anda. Surabaya.
- Semangun, H. 2001. *Pengantar Ilmu Penyakit Tumbuhan*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Setiawan, B. Karakterisasi Fisiologi dan Molekuler Bakteri Simbion Nematoda Entomopatogen Berdasarkan Sekuen Gen Pengkode 16S rRNA dari Bromo, Kabupaten Probolinggo. Tesis.
- Shofiana, R. H. 2015. Eksplorasi Jamur Endofit dan Khamir pada Tanaman Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) serta Uji Potensi Antagonismenya terhadap Jamur Akar Putih (*Rigidopus mioporus*). Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang.
- Sukumaran, R. K., Singhania, R., Pandey, A. 2005. Microbial celluloses Production, application and challenges. *Journal of Scientifc & Industrial Research*. vol. 62: 832-844.

- Suprayogi, M. T. Nguyen, N. Lertwattanaskul, N. Rodrussamee, S. Limtong, T. Kosaka, M. Yamada. 2015. A *K.marxianus* 2-Deoxyglucose_resistant Mutant with Enhanced Activity of Xylose Utilization. *Journal International Microbiology*. 18:235-244.
- Talukder, A. A., F. Easmin, S. A. Mahmud, dan M. Yamada. Thermotolerant Yeast Capable of Producing Bioethanol: Isolation from Natural Fermented Sources, Identification and Characterization. *Journal Biotechnology and Biotechnology Equipment*. 30 (6): 1106-1114.
- Watanabe, Tsuneo. 2002. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. 2 nd edition. CRC Press LLC : Boca Raton, Florida.
- Walker, J. C. 1952. *Plant Pathology*. Second Edition. International Student Edition. USA. Page: 96-150
- Widiastutik, N, dan Alami, H. 2014. Isolasi dan Identifikasi Yeast dari Rhizosfer *Rhizophora mucronata* Wonorejo. *Jurnal Sains dan Seni POMITS*. 3 (1): 11-16.
- Yamada, M., K. Makimura, H. Mirhendi, K. Ueda, H. Yamaguchi, Y. Nishiyama & M. Osumi. 2002. Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeast. *Jpn. J. Infect. Dis.* 55: 22-125.