

# AKTIVITAS DAN KARAKTERISASI MIKOSIN ANTI *Zygosaccharomyces rouxii* FNCC 3006 DARI ISOLAT KHAMIR OSMOFILIK ASAL NEKTAR BUNGA DAN MADU

[Activities and Characterization of Anti *Zygosaccharomyces rouxii* FNCC 3006 Mycocin by Osmophilic Yeast Isolated from Nectar and Honey]

Miftahul Ilmi <sup>1</sup>✉\*, dan Sovia Nur Janah <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Jl. Teknika Selatan, Sleman, D.I. Yogyakarta, Indonesia, 55281

\*Email: m.ilmii@ugm.ac.id

## ABSTRACT

High sugary (40–70%) foods can be contaminated by *Zygosaccharomyces rouxii* which is tolerant of osmotic pressure, tolerant of acid and alcohol, and resistant to food preservative. The way to inhibit the growth of *Z. rouxii* is adding anti *Z. rouxii* mycocins. The purpose of this study was to screen the activity and characterization of anti *Z. rouxii* mycocins secreted by osmophilic yeast isolates. Screening of antagonistic activity of osmophilic yeast isolates and activity of crude extract mycocins was carried out by Colony Picking and Disk Diffusion Assay. The clear zone was measured to determine its activity using the inhibition index (IP). Then, dry weight of cells was measured and characterization of mycocins was done using SDS PAGE. The result of this study showed there were 10 osmophilic yeast isolates that had antagonistic activity to *Z. rouxii*, namely AP 1, PS 1.1, BL 8.21, LW 1.1, BK 3.2, MR 3.2, AP 3, KS 1, TL 2.2, and BL 8.22 isolates. The highest activity of crude extract mycocins anti *Z. rouxii* is LW 1.1 isolates which inhibition index is 1,28. The most effective isolate to inhibit the growth of *Z. rouxii* is LW 1.1 isolate. The LW 1.1 isolate produce anti *Z. rouxii* with molecular weight are between 12,88 kDa and 72,92 kDa. We conclude that LW 1.1 isolate is a potential producer of mycocin anti *Z. rouxii* and can be use as biocontrol agent in food and beverage product.

**Keywords:** *Zygosaccharomyces rouxii*, osmophilic yeast, mycocin

## ABSTRAK

Makanan berkadar gula tinggi (40–70%) dapat terkontaminasi oleh *Zygosaccharomyces rouxii* yang toleran terhadap tekanan osmotik, asam, alkohol, serta tahan terhadap bahan preservatif makanan. Salah satu cara menghambat pertumbuhan *Z. rouxii* adalah dengan memberikan mikosin anti *Z. rouxii*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas dan karakterisasi mikosin anti *Z. rouxii* dari isolat khamir osmofilik. Penapisan aktivitas antagonistik dari isolat khamir osmofilik dilakukan dengan metode *Colony Picking* dan penapisan aktivitas ekstrak kasar dilakukan dengan *Disk Diffusion Assay*. Zona jernih yang terbentuk diukur untuk menentukan aktivitasnya dengan menggunakan indeks penghambatan (IP). Setelah itu dilakukan pengukuran berat kering sel dan karakterisasi mikosin menggunakan SDS PAGE. Hasil penelitian menunjukkan terdapat 10 isolat khamir osmofilik yang menghasilkan aktivitas antagonistik terhadap *Z. rouxii* yaitu isolat AP 1, PS 1.1, LW 1.1, BK 3.2, MR 3.2, AP 3, KS 1, dan TL 2.2 yang diisolasi dari madu, isolat BL 8.21 dan BL 8.22 yang diisolasi dari nektar bunga. Aktivitas ekstrak kasar mikosin anti *Z. rouxii* paling tinggi yaitu isolat LW 1.1 dengan nilai IP 1,28. Isolat paling efektif untuk menghambat pertumbuhan dari *Z. rouxii* adalah isolat LW 1.1, diperoleh nilai perbandingan zona hambat dengan berat kering yaitu 442,099. Isolat LW 1.1 menghasilkan anti *Z. rouxii* dengan berat molekul antara 12,88 kDa sampai 72,92 kDa. Disimpulkan bahwa isolat LW 1.1 dapat dijadikan sumber penghasil mikosin anti *Z. rouxii* yang dapat dimanfaatkan sebagai agen biokontrol dalam produk makanan.

