



**EKSPLORASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER KHAMIR
INULINOLITIK DARI UMBI KENTANG (*Solanum tuberosum L.*)
dengan PENGARUH TERHADAP SUHU dan PH**

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai derajat Sarjana
Bioteknologi (S.Biotech) Program Studi Bioteknologi, Departemen Biologi,
Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro

Oleh:

Zahrah Syahmina Badzlin

NIM. 24020222140082

**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN MATEMATIKA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
JUNI, 2026**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Skripsi : Eksplorasi dan Identifikasi Molekuler Khamir Inulinolitik dari
Umbi Kentang (*Solanum tuberosum L.*) dengan Pengaruh
Suhu dan pH

Nama Mahasiswa : Zahrah Syahmina Badzlin

NIM : 24020222140082

Menyetujui:

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Drs. Wijanarka, M.Si
NIP. 196510181991031002

Prof. Dr. Dra. Endang Kusdiyantini, DEA
NIP. 195911261988102001

Penguji

Dr. Dra. Nurhayati, M.Si

NIP. 196410091990012001

Mengetahui:

Ketua Departemen Biologi

Ketua Program Studi Bioteknologi

Rully Rahadian, S.Si., M.Si., PhD
NIP. 197207022000031001

Dr. Sri Pujiyanto, S.Si., MSi.
NIP. 197301132000031002

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan usulan penelitian dengan judul “Eksplorasi dan Identifikasi Molekuler Khamir Inulinolitik dari Umbi Kentang (*Solanum tuberosum* L.) dengan Pengaruh Suhu dan pH” di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Tembalang, Semarang.

Usulan penelitian ini ditujukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai derajat Sarjana Bioteknologi (S. Biotech) Program Studi Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro. Penulis menyampaikan banyak ucapan terima kasih kepada semua pihak yang telah terlibat sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan usulan penelitian ini dengan baik. Penulis menyadari bahwa penulisan usulan penelitian ini masih terdapat banyak kekurangan dan keterbatasan. Oleh karena itu, penulis sangat terbuka terhadap saran dan kritik yang membangun dari berbagai pihak. Akhir kata, penulis berharap proposal tugas akhir yang telah disusun ini dapat memberikan informasi yang bermanfaat bagi pembaca serta siapa saja yang membutuhkan.

Semarang, Juni 2026

Penulis

ABSTRAK

Zahrah Syahmina Badzlin.24020222140082.Eksplorasi dan Identifikasi Molekuler Khamir Inulinolitik dari Umbi Kentang (*Solanum tuberosum L.*) dengan Pengaruh Suhu dan pH

Umbi kentang (*Solanum tuberosum L.*) merupakan substrat alami kaya pati dan gula sederhana yang berpotensi menjadi habitat khamir penghasil enzim inulinase. Inulinase (EC 3.2.1.7) adalah enzim hidrolase yang mengkatalisis pemutusan ikatan β -2,1-fruktosidik pada inulin sehingga menghasilkan fruktosa dan frukto-oligosakarida yang bernilai tinggi dalam bioteknologi pangan. Penelitian ini bertujuan mengeksplorasi dan mengidentifikasi khamir indigenous dari umbi kentang sebagai penghasil inulinase serta menentukan kondisi optimum aktivitas enzim berdasarkan variasi suhu dan pH. Metode penelitian meliputi isolasi khamir pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA), skrining pada *Inulinase Selective Medium* (ISM), uji aktivitas enzim, dan identifikasi molekuler. Penelitian dilakukan secara eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial, factor pertama, yaitu pH (4,5,6) dan factor kedua, yaitu suhu (35°C dan 40°C) dengan tiga ulangan, selanjutnya diujikan ANOVA taraf 5% ($\alpha = 0,05$), dan uji lanjut Duncan. Hasil penelitian menunjukkan 11 isolat khamir pada PDA, 5 isolat tumbuh pada ISM, dan isolat I-11 memiliki aktivitas tertinggi. Pengujian terhadap variasi pH (4, 5, 6) dan suhu (35°C, 45°C) menunjukkan kondisi optimum pada pH 5 dan suhu 35°C dengan aktivitas sebesar 1,76 U/mL. Hasil identifikasi molekuler mengonfirmasi isolat I-11 sebagai *Candida parapsilosis*. Analisis ANOVA menunjukkan variasi pH berpengaruh signifikan terhadap aktivitas enzim, uji lanjut Duncan menegaskan bahwa pH 4 dan pH 5 tidak berbeda nyata, sementara pH 6 menghasilkan aktivitas lebih rendah secara signifikan.

Kata kunci: *Candida parapsilosis*, Enzim Inulinase, pH, Suhu, Umbi Kentang

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Drs. Wijanarka, M.Si
NIP. 196510181991031002

Prof. Dr. Dra. Endang Kusdiyantini, DEA
NIP. 195911261988102001

ABSTRACT

Zahrah Syahmina Badzlin.24020222140082.Exploration and Identification Molecular of Inulinolytic Yeast from Potato (Solanum tuberosum L.) Tubers with the Influence of Temperature and pH

*Potato tubers (Solanum tuberosum L.) are a natural substrate rich in starch and simple sugars that have the potential to be a habitat for yeast producing the enzyme inulinase. Inulinase (EC 3.2.1.7) is a hydrolase enzyme that catalyzes the cleavage of β 2,1 fructosidic bonds in inulin, producing fructose and fructo oligosaccharides of high value in food biotechnology. This study aims to explore and identify indigenous yeasts from potato tubers as inulinase producers and determine the optimum conditions for enzyme activity based on temperature and pH variations. The research methods include yeast isolation on Potato Dextrose Agar (PDA) media, screening on Inulinase Selective Medium (ISM), enzyme activity assay, and molecular identification. The study was conducted experimentally with a factorial Completely Randomized Design (CRD), three replications, ANOVA analysis at a 5% level ($\alpha = 0.05$), and Duncan's follow-up test. The results showed 11 yeast isolates on PDA, 5 isolates grew on ISM, and isolate I 11 had the highest activity. Testing of pH variations (4, 5, 6) and temperatures (35°C, 45°C) showed optimum conditions at pH 5 and temperature 35°C with an activity of 1.76 U/mL. Molecular identification results confirmed isolate I 11 as *Candida parapsilosis*. ANOVA analysis showed that pH variations had a significant effect on enzyme activity, Duncan's further test confirmed that pH 4 and pH 5 were not significantly different, while pH 6 produced significantly lower activity.*

Keywords: *Candida parapsilosis, Inulinase Enzyme, pH, Potato Tubers, Temperature*

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Drs. Wijanarka, M.Si
NIP. 196510181991031002

Prof. Dr. Dra. Endang Kusdiyantini, DEA
NIP. 195911261988102001

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PRAKATA.....	iii
ABSTRAK.....	iv
<i>ABSTRACT</i>	v
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
 I. PENDAHULUAN.....	 1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.3 Tujuan.....	4
1.4 Manfaat.....	5
 II. TINJAUAN PUSTAKA.....	 6
2.1 Umbi Kentang (<i>Solanum tuberosum L.</i>).....	6
2.2 Karakteristik Kentang (<i>Solanum tuberosum L.</i>).....	8
2.3 Karakteristik dan Morfologi Khamir.....	10
2.4 Khamir Inulinolitik.....	13
2.5 Inulin.....	14
2.6 Enzim Inulinase.....	15
2.7 Identifikasi Molekuler.....	17
 III. METODE PENELITIAN.....	 18
3.1 Waktu dan Tempat.....	18
3.2 Alat dan bahan.....	18
3.2.1 Alat.....	18
3.2.2 Bahan.....	18
3.3 Diagram Alir.....	19
3.4 Cara Kerja.....	20
3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan.....	20
3.4.2 Pembuatan Media <i>Potato Dextrose Agar</i>	20
3.4.3 Isolasi dan Karakterisasi Umbi Kentang.....	20
3.4.4 Pemurnian Isolat Khamir Inulinolitik.....	21
3.4.5 Pembuatan Media Inulinase Selection Medium.....	22
3.4.6 <i>Screening Yeast</i> Inulinolitik.....	22
3.4.7 Pembuatan Medium Produksi Inulin.....	23
3.4.8 Pembuatan Starter Khamir Inulinolitik.....	24
3.4.9 Pengukuran Pertumbuhan Sel.....	25
3.4.10 Produksi Enzim.....	25

3.4.11 Pembuatan Kurva Standar	26
3.4.12 Pengujian Aktivitas Enzim Inulinase.....	26
3.4.13 Identifikasi Molekuler	28
3.5 Rancangan Percobaan.....	29
3.6 Analisis Data	31
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	32
4.1 Isolat Khamir dari Umbi Kentang	32
4.2 Skrining khamir Inulinolitik Umbi Kentang pada Media <i>Inulinase Screening Media</i>	35
4.3 Karakterisasi Makroskopis dan Mikroskopis Isolat Khamir Potensial (I-11)	38
4.4 Kurva Pertumbuhan Isolat Potensial (I-11)	42
4.5 Hasil Pengujian Aktivitas Enzim.....	47
4.6 Identifikasi Molekuler Khamir Isolat (I-11).....	54
V. SIMPULAN DAN SARAN	64
5.1 Kesimpulan.....	64
5.2 Saran	65
DAFTAR PUSTAKA	66
VI. UCAPAN TERIMA KASIH.....	74
LAMPIRAN.....	76

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Umhi kentang varietas granola, (A) Tunas kentang, (B) Batang kentang, (C) Daun kentang, (D) Bunga kentang granola, (e) dan (f) Umhi kentang.....	10
Gambar 2.2	Struktur Inulin.....	16
Gambar 4.1	Makroskopis Khamir Inulinolitik I-11 pada Media PDA.....	40
Gambar 4.2	Mikroskopis Khamir Inulinolitik Isolat I-11 pada Perbesaran 400×; Tunas (A)	42
Gambar 4.3	Kurva Pertumbuhan Khamir I-11 pada Media Produksi Inulinase..	46
Gambar 4.4	Grafik Nilai Aktivitas Enzim Inulinase Khamir I-11 pada Media Produksi Inulinase.....	48
Gambar 4.5	Pohon Filogenetik Isolat I-11 Menggunakan Neighbor-Joining Method	59

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Variabel Penelitian	30
Tabel 3.2	Rancangan Percobaan	30
Tabel 4.1	Karakterisasi Morfologi Makroskopis Isolat Khamir dari Umbi Ketang pada Media PDA	34
Tabel 4.2	Tabel Hasil Skrining pada Media <i>Inulinase Screening Media</i>	37
Tabel 4.3	Hasil Pengamatan Morfologi Makroskopis Isolat Khamir I-11 pada Media PDA	40
Tabel 4.4	Konsentrasi DNA Khamir (I-11)	54
Tabel 4.5	Hasil Amplifikasi PCR Sampel I-11 Menggunakan Primer ITS 1 dan ITS 4	56

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Dokumentasi Kegiatan	76
Lampiran 2.	Hasil Makroskopis pada Media PDA dan Mikroskopis	79
Lampiran 3.	Lanjutan Lampiran 2 Hasil Makroskopis pada Media PDA dan Mikroskopis.....	81
Lampiran 4.	Lanjutan Lampiran 3 Hasil Makroskopis pada Media PDA dan Mikroskopis.....	82
Lampiran 5.	Hasil Makroskopis Isolat Khamir yang Tubuh pada Media ISM..	83
Lampiran 6.	Lanjutan Lampiran 5 Hasil Makroskopis Isolat Khamir yang Tumbuh pada Media ISM.....	84
Lampiran 7.	Tabel Aktivitas Enzim.....	85
Lampiran 8.	Uji Normalitas	85
Lampiran 9.	Tabel ANNOVA Two way.....	86
Lampiran 10.	Uji Tukey	86
Lampiran 11.	Kurva Fruktosa Standar	86

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perkembangan bioteknologi modern menuntut adanya pemanfaatan sumber daya hayati yang efisien dan berkelanjutan. Salah satu pendekatan yang banyak dikaji adalah penggunaan enzim *microbial* (Andriajo J *et al*, 2005; Andriajo *et al.*, 2014). Enzim *microbial* memiliki keunggulan dibanding enzim yang dihasilkan dari hewan maupun tumbuhan karena dapat berlangsung dalam kondisi yang ringan dan biaya produksinya lebih rendah. Selain itu, enzim *microbial* dapat diproduksi dalam jumlah besar melalui fermentasi, sehingga lebih praktis dibandingkan isolasi enzim dari tumbuhan atau hewan yang sering terkendala ketersediaan bahan baku dan proses ekstraksi yang kompleks. Keunggulan tersebut menjadikan enzim *microbial* sebagai komponen strategis dalam pengembangan pangan, farmasi, dan *bioenergy* (Saryono *et al.*, 2016; Kıran *et al.*, 2006; Kango *et al.*, 2011).

Inulinase merupakan salah satu enzim yang banyak diteliti karena dapat dihasilkan oleh berbagai mikroorganisme seperti bakteri, ragi (khamir), dan jamur. Enzim ini berfungsi memecah inulin, yaitu serat makanan larut air yang tersusun dari rantai fruktosa (Zeaiter *et al.*, 2019). Di dalam tubuh, inulin bermanfaat sebagai prebiotik yang mendukung pertumbuhan bakteri baik di usus, seperti *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus* (De Giani *et al.*, 2022). Melalui bantuan enzim inulinase, inulin dapat dipecah menjadi frukto-oligosakarida (FOS) atau fruktosa (Garuba *et al.*, 2018). Produk hasil pemecahan ini memiliki nilai ekonomi yang tinggi. Fruktosa dapat digunakan

sebagai bahan pemanis alami, sedangkan FOS berfungsi sebagai prebiotik untuk menjaga kesehatan pencernaan.

Selama ini, inulin komersial sebagian besar masih diperoleh dari tanaman *chicory* yang tumbuh di Eropa. Tanaman chicory sulit dibudidayakan di Indonesia sehingga kebutuhan inulin nasional masih sangat bergantung pada impor (Wiwiek *et al.*, 2015). Solusi atau upaya mengurangi ketergantungan tersebut, diperlukan mengeksplorasi sumber daya lokal, baik untuk mencari sumber inulin alternatif maupun mikroba unggul yang bisa mengolahnya. Dalam hal ini, Indonesia memiliki potensi hortikultura yang besar, salah satunya adalah umbi kentang. Kentang secara umum dikenal sebagai sumber karbohidrat kompleks, lingkungan hidup umbi kentang baik di permukaan kulit maupun di dalam jaringannya menjadi tempat yang potensial bagi pertumbuhan berbagai jenis khamir (Risky *et al.*, 2019). Pemanfaatan potensi khamir dari kentang lokal diharapkan menambah nilai tambah pada produk pertanian nasional.

Diantara berbagai jenis mikroorganisme, khamir adalah salah satu mikroba yang dapat menghasilkan enzim inulinase. Khamir yang pertama kali telah diketahui dapat menghasilkan enzim inulinase, yaitu dari *Saccharomyces fragilis* pada tahun 1960 atau disebut *Kluyveromyces fragilis* yang termasuk khamir uniseluler dari divisi Ascomycota (Allais *et al.*, 1987; Guiraud *et al.*, 1990; Saryono *et al.*, 2016). Beberapa jenis khamir seperti *Pichia*, *Kluyveromyces*, dan *Candida* dilaporkan mampu menghasilkan enzim inulinase dengan efisiensi yang baik (Risky *et al.*, 2019). Khamir memiliki

kemampuan tumbuh yang cepat, tahan terhadap perubahan pH dan suhu, serta mudah beradaptasi pada media yang mengandung nutrisi. Selain itu, proses fermentasi menggunakan khamir lebih mudah dikendalikan di laboratorium dan tidak memerlukan kondisi steril yang terlalu ketat jika dibandingkan dengan bakteri. Karakteristik inilah yang membuat khamir sangat cocok dikembangkan untuk produksi enzim skala industri. Pemanfaatan kentang sebagai sumber inulin tidak hanya dapat mengurangi ketergantungan terhadap impor, tetapi juga memberikan peluang pemanfaatan komoditas lokal secara lebih optimal. Dengan demikian, pengembangan bioproses berbasis inulin dari kentang berpotensi memberikan dampak ekonomi, kesehatan, dan kemandirian pangan (Laowklom *et al.*, 2012; Risky *et al.*, 2019).

Penelitian terdahulu telah banyak membahas isolasi khamir dari bahan seperti chicory, dahlia, atau limbah kulit pisang dan ampas tebu (Sun *et al.*, 2021; Dion *et al.*, 2022; Utomo *et al.*, 2022), kajian yang membahas isolasi khamir dari umbi kentang dapat menghasilkan enzim inulinase masih sangat terbatas. Akibatnya, potensi khamir yang ada pada kentang dalam menghasilkan enzim inulinase belum diketahui secara pasti. Selain itu, informasi mengenai bagaimana pengaruh variasi suhu dan pH terhadap aktivitas enzim dari isolat kentang ini juga belum diteliti secara sistematis.

Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi khamir dari umbi kentang dan menguji aktivitas enzim inulinase yang dihasilkannya pada berbagai variasi suhu dan pH. Melalui penelitian ini, diharapkan dapat ditemukan isolat khamir lokal yang potensial, yang kedepannya dapat

membantu pengembangan pangan fungsional, mendukung kemandirian industri nasional, serta memperkuat kemandirian ekonomi dengan mengurangi ketergantungan terhadap impor bahan baku.

1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan yang akan dibahas adalah sebagai berikut:

1. Apakah terdapat isolat khamir inulinolitik yang dapat diperoleh dari umbi kentang (*Solanum tuberosum L*)?
2. Bagaimanakah karakteristik khamir inulinolitik yang berhasil diisolasi, ditinjau dari aspek morfologi dan biokimia?
3. Bagaimanakah aktivitas enzim inulinase yang dihasilkan oleh khamir inulinolitik dari umbi kentang?
4. Bagaimanakah identifikasi molekuler khamir inulinolitik tersebut melalui pendekatan DNA *barcoding*?

1.3 Tujuan

Berikut merupakan tujuan yang dicapai pada tugas terakhir Adalah sebagai berikut:

1. Mengeksplorasi dan mengisolasi khamir inulinolitik penghasil enzim inulinase yang terdapat pada umbi kentang (*Solanum tuberosum L*)
2. Mengukur dan menganalisis aktivitas enzim inulinase yang dihasilkan oleh isolat khamir inulinolitik dari umbi kentang.
3. Mengidentifikasi karakteristik molekuler (melalui DNA *barcoding*) khamir inulinolitik yang ditemukan pada umbi kentang (*Solanum tuberosum L*).

1.4 Manfaat

Manfaat penelitian tugas akhir adalah sebagai berikut:

1. Bagi Mahasiswa

Penelitian ini memberikan pengalaman langsung dalam mengisolasi dan mengidentifikasi khamir inulinolitik dari sumber pangan lokal, yaitu umbi kentang. Mahasiswa memperoleh keterampilan praktis dalam teknik isolasi dan peremajaan mikroba, uji aktivitas enzim, serta analisis molekuler dengan DNA *barcoding*.

2. Bagi Akademik

Hasil penelitian ini menambah data ilmiah mengenai keberadaan khamir inulinolitik pada umbi kentang dan potensinya sebagai penghasil enzim inulinase. Temuan ini dapat memperkaya literatur bioteknologi, khususnya dalam kajian enzim hidrolitik, serta menjadi dasar bagi penelitian lanjutan yang berorientasi pada aplikasi industri pangan dan kesehatan.

3. Bagi Negara

Penelitian ini mendukung pemanfaatan sumber daya hayati lokal sebagai alternatif bahan baku bioteknologi. Identifikasi khamir penghasil inulinase dari umbi kentang membuka peluang pengembangan industri berbasis enzim di Indonesia, yang dapat berkontribusi pada peningkatan nilai tambah komoditas pertanian, ketahanan pangan, serta penembangan produk prebiotik dan pemanis alami yang ramah lingkungan.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Umbi Kentang (*Solanum tuberosum* L.)

