

Potensi Keragaman Khamir dari Madu Liar dan Buah-Buahan, serta Pemanfaatannya pada Fermentasi Etanol

Intisari

Keragaman khamir telah dipelajari secara mendalam, namun masih banyak bioma, habitat, dan rentang geografis yang belum dieksplorasi. Studi berkelanjutan mengenai keragaman khamir perlu dilakukan dengan tujuan antara lain, memperbarui basis data keragaman khamir, memahami profil keragaman khamir di suatu habitat, serta menemukan spesies/strain khamir baru yang berpotensi memberi nilai tambah produk berbasis bioindustri. Penelitian ini dirancang dengan tujuan mengungkap keragaman khamir dari madu hutan dan buah-buahan, mendapatkan strain *S. cerevisiae* baru yang mampu menurunkan kadar gula pereduksi pada fermentasi etanol, dan menganalisis ekspresi gen *Hxt1* dan *Hxt3*, serta keberadaan simpporter *Fsy1* pada *S. cerevisiae* selama fermentasi etanol. Tahapan penelitian dibagi menjadi tiga, yaitu isolasi khamir, karakterisasi isolat khamir hingga analisis keragamannya, dan fermentasi etanol menggunakan isolat *S. cerevisiae* serta analisis ekspresi gen transporter gula *Hxt1*, *Hxt3* dan *Fsy1* selama fermentasi.

Pada penelitian ini keragaman khamir dari buah-buahan lebih tinggi dibandingkan dari madu hutan. Isolat *S. cerevisiae* hanya didapatkan dari buah-buahan, yaitu Ag3 (anggur), NB1 (nanas), S1 (salak) serta BB3 (belimbing) dan keempatnya isolat digunakan untuk fermentasi etanol. Isolat NB1 dan Ag3 menunjukkan kadar gula pereduksi tersisa dengan jumlah paling sedikit pada perlakuan campuran glukosa-fruktosa, dan hasil ini berbeda nyata dengan perlakuan lain. Kadar etanol dari fermentasi fruktosa lebih kecil dibandingkan perlakuan gula lainnya, serta berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan glukosa dan campuran glukosa-fruktosa. Gen *Hxt1* terekspresi tinggi pada fase logaritmik, namun menurun pada fase stasioner hingga fermentasi berakhir. Gen *Hxt3* juga terekspresi tinggi di saat logaritmik, dan tetap lebih tinggi dibandingkan gen *Hxt1* pada fase stasioner hingga akhir fermentasi. Ekspresi kedua gen tersebut terlihat hampir sama pada perlakuan gula dan isolat, namun terdapat perbedaan nyata antar isolat dan waktu. Ekspresi gen *Hxt3* relatif rendah pada perlakuan glukosa saja dibandingkan hanya mengandung fruktosa saja dan berlaku pada semua strain, dengan ekspresi tertinggi ditunjukkan isolat NB1. Pada akhir fermentasi, ekspresi gen *Hxt3* tertinggi ditunjukkan isolat NB1 pada perlakuan fruktosa saja, sedangkan pada perlakuan yang mengandung glukosa saja ekspresi tertinggi ditunjukkan oleh isolat Ag3. Keberadaan transporter *Fsy1* tidak terdeteksi setelah amplifikasi gen tersebut, namun kenaikan pH sedikit teramati pada pengujian proton simpor setelah penambahan fruktosa, sehingga diduga perubahan pH disebabkan mekanisme lain.

Kata kunci : khamir, keragaman, madu, etanol, transporter

Potential of Yeast Diversity in Wild Honey and Fruits, and their Utilization in Ethanol Fermentation

Abstract

*Yeast diversity has long been studied deeply, but many biomes, habitats, and geographical ranges remain unexplored. Continued research on yeast diversity is essential for updating diversity databases, characterizing yeast profiles within specific habitats, and identifying novel yeast species or strains with potential applications in bioindustry-related products. Therefore, this study was aimed at investigating the diversity of yeast species isolated from wild honey and a variety of fruits; to isolate and characterize new *Saccharomyces cerevisiae* strains with the capacity to reduce levels of reducing sugars during ethanol fermentation; and to analyze the expression profiles of the Hxt1 and Hxt3 genes, as well as to assess the presence of the Fsy1 symporter, in *S. cerevisiae* during fermentation. The study comprised of three primary stages, i.e., yeast isolation from honey and fruits; characterization and identification of isolates to assess their diversity, and conducting ethanol fermentation using *S. cerevisiae* new isolates while analyzing the expression of the sugar transporter genes Hxt1, Hxt3, and Fsy1 during the process.*