**Kata kunci:** *Zygosaccharomyces rouxii*, khamir osmofilik, mikosin

## PENDAHULUAN

Kerusakan produk makanan dapat menimbulkan kerugian ekonomi baik pada konsumen maupun produsen. Pada umumnya, makanan berasam tinggi, makanan berkadar gula dan garam tinggi, serta makanan beku cenderung terkontaminasi oleh khamir (Fleet, 2011). Kerusakan pada makanan berkadar gula tinggi disebabkan adanya kemampuan unik dari khamir untuk toleran pada tekanan osmotik dan kondisi rendah *water activity* (aw) dalam produk (Martorell *et al.*, 2007). Makanan yang mengandung kadar gula tinggi (40–70%) seperti gula pasir, sirup, molase, madu, selai, jus buah, jeli dan buah kering dapat terkontaminasi oleh beberapa khamir yaitu *Zygosaccharomyces* spp., *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulasporea delbrueckii*, *Debaryomyces hansenii* dan beberapa spesies *Candida* (Tokuoka, 1993; Stratford, 2006; Martorell *et al.*, 2007).

Genus *Zygosaccharomyces* termasuk dalam phylum *Hemiascomycetes* dan dikenal sebagai *spoilage yeast* (Kuanyshev *et al.*, 2017). *Z. bailii* dan *Z. rouxii* berasosiasi menyebabkan kerusakan pada makanan terutama pada makanan dengan konsentrasi gula tinggi, pH rendah dan makanan yang mengandung asam organik lemah (Escott *et al.*, 2018). *Z. rouxii* sulit dicegah pertumbuhannya karena toleran pada berbagai macam kondisi yang pada umumnya mengganggu pertumbuhan sel, seperti kondisi tekanan osmotik tinggi, konsentrasi etanol tinggi, lingkungan dengan *water activity* (aw) yang rendah, pH rendah dan adanya asam organik serta adanya bahan pengawet/preservatif makanan. Salah satu cara yang bisa dilakukan untuk menghambat pertumbuhan *Z. rouxii* yaitu dengan pemberian mikosin.

Mikosin sebagai substansi antimikrobia dapat berperan penting dalam menghambat pertumbuhan

\*Kontributor Utama

\*Diterima: 13 April 2021 - Diperbaiki: 30 Maret 2022- Disetujui: 23 Desember 2022

khamir. Banyak spesies dari khamir telah dilaporkan dapat memproduksi protein toksik yang disebut eksotoksin atau mikosin. Mikosin akan menyerang organisme yang secara taksonomi berkerabat dengan organisme penghasilnya (Golubev, 2006). Mikosin akan menyebabkan kerusakan DNA dan menghambat replikasi DNA, menyerang membran sel target serta membentuk pori pada membran sel. Hal ini akan mengakibatkan perubahan permeabilitas membran dan membran sel kehilangan ion potassium, serta menahani siklus sel (Liu *et al.*, 2015). Mikosin telah menunjukkan memiliki efek penghambatan pada beberapa jamur patogen tanaman dan pelapukan kayu (Waema *et al.*, 2009). Menurut penelitian El-Banna *et al.*, (2011), *Kluyveromyces lactis* menghasilkan mikosin yang dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan *Candida*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, dan *Zygosaccharomyces*. Mikosin digunakan untuk menyerang khamir patogen seperti *Candida albicans* (Al-Qaysi *et al.*, 2017).

Kerusakan makanan akibat mikroorganisme merupakan masalah yang serius pada industri makanan. Eksplorasi dari khamir yang dapat memproduksi mikosin untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme kontaminan pada makanan dapat berguna untuk perkembangan industri makanan. Penelitian sebelumnya telah mengisolasi khamir osmofilik yang diisolasi dari nektar bunga (Setiady dan Ilmi, 2018) dan madu (Prihartini dan Ilmi, 2018). Isolat-isolat tersebut dimungkinkan berpotensi memproduksi mikosin anti *Z. rouxii* karena memiliki habitat yang sama dengan *Z. rouxii*. Hal tersebut memungkinkan isolat khamir osmofilik berkerabat dekat secara taksonomi dengan *Z. rouxii*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi produksi, karakterisasi, dan aktifitas antifungal dari mikosin anti *Z. rouxii* yang diproduksi oleh khamir yang diisolasi dari nektar bunga dan madu.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Isolat khamir osmofilik yang diisolasi dari nektar bunga (Setiady dan Ilmi, 2018) dan madu (Prihartini dan Ilmi, 2018) yang ditampilkan pada Tabel 1. digunakan sebagai isolat uji.