Kentang (*Solanum tuberosum* L.) merupakan tanaman umbi stolon yang menjadi salah satu komoditas pangan pokok utama di tingkat global (Liu *et al.*, 2017). Di Indonesia, tingkat konsumsi kentang terus menunjukkan tren peningkatan seiring dengan bertambahnya jumlah penduduk dan meningkatnya kesadaran masyarakat terhadap nilai gizi yang terkandung di dalamnya. Kentang termasuk dalam kelompok tanaman sayuran umbi yang potensial sebagai sumber karbohidrat, dengan kandungan mencapai 12% pada umbi segar (Purnomo *et al.*, 2017). Komoditas kentang memegang peranan penting dan mendapat prioritas untuk dikembangkan karena memiliki nilai ekonomi yang tinggi. Selain itu, pemanfaatan kentang secara optimal juga berpotensi besar dalam mendukung program diversifikasi pangan nasional (Julianti *et al.*, 2018).

Secara morfologi, umbi kentang terbentuk dari modifikasi struktur batang bawah tanah, yaitu stolon. Umbi tersebut dilengkapi dengan mata tunas yang dapat berkembang menjadi tanaman baru, sehingga jamak digunakan sebagai bahan perbanyakan vegetatif (Admin & Mustofa, 2019). Tanaman kentang umumnya termasuk dalam kategori tanaman sayuran semusim berumur pendek yang memiliki variabilitas varietas yang cukup luas (Samadi, 1997).

Kentang (*Solanum tuberosum L.*) merupakan tanaman umbi stolon penting yang dianggap sebagai tanaman pangan pokok terpenting keempat di dunia sebanyak 368 juta ton produksi kentang dunia pada tahun 2013 (Liu *et al.*, 2017). Tingkat konsumsi kentang di Indonesia terus menunjukkan tren peningkatan seiring dengan bertambahnya jumlah penduduk dan meningkatnya kesadaran masyarakat terhadap nilai gizi yang terkandung di dalamnya. Konsumsi kentang di Indonesia naik sebesar 6,4 % dari 1,73 kg/kapita pada tahun 2009 menjadi 1,84 kg/kapital pada tahun 2010 (Biro Pusat Statistik, 2012).

Kentang (*Solanum tuberosum L.*) sebagai salah satu produk hortikultura dari kelompok tanaman sayuran umbi yang sangat potensial sebagai sumber karbohidrat dengan kandungan 12% dari umbi segar (Purnomo *et al.*, 2017). Kentang (*Solanum tuberosum L.*) merupakan salah satu produk yang memegang peranan penting dan mendapat prioritas untuk dikembangkan karena bernilai ekonomi tinggi serta mempunyai potensi untuk mendukung diversifikasi pangan (Julianti *et al.*, 2018; Amarullah *et al.*, 2019).

Umbi kentang atau *Solanum tuberosum L* adalah umbi terbentuk dari struktur modifikasi batang, seperti geragih atau stolon dan rimpang. Umbi kentang dapat memunculkan tunas beserta akar, sehingga dapat dijadikan bahan perbanyakan vegetatif oleh para petani. Kentang juga termasuk dalam kategori tanaman sayuran semusim yang memiliki banyak varietas dan berumur pendek (Admin & Mustofa, 2019; Samadi, 1997). Umbi kentang

secara detail dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Admin & Mustofa, 2019; Rukmana, 1997):

Kingdom : Plantae (tumbuh-tumbuhan)

Divisio : Spermatophyta (tumbuhan berbiji)

Subdivisio : Angiospermae (Berbiji tertutup)

Clasis : Dycotiledone (berkeping dua)

Ordo : Solanes Familia : Solanaceae

Genus : Solanum Spesies : Solanum tuberosum Linn.

Kandungan karbohidrat pada kentang mencapai sekitar 18%, protein 2.4% dan lemak 0.1%. Total energi yang diperoleh dari 100 gram kentang adalah sekitar 80 kkal. Berdasarkan kandungan gizinya, karbohidrat dalam kentang berperan penting dalam menyediakan energi bagi tubuh, sehingga membantu manusia menjalankan berbagai aktivitas sehari-hari. Selain itu, karbohidrat juga memiliki peran vital dalam mendukung proses metabolisme tubuh. Sampel kentang yang digunakan, yaitu kentang granola. Kentang granola merupakan jenis sayur yang paling banyak digunakan dalam masakan Indonesia. Kandungan pati dalam kentang granola termasuk rendah dengan kandungan air yang tinggi (Julianti *et al.*, 2018).

2.2 Karakteristik Kentang (*Solanum tuberosum L.*)

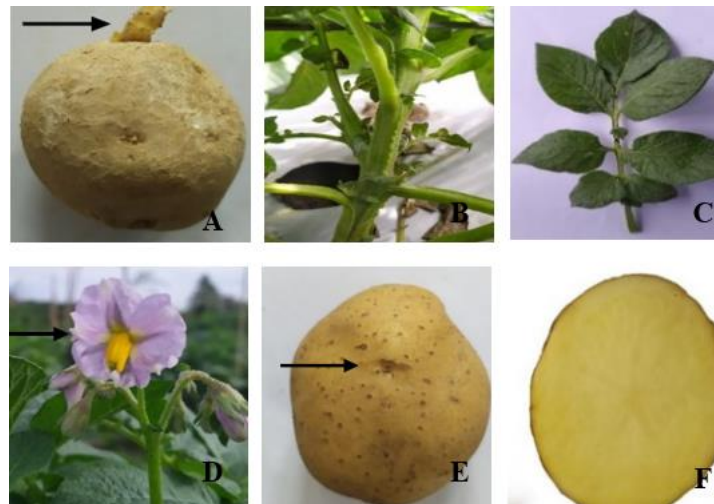
Secara morfologi, karakteristik tanaman kentang dapat diamati pada Gambar 2.1. Gambar 2.1 poin A menunjukkan ukuran tunas varietas kentang lebih pendek dengan rata-rata ukuran tunas 1,15 cm, bentuk tunas ovoid, ukuran ujung tunas rata-rata 0,2 cm, pola pertunasan tertutup, dan memiliki

tunas lateral yang lebih pendek. Bibit tunas pada tanaman kentang granola terdiri dari lima bentuk, yaitu *spherical*, *ovoid*, *conical*, *broad cylindrical*, dan *narrow cylindrical*. Bibit tunas varietas kentang, yaitu *conica*, yang berbentuk seperti kerucut.

Batang tanaman kentang tumbuh tegak dengan percabangan pada ketiak daun sebagai tempat munculnya organ vegetatif, sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 2.1 poin B. Struktur daun varietas ditunjukkan pada Gambar 2.1 poin C, dengan ukuran panjang daun sebesar 11,6 cm dengan susunan daun sedang (Ismadi *et al.*, 2021). Ukuran anak daun tergolong kecil yaitu 3,5 cm, frekuensi daun sekunder 12 daun, frekuensi daun sekunder pada terminal daun sebanyak 8 daun, pada lateral daun sebanyak 4 daun, dan ukuran daun sekunder besar 1,5 cm.

Gambar 2.1 poin D menunjukkan bagian generatif tanaman kentang. Tandan bunga kentang varietas berukuran 0,2 cm dengan empat bunga. Mahkota bunga berukuran 1,3 cm dan bagian dalam mahkota bunga berwarna violet biru dan buahnya berjumlah empat. Karakteristik umbi lainnya ditunjukkan pada Gambar 2.1 poin E dan F. Umbi kentang memiliki bentuk umbi oval memendek, kedalaman mata dangkal, dan kulit umbi sedang, sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 2.1 poin E. Kentang memiliki warna kulit kuning, warna pangkal mata tunas kuning, dan warna daging umbi kuning. Umbi kentang berbentuk lonjong atau oval dengan mata tunas yang dangkal, warna kulit umbi dan daging umbi kuning. Penampang

melintang pada Gambar 2.1 poin F menunjukkan daging umbi varietas memiliki warna lebih pucat atau kuning muda (Ismadi *et al.*, 2021).



Gambar 2.1 Umbi kentang, (A) Tunas kentang, (B) Batang kentang, (C) Daun kentang, (D) Bunga kentang, (e) dan (f) Umbi kentang (Ismadi *et al.*, 2021)

2.3 Karakteristik dan Morfologi Khamir

Khamir atau *yeast* salah satu mikroorganisme yang tersebar banyak di Indonesia. Khamir merupakan mikroorganisme kemoorganotrof, karena memanfaatkan senyawa organik sebagai sumber energi dan tidak memerlukan cahaya untuk pertumbuhannya. Mikroorganisme ini tersebar luas di alam dan umumnya ditemukan pada berbagai jenis bahan pangan yang memiliki kandungan gula tinggi (Yurliasni & Zakaria, 2013).

Khamir atau *yeast* adalah mikroorganisme bersel satu dari kelompok cendawan yang banyak tersebar di Indonesia (Anggraini *et al.*, 2022) dan mudah ditemukan di alam, terutama pada bahan pangan berkadar gula tinggi. Hal ini disebabkan, karena khamir memanfaatkan senyawa organik sebagai

sumber energi sehingga termasuk mikroorganisme kemoorganotrof dan pertumbuhannya tidak membutuhkan Cahaya (Yamin *et al.*, 2022).

Khamir merupakan kelompok cendawan bersel tunggal, meskipun beberapa spesies menunjukkan sifat dimorfik, yaitu kemampuan untuk tumbuh dalam bentuk sel uniseluler maupun membentuk hifa. Beberapa spesies bersifat dimorfik, artinya bisa tumbuh sebagai sel uniseluler atau berubah membentuk struktur seperti hifa pada kondisi tertentu, sehingga khamir memiliki kemampuan adaptasi yang baik pada beragam lingkungan serta berperan penting dalam berbagai proses fermentasi pangan (Lingga *et al.*, 2021).

Pertumbuhan Khamir umumnya berkisar pada suhu 25–30°C karena pada rentang ini kerja enzim di dalam sel khamir berada pada kondisi paling sesuai untuk mengubah nutrisi menjadi energi dan bahan penyusun sel, sehingga pembelahan sel berlangsung cepat dan stabil (Shofa *et al.*, 2024). Ketika suhu naik mendekati 40°C, pertumbuhan masih bisa terjadi tetapi sudah berada di batas atas kemampuan khamir karena panas mulai mengganggu bentuk dan fungsi protein/enzim, membran sel menjadi lebih rapuh, dan keseimbangan air di dalam sel terganggu, sehingga proses metabolisme melambat dan banyak sel mengalami stres, dimana menurut (Chen *et al.*, 2025) di atas suhu maksimum ini kerusakan protein dan membran semakin besar sampai sel sulit bertahan hidup.

Selain suhu, pH juga berpengaruh terhadap pertumbuhan khamir, dimana pH optimum khamir berada di kisaran 4,5–5 karena lingkungan yang agak asam membantu menjaga sistem kerja enzim dan transport nutrisi tetap

efisien (Effendi & Parhusip, 2022), sekaligus membuat banyak bakteri pesaing lebih sulit tumbuh sehingga khamir lebih unggul dalam memanfaatkan makanan yang ada, sementara pH yang terlalu rendah membuat kondisi terlalu asam untuk kestabilan struktur sel dan menghambat kerja enzim, dan pH yang terlalu tinggi (kurang asam) mengacaukan keseimbangan ion serta fungsi membran sehingga penyerapan nutrisi dan produksi energi tidak berjalan sebaik pada kisaran 4 dan 5 (Effendi & Parhusip, 2022).

Khamir umumnya berupa sel tunggal berbentuk bulat, oval, atau sedikit lonjong, dengan permukaan sel yang jelas karena memiliki dinding sel seperti jamur (Faikar, 2024), dan ciri yang paling mudah dikenali adalah adanya tunas kecil yang muncul pada permukaan sel sebagai cara khamir beregenerasi. Khamir berukuran jauh lebih besar dibanding bakteri, sekitar 5–20 μm (Khazalina, 2020), sedangkan bakteri umumnya lebih kecil sekitar 1–10 μm (Puspita et al., 2020), sehingga khamir lebih mudah terlihat jelas di bawah mikroskop.

Reproduksi khamir, yaitu asexual dan seksual. Reproduksi asexual, membentuk tunas (budding) yang kemudian membesar dan akhirnya lepas menjadi sel baru (Noni *et al.*, 2025), dimana bentuk khas bertunas ini membuat khamir terlihat seperti sel induk dengan “anak sel” menempel. Khamir tumbuh optimal pada lingkungan yang memiliki ketersediaan air cukup, karena mampu beradaptasi pada medium dengan konsentrasi zat terlarut (seperti gula atau garam) yang relatif tinggi dibandingkan bakteri. Beberapa jenis khamir bahkan

mampu tumbuh pada kondisi aktivitas air rendah, dan termasuk dalam kelompok osmofilik (Fardiaz, 1992).

2.4 Khamir Inulinolitik

Khamir inulinolitik adalah kelompok khamir yang mampu menghasilkan enzim inulinase, yaitu enzim yang menghidrolisis inulin menjadi fruktosa dan fruktooligosakarida. Kemampuan ini menjadikan khamir inulinolitik penting dalam proses biokonversi bahan alami yang mengandung inulin, seperti umbi dahlia, chicory, dan agave, menjadi produk bernilai tinggi seperti sirup fruktosa dan prebiotik (Saryono *et al.*, 2016).

Beberapa spesies khamir memiliki kemampuan menghasilkan enzim inulinase yang mampu menghidrolisis inulin menjadi fruktosa atau fruktooligosakarida. Khamir dengan kemampuan tersebut disebut sebagai khamir inulinolitik (Saryono *et al.*, 2016). Inulinase termasuk dalam kelompok enzim hidrolitik yang berperan penting dalam pemecahan ikatan β -(2,1)-fruktosidik pada inulin, sehingga berpotensi dimanfaatkan dalam industri pangan, farmasi, dan bioteknologi (Singh & Gill, 2006).

Beberapa spesies khamir yang telah dilaporkan memiliki potensi inulinolitik antara lain *Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefyr*, *Pichia caribbica*, dan *Cryptococcus aureus* (Saryono *et al.*, 2016; Viswanathan & Kulkarni, 1995; Cruzguerrero *et al.*, 1995). Spesies *K. marxianus* diketahui sebagai produsen inulinase yang efisien karena memiliki sistem sekresi enzim yang baik dan mampu tumbuh pada suhu tinggi hingga 45 °C, menjadikannya kandidat unggul untuk produksi enzim skala industri (Singh & Gill, 2006).

Penelitian yang dilakukan (Wijanarka *et al.*, 2011) menunjukkan bahwa beberapa isolat khamir lokal mampu menghasilkan aktivitas inulinase saat ditumbuhkan pada substrat yang mengandung ekstrak chicory. Sementara itu, di Indonesia, khamir inulinolitik juga diisolasi dari bahan alami seperti kulit pisang kepok (*Musa acuminata* × *balbisiana*) dan ampas tebu, yang menunjukkan potensi besar sebagai sumber inulinase lokal (Utomo *et al.*, 2021).

2.5 Inulin

Inulin merupakan polifruktan yang melimpah di alam dan berpotensi menjadi substat untuk produksi FOS serta berbagai olahan produk makanan kesehatan. Struktur inulin tersusun atas senyawa linier yang terdiri dari oligomer fruktosa dengan ikatan glikosidik B-D (2→1) dan bagian glukosa pada ujung pereduksi terminal yang dihubungkan oleh ikatan α-D (1→2). Inulin adalah karbohidrat alami, polimer dari unit fruktosa. Ini adalah komponen makanan dengan kandungan serat yang sangat tinggi (>90%) dan digunakan dalam makanan fungsional. Inulin larut dalam air tetapi tidak dapat dipecah oleh enzim pencernaan dan oleh karena itu mencapai usus besar tanpa mengalami perubahan. Namun, di sana, inulin dapat difermentasi oleh flora usus, yang memiliki efek positif pada kesehatan. Oleh karena itu, inulin dapat digunakan sebagai prebiotik (Singh *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2019 dan Teferra, 2019).

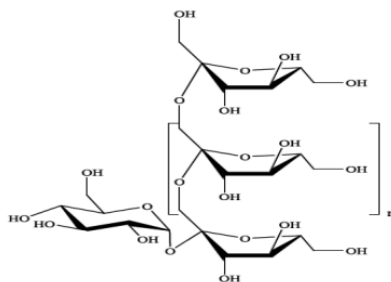
Macam-macam prebiotik dari golongan oligosakarida yang umum ditambahkan pada olahan makanan dan suplemen, terdiri dari inulin, fruktooligosakarida (FOS), galaktooligosakarida (GOS), trans-galacto-oligosakarida (TOS), polidekstroza, isomalto-oligosakarida, malto-oligosakarida, glukosa-oligosakarida, gliko-oligosakarida, lactilol, fiber gums, laktosukrosa, laktulosa, oligofruktosa, pirodekstrin, soy oligosaccharides (Sharma *et al.*, 2011; Ricke., 2015 dan Davani *et al.*, 2019). Prebiotik dapat berasal dari serat pangan yang tersusun dari karbohidrat (macam: pati resisten, pati dan produk degradasi pati); polisakarida nonpati (macam: selulosa, hemiselulosa dan pektin); serta inulin dan oligosakarida (macam fruktooligosakarida (FOS), galaktooligosakarida (GOS), dan xilooligosakarida (XOS)) (Tsai *et al.*, 2019).

2.6 Enzim Inulinase

Enzim yang memecah inulin menjadi molekul glukosa disebut inulinase. Enzim ini termasuk dalam kelompok hidrolase dan memecah inulin menjadi fruktooligosakarida (FOS), yaitu fruktosa. Inulinase dapat diproduksi oleh bakteri, jamur, dan tumbuhan. Enzim ini pertama kali diisolasi dari tumbuhan dan juga diproduksi oleh berbagai mikroorganisme seperti bakteri, ragi, dan kapang. Mekanisme aksi inulinase terhadap inulin dikategorikan menjadi exoinulinase (B-D-fructan fructohidrolase) dan endoinulinase (1-B-D-fruktan fruktanohidrolase). Exoinulinase beraksi pada unit terminal fruktosa pada inulin dan memproduksi fruktosa. Endoinulinase beraksi secara acak pada internal B-2,1 ikatan glikosidik pada inulin dan memproduksi

fruktooligosakarida (Singh *et al.*, 2016). Inulinase mengkatalis proses hidrolisis ikatan glikosidik pada inulin untuk memproduksi fruktosa, glukosa dan inulo-oligosakarida, 95-98% produk yang dihasilkan merupakan fruktosa (Leva *et al.*, 2016). Sumber inulinase diperoleh dari tanaman dan mikroorganisme. Sumber inulinase dari tanaman berasal dari dandelion, chicory, dan jerusalem artichokefruktosil (F) yang bertaut pada sukrosa (Vandana *et al.*, 2013 dan Sridevi *et al.*, 2014).

Hidrolisis inulin menggunakan inulinase merupakan proses satu tahap melalui mekanisme enzimatik dengan memecah ikatan glikosidik β -D-(2 $\rightarrow$ 1) secara acak dan memproduksi campuran FOS. Hasil produksi meliputi β -D-Fru (2 $\rightarrow$ 1)-[β -D-Fru(2 $\rightarrow$ 1)-] $_n$ di mana $n = 2-9$ (Vandana *et al.*, 2013 dan Singh *et al.*, 2016). Beberapa khamir yang mampu menghasilkan inulinase, yakni Khamir *Pichia manshurica* DUCC-Y015 mampu menghasilkan enzim inulinase dengan diinduksi substrat inulin. *Pichia manshurica* DUCC-Y015 merupakan khamir indigenous yang berhasil diisolasi dari umbi dahlia dan mampu menghasilkan enzim inulinase sebesar 0,683 IU (Wijanarka & A.N, 2019).