*The results showed that yeasts from fruits showed higher diversity than those from wild honey. New *S. cerevisiae* strains were only obtained from fruits, namely Ag3 (grape), NB1 (pineapple), S1 (salak/dragonfruit), and BB3 (star fruit), which were subsequently employed for ethanol fermentation. Two isolates, NB1 and Ag3, showed the least amount of remaining reducing sugar in the glucose-fructose mixture, and this significantly differed from the other treatments. Fructose fermentation produced lower ethanol levels, significantly different from glucose and glucose-fructose mixture. The Hxt1 gene was highly expressed during the logarithmic phase but decreased throughout the stationary phase until the end of fermentation. Likewise, the Hxt3 gene exhibited high expression during the logarithmic phase, but maintained its expression higher than that of Hxt1 in the stationary phase until fermentation concluded. Both genes displayed similar expression levels across sugar and isolate treatments, although significant differences emerged between isolates and time. Expression of the Hxt3 gene was consistently lower in the glucose-only treatment compared to the fructose-only treatment across all isolates, with isolate NB1 exhibiting the highest expression levels overall. At the end of fermentation, isolate NB1 maintained the highest Hxt3 expression under fructose-only conditions, while isolate Ag3 showed the highest expression in the glucose-only treatment. Meanwhile, despite the fact that a slight increase in pH was observed in the proton symporter assay following fructose addition, the presence of the Fsy1 transporter gene was undetected after PCR amplification, indicating that the gene probably did not occur in *S. cerevisiae*, and other proton transport mechanisms may be involved.*

Keywords : yeast, diversity, honey, ethanol, transporters

RINGKASAN

Studi keragaman khamir telah dilakukan secara mendalam, namun masih banyak bioma, habitat, dan rentang geografis yang belum dieksplorasi. Penelitian berkelanjutan mengenai keragaman khamir perlu dilakukan dengan tujuan antara lain, memperbarui basis data keragaman khamir, memahami profil keragaman khamir di suatu habitat, serta menemukan spesies/strain khamir baru yang berpotensi memberi nilai tambah produk berbasis bioindustri. Penelitian ini dirancang dengan tujuan (1) mengungkap keragaman khamir dari madu hutan dan buah-buahan (2) mendapatkan strain *S. cerevisiae* baru yang mampu menurunkan kadar gula pereduksi pada fermentasi etanol, dan (3) menganalisis ekspresi gen Hxt1 dan Hxt3, dan keberadaan simporter Fsy1 pada *S. cerevisiae* selama fermentasi etanol. Tahapan penelitian dibagi menjadi tiga, yaitu (1) analisis keragaman khamir dengan melakukan isolasi, karakterisasi morfologi, skrining penggunaan glukosa dan fruktosa, skrining dan analisis pola *fingerprinting* dengan *microsatellite primed*-PCR, identifikasi isolat dengan sekuensing gen 26S pada domain 1 dan 2 (D1/D2) dari *large subunit* rDNA, menghitung keragaman alpha dengan indeks keragaman Shannon-Wiener (H') dan dominansi Simpson (D); (2) fermentasi etanol menggunakan isolat *S. cerevisiae* terpilih, analisis kadar gula pereduksi tersisa dengan metode *dinitrosalicylic acid* (DNS), menghitung laju fermentasi dengan mengukur volume CO_2 (evolusi CO_2) dan analisis kadar etanol dengan metode *microdiffusion* Conway; dan (3) analisis transporter gula Hxt1, Hxt3 dan Fsy1 selama fermentasi, dengan melakukan amplifikasi gen penyandi ketiga transporter dan mengamati ekspresinya menggunakan *quantitative Real Time*-PCR (qRT-PCR). Khusus untuk pengujian transporter Fsy1, sebelum tahap amplifikasi gen dilakukan deteksi simporter proton dengan memantau kenaikan pH pada larutan uji, bila terpantau kenaikan pH akan dilakukan amplifikasi gen *Fsy1*. Pada tahap ini, apabila terdapat amplikon akan dilanjutkan dengan analisis ekspresi gen *Fsy1*, namun bila tidak terdapat amplikon maka analisis ekspresi gen *Fsy1* tidak dikerjakan.