*Zygosaccharomyces rouxii* FNCC 3006 digunakan sebagai isolat target. Potato Dextrose Agar [Himedia] digunakan untuk subkultur isolat khamir. Yeast ekstrak [Himedia], Pepton [Oxoid], Glukosa [Himedia], dan Agar [Himedia], antifungi nystatin [PT. Metiska Farma], dan akuades [CV. Progo Mulyo] digunakan untuk uji aktivitas mikosin dan produksi mikosin. Aseton untuk bahan presipitasi mikosin. Aquabides, 4x Tris buffer, 30% acrylamide, 10% APS, TEMED, isopropanol, loading buffer, running buffer/reservoir buffer, staining solution (coomassie Blue R-250 1 g, methanol 450 ml, akuades 450 ml, dan asam asetat glasial 100ml), dan protein ladder [SMOBIO PM5100] digunakan untuk analisis berat molekul.

## Peremajaan isolat yang digunakan

Sebanyak 31 isolat khamir osmofilik dari *stock culture* diremajakan dalam medium PDA secara streak. Isolat *Zygosaccharomyces rouxii* diinokulasikan pada medium YEPG broth, diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C dengan pengocokan 200 rpm. Kemudian kultur diremajakan pada medium YEPG agar secara streak.

## Penapisan aktivitas antagonistik isolat khamir terhadap *Zygosaccharomyces rouxii*

Penapisan dilakukan dengan menggunakan metode *Colony Picking* (Hettiarachchi *et al.*, 2017). Koloni dari khamir target *Z. rouxii* disuspensikan dalam 2 mL akuades steril. Kemudian 100µL suspensi diinokulasikan kedalam medium YEPG 20 Agar (1% yeast ekstrak, 2% pepton, 20% glukosa, dan 2% agar) secara spread (lawn). Koloni tunggal dari isolat khamir uji diambil secara steril dan diletakkan kedalam lawn. Kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Indeks penghambatan diukur dengan menggunakan rasio zona bening yang terbentuk menggunakan rumus  $IP = \frac{\text{diameter koloni}}{\text{zona bening}}$  (Gohel *et al.*, 2006). Tahapan ini dibuat tiga ulangan.

**Tabel 1.** Daftar isolat yang digunakan sebagai isolat uji. (*List of isolates used in this research*).

No.	Jenis sampel	Kode isolat	Asal daerah
1.	Madu hutan ( <i>forrest honey</i> )	AP 1	Ampana
2.		AP 3	
3.		BK 3.2	Banggai Kepulauan
4.		KS 1	Kasimbar
5.		KS 2	
6.		LW 1.1	Luwuk
7.		LW 3.1	
8.		LW 3.2	
9.		MR 2.2	Morowali
10.		MR 3.1	
11.		MR 3.2	
12.		OG 1	Ogoamas
13.		OG 2	
14.		PM 1.1	Parigi-Moutong
15.		PM 2.1	
16.		PS 1.1	Poso
17.		PS 1.2.1	
18.		PS 3.2	
19.		SG 1.2	Sigi
20.		SG 3.1	
21.		SG 3.2	
22.		TL 1.1	Toli-Toli
23.		TL 2.2	
24.		TL 3.2	
25.	BL 6.1	Kebun Raya Baturraden	
26.	BL 6.4		
27.	BL 8.4		
28.	BL 8.22		
29.	BL 8.21		
30.	BL 6.22		
31.	PG 2.2	Panggeran	

### Produksi mikosin anti *Z. rouxii*

Produksi mikosin dilakukan dengan Broth culture method (Hettiarachchi *et al.*, 2017). Koloni murni dari tujuh isolat khamir diinokulasikan ke dalam 10 ml medium preculture YEPG 20 broth dan diinkubasi pada Shaking Incubator B-One YC-R50 secara rotary suhu 30°C, dengan kecepatan pengocokan 200 rpm. Setelah densitas sel mencapai 0,6 (pada OD600), 2 mL *preculture* diinokulasikan ke dalam medium kultur YEPG 20 Broth 18 mL.

Kultur diinkubasi pada suhu 30°C dengan kecepatan pengocokan 200 rpm selama 72 jam. Kemudian kultur disentrifugasi menggunakan Hettich Benchtop Centrifuges Universal 320/320 R dengan kecepatan 4.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatant disimpan didalam lemari pendingin dengan suhu 4°C untuk digunakan pada penapisan aktivitas ekstrak kasar mikosin dan karakterisasi mikosin

### Penapisan aktivitas ekstrak kasar mikosin anti *Z. rouxii*

Penapisan dilakukan dengan menggunakan Disk Diffusion Assay (Clinical dan Laboratory Standards Institute, 2015). *Paper disk* steril dengan diameter 5,4 mm diletakkan diatas lawn dan ditetesi dengan 7 µl ekstrak kasar mikosin dari masing-masing khamir uji. Digunakan tetesan 7 µl dari 0,3mg/ml nystatin dan akuades steril sebagai kontrol positif dan kontrol negatif. Kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. dilakukan pengukuran terhadap indeks penghambatan dengan diameter zona bening.