Gambar 2.2 Struktur Inulin (Wan *et al.*, 2020)

2.7 Identifikasi Molekuler

Identifikasi molekuler penting dilakukan dalam eksplorasi khamir inulinolitik, karena memberikan informasi genetik yang akurat untuk mendukung karakterisasi spesies (Sulistiani *et al.*, 2018). Teknik DNA *barcoding* memanfaatkan gen spesifik dalam suatu individu untuk menganalisis dan mengetahui jenis khamir yang diidentifikasi, di mana marker gen yang umum digunakan adalah daerah ITS rDNA karena memiliki tingkat variabilitas tinggi antar spesies (Karimi *et al.*, 2015).

DNA *barcoding* dengan ITS rDNA banyak digunakan dalam membantu karakterisasi molekuler khamir karena memiliki keunggulan berupa keberadaan gen pada seluruh khamir serta adanya variasi urutan basa yang memungkinkan identifikasi spesies baru (Vu *et al.*, 2019). Dengan menggunakan urutan ITS rDNA, hubungan filogenetik antar khamir dapat diukur sehingga pohon kekerabatan dapat disusun secara lebih akurat (Groenewald *et al.*, 2018).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian tugas akhir dengan judul “**Eksplorasi dan Identifikasi Molekuler dengan DNA Barcodung Khamit Inulinolitik Penghasil Enzim Inulinolitik dari Umbi Kentang (*Solanum tuberosum L.*)**” berlangsung pada bulan November 2025-Maret 2026 yang bertempat di Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro.

3.2 Alat dan bahan

3.2.1 Alat

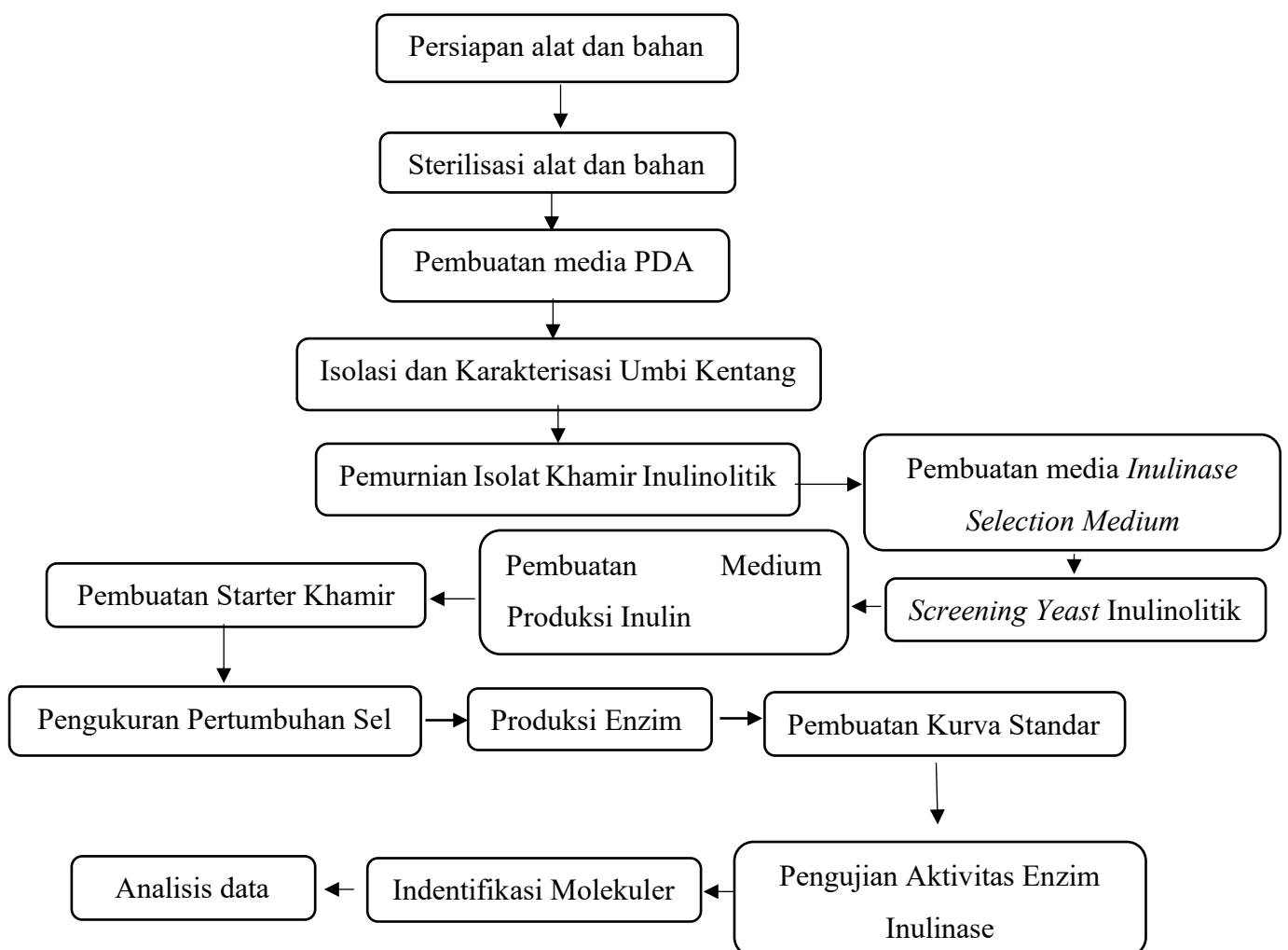
Alat yang digunakan dalam penelitian tugas akhir adalah tabung reaksi, gelas ukur, erlenmeyer, gelas beker, cawan petri, rak tabung reaksi, jarum ose bulat, pipet tetes, mikropipet, mikroskop Optilab, *object glass*, *cover glass*, mortar, pastle, *Laminar Air Flow*, *oven*, *microwave*, *autoclave*, *rotary shaker*, *centrifuge*, spektrofotometer UV-Vis, *incubator*, *vortex*, *hotplate and magnetic stirrer*, eppendorf, kompor, botol film, talenan, panci, dan wadah.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian tugas akhir adalah kentang, serbuk *potato dextrose agar*, akuades steril, alkohol 70%, inulin murni 1%, agar, *methylene blue*, reagen asam 3,5 dinitrosilat (DNS), *yeast extract*, pepton, glukoda, *Inulin selecting medium* (ISM),

NH_4NO_3 0,23%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.37%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, *chloramfenicol*, larutan fruktosa, buffer sodium asetat, HCL, minyak inersi, label, wrap, kapas steril, plastik tahan panas, aluminium foil, dan karet.

3.3 Diagram Alir



3.4 Cara Kerja

3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan dilakukan untuk menjaga kondisi aseptis selama penelitian sehingga tidak terjadi kontaminasi mikroba. Peralatan gelas seperti adalah tabung reaksi, gelas ukur, erlenmeyer, gelas beker, cawan petri, mortar, dan pastel disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15–20 menit. Prosedur ini mengikuti standar laboratorium mikrobiologi modern yang menekankan kombinasi metode fisik dan kimia untuk memastikan integritas sampel serta keandalan data penelitian (Zhang *et al.*, 2024)

3.4.2 Pembuatan Media *Potato Dextrose Agar*

Pembuatan media PDA yang mengacu pada penelitian (Puspita *et al.*, 2020), yaitu PDA ditimbang sebanyak 10,5 gr lalu ditambahkan *aquadest* sebanyak 250 mL, kemudian dihomogenkan di *hotplate*. Setelah itu disterilisasi dalam *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dituangkan ke cawan petri secara aseptis.

3.4.3 Isolasi dan Karakterisasi Umbi Kentang

Umbi kentang (*Solanum tuberosum L.*) segar dibersihkan menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel (Dion *et al.*, 2022). Permukaan umbi kemudian disterilisasi dengan etanol 70% selama satu menit dan dibilas dengan akuades steril agar kontaminan permukaan dapat dihilangkan (Bessadok *et al.*, 2022). Umbi kentang (*Solanum tuberosum L.*) yang digunakan sebagai sumber

isolat khamir terlebih dahulu disimpan selama ± 10 hari pada kondisi ruang untuk terjadinya perubahan fisiologis dan akumulasi gula sederhana yang mendukung pertumbuhan mikroorganisme endofitik.

Setelah periode penyimpanan, umbi digerus menggunakan mortar dan pestle secara aseptik hingga membentuk homogenat, sehingga mikroorganisme dapat dilepaskan dari jaringan umbi (Bessadok *et al.*, 2022). Homogenat tersebut dipindahkan ke cawan petri steril untuk memudahkan proses inokulasi. Suspensi kemudian diinokulasikan ke media *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang telah ditambahkan antibiotik untuk menghambat pertumbuhan bakteri, dan diinkubasi pada suhu 28–30 °C selama 48–72 jam hingga koloni khamir muncul (Dion *et al.*, 2022). Koloni yang muncul diamati berdasarkan karakter morfologi makroskopis seperti warna, bentuk, dan tekstur, serta karakter mikroskopis berupa bentuk sel dan cara reproduksi menggunakan mikroskop cahaya (Luo *et al.*, 2019).

3.4.4 Pemurnian Isolat Khamir Inulinolitik

Pemurnian isolat khamir inulinolitik dilakukan dengan koloni khamir yang tumbuh pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) setelah tahap isolasi awal diamati berdasarkan perbedaan morfologi makroskopis seperti warna, bentuk, dan tekstur permukaan koloni untuk menentukan kandidat isolat yang berbeda (Dion *et al.*, 2022). Koloni yang menunjukkan karakteristik morfologi bervariasi kemudian dipindahkan ke media PDA baru menggunakan teknik *streak plate*,

dengan tujuan memperoleh isolat tunggal yang bebas dari kontaminasi mikroba lain (Nafisa & Wijanarka, 2025). Proses teknik *streak* ini dilakukan secara berulang hingga diperoleh koloni dengan morfologi seragam, yang menjadi indikator bahwa isolat telah mencapai tingkat kemurnian yang memadai dan diinkubasi selama 24-48 jam.

3.4.5 Pembuatan Media Inulinase Selection Medium

Media *Inulinase Selecting Medium* (ISM) untuk menyeleksi isolat khamir yang berpotensi menghasilkan enzim inulinase. Formulasi media ini mengacu pada penelitian (Dion *et al.*, 2022), yang menggunakan inulin sebanyak 1 g sebagai sumber karbon, *yeast extract* 0,5 g sebagai sumber nitrogen, serta agar 2 g sebagai pemadat dalam 100 mL media. Penambahan *yeast extract* dalam jumlah terbatas bertujuan menyediakan nutrisi dasar tanpa mengurangi tekanan seleksi terhadap pemanfaatan inulin (Bessadok *et al.*, 2022). Semua bahan dicampurkan dengan aquades steril hingga mencapai volume yang ditentukan, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C tekanan 2 atm selama 15 menit. Media steril dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan memadat pada suhu ruang.

3.4.6 Screening Yeast Inulinolitik

Screening isolat khamir dilakukan untuk mengetahui kemampuan menghasilkan enzim inulinase. Isolat murni hasil pemurnian terlebih dahulu diinokulasikan ke dalam media *Inulinase Selecting Medium* (ISM). Isolat murni hasil pemurnian diinokulasikan

pada media *Inulinase Selecting Medium* (ISM) dengan teknik *streak* menggunakan ose steril, sehingga koloni dapat tumbuh terpisah dan mudah diamati (Dion *et al.*, 2022; Paixão *et al.*, 2013). Cawan petri yang telah diinokulasi diinkubasi pada suhu 28–30 °C selama 48–72 jam. Pertumbuhan koloni diamati secara makroskopis dan mikroskopis, dengan indikator utama berupa kemampuan isolat untuk tumbuh pada media yang hanya menyediakan inulin sebagai substrat (Nafisa *et al.*, 2025).

3.4.7 Pembuatan Medium Produksi Inulin

Medium produksi inulin disiapkan untuk menguji kemampuan isolat khamir dalam menghasilkan enzim inulinase. Formulasi pembuatan medium produksi inulin dilakukan dengan mengacu pada penelitian (Dion *et al.*, 2022). Dalam 100 mL media terdiri atas tepung dahlia 3% sebagai sumber inulin, NH_4NO_3 0,23% sebagai sumber nitrogen anorganik, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,37% dan K_2HPO_4 0,1% sebagai sumber fosfat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05% sebagai sumber mineral, serta *yeast extract* 0,15% sebagai sumber vitamin dan nitrogen organik.

Tahapan pertama dilakukan dengan melarutkan tepung dahlia dalam 100 mL akuades, kemudian dipanaskan hingga mendidih sampai larutan berwarna bening. Larutan yang telah mendidih disaring menggunakan corong dan kertas saring steril, lalu volume hasil saringan diukur kembali hingga mencapai 100 mL dengan gelas ukur (Dion *et al.*, 2022). Bahan tambahan yang telah ditimbang sesuai

konsentrasi dimasukkan ke dalam larutan tepung dahlia, kemudian diaduk hingga homogen. pH larutan diukur menggunakan pH strip dan disesuaikan dengan menambahkan HCl sedikit demi sedikit hingga mencapai pH 5 (Dion *et al.*, 2022). Medium yang telah homogen kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit untuk memastikan kondisi aseptik (Bessadok *et al.*, 2022). Medium steril didinginkan hingga suhu ruang sebelum digunakan untuk inokulasi isolat khamir inulinolitik.

3.4.8 Pembuatan Starter Khamir Inulinolitik

Pembuatan starter khamir inulinolitik dilakukan untuk memperoleh kultur aktif yang siap digunakan pada tahap produksi enzim. Isolat khamir diinokulasikan sebanyak 1 ose ke dalam erlenmeyer berisi 5 mL medium produksi, kemudian diinkubasi pada suhu ruang 28–30 °C dengan agitasi 120 rpm selama 24 jam untuk merangsang pertumbuhan sel aktif (Bessadok *et al.*, 2022). Kultur starter yang diperoleh diamati kekeruhannya sebagai indikator pertumbuhan, dan selanjutnya digunakan sebagai inokulum pada medium produksi inulin.

3.4.9 Pengukuran Pertumbuhan Sel

Pertumbuhan sel khamir inulinolitik diukur menggunakan metode spektrofotometri pada panjang gelombang 520 nm. Kultur cair diinkubasi pada suhu 28–30 °C dengan agitasi 120 rpm, kemudian sampel diambil setiap 6 jam sekali selama periode inkubasi 30 jam menggunakan mikropipet steril sebanyak 3 mL (Mutiaratri *et al.*, 2015). Nilai absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis, dan peningkatan densitas optik digunakan sebagai indikator pertumbuhan sel (Mira *et al.*, 2022).

3.4.10 Produksi Enzim

Produksi enzim inulinase mengacu pada penelitian (Amedia *et al.*, 2016), yaitu dengan inokulasi starter yang telah dibuat pada masing-masing medium 50 mL medium produksi inulin. Biakan tersebut diinkubasi serta dihomogenkan menggunakan *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Kemudian pengamatan untuk pertumbuhan sel dilakukan setiap 6 jam sekali selama ± 30 jam. Waktu-waktu tersebut merupakan waktu khamir menunjukkan kepadatan sel maksimum. Sampel kultur diambil sebanyak 1,5 mL dimasukkan ke dalam botol film. Sampel kultur yang diambil disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan *crude enzyme*, dan digunakan untuk uji aktivitas enzim.

3.4.11 Pembuatan Kurva Standar

Pembuatan kurva standar dilakukan untuk memperoleh persamaan regresi antara konsentrasi gula pereduksi dengan nilai absorbansi hasil reaksi DNS. Larutan fruktosa standar disiapkan dengan konsentrasi bertingkat, misalnya 0,2%; 0,4%; 0,6%; 0,8%; dan 1,0%, kemudian masing-masing diambil sebanyak 1 mL dan ditambahkan 1 mL reagen DNS (Kumar *et.al*, 2018). Campuran dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit hingga terbentuk warna jingga, lalu didinginkan pada suhu ruang sebelum ditambahkan 8 mL akuades steril untuk mengencerkan volume (Nafisa & Wijanarka, 2025).

3.4.12 Pengujian Aktivitas Enzim Inulinase

Pengujian aktivtitas enzim inulinase mengacu penelitian (Wijanarka & A.N, 2019) dengan sebanyak 4 buah tabung reaksi disiapkan dengan masing-masing perlakuan dengan label ES (Enzim-Substrat), S (Substrat inulin), E (*Crude Enzyme*) dan blanko. Tabung ES dengan komposisi 0,5 mL substrat inulin murni 1%, 0,4 mL buffer sodium asetat 0,1 M pH 5 dan 0,1 mL *crude enzyme*; tabung S dimasukkan 0,5 mL substrat inulin murni 1%, 0,4 mL buffer sodium asetat 0,1 M pH 5 dan 0,1 mL akuadest steril; tabung E dimasukkan 0,4 mL buffer sodium asetat, 0,1 mL *crude enzyme* dan 0,5 mL akuadest steril; dan tabung blanko diisi 0,4 mL buffer sodium asetat dan 0,6 mL akuadess steril.

Semua tabung diinkubasikan dalam oven pada suhu 35 °C dan 40 °C selama 30 menit. Reaksi dimatikan dengan air mendidih $\pm$ 2 menit dan ditunggu hingga larutan dengan panas hangat-hangat kuku, kemudian ditambahkan 1 mL reagen DNS dan dipanaskan kembali selama $\pm$ 2 menit, ditambahkan 5 mL akuadest dan diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 570 nm. Aktivitas enzim dinyatakan dalam satuan Internasional Unit (IU), dimana 1 unit aktivitas enzim berarti sejumlah enzim mampu membebaskan produk sebanyak 1 μ mol per menit. Aktivitas inulinase dapat ditentukan menurut rumus dari penelitian (Milek, 2022; Wijanarka & A.N, 2019) sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas enzim (IU)} = \frac{\text{AbsES} - \text{AbsE} - \text{AbsS} \cdot \text{fruktosa}}{\text{BMf} \cdot t} \times P \times 1000$$

Keterangan:

Abs ES	= absorbansi enzim substrat
Abs E	= absorbansi enzim
Abs ES	= absorbansi enzim substrat
Abs S	= absorbansi substrat
BMf	= berat molekul fruktosa (180,1 gr/mol)
P	= faktor pengenceran (50 x)
t	= waktu inkubasi selama 30 menit dengan persamaan regresi kurva fruktosa standar $Y \text{ fruktosa} = -0,0288 + 0.5398 X_{\text{nilai OD}}$.

3.4.13 Identifikasi Molekuler

Identifikasi molekuler khamir dilakukan melalui beberapa tahapan yang terstandar. Tahap pertama adalah ekstraksi DNA, yang dilakukan menggunakan kit komersial untuk memperoleh DNA genom dengan kemurnian tinggi. Metode ini efektif dalam isolasi DNA khamir yang stabil dan siap digunakan sebagai template PCR (Alves *et al.*, 2017). DNA hasil ekstraksi kemudian dilarutkan dalam 50 μ L akuades steril dan disimpan pada suhu -20 °C hingga digunakan (Dion *et al.*, 2022). Tahap kedua kemudian, adalah amplifikasi gen target menggunakan PCR. Marker gen yang digunakan adalah ITS region dengan primer universal ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') dan ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), karena region ini merupakan standar internasional untuk identifikasi khamir (Kurtzman & Robnett, 2016).

Reaksi PCR dilakukan dengan komposisi larutan DNA sebanyak 2 μ L ($\pm$ 500 ng) diamplifikasi dengan volume reaksi 25 μ L yang terdiri dari 12,5 μ L master mix (Thermoscientific), 1 μ L (10 pmol) forward primer (ITS1) (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'), 1 μ L (10 pmol) reverse primer (ITS4) (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), dan 8,5 μ L dH₂O. Kondisi PCR terdiri atas denaturasi awal 95 °C selama 5 menit, diikuti 35 siklus denaturasi 95 °C selama 30 detik, annealing 55 °C selama 30 detik, dan ekstensi 72 °C selama 1

menit, serta ekstensi akhir 72 °C selama 10 menit (Nafisa & Wijanarka, 2025).