Hasil penelitian menunjukkan, keragaman alpha khamir dari buah-buahan lebih tinggi dibandingkan dari madu hutan. Indeks Shannon-Wiener (H') dari buah-buahan pada level genus khamir adalah 0,884 sedangkan madu hutan sebesar 0,709. Pada level spesies khamir, nilai H' dari buah-buahan adalah 1,862 sedangkan dari madu hutan sebesar 1,585. Nilai indeks dominansi Simpson (D) madu hutan nilai lebih tinggi yaitu 0,091 pada level genus dan 0,337 pada level spesies, sedangkan nilai D dari buah-buahan yaitu 0,088 pada level genus dan 0,129 pada level spesies. Jumlah spesies yang didapatkan dari buah-buahan adalah 13 spesies, sedangkan dari madu hutan sebanyak 11 spesies. Kelompok Ascomycetes mendominasi sebanyak 11 genus dibandingkan satu anggota Basidiomycetes yaitu *Rhodotorula*. Genus yang dominan dari kedua sumber isolat adalah *Candida*. Pada madu hutan terdapat dominansi *Zygosaccharomyces rouxii*. Empat isolat *S. cerevisiae* hanya didapatkan dari buah anggur (Ag3), nanas (NB1), S1 (salak) serta BB3 (belimbing), dan keempatnya digunakan untuk fermentasi etanol. Hasil fermentasi oleh semua isolat menunjukkan, laju fermentasi pada medium yang menggunakan glukosa dan campuran glukosa-fruktosa lebih tinggi serta berbeda nyata bila dibandingkan

hanya mengandung fruktosa saja. Kadar gula pereduksi tersisa di akhir fermentasi dengan jumlah paling sedikit ditunjukkan oleh isolat NB1 dan Ag3 pada perlakuan gula campuran glukosa-fruktosa, hasil ini berbeda nyata dengan perlakuan lain. Etanol yang dihasilkan menunjukkan perbedaan nyata pada perlakuan glukosa serta campuran glukosa-fruktosa bila dibandingkan dengan fruktosa. Kadar etanol dari fermentasi fruktosa lebih kecil dibandingkan perlakuan gula lainnya, kondisi ini terlihat pada semua isolat. Hasil analisis ekspresi gen *Hxt1* selama fermentasi menunjukkan perbedaan nyata antara fase logaritmik dan stasioner. Gen *Hxt1* terekspresi tinggi pada fase logaritmik, namun menurun pada fase stasioner hingga fermentasi berakhir, dan hasil ini terlihat pada semua perlakuan gula dan isolat. Gen *Hxt3* juga terekspresi tinggi di saat logaritmik, dan tetap lebih tinggi dibandingkan gen *Hxt1* pada fase stasioner hingga akhir fermentasi. Kecenderungan ekspresi kedua gen tersebut terlihat hampir sama pada perlakuan gula dan isolat, namun terdapat perbedaan nyata antar isolat dan waktu. Ekspresi gen *Hxt3* relatif rendah pada perlakuan glukosa saja dibandingkan hanya mengandung fruktosa saja, perbedaan nyata umumnya terlihat pada jam ke-48, berlaku pada semua strain, dengan ekspresi tertinggi ditunjukkan isolat NB1. Pada akhir fermentasi di jam ke-72, ekspresi gen *Hxt3* tertinggi ditunjukkan isolat NB1 pada perlakuan fruktosa saja, sedangkan pada perlakuan yang mengandung glukosa ekspresi tertinggi ditunjukkan oleh isolat Ag3. Keberadaan transporter Fsy1 tidak terdeteksi berdasarkan hasil amplifikasi gen, namun kenaikan pH sedikit teramati pada medium uji dengan fruktosa.

Kesimpulan penelitian ini adalah, (1) keragaman khamir dari buah-buahan lebih tinggi dibandingkan dari madu hutan, (2) isolat *S. cerevisiae* hanya didapatkan dari buah-buahan, dan strain yang menyisakan gula reduksi paling sedikit selama fermentasi adalah NB1 dan Ag3 pada perlakuan campuran glukosa-fruktosa, (3) gen *Hxt1* terekspresi tinggi hanya di fase logaritmik fermentasi, sedangkan ekspresi *Hxt3* tetap dipertahankan relatif lebih tinggi dibandingkan gen *Hxt1* sejak fase eksponensial hingga akhir fermentasi. Transporter Fsy1 diduga tidak terdapat pada *S. cerevisiae* dan kenaikan pH pada uji simporter proton disebabkan karena mekanism lain.