### Penentuan berat molekul mikosin anti *Zygosaccharomyces rouxii*

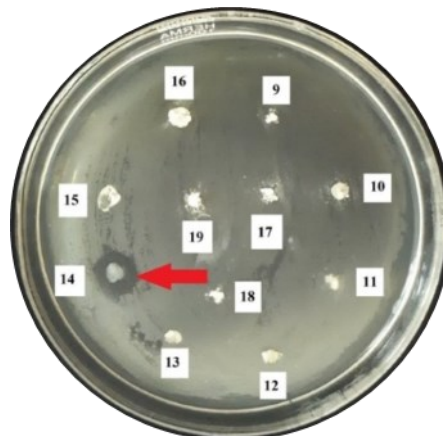
Penentuan berat molekul dilakukan dengan menggunakan SDS PAGE. Pembuatan 12% Separating gel digunakan 4 ml 30% akrilamid-bis, 3,45 ml akuabides, 2,5 ml 4x lower Tris buffer, 50 µl APS 10%, dan 5 µl TEMED. Bahan-bahan tersebut dimasukkan kedalam tabung dan digoyang perlahan. Setelah larutan tercampur, larutan dituang diatas plate dan gel dibiarkan memadat. Pembuatan Stacking gel digunakan 0,67 ml 30% akrilamid-bis, 3,05 ml akuabides, 1,25 ml 4x upper Tris buffer, 5 µl TEMED, dan 25 µl APS 10%. Bahan-bahan tersebut dimasukkan kedalam tabung dan digoyang perlahan. Setelah larutan tercampur, larutan dituang diatas plate dan sisir dipasang diatas

gel. Gel dibiarkan memadat. Setelah memadat, gel dipasangkan ke alat elektroforesis dan dituang running buffer (370 ml akubides, 125 ml 4x reservoir buffer, 5ml 10% SDS), kemudian sisir dilepas secara perlahan. 16 µl mikosin dimasukkan dalam Eppendorf dan ditambah dengan 4 µl loading buffer kemudian dipanaskan dalam water bath 95°C selama lima menit. Kemudian didinginkan pada suhu kamar. Setelah itu, 20 µl sampel mikosin dan 5 µl protein ladder SMOBIO PM5100 dimasukkan ke dalam sumuran dan dilakukan running selama 30 menit pada arus 50 volt dan dilanjut 60 menit pada arus 100 volt. Kemudian dilakukan staining selama 1 jam pada suhu 37°C dalam water bath dan destaining sampai pita protein terlihat jelas. Pita diukur dan dihitung berat molekulnya.

### HASIL

#### Penapisan aktivitas antagonistik isolat khamir osmofilik terhadap *Zygosaccharomyces rouxii*

Penapisan terhadap isolat khamir osmofilik dalam aktivitas antagonistik isolat khamir osmofilik terhadap *Zygosaccharomyces rouxii* dilakukan menggunakan metode *colony picking* (Hettiarachchi *et al.*, 2017). Aktivitas mikosin dapat dideteksi dengan adanya aktivitas antagonistik antara isolat khamir osmofilik dengan *Zygosaccharomyces rouxii*, hal ini dilihat dari zona jernih yang terbentuk disekitar koloni yang merupakan bentuk penghambatan pertumbuhan isolat *Z. Rouxii* (Gambar 1).



**Gambar 1.** Contoh hasil penapisan aktivitas antagonistik terhadap *Z. Rouxii*. Zona jernih yang terbentuk (tanda panah merah) menunjukkan hasil positif. (Example of antagonistic activity screening result against *Z. rouxii*. Visible clear zone (red arrow) indicated positive result).

Berdasarkan uji aktivitas antagonistik yang dilakukan, terdapat 10 isolat yang dapat menghambat *Z. rouxii*. Isolat-isolat tersebut adalah

AP 1, PS 1.1, BL 8.21, LW 1.1, BK 3.2, MR 3.2, AP 3, KS 1, TL 2.2, dan BL 8.22. Hasil pengukuran zona penghambatan ditampilkan pada Tabel 2.