Tahap ketiga adalah elektroforesis dilakukan dalam 1,5% w/v gel agarose (TopVision, Frementas) dengan buffer TBE 0,5X, marker GeneRuler 100 pb DNA Ladder (Fermentas) dan diwarnai dengan ethidiup bromide. Gel diberi pewarna DNA interkalasi, kemudian dijalankan pada tegangan 100 V selama 45 menit dengan marker DNA 100 bp sebagai penanda ukuran. Visualisasi pita DNA dilakukan menggunakan UV *transilluminator* dan didokumentasikan dengan sistem GelDoc (Bessadok *et al.*, 2022). Tahap keempat adalah sekuensing DNA menggunakan metode Sanger. Produk PCR yang sesuai dikirim ke Laboratorium SIG dan hasil sekuens dianalisis menggunakan perangkat lunak BLAST untuk membandingkan dengan database GenBank NCBI (Alves *et al.*, 2017).

3.5 Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Percobaan Acak Kelompok (RAK) pola factorial. Penelitian yang dilakukan, yakni penelitian kuantitatif dengan dua faktor. Dua factor yang dicoba meliputi, yaitu suhu inkubasi dan pH inkubasi fermentasi. Factor suhu inkubasi terdiri dari taraf 35°C (S1) dan 40°C (S2). Pada factor ke dua, yaitu PH dengan taraf (4,0 5,0, dan 6,0). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak tiga kali pengulangan. Data yang diperoleh kemudian dianalisis lebih lanjut dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan tingkat signifikansi yang digunakan adalah 5% ($p < 0,05$),

jika terdapat pengaruh dari perlakuan dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan berdasarkan hasil nilai koefisien keragaman.

Tabel 3.1 Variabel Penelitian

Jenis Variabel	Keterangan
Variabel Bebas	Suhu Inkubasi, PH Inkubasi
Variabel Terikat	Aktivitas Enzim
Variabel Kontrol	Waktu Inkubasi, Media Fermentasi, Kondisi Lingkungan, Metode dan Alat Pengukuran

Tabel 3.2 Rancangan Percobaan

No.	Faktor		Pengulangan			Total
	PH	Suhu	1	2	3	
1	P1	S1	P1S1A	P1S1B	P1S1C	3
		S2	P1S2A	P1S1B	P1S1C	3
2	P2	S1	P2S1A	P2S1B	P2S1C	3
		S2	P2S2A	P2S2B	P2S2C	3
3	P3	S1	P3S1A	P3S1B	P3S1C	3
		S2	P3S2A	P3S2B	P3S2C	3

Keterangan:

P1S1: pH 4 Suhu 35 °C

P1S2: pH 4 suhu 40 °C

P2S1: pH 5 suhu 35 °C

P2S2: pH 5 Suhu 40 °C

P3S1: pH 6 Suhu 35 °C

P3S2: pH 6 Suhu 35 °C

3.6 Analisis Data

Data hasil yang didapatkan diolah dengan menggunakan Ms Excel sebagai mengetahui rata-rata aktivitas enzim inulinase dan mendapatkan kurva standar dari pertumbuhan. Kemudian digunakan *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) untuk menganalisa data hasil penelitian secara statistik. Sebelum dilakukan uji *Analysis of Variance* (ANOVA) data diuji persyarat parametrik, yaitu uji normalitas. Uji normalitas menggunakan metode *Shapiro-Wilk* dan *Kolmogorov-Smirnov* bertujuan untuk memastikan data terdistribusi secara normal. Apabila terpenuhi, data dianalisis lebih lanjut menggunakan uji *Analysis of Variance* (ANOVA), lalu diuji lanjutan menggunakan uji tukey untuk mengetahui perlakuan mana yang berbeda nyata.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolat Khamir dari Umbi Kentang

Berdasarkan tabel 4.1 dan 4.2 karakterisasi morfologi makroskopis terhadap sebelas isolat khamir (I-1 hingga I-11) yang ditumbuhkan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) menunjukkan karakteristik antar-isolat, pada bentuk, tekstur, warna, permukaan dan elevasi. Hal ini didukung oleh pernyataan Wirato, *et al.*, (2018) bahwa identifikasi khamir secara morfologi dapat dilakukan melalui pengamatan koloni dan sel. Karakter morfologi koloni dapat diidentifikasi berdasarkan warna, bentuk, elevasi, tepi, dan tekstur koloni. Berdasarkan data pengamatan, keseluruhan isolat memperlihatkan bentuk koloni (*shape*) bulat (*circular*). Karakteristik bentuk ini sejalan dengan pernyataan Fadhli *et al.*, (2019) bahwa bentuk koloni khamir umumnya meliputi bulat (*circular*), tidak beraturan (*irregular*), *filamentous*, dan *rhizoid*, di mana bentuk sirkular merupakan karakter yang paling dominan dijumpai pada khamir yang dikultur pada media padat.

Berdasarkan tabel 4.1 dan 4.2 tekstur koloni, mayoritas isolat khamir menunjukkan karakteristik *butyrous* (seperti mentega) tidak berlendir dengan koloni yang lunak, padat. Namun, variasi ditemukan pada isolate I-1, I-6, I-7, dan I-10 yang memiliki tekstur licin. Menurut Fadhli *et al.* (2019), tekstur koloni khamir dapat *butyrous* atau tidak licin dan tidak berlendir, menegaskan salah satu variasi karakterisasi umum isolat khamir yang diisolasi dari substrat alami. Berdasarkan tabel 4.1 dan 4.2 keberagaman warna dan permukaan koloni yang teramati pada kesebelas isolat mengindikasikan

adanya keragaman spesies khamir yang berhasil diisolasi dari umbi kentang. Warna koloni menunjukkan kisaran warna dari putih hingga krem. Isolat I-1 dan I-6 memiliki warna putih (*white*), sedangkan isolat lainnya seperti I-2, I-3, I-4, dan I-6 menunjukkan gradasi warna krem (*cream*) hingga krem keputihan. Karakteristik ini didukung oleh penelitian Al Halim et al. (2024) yang menyatakan bahwa khamir penghasil enzim hidrolitik dari substrat kaya karbohidrat, seperti umbi-umbian, umumnya menampilkan koloni berwarna putih hingga krem sebagai refleksi dari aktivitas metabolisme karbohidrat pada media pertumbuhannya. Hal ini sejalan dengan pernyataan Faikar, *et al.*, (2024) bahwa isolat khamir yang diisolasi dari substrat organik yang sama cenderung memiliki kemiripan karakteristik morfologi makroskopis pada parameter bentuk, tekstur, elevasi, dan tepi koloni, meskipun dapat menunjukkan perbedaan pada parameter warna dan permukaan koloni

Variasi permukaan koloni *dull* atau tidak mengilap yang teramati pada isolat mengindikasikan adanya perbedaan kemampuan produksi senyawa ekstraseluler antar isolat khamir, yang berkaitan erat dengan potensi masing-masing isolat dalam memproduksi enzim inulinase. Elevasi (*elevation*) seluruh isolat menunjukkan profil *flat* (datar), yaitu koloni tumbuh sejajar dengan permukaan media agar tanpa adanya tonjolan ke atas. Nurhayati *et al.*, (2022) menyatakan bahwa profil elevasi koloni khamir dapat bervariasi mulai dari *flat*, *raised*, hingga *convex* bergantung pada spesies khamir dan komposisi nutrisi media yang digunakan. Tepi koloni (*edges*) seluruh isolat bersifat *entire* (rata), yaitu tepi koloni halus dan tidak berlobus maupun

bergelombang, yang mencerminkan pola pertumbuhan koloni yang teratur dan konsisten.

Keberagaman warna dan permukaan koloni yang teramati pada kesebelas isolat mengindikasikan adanya keragaman spesies khamir yang berhasil diisolasi dari umbi kentang. Hal ini sejalan dengan pernyataan Faikar, *et al.*, (2024) bahwa isolat khamir yang diisolasi dari substrat organik yang sama cenderung memiliki kemiripan karakteristik morfologi makroskopis pada parameter bentuk, tekstur, dan elevasi meskipun dapat menunjukkan perbedaan pada parameter warna dan permukaan koloni.

Tabel 4.1 Karakterisasi Morfologi Makroskopis Isolat Khamir dari Umbi Ketang pada Media PDA menurut Darmasiwi *et al.*, (2024)

No.	Kode Isolat	Shape (Bentuk)	Texture (Tekstur)	Color (Warna)	Surface (Permukaan)	Elevation (Elevasi)
1.	I-1	Bulat	Butyrous	Putih (White)	Glistening	Flat
2.	I-2	Bulat	Butyrous	Putih krem (Creamy white)	Glistening	Flat
3.	I-3	Bulat	Butyrous	Krem (Cream)	Dull	Flat
4.	I-4	Bulat	Butyrous	Krem (Cream)	Glistening	Flat
5.	I-5	Bulat	Butyrous	Putih (White)	Dull	Flat
6.	I-6	Bulat	Granular	Krem keputihan (Creamy)	Smooth	Flat
7.	I-7	Bulat	Butyrous	Putih krem (Creamy white)	Glistening	Flat
8.	I-8	Bulat	Dry	Putih (White)	Rough	Flat
9.	I-9	Bulat	Butyrous	Putih (White)	Smooth	Flat
10.	I-10	Bulat	Butyrous	Putih (White)	Glistening	Flat
11.	I-11	Bulat	Butyrous	Putih krem (Creamy white)	Dull	Flat

4.2 Skrining khamir Inulinolitik Umbi Kentang pada Media *Inulinase Screening Media*

Skrining khamir inulinolitik dari umbi kentang bertujuan untuk mengurangi pertumbuhan mikroorganisme non-target sekaligus mendukung pertumbuhan khamir inulinolitik dengan memanfaatkan inulin sebagai sumber karbon. Sesuai dengan pernyataan Manguali *et al.*, (2024) bahwa pemanfaatan inulin sebagai sumber karbon mampu mendukung pertumbuhan selektif, karena menyediakan kondisi yang sesuai sekaligus menekan pertumbuhan mikroorganisme non target, Media ISM ditambahkan dengan *chloramphenicol* untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Sesuai dengan pernyataan Elisabeth *et al* (2019) bahwa kloramfenikol yang berperan sebagai antibiotik untuk menghambat pertumbuhan bakteri dan menghindari terjadinya kontaminasi dengan mikroba disekitar.

Sebanyak 11 isolat dengan koloni tunggal khamir yang sebelumnya tumbuh pada media PDA, selanjutnya diseleksi menggunakan media ISM. Pertumbuhan pada media ISM menunjukkan bahwa isolat tersebut memiliki kemampuan memanfaatkan inulin sebagai sumber karbon utama, dan dapat berpotensi menghasilkan enzim inulinase. Sesuai dengan pernyataan Dion, *et al.*, (2022) bahwa penggunaan pembatasan nutrisi melalui medium selektif inulin ini memiliki kecenderungan kuat untuk hanya memperoleh isolat khamir yang secara spesifik mampu tumbuh dengan memanfaatkan inulin sebagai sumber karbon Tunggal. Pernyataan tersebut diperkuat oleh Yusuf and Wijanarka (2024) yang menyatakan bahwa media

Inulin Selective Medium (ISM) merupakan media selektif yang mengandung inulin sebagai satu-satunya sumber karbon, sehingga hanya mikroba penghasil inulinase yang mampu tumbuh pada media ini.

Tabel 4.2 Tabel Hasil Skrining pada Media *Inulinase Screening Media*

Nama Isolat	Media PDA	Media ISM	Aktivitas Enzim
Isolat I-1	Tumbuh	Tidak tumbuh	-
Isolat I-2	Tumbuh	Tidak tumbuh	-
Isolat I-3	Tumbuh	Tumbuh	0,27 U/mL
Isolat I-4	Tumbuh	Tidak tumbuh	-
Isolat I-5	Tumbuh	Tumbuh	0,48 U/mL
Isolat I-6	Tumbuh	Tidak tumbuh	-
Isolat I-7	Tumbuh	Tidak tumbuh	-
Isolat I-8	Tumbuh	Tumbuh	0,43 U/mL
Isolat I-9	Tumbuh	Tumbuh	0,36 U/mL
Isolat I-10	Tumbuh	Tidak tumbuh	-
Isolat I-11	Tumbuh	Tumbuh	0,69 U/mL

Hasil dari skrining pada tabel 4.2 menunjukkan sebanyak 5 isolat yang mampu tumbuh pada media ISM sehingga dikategorikan sebagai khamir inulinolitik. Berdasarkan tabel 4.2 terlihat bahwa Isolat I-11 memperlihatkan aktivitas enzim inulinase tertinggi sebesar 0,69 U/mL, yang menjadikannya kandidat potensial untuk diseleksi lebih lanjut.

Isolat yang paling potensial dilakukan uji aktivitas enzim inulinase pada seluruh isolat pada masa inkubasi. Pemilihan waktu inkubasi mengarah pada waktu khamir memasuki fase pertumbuhan eksponensial. Hal ini sejalan dengan penelitian Hal ini sejalan dengan penelitian Dion, *et al.*, (2022) bahwa pertumbuhan isolat khamir inulinolitik lokal mulai memasuki fase eksponensial transisi menuju puncak densitas sel pada rentang waktu inkubasi 24 jam, di mana pada fase tersebut sel khamir menunjukkan kapasitas adaptasi dan kemampuan hidrolisis substrat inulin yang sangat aktif.

4.3 Karakterisasi Makroskopis dan Mikroskopis Isolat Khamir Potensial (I-11)

Karakterisasi morfologi makroskopis terhadap koloni isolat khamir I-11 pada cawan petri dilakukan untuk memetakan identitas fisik dan memastikan kemurnian kultur mikroba secara visual. Pengamatan makroskopis terhadap isolat khamir I-11 bertujuan gambaran sifat khamir yang didapatkan (Gambar 4.1). Parameter makroskopis yang umum digunakan untuk mengidentifikasi khamir meliputi bentuk koloni, warna, permukaan, elevasi, tepi, dan tekstur. Hal ini sesuai dengan Sulmiyati *et al.*, (2019) menyatakan bahwa sifat morfologi koloni (*shape, texture, color, surface, elevation, and edges*) menjadi dasar identifikasi awal genus khamir.

Berdasarkan pengamatan makroskopis yang dilakukan terhadap isolat khamir I-11 yang ditumbuhkan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA), koloni menampilkan ciri-ciri morfologi sebagai berikut. Bentuk koloni (*shape*) adalah sirkular (*circular*) dengan pertumbuhan yang merata ke segala

arah. Menurut Ramia et al., (2024), koloni khamir yang menunjukkan bentuk sirkular merupakan karakter umum yang dijumpai pada khamir penghasil enzim yang diisolasi dari substrat alami. Tekstur (*texture*) koloni isolat I-11 tergolong *butyrous* (seperti mentega), yaitu lunak dan padat namun tidak berlendir. Menurut Faikar et al., (2024) menyatakan bahwa tekstur koloni khamir yang diisolasi dari substrat organik pada umumnya bersifat lunak dengan konsistensi menyerupai mentega (*butyrous*), yang mencerminkan karakteristik pertumbuhan khamir pada media padat. Berdasarkan gambar 4.1 warna (*color*) koloni isolate I-11, yaitu putih hingga putih krem (*white to creamy*) yang seragam di seluruh permukaan koloni. Hal ini sesuai dengan pernyataan Dion, et al., (2022) bahwa khamir yang diisolasi dari substrat alami umumnya menampilkan warna koloni putih hingga krem pada media PDA.

Berdasarkan hasil gambar 4.1 dan tabel 4.3, permukaan (*surface*) koloni tampak kusam (*dull*) atau tidak mengkilap (*not glistening*), yang mengindikasikan tidak adanya produksi kapsul polisakarida ekstraseluler yang berlebih. Abd El Aty et al., (2020) menyatakan bahwa permukaan *dull* pada koloni khamir merupakan ciri yang membedakannya dari khamir berkapsul yang umumnya menampilkan permukaan mengkilap (*glistening*). Elevasi (*elevation*) koloni menunjukkan profil *flat* (datar), yaitu koloni tumbuh sejajar dengan permukaan media. Menurut Nurhayati et al., (2022) bahwa profil elevasi koloni khamir dapat bervariasi mulai dari *flat*, *raised*,

hingga *convex* tergantung pada spesies dan kondisi pertumbuhan pada media yang digunakan.



Gambar 4.1 Makroskopis Khamir Inulinolitik I-11 pada Media PDA

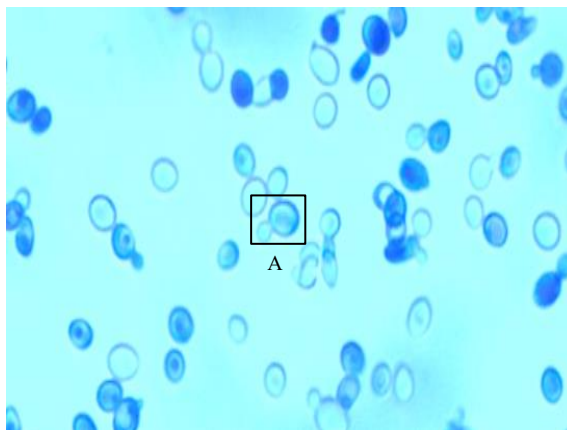
Tabel 4.3 Hasil Pengamatan Morfologi Makroskopis Isolat Khamir I-11 pada Media PDA

No.	Karakteristik	Hasil Pengamatan I-11
1.	<i>Shape</i> (Bentuk)	<i>Circular</i> (Sirkular)
2.	<i>Texture</i> (Tekstur)	<i>Butyrous</i> (seperti mentega)
3.	<i>Color</i> (Warna)	Putih hingga putih krem
4.	<i>Surface</i> (Permukaan)	<i>Dull</i> (kusam)
5.	<i>Elevation</i> (Elevasi)	<i>Flat</i> (datar)

Pengamatan mikroskopis terhadap isolat khamir I-11 bertujuan untuk mengidentifikasi bentuk sel, tipe reproduksi vegetatif, serta karakteristik morfologi spesifik pada tingkat seluler. Berdasarkan hasil dari pengamatan yang dilakukan menggunakan mikroskop optik dengan perbesaran 400× dilakukan menggunakan pewarnaan methylene blue, sel isolat khamir I-11

menunjukkan bentuk uniseluler yang heterogen dengan dominasi bentuk bulat (*globose*). Sel-sel tersebut tersebar secara individual maupun berpasangan dalam medium. Karakteristik bentuk sel oval dan elips ini merupakan ciri morfologi khas yang umum ditemukan pada kelompok khamir fungsional dari filum Ascomycota. Pewarnaan *methylene blue* merupakan pewarnaan sederhana yang sering digunakan dalam pengamatan morfologi khamir karena prinsipnya yang didasarkan pada kemampuan sel-sel yang masih hidup untuk mereduksi *methylene blue* menjadi bentuk tidak berwarna (leukomethylene blue) melalui aktivitas enzimatik intraseluler.

Berdasarkan hasil pengamatan mikroskopis, isolat khamir I-11 menunjukkan sel-sel berukuran kecil hingga sedang dengan bentuk dominan bulat, tersebar secara acak dalam bidang pandang. Sel-sel globos tampak bulat sempurna atau mendekati bulat dengan dinding sel yang tampak jelas, dan ditandai adanya tunas yang artinya adanya perkembangbiakannya. Hal ini sejalan dengan deskripsi taksonomi oleh Kurtzman *et al.*, (2018); Bukcle, *et al* (1987) yang menyatakan bahwa Isolat-isolat khamir potensif secara mikroskopis berbentuk bulat sampai lonjong dan ditandai huruf (A) pada gambar 4.2 adanya tunas sebagai bentuk perkembangbiakannya. Pembelahan sel terjadi secara aseksual dengan pembentukan tunas yakni suatu proses yang merupakan sifat khas dari khamir. Hal ini juga diperkuat Ferdias (1998) bahwa bentuk sel khamir bervariasi yaitu bulat, lonjong, silinder atau berbentuk batang, segitiga melengkung, berbentuk botol, bentuk apikulat , atau berbentuk lemon, membentuk pseudomiselium.