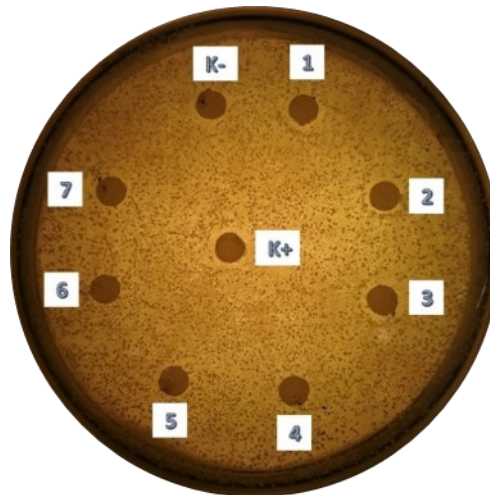
**Tabel 2.** Daftar isolat khamir uji yang memberikan hasil penapisan positif aktivitas antagonistik terhadap strain *Z. rouxii*. (*List of isolates which give positive result at antagonistic activity screening against Z. rouxii*).

No. Nr.	Kode isolat Isolate code	Indeks Penghambatan aktivitas antagonistik Inhibition Indeks of antagonistic activity
1	AP 1	1.46 ± 0.031
2	PS 1.1	1.31 ± 0.200
3	BL 8.21	1.13 ± 0.080
4	LW 1.1	1.48 ± 0.215
5	BK 3.2	1.36 ± 0.252
6	MR 3.2	1.5 ± 0.227
7	AP 3	1.36 ± 0.229
8	KS 1	1.26 ± 0.060
9	TL 2.2	1.27 ± 0.278
10	BL 8.22	1.22 ± 0.098

Berdasarkan Tabel 2, 32,26% isolat khamir osmofilik menghasilkan aktivitas antagonistik. Delapan isolat diisolasi dari madu, sedangkan dua isolat lainnya diisolasi dari nektar bunga. Dua isolat yang diisolasi dari nektar bunga, memiliki aktivitas antagonistik paling rendah yaitu dengan nilai IP 1,13 dan 1,22.

**Aktivitas Ekstrak Kasar Mikosin Anti *Z. rouxii***

Mikosin yang telah diproduksi kemudian dilakukan uji aktivitas menggunakan paper dish. Zona jernih yang terbentuk kemudian diukur. Selain itu juga dilakukan pengukuran berat kering sel. Hasil pengukuran zona jernih ditampilkan dalam (Gambar 2).



**Gambar 2.** Penapisan aktivitas ekstrak kasar mikosin dari isolat AP 3 (1), BK 3.2 (2), LW 1.1 (3), TL 2.2 (4), MR 3.2 (5), PS 1.1 (6), AP 1 (7), akuades steril sebagai kontrol negatif (K-), dan antifungal nystatin (0,3 mg/mL) sebagai kontrol positif (K+). (*Activity screening of crude mycocin of AP 3 (1), BK 3.2 (2), LW 1.1 (3), TL 2.2 (4), MR 3.2 (5), PS 1.1 (6), AP 1 (7) isolate, sterile aquades as negative control (K-), and nystatin (0.3 mg/mL) as positive control (K+)*).

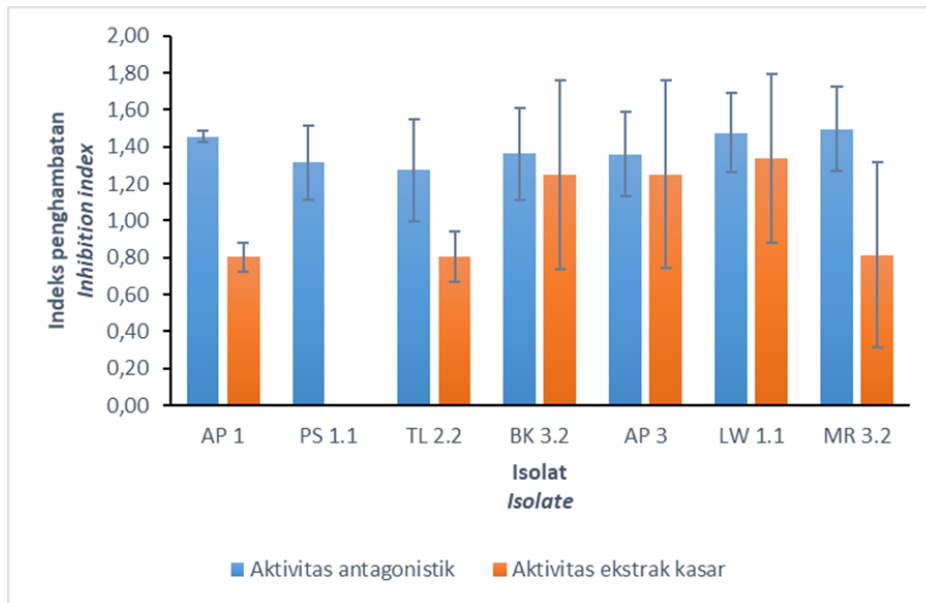
Tujuh isolat dengan nilai IP tertinggi digunakan untuk penapisan aktivitas ekstrak mikosin. Berdasarkan pada (Gambar 2) zona jernih yang terbentuk terlihat jelas pada isolat AP 3, BK 3.2, LW 1.1, TL 2.2, MR 3.2 dan AP 1. dengan diameter terbesar pada isolat LW 1.1. Hasil pengukuran zona jernih ekstrak kasar mikosin kemudian dibandingkan dengan zona jernih aktivitas antagonistik. Hal ini digunakan untuk melihat

efektivitas penghambatan.

Hasil eksperimen menunjukkan bahwa IP tertinggi aktivitas antagonistik ditunjukkan oleh isolat MR 3.2. dengan nilai IP sebesar 1,5 (Gambar 3). Namun pada penapisan aktivitas ekstrak kasar mikosin, IP tertinggi pada isolat LW 1.1 dan AP 3 dengan nilai IP 1,28. Selain itu, penggunaan ekstrak kasar mikosin dari isolat PS 1.1 tidak menghasilkan zona penghambatan.

Berdasarkan Tabel 3, nilai perbandingan antara diameter penghambatan dengan berat kering khamir penghasil mikosin tertinggi tunjukkan oleh isolat LW 1.1 dengan nilai 442,099, kemudian disusul AP

3 dengan nilai 270,588, TL 2.2 dengan nilai 99,911, PS 1.1 dengan nilai 84,243, MR 3.2 dengan nilai 77,903, AP 1 dengan nilai 65,285, dan efektivitas terendah yaitu isolat BK 3.2 dengan nilai 64,003.



**Gambar 3.** Grafik perbandingan indeks penghambatan aktivitas antagonistik dengan indeks penghambatan aktivitas ekstrak kasar mikosin. (*Comparison between inhibition index from antagonistic activity and inhibition index from crude mycosin activity*).

**Tabel 3.** Efektivitas aktivitas mikosin anti-*Z.rouxii*. (*Efectivity of anti-*Z. rouxii* mycosin*).

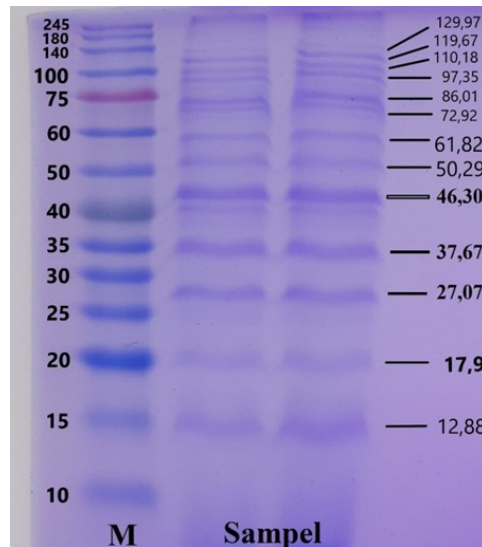
No.	Isolat	Diameter Penghambatan (mm)	Berat kering sel (g)	Rasio diameter penghambatan dan berat kering sel
Nr.	Isolate	Diameter of inhibition (mm)	Cell dry weight (g)	Ratio between inhibition diameter and cell dry weight
1	AP 3	6,9 ± 0,08	0,0255	270,588
2	BK 3.2	6,71 ± 0,04	0,1048	64,003
3	LW 1.1	6,90 ± 0,14	0,0156	442,099
4	TL 2.2	6,35 ± 0,51	0,0636	99,911
5	MR 3.2	6,24 ± 0,51	0,0801	77,903
6	PS 1.1	5,40 ± 0,00	0,0641	84,243
7	AP 1	6,14 ± 0,50	0,0941	65,285

**Karakterisasi Mikosin Anti *Zygosaccharomyces rouxii***

Isolat khamir osmofilik dengan aktivitas tertinggi dikarakterisasi dengan pengukuran berat molekul menggunakan SDS PAGE. Sebanyak 16 µl mikosin yang telah dipresipitasi, dianalisis dengan SDS PAGE dan diperoleh hasil pada Gambar 4.