Gambar 4.2 Mikroskopis Khamir Inulinolitik Isolat I-11 pada Perbesaran 400 $\times$; Tunas (A)

4.4 Kurva Pertumbuhan Isolat Potensial (I-11)

Pertumbuhan isolat khamir dilihat dari hasil kurva pertumbuhan yang menggambarkan jumlah sel berdasarkan varietas waktu tertentu dan digunakan untuk mengidentifikasi fase-fase pertumbuhan serta laju pertumbuhan. Sesuai dengan pernyataan Mozzachiodi and Bhalerao (2022) bahwa pertumbuhan khamir diukur dalam menggunakan nilai OD pada panjang gelombang tertentu, kemudian kurva pertumbuhan dibangun dengan memplot nilai OD terhadap waktu sehingga memungkinkan identifikasi dan seleksi fase eksponensial. Pernyataan tersebut didukung oleh pernyataan Fukuda (2023) bahwa OD dapat dipakai untuk melacak dinamika pertumbuhan, meskipun nilai OD dipengaruhi karakter sel dan perlu dibaca dalam rentang densitas yang tepat.

Berdasarkan hasil gambar 4.3 kurva pertumbuhan terlihat pertumbuhan isolat khamir I-11 diukur menggunakan metode turbidimetri

dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm. Nilai OD (*Optical Density*) yang terukur mencerminkan kepadatan sel di dalam medium, di mana semakin tinggi nilai absorbansi, semakin banyak sel yang ada dalam suspensi. Pengukuran dilakukan pada enam titik waktu, yaitu T0 (0 jam), T1 (6 jam), T2 (12 jam), T3 (18 jam), T4 (24 jam), dan T5 (30 jam), dengan enam kombinasi perlakuan pH dan suhu: P1S1 (pH 4, suhu 35°C), P1S2 (pH 4, suhu 40°C), P2S1 (pH 5, suhu 35°C), P2S2 (pH 5, suhu 40°C), P3S1 (pH 6, suhu 35°C), dan P3S2 (pH 6, suhu 40°C).

Berdasarkan kurva OD, Pada T0 (jam ke-0), seluruh perlakuan menunjukkan nilai OD yang rendah. Rendahnya nilai OD pada seluruh perlakuan di T0 mencerminkan bahwa isolat khamir I-11 sedang berada dalam fase adaptasi (*lag phase*) terhadap kondisi medium baru yang mengandung inulin sebagai satu-satunya sumber karbon. Pada fase ini, sel khamir belum membelah secara aktif, melainkan sedang menyintesis enzim-enzim yang dibutuhkan untuk memanfaatkan substrat inulin. Hal ini sesuai dengan pernyataan Schultz and Kishony (2013) bahwa selama fase lag, enzim-enzim katabolisme sumber karbon terlebih dahulu sebelum gen-gen biosintesis biomassa diekspresikan, sehingga tidak terjadi pertumbuhan sel yang terukur pada periode ini meskipun sel aktif secara metabolik.

Hal ini juga diperkuat oleh pernyataan Buerger, *et al.*, (2022) bahwa ukuran dan kualitas inokulum merupakan faktor yang memengaruhi lamanya fase lag pada khamir, di mana inokulum yang lebih besar dan sel yang lebih

muda menghasilkan fase lag yang lebih singkat, sehingga nilai OD yang rendah pada T0 mencerminkan kondisi inokulum awal yang belum mengalami pertumbuhan aktif. Dari T0 (jam ke-0) menuju T1 (jam ke-6), seluruh perlakuan mengalami peningkatan nilai OD yang menandakan isolat khamir I-11 mulai memasuki fase eksponensial awal.

Peningkatan OD yang terjadi pada seluruh perlakuan ini menunjukkan bahwa khamir I-11 telah berhasil melewati fase adaptasi dan mulai melakukan pembelahan sel secara aktif. Peningkatan kepadatan sel ini didorong oleh kemampuan isolat dalam menghidrolisis inulin menjadi fruktosa melalui aktivitas inulinase ekstraselular, sehingga menghasilkan sumber energi yang dibutuhkan untuk mendukung proliferasi sel. Hal ini sesuai dengan pernyataan Prasetyo *et al.*, (2021) bahwa khamir inulinolitik yang ditumbuhkan pada medium dengan inulin sebagai satu-satunya sumber karbon menunjukkan kurva pertumbuhan normal yang terdiri dari fase lag, fase eksponensial, fase stasioner, dan fase penurunan, di mana fase eksponensial ditandai oleh peningkatan nilai OD yang signifikan seiring dimulainya aktivitas enzimatik inulinase ekstraselular. Hal ini juga diperkuat oleh pernyataan Guice *et al.*, (2023) bahwa dalam tumbuhan maupun mikroorganisme, inulinase memecah fruktan untuk melepaskan fruktosa sebagai sumber energi metabolik, sehingga ketersediaan fruktosa hasil hidrolisis inulin secara langsung mendukung peningkatan laju pertumbuhan dan proliferasi sel khamir.

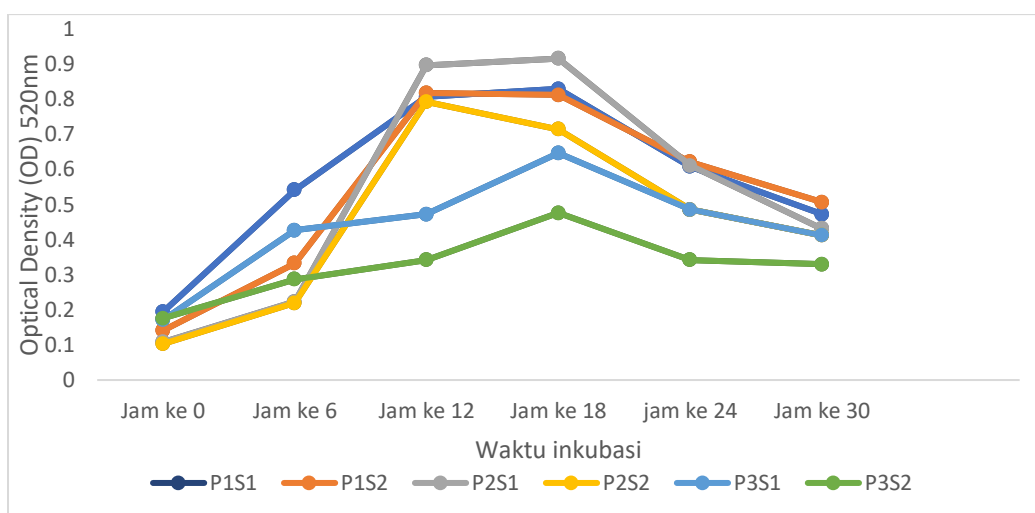
Memasuki T2 (jam ke-12), seluruh perlakuan mengalami peningkatan nilai OD yang paling signifikan sepanjang periode pengamatan, menandakan isolat khamir I-11 berada pada puncak fase eksponensial perlakuan P2S1 (pH 5, suhu 35°C) menunjukkan nilai OD tertinggi secara keseluruhan, mencapai puncak pada T2 dengan nilai 0,896 diikuti P1S2 dengan nilai 0,817, P1S1 dengan nilai 0,806, P2S2 dengan nilai 0,792, P3S1 dengan nilai 0,472, dan P3S2 dengan nilai 0,342. Tingginya peningkatan OD pada periode T1–T2 ini menunjukkan laju pembelahan sel yang sangat cepat, didukung oleh ketersediaan fruktosa hasil hidrolisis inulin yang berlimpah dalam medium.

Perlakuan dengan suhu 35°C (P1S1, P2S1) secara konsisten menunjukkan nilai OD yang lebih tinggi dibandingkan suhu 40°C pada pH yang sama, mengindikasikan bahwa suhu 35°C lebih mendukung pertumbuhan khamir I-11 secara optimal. Hal ini sesuai dengan pernyataan Mozzachiodi and Bhalerao, (2022) bahwa kurva pertumbuhan khamir dibangun dengan memplot nilai OD terhadap waktu, dan fase log merupakan periode ketika menghasilkan biomassa mikroorganisme adalah yang paling efektif karena nutrisi tersedia optimal, serta bahwa perbedaan suhu inkubasi secara langsung memengaruhi laju pertumbuhan yang teramati melalui nilai OD.

Waktu pada T3 (jam ke-18) hingga T5 (jam ke-30), isolat khamir I-11 telah memasuki fase stasioner dan kemudian fase penurunan. Penurunan nilai OD ini disebabkan oleh menipisnya substrat inulin dalam medium

sebagai satu-satunya sumber karbon, akumulasi produk metabolik yang bersifat inhibitori, serta meningkatnya laju kematian sel melampaui laju pembelahan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Buerger, *et al.*, (2022) bahwa fase stasioner pada khamir dan mikroorganisme lainnya dimulai ketika nutrisi pembatas dalam lingkungan habis dan pembelahan sel terhenti.

Pernyataan diperkuat oleh García-Ochoa, *et al.*, (2023) bahwa pada fase penurunan, sel-sel yang hidup berkurang secara eksponensial akibat deplesi nutrisi dan akumulasi produk toksik, sehingga penurunan nilai OD yang terukur merupakan cerminan langsung dari berkurangnya kepadatan sel hidup. Hal ini juga diperkuat oleh pernyataan Cros *et al.*, (2023) bahwa produksi metabolit ekstraseluler terus berlangsung bahkan pada fase stasioner meskipun pertumbuhan sel telah terhenti, karena sel masih aktif secara metabolik dalam menghasilkan enzim dan produk sekunder sebagai strategi bertahan hidup.



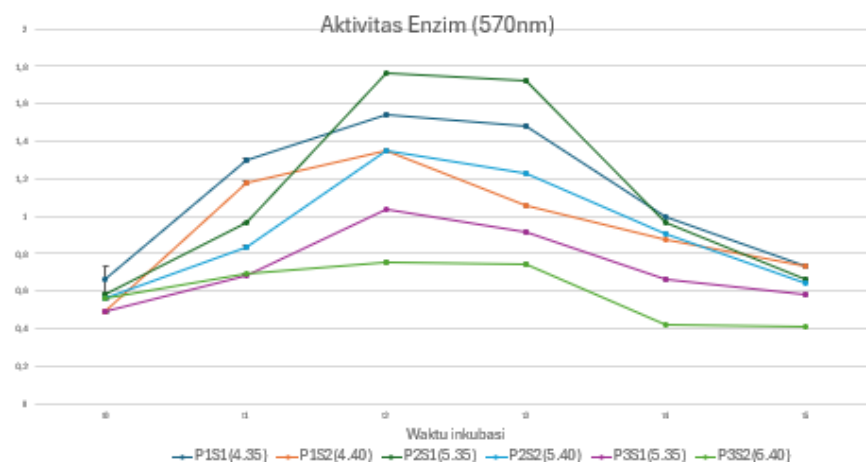
Gambar 4.3 Kurva Pertumbuhan Khamir I-11 pada Media Produksi Inulinase

4.5 Hasil Pengujian Aktivitas Enzim

Uji aktivitas enzim inulinase merupakan parameter menguji kemampuan dalam khamir inulinolitik mendegradasi inulin menjadi fruktosa dan *fructooligosaccharides* (FOS), sekaligus untuk mengetahui seberapa banyak enzim inulinase yang dihasilkan oleh isolat khamir I-11. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan menggunakan metode DNS (*3,5-Dinitrosalicylic Acid*) yang memiliki sensitivitas tinggi, efisien, dan mudah dilakukan. Prinsip metode DNS didasarkan pada reaksi redoks antara kelompok karbonil bebas ($C=O$) dari fruktosa yang dibebaskan oleh hidrolisis inulin dengan reagen 3,5-dinitrosalisilat dalam kondisi alkali, menghasilkan produk berwarna kuning-oranye (3-amino-5-nitrosalicylic acid) yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 570 nm. Hal ini sesuai dengan pernyataan Putri (2022) bahwa enzim inulinase merupakan enzim yang mampu menghidrolisis inulin dan digunakan sebagai katalis dalam produksi *High Fructose Syrup* (HFS) dan *fructooligosaccharides* (FOS), dan bahwa aktivitas inulinase ekstraselular dari khamir ditentukan secara kuantitatif berdasarkan jumlah gula pereduksi yang terbentuk dari hidrolisis inulin menggunakan metode DNS.

Hal ini juga diperkuat oleh pernyataan Guice *et al.*, (2023) bahwa inulinase adalah β -fructofuranosidase yang menghidrolisis ikatan β -glikosidik 2,1-*linked* antara monomer fruktosa pada fruktan seperti inulin, dan bahwa dalam tumbuhan maupun mikroorganisme, inulinase memecah fruktan untuk melepaskan fruktosa sebagai sumber energi metabolik,

sehingga kuantifikasi fruktosa yang dibebaskan secara langsung mencerminkan besarnya aktivitas enzim yang dihasilkan.



Gambar 4.4 Grafik Nilai Aktivitas Enzim Inulinase Khamir I-11 pada Media Produksi Inulinase

Berdasarkan hasil pengukuran aktivitas enzim inulinase isolat khamir I-11 pada keenam perlakuan kombinasi pH dan suhu selama 30 jam inkubasi, diperoleh pola peningkatan aktivitas dari T0 menuju puncaknya pada T2 (jam ke-12) atau T3 (jam ke-18), kemudian menurun pada T4 dan T5 yang mengindikasikan bahwa produksi enzim ekstraselular berlangsung optimal pada fase akhir eksponensial hingga awal fase stasioner.

Penurunan aktivitas yang terjadi pada T4 (jam ke-24) dan T5 (jam ke-30) di seluruh perlakuan menunjukkan bahwa memasuki fase stasioner lanjut, kondisi medium sudah tidak lagi mendukung produksi enzim secara maksimal, baik akibat deplesi substrat maupun perubahan kondisi fisikokimia medium. Hal ini sesuai dengan pernyataan García-Ochoa, *et al.*, (2023) bahwa metabolit sekunder termasuk enzim ekstraselular cenderung

diproduksi pada fase akhir log dan awal fase stasioner, ketika sel-sel mulai mengaktifkan respons stres dan mengekspresikan gen-gen produksi enzim sebagai strategi bertahan hidup menghadapi keterbatasan nutrisi. Waktu T0, seluruh perlakuan menunjukkan nilai aktivitas awal yang rendah, yakni belum optimalnya sekresi enzim ekstraselular pada awal inkubasi.

Aktivitas spesifik enzim tertinggi dari isolat khamir ini dicapai pada waktu T2 (jam ke-12) dengan kondisi inkubasi optimal pada suhu 35°C dan pH 5 (asam lemah). Peningkatan suhu ke 40°C menunjukkan nilai aktivitas enzim lebih rendah. Pola ini menunjukkan bahwa enzim inulinase yang dihasilkan isolat khamir I-11 bekerja optimal pada kondisi asam-sedang (pH 4–5) dan aktivitasnya menurun pada pH yang lebih tinggi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Guice *et al.*, (2023) bahwa inulinase adalah β -fructofuranosidase yang secara struktural lebih stabil pada kondisi asam, dan bahwa kondisi pH yang menyimpang dari optimum dapat mengubah muatan ionik sisi aktif enzim sehingga menurunkan kemampuan pengikatan substrat dan laju hidrolisis inulin.

Isolat khamir menunjukkan bahwa bersifat asam ringan dan membutuhkan lingkungan asam lemah untuk mencapai efisiensi metabolisme tertinggi. Hal ini menunjukkan bahwa pH 5 merupakan titik eksponensial yang paling ideal bagi aktivitas enzimatik dan metabolisme selular isolat tersebut. Hal ini sejalan dengan pernyataan Azzahra, *et al.*, (2021) bahwa khamir pada umumnya menunjukkan laju pertumbuhan dan aktivitas biokatalis yang optimal pada rentang pH asam ringan berkisar antara 4,5

hingga 5,5. Kondisi pH 5 memberikan keseimbangan muatan listrik pada permukaan membran sel khamir, sehingga mempermudah transpor nutrisi penting ke dalam sel tanpa memerlukan energi ekstra untuk homeostasis internal. Hal ini diperkuat dengan pernyataan Atmodjo (2018) bahwa berdasarkan pH medium pertumbuhannya, mikroba dibagi tiga kelompok, yaitu kelompok mikroba asidofil yang tumbuh pada medium pH asam (kurang dari 6), netrofil adalah mikroba yang tumbuh pada pH netral antara 6 - 7,5 dan basophil yaitu mikroba yang hidup pH basa di atas 7,5.

Aktivitas isolat khamir dengan suhu inkubasi sebesar 35°C relatif tinggi dibandingkan pada suhu inkubasi 40°C dimana memiliki sistem metabolisme sangat aktif dan efisien pada suhu hangat dimana suhu 35°C ini bertindak sebagai inkubator yang memicu energi kinetik optimal bagi interaksi antara enzim dan substrat di dalam sel khamir, sehingga seluruh jalur biokimia untuk menghasilkan aktivitas biologis dapat berjalan pada kecepatan maksimumnya. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hal ini menurut Azzahra, *et al.*, (2021) bahwa suhu rata-rata 30°C hingga 35°C merupakan *golden zone* bagi sebagian besar strain khamir tropis untuk mencapai kestabilan struktural pada protein dan membran selnya, yang secara langsung berkontribusi pada tingginya akumulasi produk atau aktivitas metabolisme.

Kenaikan suhu inkubasi akan meningkatkan laju reaksi sampai titik tertentu, lalu aktivitas turun karena denaturasi enzim. Hal ini sesuai dengan pernyataan Yazici *et al.*, (2021) bahwa aktivitas inulinase meningkat dalam rentang suhu 30–40°C dan aktivitas spesifik tertinggi ditemukan pada suhu

35°C, namun aktivitas mulai menurun secara signifikan pada suhu lebih dari 40°C, yang berkaitan dengan denaturasi enzim. Hal ini diperkuat oleh penelitian Kourkoutas, *et al.*, (2021) bahwa optimasi bioproses berbasis khamir dalam media fermentasi cair mencapai efisiensi tertinggi ketika dikondisikan pada suhu hangat sekitar 30°C–35°C dengan pH stabil di angka 5,0. Kemudian dengan suhu inkubasi sebesar 35°C aktivitas isolat khamir relatif tinggi dibandingkan pada suhu inkubasi 40°C. Dimana kenaikan suhu akan meningkatkan laju reaksi sampai titik tertentu, lalu aktivitas turun karena denaturasi enzim. Hal ini sesuai dengan pernyataan de Oliveira *et al.*, (2022) menjelaskan bahwa laju reaksi enzimatik meningkat dengan suhu, namun pada saat yang sama terjadi denaturasi progresif yang menyebabkan hilangnya aktivitas jika melewati suhu optimum. Hal ini diperkuat pernyataan dari Mahmud, *et al.*, (2020) bahwa sel khamir telah memasuki fase *heat stress* (cekaman panas) akut ketika dipaparkan pada suhu 38°C hingga 40°C.

Kondisi cekaman panas tersebut, energi seluler khamir dialihkan secara penuh dari fungsi metabolisme produktif menuju mekanisme pertahanan hidup (*survival mechanism*). Hal ini sesuai dengan pernyataan Yazici *et al.*, (2021) bahwa aktivitas inulinase meningkat dalam rentang suhu 30–40°C, namun aktivitas mulai menurun secara signifikan pada suhu lebih dari 40°C, yang berkaitan dengan denaturasi enzim. Menurut Abdella *et al.*, (2023) menyatakan bahwa inulinase murni dari khamir mempunyai kisaran pH aktivitas yang sesuai 5–6 dengan pH optimum 6, dan aktivitasnya menurun tajam di pH lebih basa. Pernyataan tersebut juga diperkuat oleh

Tippanavar *et al.*, (2024) bahwa inulinase dari khamir lain sangat aktif pada pH 4–6 dan aktivitas puncak serta kestabilan tertinggi.