Berdasarkan Gambar 4, terdapat 13 pita protein dengan berat 12,88 kDa, 17,9 kDa, 27,07 kDa, 37,67 kDa, 46,30 kDa, 50,29 kDa, 61,82 kDa, 72,92 kDa, 86,01 kDa, 97,35 kDa, 110,18 kDa,

119,67 kDa, dan 129,97 kDa. Mikosin dapat tersusun oleh protein maupun glikoprotein yang terdiri dari dua atau tiga subunit. Pada umumnya mikosin memiliki berat molekul 10-20 kDa, namun beberapa mikosin memiliki berat molekul hingga 100 kDa atau lebih (Golubev, 1998). Melihat ketebalan pita protein yang dihasilkan, kami menduga mikosin yang dihasilkan oleh isolat LW 1.1 memiliki berat molekul subunit proteinnya adalah 72,92 kDa, 46,30 kDa, 37,67 kDa, 27,07 kDa, dan 12,88 kDa.



**Gambar 4.** Hasil analisis berat molekul mikosin menggunakan 12% SDS-PAGE. M: protein marker SMOBIO PM5100, Sampel: 16µL sampel mikosin isolat LW 1.1. (The result of molecular weight analysis of mycocin using 12% SDS-PAGE. M: SMOBIO PM5100 protein marker. Sampel: 16 µL LW 1.1 mycocin sample).

**PEMBAHASAN**

Penapisan terhadap isolat penghasil mikosin anti *Zygosaccharomyces rouxii* dilakukan dengan melihat aktivitas antagonistik antara isolat khamir osmofilik dengan *Z. rouxii*. Aktivitas antagonistik dapat terlihat dengan adanya zona jernih yang terbentuk ketika ditumbuhkan bersama dengan metode *colony picking*. Ketika mikroorganisme berada pada lingkungan yang sama, mereka akan mendominasi lingkungan tersebut dan menciptakan kondisi lingkungan yang sulit untuk mikroorganisme lain, yaitu dengan menghasilkan senyawa antimikrobia. Senyawa protein yang memiliki aktivitas fungisidal maupun fungistatik disebut mikosin (Golubev, 2006). Menurut Al-Qaysi *et al.* (2017) adanya aktivitas mikosin dapat ditunjukkan dengan adanya zona penghambatan. Hatoum *et al.* (2012) melaporkan bahwa efek penghambatan dari khamir pada beberapa mikroorganisme dapat disebabkan oleh adanya kompetisi nutrient, perubahan pH pada medium hasil ion exchange maupun adanya produksi asam organik, produksi etanol, dan adanya sekresi mikosin.

Berdasarkan hasil penapisan aktivitas antagonistik, diperoleh 32,26% isolat khamir osmofilik yaitu 10 isolat menunjukkan adanya aktivitas antagonistik. Delapan isolat diisolasi dari madu, sedangkan dua isolat lainnya diisolasi dari nektar bunga. Delapan isolat yang berasal dari madu hutan menghasilkan aktivitas antagonistik yang lebih besar terhadap *Z. rouxii*. Hal ini disebabkan pertumbuhan isolat khamir dari madu hutan lebih banyak membutuhkan gula. Habitat

awal isolat yang berada pada madu mengandung kadar gula lebih tinggi yaitu 60% gula (Gou *et al.*, 2011) dan nektar bunga mengandung 40% gula (Pamminger *et al.*, 2019). Isolat yang berasal dari madu hutan akan lebih mendominasi, sehingga menghasilkan aktivitas antagonistik lebih besar. Sedangkan dua isolat yang diisolasi dari nektar bunga, memiliki aktivitas antagonistik paling rendah yaitu dengan nilai Indeks Penghambatan (IP) 1,13 dan 1,22. Pertumbuhan isolat hanya menghasilkan sedikit aktivitas antagonistik sebagai akibat dari kurangnya kompetisi nutrient berupa gula. Aktivitas antagonistik ini menunjukkan adanya kompetisi nutrient pada medium, seperti dijelaskan oleh (Hatoum *et al.*, 2012) bahwa, adanya zona penghambatan dapat diakibatkan adanya kompetisi nutrient.

Isolat-isolat yang menunjukkan aktivitas antagonistik terhadap *Z. rouxii* diujikan kembali dengan menggunakan metode *Disk Diffusion Assay* untuk mengetahui aktivitas ekstrak kasar mikosinnya. Aktivitas ekstrak kasar mikosin dapat terlihat dengan adanya zona jernih disekitar *paper disk*. Pada pengujian ini diperoleh enam dari tujuh isolat memperlihatkan adanya penghambatan.