Pengujian statistik dilakukan untuk memvalidasi hasil pengamatan aktivitas enzim secara objektif. Sebelum dilakukan analisis ANOVA dua arah, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas menggunakan uji Shapiro-Wilk dan uji Kolmogorov-Smirnov (dengan koreksi Lilliefors) untuk memastikan data aktivitas enzim terdistribusi normal. Hasil uji Shapiro-Wilk menunjukkan nilai signifikansi untuk pH 4 sebesar 0,710, pH 5 sebesar 0,108, dan pH 6 sebesar 0,664. Seluruh nilai signifikansi tersebut berada di atas nilai $\alpha = 0,05$, sehingga data aktivitas enzim pada masing-masing kelompok pH dinyatakan berdistribusi normal dan asumsi parametrik terpenuhi.

Hal ini sesuai dengan pernyataan Razali and Yap (2011) bahwa uji Shapiro-Wilk memiliki kekuatan statistik (*statistical power*) yang lebih tinggi dibandingkan uji Kolmogorov-Smirnov dan uji Anderson-Darling pada berbagai kondisi distribusi, sehingga direkomendasikan sebagai uji normalitas utama pada data biologi dan bioteknologi dengan jumlah sampel kecil ($n < 50$), di mana nilai signifikansi $> 0,05$ mengindikasikan data tidak berbeda secara signifikan dari distribusi normal. Hal ini juga diperkuat oleh pernyataan Field (2018) bahwa uji normalitas merupakan prasyarat yang dipenuhi sebelum menjalankan analisis ANOVA parametrik, dan bahwa terpenuhinya asumsi normalitas pada seluruh kelompok perlakuan merupakan dasar untuk melanjutkan ke tahap analisis varians.

Hasil analisis ragam dua arah (*two-way ANOVA*) menunjukkan bahwa pH berpengaruh nyata terhadap aktivitas enzim inulinase isolat khamir I-11 dengan nilai $F = 4,845$ dan $p\text{-value} = 0,015 (< 0,05)$. Nilai *partial eta squared* (η^2) untuk pH sebesar 0,244, suhu sebesar 0,206, dan interaksinya sebesar 0,182 mengindikasikan bahwa pH memberikan efek terhadap variansi aktivitas enzim. Hal ini sesuai dengan prinsip analisis statistika bioproses oleh Lakens (2020) bahwa pelaporan nilai di atas 0,14 memberikan bukti kuat mengenai signifikansi praktis suatu model eksperimen di laboratorium, melampaui informasi standar yang diberikan oleh $p\text{-value}$ semata. Hal ini diperkuat oleh pernyataan Silva, *et al.*, (2022) yang melaporkan bahwa pH berpengaruh signifikan terhadap aktivitas inulinase. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa kondisi pH dapat dioptimalkan karena memengaruhi kestabilan struktur enzim dan efisiensi hidrolisis inulin.

Hasil uji lanjut Tukey HSD (*Honestly Significant Difference*) menunjukkan bahwa pH 4 (rata-rata aktivitas = 1,037 U/mL) dan pH 5 (rata-rata aktivitas = 1,020 U/mL) berada pada subset yang sama (subset 2) dengan nilai signifikansi antar keduanya sebesar 0,992, sehingga keduanya tidak berbeda nyata dalam menghasilkan aktivitas enzim inulinase. Sebaliknya, pH 6 (rata-rata aktivitas = 0,662 U/mL) berada pada subset yang berbeda (subset 1) dan terpisah secara signifikan dari pH 4 maupun pH 5, yang menunjukkan bahwa aktivitas inulinase pada pH 6 secara statistik lebih rendah. Perbedaan ini menunjukkan bahwa kisaran pH asam (pH 4–5) merupakan kondisi yang

lebih sesuai bagi aktivitas katalitik enzim inulinase yang dihasilkan isolat khamir I-11, sementara pH yang mendekati netral (pH 6) kurang mendukung aktivitas enzim tersebut. Hal ini sesuai dengan pernyataan Guice *et al.*, (2023) bahwa inulinase dari berbagai sumber khamir dan fungi secara umum menunjukkan aktivitas dan stabilitas optimal pada kondisi asam, di mana pergeseran ke arah pH yang lebih tinggi dari optimum menyebabkan perubahan muatan ionik pada residu asam amino sisi aktif enzim sehingga menurunkan afinitas terhadap substrat inulin secara signifikan.

4.6 Identifikasi Molekuler Khamir Isolat (I-11)

Hasil identifikasi molekuler sampel khamir I-11 yang didapatkan, yaitu pada ekstraksi DNA (Tabel 4.4) didapatkan konsentrasi DNA sebesar 87,1 ng/μL yang cukup untuk ke tahapan PCR, menurut Mazlan *et al.*, (2024) bahwa konsentrasi DNA template yang ideal untuk PCR umumnya berada dalam kisaran 10–100 ng/μL. Hal tersebut juga diperkuat oleh Rahmah, *et al.*, (2025) yang menyatakan bahwa konsentrasi DNA dalam kisaran puluhan nanogram per mikroliter sangat efektif untuk menghasilkan pita DNA yang jelas saat elektroforesis, serta menghindari kegagalan PCR akibat kejenuhan sampel.

Tabel 4.4 Konsentrasi DNA Khamir (I-11)

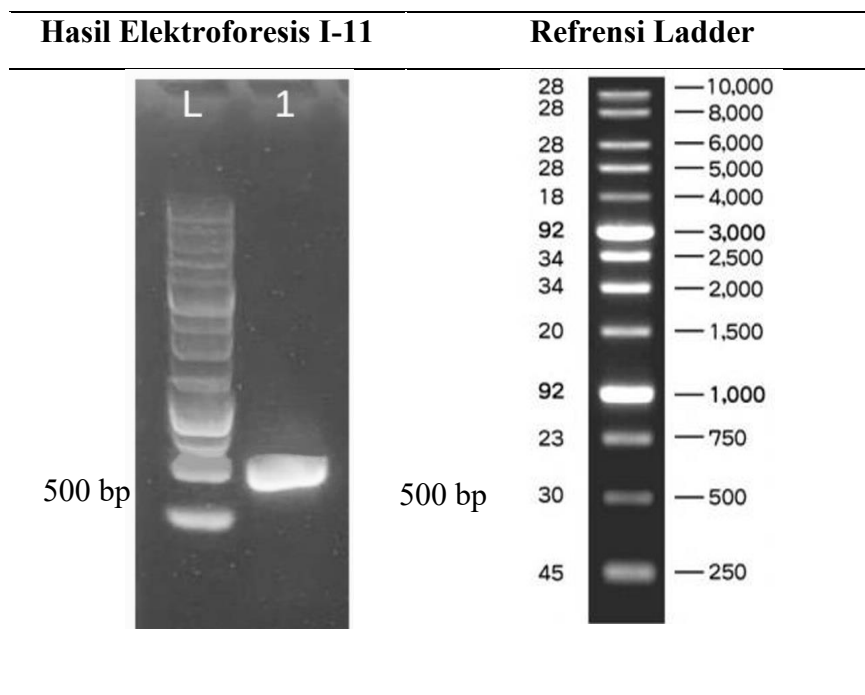
No.	Sample Name	Concentration ng/μL
1.	Isolat Khamir 1 Kode I-11	87.10

Tahapan identifikasi molekuler selanjutnya adalah mengamplifikasi DNA menggunakan gen ITS menggunakan primer universal yaitu ITS 1 dan ITS 4. Hal ini sesuai penelitian Rahmawati, *et al.*, (2017) bahwa hasil ekstraksi DNA yang diperoleh kemudian diamplifikasi menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), menggunakan ITS1 sebagai primer *forward* dan ITS4 sebagai primer *reverse*. Daerah ITS sebagai daerah sekuen DNA yang tidak menyandikan protein fungsional. Hal ini juga diperkuat oleh pernyataan Purnamasari *et al.*, (2012) bahwa daerah ITS dapat digunakan sebagai penanda genetika karena memiliki variasi sekuen yang cukup tinggi bahkan dalam spesies yang sama, dan semua fungi memiliki ITS rDNA.

Bedasarkan hasil dari tabel 4.5 hasil amplifikasi PCR sampel I-11 dengan menggunakan primer ITS1 dan ITS4 menunjukkan satu pita DNA pada posisi sekitar 500 bp, yang sejajar dengan marker DNA. Ukuran ini menunjukkan bahwa fragmen ITS khamir I11 berhasil diamplifikasi dengan tepat. Hal ini didukung oleh Hermansyah, *et al.*, (2018) yang bahwa amplifikasi DNA khamir dengan primer ITS1 dan ITS4 menghasilkan fragmen ± 500 bp yang sejajar dengan marker dan menunjukkan bahwa amplifikasi mengenai target yang diharapkan. Gambar kualitas pita tunggal I-11 yang dihasilkan, yaitu tebal dan terang mengindikasikan bahwa primer ITS yang digunakan bersifat spesifik terhadap DNA khamir dan tidak banyak menimbulkan amplifikasi non-spesifik. Hermansyah, *et al.*, (2018) menyatakan bahwa produk isolasi DNA khamir yang berkualitas baik ditandai dengan pita DNA yang tebal, bersih, dan menyala terang; sebaliknya,

tidak munculnya pita atau pita yang sangat lemah biasanya berkaitan dengan konsentrasi DNA template yang terlalu rendah sehingga tidak dapat diamplifikasi dengan baik.

Tabel 4.5 Hasil Amplifikasi PCR Sampel I-11 Menggunakan Primer ITS 1 dan ITS 4



Hasil isolat khamir I-11 berhasil melalui pada tahapan amplifikasi menggunakan primer universal, yaitu ITS 1 dan ITS 4 dengan panjang fragmen 500 bp menunjukkan keberhasilan PCR. Hal sekuensing gen ITS khamir I-11 selanjutnya dianalisis menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada database *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Berdasarkan hasil analisis sekuensing gen ITS menunjukkan kesamaan (*Identity*) yang mencapai nilai tinggi mencapai 100% dengan *Candida parapsilosis* IFM 52595 genes for 18S rRNA ITS1 dan

query cover 100 dan skor maksimal 937. Menurut pernyataan Kai *et al.*, (2018) bahwa tingginya nilai presetase indentitas >98,65% dapat mengkonfirmasi identifikasi suatu isolat pada tingkat spesies berdasarkan perbandingan sekuens terhadap aksesori referensi yang tersimpan di database GenBank NCBI. Pernyataan ini juga diperkuat oleh Weiss *et al.*, (2016) bahwa ambang batas taksonomi untuk mendiskriminasi spesies khamir adalah 98,41% untuk ITS dan 99,51% untuk LSU, sehingga nilai *identity* $\geq 99\%$ merupakan bukti kuat untuk konfirmasi identitas spesies.

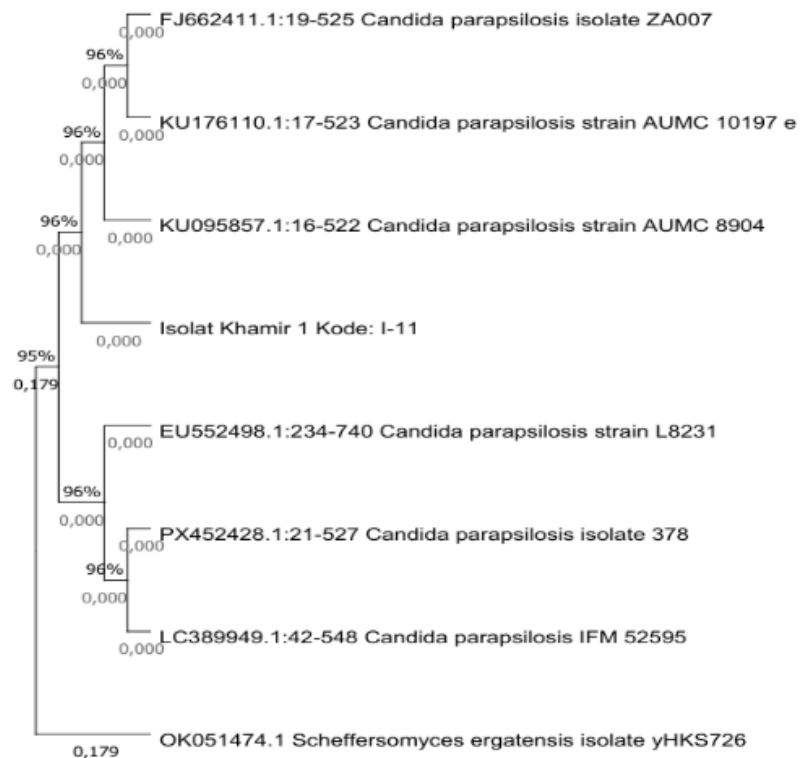
Hasil identifikasi berbasis BLAST diperkuat dengan analisis filogenetik selanjutnya dilakukan melalui penjajaran multipel sekuens (*multiple sequence alignment*) menggunakan algoritma ClustalW dalam perangkat lunak MEGA, diikuti dengan konstruksi pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbor-Joining* (NJ) dengan model substitusi Tamura-Nei dan 1.000 ulangan *bootstrap*.

Berdasarkan hasil dari pohon filogenetik menunjukkan bahwa isolat khamir I-11 berklaster erat bersama aksesori LC389949.1 (*Candida parapsilosis* IFM 52595) dengan nilai *bootstrap* sebesar 96%, diikuti dengan PX452428.1 (*Candida parapsilosis* isolat 378), EU552498.1 (*Candida parapsilosis* strain L8231), dan KU176110.1 (*Candida parapsilosis* strain AUMC 10197) yang kesemuanya merupakan strain *C. parapsilosis* berada di GenBank, serta subklaster tersendiri antara KU095857.1 (*Candida parapsilosis* strain AUMC 8904) dan FJ662411.1 (*Candida parapsilosis* strain AUMC 8904) dengan nilai *bootstrap* 96%.

Seluruh strain *C. parapsilosis* tersebut membentuk satu kelompok monofiletik yang kohesif dan terpisah dari *outgroup* *Scheffersomyces ergatensis* isolate yHKS726. Nilai *bootstrap* 96% pada kluster inti antara isolat I-11 dan strain referensi terdekatnya. Menurut Felsenstein (1985) menyatakan bahwa nilai *bootstrap* secara umum dianggap sebagai simpul yang didukung secara kuat, karena pembobotan diferensial melalui *resampling* data asli cenderung menghasilkan kelompok yang sama apabila data dengan baik mencerminkan filogeni aktual. Hal ini juga diperkuat oleh de Carvalho Cardoso *et al.*, (2025) bahwa nilai *bootstrap* berkaitan dengan probabilitas bahwa suatu klad berasal dari pohon yang sesungguhnya, di mana nilai *bootstrap* pada hakikatnya mengukur *repeatability* data yaitu probabilitas untuk mendapatkan kembali klad yang sama apabila digunakan dataset independen.

Berdasarkan integrasi hasil analisis BLASTn (*identity* 100%, *query cover* 100%, skor 937) dan topologi pohon filogenetik (kluster monofiletik dengan *bootstrap* dominan 99%), isolat khamir I-11 dapat diidentifikasi secara molekuler sebagai *Candida parapsilosis*. Hasil analisis filogenetik menunjukkan seluruh isolat dari genus *Candida* sementara pada kluster terpisah dengan nilai *bootstrap*, yaitu 95% yaitu *Scheffersomyces ergatensis* isolate yHKS726. Nilai berada diatas batas penerimaan umum $\geq 70\%$. Hal ini menurut Felsenstein (1985) bahwa nilai *bootstrap* $\geq 70\%$ secara umum dianggap sebagai simpul yang didukung secara kuat, karena pembobotan diferensial melalui *resampling* data asli cenderung menghasilkan kelompok

yang sama apabila data dengan baik mencerminkan filogeni aktual. Hal ini juga diperkuat oleh de Carvalho Cardoso *et al.*, (2025) bahwa nilai *bootstrap* berkaitan dengan probabilitas bahwa suatu klad yang didukung kuat benar-benar berasal dari pohon yang sesungguhnya, di mana nilai *bootstrap* pada hakikatnya mengukur *repeatability* data yaitu probabilitas untuk mendapatkan kembali klad yang sama apabila digunakan dataset independent.



Gambar 4.5 Pohon Filogenetik Isolot I-11 Menggunakan Neighbor-Joining Method

Candida parapsilosis adalah khamir askomisetes yang termasuk dalam kelas *Saccharomycetes* dan famili *Debaryomycetaceae*, dikenal sebagai salah satu spesies khamir oportunistik yang tersebar luas di berbagai habitat. Hal ini menurut pernyataan Guinea *et al.*, (2025) bahwa *Candida parapsilosis* adalah ragi *ascomycetous* diploid dan anggota *Debaryomycetaceae*, seperti ragi lain secara medis seperti *Candida albicans*, *Candidozyma auris*, atau *Candida tropicalis*. *Candida parapsilosis* dikenal sebagai organisme yang sangat adaptif dan mampu bertahan serta tumbuh di berbagai habitat, tidak terbatas pada lingkungan klinis.

Spesies ini ditemukan di berbagai sumber lingkungan, termasuk tanah, air, sedimen, permukaan tumbuhan, dan berbagai bahan organik, yang mengindikasikan kapasitas metaboliknya yang luas dalam memanfaatkan beragam sumber karbon yang tersedia di lingkungan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Lombardi *et al.*, (2024) bahwa kemampuan *C. parapsilosis* bertahan di lingkungan yang sangat berbeda seperti usus manusia, tanah, dan berbagai substrat organik lainnya menunjukkan bahwa patogen oportunistik ini memiliki fleksibilitas metabolik yang signifikan, dan kemampuan untuk menyesuaikan metabolismenya agar dapat beradaptasi. Hal ini juga diperkuat oleh pernyataan Cillingová *et al.*, (2022) bahwa khamir *C. parapsilosis* mampu memetabolisme berbagai sumber karbon yang tidak konvensional, termasuk senyawa hidroksiaromatik, melalui jalur-jalur metabolisme yang dikode oleh kluster gen metabolik yang terekspresi bersama dan diatur secara

substrat-spesifik, yang mendemonstrasikan fleksibilitas metabolik spesies ini pada tingkat genomik dan transkriptomik. *Candida parapsilosis* termasuk khamir oportunistik yang tersebar luas, selain dari manusia tapi juga dari tanaman, termasuk buah dan sayuran.

Khamir dengan adaptabilitas metabolik tinggi, *C. parapsilosis* diketahui mampu memproduksi berbagai enzim ekstraselular yang berperan dalam degradasi substrat kompleks. Kemampuan enzimatik *C. parapsilosis* mencakup produksi enzim-enzim hidrolitik yang memungkinkan spesies ini untuk memanfaatkan berbagai sumber karbon, termasuk karbohidrat kompleks. *Candida parapsilosis* memecah karbohidrat melalui proses metabolisme fermentasi dan asimilasi. *Candida parapsilosis* menghasilkan enzim untuk mengubah molekul karbohidrat kompleks menjadi gula sederhana. Hal ini menurut Kukec *et al.*, (2002) bahwa *Candida parapsilosis* memiliki kemampuan metabolik ganda yang khas, yaitu melakukan fermentasi positif kuat pada glukosa serta mengasimilasi berbagai jenis karbohidrat.

Hal ini diperkuat pernyataan Erum *et al.*, (2020) bahwa *C. parapsilosis* termasuk genus *Candida* spp. mampu memproduksi berbagai enzim ekstraselular seperti proteinase, fosfolipase, esterase, dan hemolisin yang berperan dalam degradasi substrat kompleks, dan bahwa kapasitas enzimatik spesies *Candida* sangat bervariasi tergantung pada strain dan kondisi pertumbuhan. Hal ini juga diperkuat oleh pernyataan Cillingová *et al.*, (2022) bahwa *C. parapsilosis* memiliki kluster gen metabolik yang

mengkode enzim-enzim untuk pemanfaatan substrat karbon tidak konvensional, kemungkinan bahwa spesies ini dapat mengekspresikan aktivitas enzimatik baru, termasuk aktivitas inulinolitik, ketika diekspos terhadap substrat yang tepat seperti inulin dari umbi kentang.

Isolat khamir I-11 dalam kemampuannya untuk tumbuh pada media ISM (*Inulinase Selecting Medium*) yang menggunakan inulin sebagai satu-satunya sumber karbon menunjukkan bahwa isolat ini memiliki sistem enzimatik yang mampu mendegradasi inulin. Inulin merupakan suatu fruktan yang tersusun dari rantai fruktosa yang terikat melalui ikatan β -2,1-glikosidik, dan untuk menghidrolisis ikatan tersebut diperlukan enzim inulinase. Hal ini sesuai dengan pernyataan Guice *et al.*, (2023) bahwa inulinase adalah enzim. Inulinase merupakan enzim yang mampu menghidrolisis polimer inulin menjadi bentuk oligosakarida melalui aktivitas endoinulinase dan monomer fruktosa melalui aktivitas eksoinulinase. Hal ini juga diperkuat oleh pernyataan Putri (2022) bahwa kemampuan khamir untuk tumbuh pada media selektif ISM dengan inulin sebagai satu-satunya sumber karbon merupakan indikasi langsung bahwa khamir tersebut memiliki aktivitas inulinase, karena pertumbuhan pada media tersebut hanya dimungkinkan apabila sel khamir mampu menghidrolisis inulin melalui aktivitas enzim β -fructosidase ekstraselular maupun intraselular.

Identifikasi isolat khamir I-11 sebagai *Candida parapsilosis* dengan aktivitas inulinolitik dari umbi kentang (*Solanum tuberosum*) merupakan temuan yang baru dan signifikan. Meskipun genus *Candida* secara umum diketahui memiliki spesies-spesies penghasil inulinase, aktivitas inulinolitik pada *Candida parapsilosis* secara spesifik dari umbi kentang masih sangat terbatas dalam literatur ilmiah yang ada. Laporan inulinase sebelumnya dalam genus *Candida* banyak berfokus pada spesies seperti *Candida guilliermondii*, *Candida kutaonensis*, *Candida kefyr*, dan *Candida oleophila*.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Eksplorasi mikrobiologis pada komoditas umbi kentang (*Solanum tuberosum* L.) berhasil mendapat lima jenis isolat khamir inulinolitik potensial penghasil enzim inulinase, dengan Isolat I-11 yang menghasilkan aktivitas penapisan awal sebesar 0,69 U/mL. Pengujian parameter suhu dan pH membuktikan bahwa aktivitas enzim dari Isolat I-11 mencapai kondisi optimum sebesar 1,76 U/mL pada tingkat keasaman pH 5 dan suhu 35°C. Analisis indentifikasi molekuler berbasis *DNA Barcoding* bahwa Isolat I-11 memiliki hubungan kekerabatan terdekat dengan spesies *Candida parapsilosis* IFM 52595.

5.2 Saran

- 5.2.1 Perlu dilakukannya mendalami spesies jamur *Candida parapsilosis* dengan penambahan nutrisi dan substrat, guna menemukan dan mengembangkan enzim inulinase jenis khamir tersebut.
- 5.2.2 Perlu dilakukan uji lanjutan khamir *Candida parapsilosis* dalam menghasilkan enzim inulinase pada pH dan suhu paling optimal pada khamir *Candida parapsilosis*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abd El Aty, A.A., Mohamed, A.A. and El-Sayed, M. (2020) "Screening of Yeast Isolates for Inulinase Activity," *Annals of Microbiology*, 70(1), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13213-020-01569-8>.
- Abdella, A. *et al.* (2023) "Rhizopus oryzae Inulinase Production and Characterization with Application in Chicory Root Saccharification," *Microbiology Research*, 14(1), pp. 297–315. Available at: <https://doi.org/10.3390/microbiolres14010024>.
- Al-kashef, A.S. *et al.* (2023) "Production and optimization of novel Sphorolipids from Candida parapsilosis grown on potato peel and frying oil wastes and their adverse effect on Mucorales fungal strains," *Microbial Cell Factories*, 22(1), p. 79. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02088-0>.
- Admin, A., & Mustofa, M. (2019). Penentuan Sifat Fisik Kentang (*Solanum tuberosum* L.): Sphericity, Luas Permukaan Volume Dan Densitas. *Jurnal Teknologi Pertanian Gorontalo (JTPG)*, 4(2), 46–51. <https://doi.org/10.30869/jtpg.v4i2.457>
- Amarullah, M. R., Sudarsono, & Amarillis, S. (2019). Produksi dan Budidaya Umbi Bibit Kentang (*Solanum tuberosum* L.) di Pangalengan, Bandung, Jawa Barat. *Bul. Agrohorti*, 7(1), 93–99.
- Anggraini, I., Ferniah, R. S., & Kusdiyantini, E. (2022). Isolasi Khamir Fermentatif dari Batang Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum*. L) dan Hasil Identifikasinya Berdasarkan Sekuens Internal Transcribed Spacer. *Berkala Bioteknologi*, 5(2), 12–22.
- Atmodjo, K. (2018) "Optimalisasi Gula Cair dan pH Medium untuk Fermentasi Alkohol dari Jus Curucuma xanthorhiza," *Biota : Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*, 2(3), pp. 97–104. Available at: <https://doi.org/10.24002/biota.v2i3.1885>.
- Azzahra, S., Rahayu, T. and Astuti, W. (2021) "Pengaruh suhu inkubasi dan derajat keasaman (pH) terhadap laju pertumbuhan dan aktivitas metabolit sekunder khamir isolat lokal," *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, 15(2), pp. 78–85. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.21009/jmi.15.2.03>.
- Bessadok, B., Jaouadi, B., Brück, T., Santulli, A., Messina, C. M., & Sadok, S. (2022). Molecular Identification and Biochemical Characterization of Novel

- Marine Yeast Strains with Potential Application in Industrial Biotechnology. *Fermentation*, 8(10), 538. <https://doi.org/10.3390/fermentation8100538>
- Buerger, A., Weisse, A.Y. and Nikolados, E.M. (2022) “How to determine microbial lag phase duration?” Available at: <https://doi.org/10.1101/2022.11.16.516631>.
- de Carvalho Cardoso, E.S. *et al.* (2025) “Production and application of inulinase by new isolates of *Aspergillus welwitschiae* from fermented peach-palm waste for the production of fructooligosaccharides,” *Food Chemistry*, 465, p. 141978. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.141978>.
- Chen, J., Pu, D., Cao, B., Sun, B., & Zhang, Y. (2025). Effect of Temperature and Water Addition Ratio on the Aroma Release of Yeast Proteins. *Foods*, 14(6), 1037. <https://doi.org/10.3390/foods14061037>
- Cillingová, A. *et al.* (2022) “Transcriptome and proteome profiling reveals complex adaptations of *Candida parapsilosis* cells assimilating hydroxyaromatic carbon sources,” *PLOS Genetics*, 18(3), p. e1009815. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009815>.
- Darmasiwi, S., Pahlevi, R. D., & Setiadi, C. E. B. (2024). Isolation and identification of fungi from natural fermentation of guava seeds. *Jurnal Biologi Tropis*.
- Dion, R., Wijanarka, W. and Rukmi, M.G.I. (2022) “Isolation and screening of inulinolytic yeast from local tubers of Semarang, Indonesia,” *ournal of Bioremediation and Microbial Biotechnology*, 10(2), pp. 45–52. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.14710/jbmb.10.2.45-52>.
- Dion, R., Wijanarka, W., & Pujiyanto, S. (2022). Inulinase Producing Yeast Isolated from Kepok Banana Peels (*Musa acuminata* x *balbisiana*). *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 14(2), 236–244. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v14i2.37117>
- Effendi, V. P., & Parhusip, A. J. N. (2022). Kajian Literatur Spesifikasi Mutu Fisikokimia dan Mikrobiologis Water Kefir dengan Variasi Konsentrasi Substrat dan Starter. *Jurnal Teknologi Pangan Dan Kesehatan (The Journal of Food Technology and Health)*, 3(2), 66–76. <https://doi.org/10.36441/jtepakes.v3i2.558>
- Erum, R. *et al.* (2020) “A comparative study on production of extracellular hydrolytic enzymes of *Candida* species isolated from patients with surgical site infection and from healthy individuals and their co-relation with antifungal drug resistance,” *BMC Microbiology*, 20(1), p. 368. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02045-6>.

- Fadhli, H., Kusdiyantini, E. and Nurhayati, N. (2019) “Karakterisasi morfologi, biokimia, dan uji enzimatis isolat khamir dari buah durian dan nira kelapa,” *Jurnal Biologi Tropika*, 2(2), pp. 62–73. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.14710/jbt.2.2.62-73>.
- Faikar, R. A. (2024). Isolasi dan Identifikasi Kapang dan Khamir pada Ekoenzim Campuran Feses Sapi Potong dan Jerami Padi pada Lama Fermentasi yang Berbeda. *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*, 5(2), 19–38. <https://doi.org/10.24198/jthp.v5i2.56004>
- Field, A. (2018) *Discovering statistics using IBM SPSS statistics*. 5th ed. SAGE Publications.
- Fukuda, N. (2023) “Apparent diameter and cell density of yeast strains with different ploidy,” *Scientific Reports*, 13(1), p. 1513. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28800-z>.
- García-Ochoa, F., Santos, V.E. and Gomez, E. (2023) “Microbial Growth under Limiting Conditions-Future Perspectives,” *Microorganisms*, 11(7), p. 1641. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071641>.
- Guice, J.L. *et al.* (2023) “Microbial inulinase promotes fructan hydrolysis under simulated gastric conditions,” *Frontiers in Nutrition*, 10. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1129329>.
- Al Halim, L.R.A., Hemeda, N.F. and Serag, A.M. (2024) “Isolation, characterization, and screening of yeast biodiversity for multi- hydrolytic enzymes,” *Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences*, 10(3), pp. 474–484. Available at: <https://doi.org/10.1007/s43994-023-00118-6>.
- Hermansyah, H., Sutami, N. and Miksusanti, M. (2018) “Amplifikasi Pcr Domain D1/D2 28s Rdna Menggunakan Primer Its1 Dan Its4 Sampel Dna Dari Candida Tropicalis Yang Diisolasi Dengan Metode Pendinginan,” *Indonesian Journal of Pure and Applied Chemistry*, 1(1), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.26418/indonesian.v1i1.26037>.
- Ismadi, I., Annisa, K., Nazirah, L., Nilahayati, N., & Maisura, M. (2021). Karakterisasi Morfologi Dan Hasil Tanaman Kentang Varietas Granola Dan Kentang Merah Yang Dibudidayakan Di Bener Meriah Provinsi Aceh. *Jurnal Agrium*, 18(1), 63–71. <https://doi.org/10.29103/agrium.v18i1.3844>
- Jagiello, A., Kaminska, J. and Riezman, H. (2019) “Cell shape and surface-to-volume ratio constraints regulate nutrient uptake and metabolic efficiency in budding yeasts,” *Current Genetics*, 65(3), pp. 711–722. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00294-019-00931-1>.

- Karimi, L., Mirhendi, H., Khodadadi, H., & Mohammadi, R. (2015). Molecular identification of uncommon clinical yeast species in Iran. *Current Medical Mycology*, 1(2), 1–6. <https://doi.org/10.18869/acadpub.cmm.1.2.1>
- Khazalina, T. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* in making halal products based on conventional biotechnology and genetic engineering. *Journal of Halal Product and Research*, 3(2), 88. <https://doi.org/10.20473/jhpr.vol.3-issue.2.88-94>
- Kourkoutas, Y., Kanellaki, M. and Koutinas, A.A. (2021) “Optimization of yeast-based bioprocesses: Effect of thermal and pH homeostasis on enzymatic secretion and fermentation kinetics,” *Biochemical Engineering Journal*, 168, p. 107932. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.107932>.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. and Boekhout, T. (2018) “Systematics of yeasts and their biotechnological applications: A review of morphological and molecular identification protocols,” *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(5), pp. 723–741. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10482-018-1031-z>.
- Lachance, M. (2022) “Phylogenies in yeast species descriptions: In defense of neighbor-joining,” *Yeast*, 39(10), pp. 513–520. Available at: <https://doi.org/10.1002/yea.3812>.
- Laowklom, N., Chantanaphan, R., & Pinphanichakarn, P. (2012). Production, Purification and Characterization of Inulinase from a Newly Isolated *Streptomyces* sp. CP01. *Natural Resources*, 03(03), 137–144. <https://doi.org/10.4236/nr.2012.33018>
- Lingga, R., Dalimunthe, N. P., Afriyansyah, B., Irwanto, R., Henri, H., Januardi, E., Marinah, M., & Safitri, S. (2021). Keanekaragaman jamur makroskopik di Hutan Wisata Desa Tiang Tarah Kabupaten Bangka. *Bioma : Jurnal Ilmiah Biologi*, 10(2), 180–200. <https://doi.org/10.26877/bioma.v10i2.7920>
- Liu, Q., Guo, Q., Akbar, S., Zhi, Y., El Tahchy, A., Mitchell, M., Li, Z., Shrestha, P., Vanhercke, T., Ral, J., Liang, G., Wang, M., White, R., Larkin, P., Singh, S., & Petrie, J. (2017). Genetic enhancement of oil content in potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) through an integrated metabolic engineering strategy. *Plant Biotechnology Journal*, 15(1), 56–67. <https://doi.org/10.1111/pbi.12590>
- Lombardi, L. *et al.* (2024) “Alternative sulphur metabolism in the fungal pathogen *Candida parapsilosis*,” *Nature Communications*, 15(1), p. 9190. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-53442-8>.
- Mahmud, F., Islam, M.S. and Al-Mamun, M. (2020) “Heat shock proteins (HSPs) synthesis and trehalose accumulation as survival mechanisms in wild yeast strains under acute thermal stress,” *Frontiers in Microbiology*, 11, p. 572134. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.572134>.

- Mazlan, A.H. *et al.* (2024) "Effect of DNA Template Concentration on Standard Polymerase Chain Reaction," *International Journal of Pharmaceuticals, Nutraceuticals and Cosmetic Science*, 7(1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.24191/IJPNaCS.v7i1.01>.
- Milek, J. (2022). The inulin hydrolysis by recombinant exo-inulinases: determination the optimum temperatures and activation energies. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 147(14), 8061–8067. <https://doi.org/10.1007/s10973-021-11086-6>
- Mozzachiodi, S. and Bhalerao, R. (2022) "Saccharomyces cerevisiae Exponential Growth Kinetics in Batch Culture to Analyze Respiratory and Fermentative Metabolism," *Journal of Visualized Experiments* [Preprint], (139). Available at: <https://doi.org/10.3791/58192>.
- Mutiaratri, R. L., Wijanarka, & Pujiyanto, S. (2015). Produksi Enzim Inulinase Khamir *Pichia manshurica* DUCC Y-015 Dari Tepung Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.) Dengan Variasi Konsentrasi Magnesium Sulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) Dan Waktu Inkubasi. *Jurnal Akademika Biologi*, 4(2), 35–41.
- Noni, D., Bunyani, N. A., Finmeta, A. W., & Roman, M. F. (2025). Pengaruh Pemberian Ragi Roti (*Sacharomyces Cerevisiae*) Dengan Dosis Yang Berbeda Terhadap Minyak Kelapa Murni Dengan Metode Fermentas. *Netizen: Journal Of Society And Bussiness*, 1(8), 1–7.
- Nurhayati *et al.* (2022) "Isolasi dan Identifikasi Khamir Toleran Alkohol dari Molase," *Biota : Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*, 7(1), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.24002/biota.v7i1.5426>.
- de Oliveira, R.L. *et al.* (2022) "Production, Biochemical Characterization, and Kinetic/Thermodynamic Study of Inulinase from *Aspergillus terreus* URM4658," *Molecules*, 27(19), p. 6418. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules27196418>.
- Paixão, S. M., Teixeira, P. D., Silva, T. P., Teixeira, A. V., & Alves, L. (2013). Screening of novel yeast inulinases and further application to bioprocesses. *New Biotechnology*, 30(6), 598–606. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.02.002>
- Prasetyo, J. *et al.* (2021) "The growth rate of inulinolytic yeast isolates from yum (*Pachyrhizus erosus* L.) and their inulinase production capability," *Journal of Physics: Conference Series*, 1943(1), p. 012082. Available at: <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1943/1/012082>.
- Purnamasari, M. *et al.* (2012) "Isolasi dan Identifikasi Secara Molekuler *Ganoderma* spp. yang Berasosiasi dengan Penyakit Busuk Pangkal Batang di

- Kelapa Sawit,” *Jurnal Fitopatologi Indonesia*, 8(1), pp. 9–15. Available at: <https://doi.org/10.14692/jfi.8.1.9>.
- Purnomo, E., Suedy, S. W. A., & Haryanti, S. (2017). Pengaruh Cara dan Waktu Penyimpanan terhadap Susut Bobot, Kadar Glukosa dan Kadar Karotenoid Umbi Kentang Konsumsi (*Solanum tuberosum* L. Var Granola). *Buletin Anatomi Dan Fisiologi*, 2(2), 107–113. <https://doi.org/10.14710/baf.2.2.2017.107-113>
- Puspita, D., Nadia, E., Immanuela, E., & Titania, MC. (2020). Isolasi, Identifikasi dan Uji Produksi Yeast yang Diisolasi Dari Nira Kelapa. *Biosfer: Jurnal Biologi Dan Pendidikan Biologi*, 5(1), 1–5. <https://doi.org/10.23969/biosfer.v5i1.2395>
- Putri, A. (2022) “Inulinase producing yeast isolated from kepok banana peels (*Musa acuminata* × *balbisiana*),” *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 14(2), pp. 236–244.
- Rahmah, V.A., Tanuwiria, U.H. and Islami, R.Z. (2025) “Konsentrasi dan Kemurnian DNA Hasil Ekstraksi Rumpun Odor, Jagung Hibrida, Padi IR64 Dan Padi Ciherang ,” *Agrinimal Jurnal Ilmu Ternak dan Tanaman*, 13(2), pp. 119–126. Available at: <https://doi.org/10.30598/ajitt.2025.13.2.119-126>.
- Rahmawati, F.C., Kusdiyantini, E. and Budiharjo, A. (2017) “Isolasi dan Identifikasi Molekuler Khamir dari Molase serta Kemampuannya dalam Produksi Etanol ,” *Jurnal Akademika Biologi*, 6(4), pp. 88–98.
- Razali, N.M. and Yap, B.W. (2011) “Power Comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling Tests,” *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2(1), pp. 21–33.
- Risky, F. U., Wijanarka, W., & Pujiyanto, S. (2019). Isolasi Khamir Penghasil Enzim Inulinase Dari Buah Kersen (*Muntingia calabura*) Serta Pengaruh Mikronutrien Mangan (Mn) Pada Produksi Enzimnya. *NICHE Journal of Tropical Biology*, 2(2), 27–37. <https://doi.org/https://doi.org/10.14710/niche.2.2.27-37>
- Rukmana, R. (1997). *Ubi Kayu Budidaya dan Pasca Panen*. Kanisius.
- Samadi, B. (1997). *Usaha Tani Kentang*. Kanisius.
- Schultz, D. and Kishony, R. (2013) “Optimization and control in bacterial Lag phase,” *BMC Biology*, 11(1), p. 120. Available at: <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-120>.
- Shofa, G. S., Badruzzaman, D. Z., & Harlia, E. (2024). Isolasi dan Identifikasi Kapang dan Khamir pada Media Pertumbuhan Maggot Black Soldier Fly. *Media Pertanian*, 9(1), 10–26. <https://doi.org/10.37058/mp.v9i1.10585>

- Silva, D., Bambaranda, B.V.A.S.. and Mudannayake, D.C. (2022) “Bioactive, Microbiological, and Sensory Properties of Sargassum cristaefolium and Sargassum crassifolium Herbal Tea,” *Advances in Technology*, 2(1), pp. 38–49. Available at: <https://doi.org/10.31357/ait.v2i1.5456>.
- Singh, P., & Gill, P. K. (2006). Production of Inulinases : Recent Advances. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 151–162.
- Sulmiyati, S. *et al.* (2019) “Assessment of the characteristics of yeast in goat milk kefir using yeast extract peptone dextrose agar media (YEPDA),” *International Journal of Agriculture and Biosciences*, 8(1), pp. 51–55.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J. and Higgins, D.G. (2003) “Multiple Sequence Alignment Using ClustalW and ClustalX,” *Current Protocols in Bioinformatics*, 00(1). Available at: <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0203s00>.
- Tippanavar, N. *et al.* (2024) “Bio-utilization of agricultural residue banana plant shoot through solid state fermentation for production of inulinase using newly isolated *Nothophoma anigozanthi* JAM,” *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(13), pp. 14755–14769. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13399-023-03835-4>.
- Utomo, M. A., Erfianti, T., Maryati, D. A., Dion, R., Anggini, P. W., Wijanarka, W., & Hadi, M. (2021). Pemanfaatan Khamir Inulinolitik Indigenous Ampas Tebu (Bagasse) Sebagai Penghasil Biokatalis Inulinase Dalam Produksi Gula Rendah Kelori. *NICHE Journal of Tropical Biology*, 4(2), 56–63. <https://doi.org/https://doi.org/10.14710/niche.4.2.56-63>
- Wan, X., Guo, H., Liang, Y., Zhou, C., Liu, Z., Li, K., Niu, F., Zhai, X., & Wang, L. (2020). The physiological functions and pharmaceutical applications of inulin: A review. *Carbohydrate Polymers*, 246, 116589. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116589>
- Weiss, S. *et al.* (2016) “Correlation detection strategies in microbial data sets vary widely in sensitivity and precision,” *The ISME Journal*, 10(7), pp. 1669–1681. Available at: <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.235>.
- Wijanarka, W., & A.N, S. (2019). Isolasi Khamir Inulinolitik pada Buah Kersen (*Muntingia Calabura* L.) Sebagai Penghasil Enzim Inulinase. *Bioma : Jurnal Ilmiah Biologi*, 8(2), 414–426. <https://doi.org/10.26877/bioma.v8i2.4939>
- Yamin, B., Rinihapsari, E., Firstania Tirza Diandra, & Raka Pradistya. (2022). Perbandingan Kemampuan Fermentasi Khamir *Saccharomyces Cerevisiae* Dari Berbagai Media Kultur. *Bioma*, 17(2), 65–73. [https://doi.org/10.21009/Bioma17\(2\).3](https://doi.org/10.21009/Bioma17(2).3)

- Yazici, S.O. *et al.* (2021) “Optimization of fermentation parameters for high-activity inulinase production and purification from *Rhizopus oryzae* by Plackett–Burman and Box–Behnken,” *Journal of Food Science and Technology*, 58(2), pp. 739–751. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04591-3>.
- Yurliasni, & Zakaria, Y. (2013). Kajian Penambahan Khamir *Kluyveromyces lactis*, *Candida curiosa* dan *Brettanomyces custersii* Asal Dadih Terhadap Konsentrasi Asam-Asam Amino, Lemak, Organik Dan Karbohidrat Susu Kerbau Fermentasi (Dadih). *Bionatura-Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati Dan Fisik*, 15(1), 54–59.
- Yusuf, M.A. and Wijanarka, W. (2024) “Characterization and optimization of inulinase production by local yeast isolates on Inulin Selective Medium (ISM),” *Jurnal Biologi Tropis*, 24(1), pp. 112–120. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.29303/jbt.v24i1.6142>.
- Zhang, Y., Li, H., & Chen, X. (2024). Advances in Sterilization Techniques for Microbiological and Biochemical Laboratories. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1456789>

VI. UCAPAN TERIMA KASIH

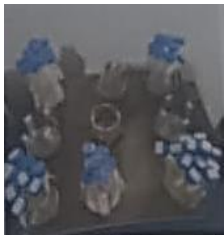
Segala puji dan Syukur Kehadirat Allah Subhanahu wa taala karena berkat limpahan karunia dan rahmatnya, penulis dapat menyelesaikan penelitian serta penulisan laporan skripsi dengan baik. Banyak hambatan serta tantangan selama proses penelitian dan penyusunan laporan, oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

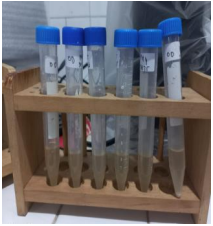
1. Allah Subhanahu wa taala yang senantiasa melindungi dan melimpahkan kemudahan kepada penulis saat prose penelitian dan penyusunan laporan skripsi.
2. Rully Rahadian, S.Si., M.Si., Ph.D. selaku Ketua Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.
3. Dr. Sri Pujiyanto, S.Si., M.Si., selaku Ketua Program Studi Bioteknologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang
4. Dr. Drs. Wijanarka, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing I yang senantiasa mengarahkan dan membimbing penulis saat proses pengerjaan skripsi.
5. Prof. Dr. Endang Kusdiyantini, DEA., selaku Dosen Pembimbing II. Terima kasih atas ilmu, saran, serta bimbingan yang diberikan kepada penulis.
6. Dwi Retno Fatmawati, M.Si. selaku dosen yang selalu memberikan Pengertian, membimbing, dan mensupport penulis selama proses penelitian dan penyusunan skripsi
7. Bapak dan Ibu Dosen Departemen Biologi atas ilmu dan pengalamannya yang diberikan selama penulis menempuh pendidikan di Program Studi Bioteknologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro.

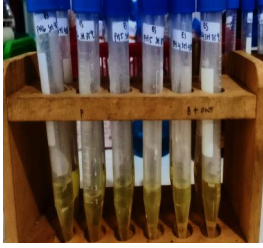
8. Indra Gunawan, S.T., M.T. dan Eko Purnomo, S.Si selaku asisten di Laboratorium Bioteknologi Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika
9. Ibu dan Bapak penulis, Susi Indrawati dan Basuki Wibowo, yang selalu memberikan kasih sayang, doa yang tidak pernah putus, nasihat, serta selalu mendukung setiap usaha yang dilakukan oleh penulis selama masa kuliah di Universitas Diponegoro.
12. Teman-teman Universitas Diponegoro terutama Nurlita, Aqila, Cantika, Velisya, Hani, Cindy, Uswa, Artha, Afifa, Sifa, Devina, Winda, Omar, Faris yang selalu memberikan dukungan dan membantu penulis saat penyusunan skripsi.
14. Semua pihak yang membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian dan penyusunan laporan skripsi yang tidak bisa disebutkan satu per satu

LAMPIRAN

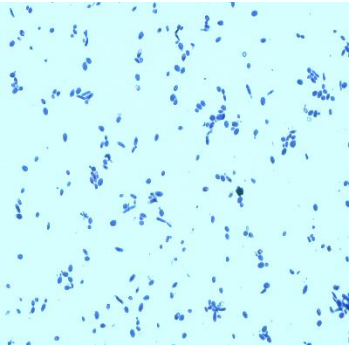
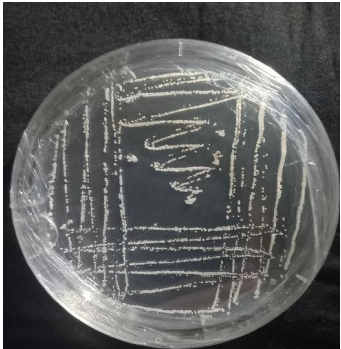
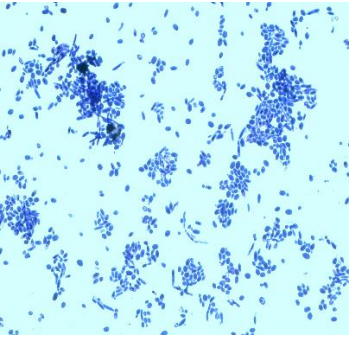
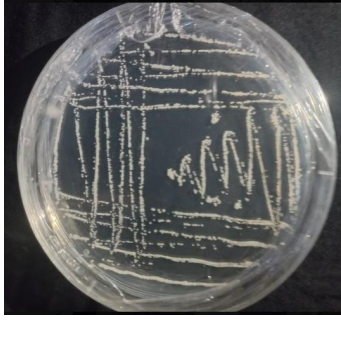
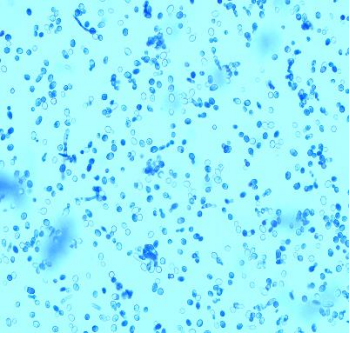
Lampiran 1. Dokumentasi Kegiatan

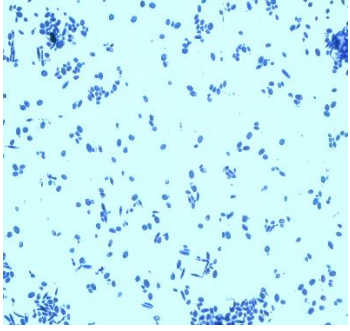
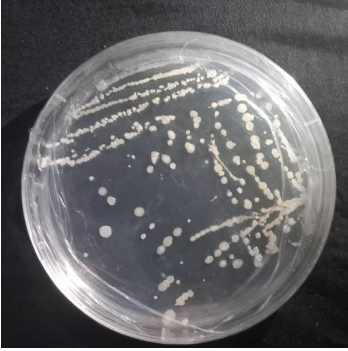
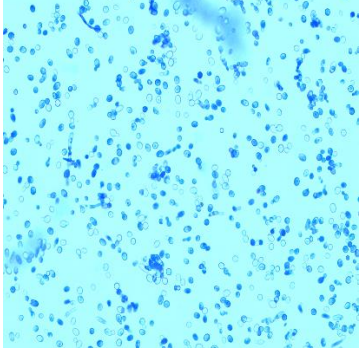
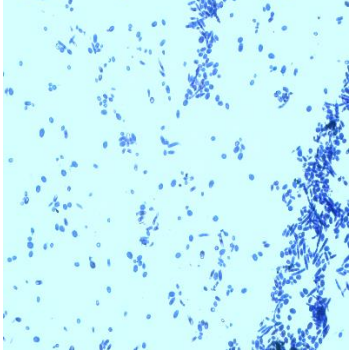
No	Gambar	Keterangan
1		Tahapan Isolasi ke media PDA
2.		Skrining ke media ISM
3.		Pengukuran pH ke media produksi
4.		Tahapan inkubasi untuk pertumbuhan khamir dengan alat shaker selama 22 Jam

5.		Media produksi sebelum dan sesudah diukur
6.		Tahapan sentrifugasi untuk mendapat <i>crude</i> enzim
7.		Tahapan setelah sentrifugasi
8.		Inkubasi media produksi dengan oven

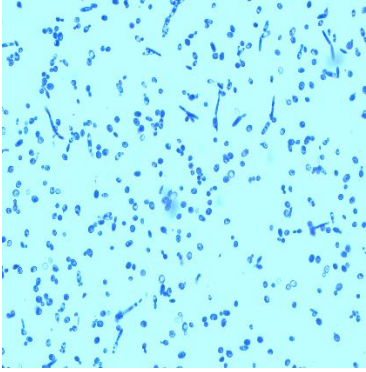
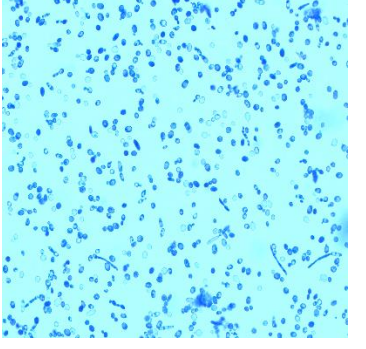
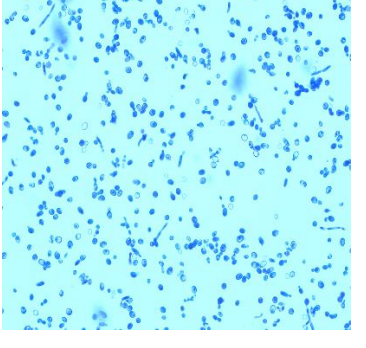
9.		Tahapan proses dimasukkan air mendidih
10		Proses setelah penambahn larutan DNS

Lampiran 2. Hasil Makroskopis pada Media PDA dan Mikroskopis

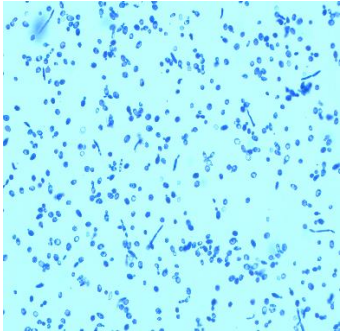
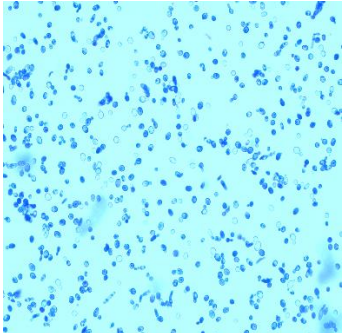
No	Gambar Makroskopis	Gambar Mikroskopis Perbesaran 400x	Keterangan
1			I-1
2.			I-2
3.			I-3

No	Gambar Makroskopis	Gambar Mikroskopis Perbesaran 40x	Keterangan
4			I-4
5.			I-5
6.			I-6

Lampiran 3. Lanjutan Lampiran 2 Hasil Makroskopis pada Media PDA dan Mikroskopis

No	Gambar Makroskopis	Gambar Mikroskopis Perbesaran 40x	Keterangan
7.			I-7
8.	 Galaxy A32		I-8
9.			I-9

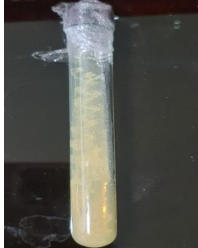
Lampiran 4. Lanjutan Lampiran 3 Hasil Makroskopis pada Media PDA dan Mikroskopis

No	Gambar Makroskopis	Gambar Mikroskopis Perbesaran 40x	Keterangan
10.			I-10
11.			I-11

Lampiran 5. Hasil Makroskopis Isolat Khamir yang Tumbuh pada Media ISM

No	Gambar	Keterangan
1		I-3
2.		I-5
3.		I-8
4.		I-9

Lampiran 6. Lanjutan Lampiran 5 Hasil Makroskopis Isolat Khamir yang Tubuh pada Media ISM

No	Gambar	Keterangan
5.		I-11

Lampiran 7. Tabel Aktivitas Enzim

Nama Isolat	Ulangan	Waktu Inkubasi					
		T0 (jam ke-0)	T1 (jam ke-6)	T2 (jam ke-12)	T3 (jam ke-18)	T4 (jam ke-24)	T5 (jam ke-30)
P1S1 (I-11.4.35)	1	0,70	1,31	1,55	1,48	0,892	0,73
	2	0,69	1,30	1,54	1,49	0,894	0,73
	3	0,57	1,30	1,54	1,49	0,896	0,73
	Rata-rata	0,66	1,30	1,54	1,48	0,89	0,73
	Stdev	0,07	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00
P1S2 (I-11.4.40)	1	0,49	1,17	1,34	1,04	0,87	0,73
	2	0,49	1,18	1,35	1,05	0,87	0,73
	3	0,48	1,18	1,35	1,05	0,87	0,72
	Rata-rata	0,49	1,18	1,35	1,05	0,87	0,73
	Stdev	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01
P2S2 (I-11.5.40)	1	0,57	0,85	1,35	1,24	0,96	0,66
	2	0,56	0,83	1,35	1,23	0,95	0,66
	3	0,56	0,82	1,34	1,23	0,95	0,65
	Rata-rata	0,57	0,83	1,35	1,23	0,95	0,66
	Stdev	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
P2S1 (I-11.5.35)	1	0,58	0,97	1,77	1,73	0,97	0,67
	2	0,57	0,97	1,76	1,73	0,96	0,66
	3	0,57	0,97	1,76	1,72	0,96	0,65
	Rata-rata	0,57	0,97	1,76	1,73	0,96	0,66
	Stdev	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01
P3S1 (I-11.6.35)	1	0,49	0,68	1,033	0,93	0,67	0,58
	2	0,49	0,68	1,03	0,93	0,67	0,57
	3	0,49	0,67	1,028	0,92	0,66	0,57
	Rata-rata	0,49	0,67	1,03	0,93	0,67	0,57
	Stdev	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01
P3S2 (I-11.6.40)	1	0,42	0,42	0,75	0,76	0,693	0,57
	2	0,42	0,42	0,742	0,75	0,687	0,57
	3	0,41	0,42	0,74	0,75	0,684	0,56
	Rata-rata	0,416	0,42	0,74	0,75	0,69	0,56
	Stdev	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00

Lampiran 8. Uji Normalitas

Tests of Normality							
	pH	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Aktivitas	4	.147	12	.200 [*]	.955	12	.710
	5	.220	12	.111	.887	12	.108
	6	.150	12	.200 [*]	.952	12	.664

Lampiran 9. Tabel ANNOVA *Two way*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Aktivitas

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	2.681 ^a	5	.536	4.831	.002	.466
Intercept	29.588	1	29.588	266.566	.000	.899
pH	1.075	2	.538	4.845	.015	.244
Suhu	.236	1	.236	2.129	.115	.066
pH * Suhu	.005	2	.002	.021	.979	.001
Error	3.330	30	.111			
Total	34.235	36				
Corrected Total	4.647	35				

^a R Squared = .577 (Adjusted R Squared = .506)

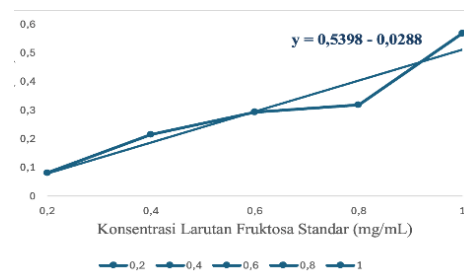
Lampiran 10. Uji Tukey

Aktivitas

Tukey HSD^{a,b}

pH	N	Subset	
		1	2
6	12	.66233	
5	12		1.02042
4	12		1.03700
Sig.		1.000	.992

Lampiran 11. Kurva Fruktosa Standar



DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Nama	:	Zahrah Syahmina Badzlin	
NIM	:	24020222140082	
TTL	:	Jakarta, 26 November 2004	
Agama	:	Islam	
Alamat	:	Jln.Timoho Barat 2 No. 5, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah	
No Telp	:	0812-8236-6546	
Email	:	zahrahsyahminabadzli@students.undip.ac.id / harhazzsb24@gmail.com	

RIWAYAT PENDIDIKAN FORMAL

SDI PB Soedirman Jakarta	Tahun : 2010 – 2016
SMPN 179 Kalisari Jakarta Timur	Tahun : 2016 – 2019
SMAI PB Soedirman Jakarta	Tahun : 2019 – 2022
Universitas Diponegoro	Tahun : 2022 – Sekarang

PENGALAMAN ASISTEN PRAKTIKUM	
Praktikum	Tahun
Mikrobiologi Industri	2024
Mikrobiologi Umum	2025

PENGALAMAN KERJA PRAKTIK		
Kegiatan	Tempat	Tahun
Monitoring Kolam Spirulina	PT. Alga Bioteknologi Indonesia Kel, Jetis Terawas, RT.03/RW.03, Cepoko, Kec. Gn. Pati, Kota Semarang, Jawa Tengah 50225	2024
Ikut serta Panen Spirulina		
Ikut serta Proses Produksi Produk PT.ALBITEC		
Ikut serta Proses Packaging Produk PT.ALBITEC		
Ikut Serta Memasarkan Produk PT.ALBITEC		
Ikut serta Pembuatan Artikel dan Konten PT.ALBITEC		