Berdasarkan perbandingan nilai indeks antara aktivitas antagonistik dan penghambatan ekstrak kasar mikosin yang ditampilkan pada Gambar 3, diperoleh bahwa penghambatan pada aktivitas antagonistik lebih besar daripada penggunaan ekstrak kasar. Hasil tersebut menunjukkan bahwa penggunaan isolat langsung untuk menghambat pertumbuhan *Z. rouxii* lebih efektif dibanding

dengan penggunaan ekstrak kasar mikosin. Hal ini disebabkan sel khamir terinduksi secara langsung untuk mensekresi mikosin akibat adanya kompetisi terhadap nutrient. Sedangkan produksi ekstrak kasar mikosin tidak ditambahkan isolat target *Z. rouxii*, sehingga isolat khamir osmofilik diasumsikan mensekresi mikosin secara terus-menerus (tidak terinduksi). Namun isolat PS 1.1 tidak menghasilkan mikosin akibat tidak adanya penginduksi berupa *Z. rouxii*. Belda *et al.* (2017) menjelaskan bahwa persentase dari *killer yeast* dalam lebih besar dibanding yang ditemukan di laboratorium, yang mana hal ini mengindikasikan adanya kompetisi. *Z. rouxii* menjadi penginduksi sekresi mikosin dengan berperan sebagai kompetitor terhadap sumber makanan, seperti dijelaskan oleh Chang *et al.* (2015) bahwa mikosin yang disekresikan khamir memberikan manfaat yang penting untuk kompetisi.

Aktivitas mikosin anti *Z. rouxii* ini tergolong cukup rendah yaitu dengan nilai indeks tertinggi 1,5 dan zona hambat maksimal 6,9 mm dengan metode *colony picking* dan nilai indeks tertinggi 1,28 dengan metode *Disk Diffusion Assay*. Aktivitas mikosin dengan ekstrak kasar lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas antagonistik. Hal ini disebabkan oleh penggunaan ekstrak kasar yang masih belum dimurnikan sehingga didalam ekstrak kasar mikosin yang diberikan hanya terkandung mikosin dalam jumlah yang kecil. Didalam penelitian yang dilakukan (Alonso *et al.*, 2014), aktivitas antagonistik antara *Pichia membranifaciens* terhadap *Z. rouxii* dapat menghasilkan hingga 30 mm penghambatan pada medium dengan suplementasi 3% NaCl dan 11–20 mm penghambatan pada medium dengan suplementasi 60% glukosa.

Efektivitas aktivitas mikosin yang diproduksi oleh isolat terpilih ditujukan untuk melihat tingkat aktivitas mikosin per berat kering sel. Semakin tinggi penghambatan yang terjadi dengan berat kering yang semakin kecil menunjukkan aktivitas yang lebih efektif untuk biokontrol. Berdasarkan data perbandingan yang diperoleh, terlihat bahwa jumlah produksi mikosin perberat kering sel lebih banyak pada isolat LW 1.1. Diasumsikan bahwa isolat khamir LW 1.1 dapat menghasilkan mikosin dalam jumlah besar, maupun mikosin yang dihasilkan memiliki aktivitas yang tinggi. Seperti dijelaskan oleh El-Banna *et al.* (2011) bahwa beberapa khamir memproduksi lebih dari satu macam mikosin. Sehingga isolat ini berpotensi untuk produksi mikosin dan dimanfaatkan untuk banyak bidang. *Killer yeast* dan mikosin yang dihasilkan dapat berpotensi untuk dimanfaatkan dalam berbagai bidang seperti industri fermentasi alkohol, fermentasi sayuran, *biological control*,

bio-typing, dan antimikotik dalam bidang medis (Belda *et al.*, 2017).

Aktivitas produksi yang besar dari isolat LW 1.1 yang telah ditunjukkan dalam Tabel 2. dapat diakibatkan adanya beberapa jenis mikosin yang dihasilkan. Namun belum diketahui secara pasti jenis mikosin yang dihasilkan. Mikosin-mikosin tersebut dapat tersusun oleh monomer polipeptida maupun gabungan dari polipeptida. Hasil perhitungan pita berat mikosin tersebut merupakan berat dari monomer polipeptida. Sehingga dimungkinkan berat molekul mikosin dari isolat LW 1.1 merupakan berat dari salah satu pita maupun gabungan dari beberapa pita protein. Beberapa spesies khamir dapat mensekresikan lebih dari satu macam mikosin, diantaranya *Saccharomyces cerevisiae* yang mensekresi tiga macam mikosin, *Pichia anomala*, *Pichia membranifaciens* dan *Williopsis mrakii* masing-masing menghasilkan dua macam mikosin (El-Banna *et al.*, 2011). Mikosin bekerja dengan beberapa mekanisme, seperti merusak membran, aktivitas glukonase, inhibitor dari  $\beta$  1-3-*glucansynthase*, menghentikan siklus sel, menghambat *calcium uptake*, maupun dengan aktivitas tRNase (Belda *et al.*, 2017).

Dalam penelitian Alonso *et al.* (2014) mengenai kontrol kerusakan makanan akibat *Zygosaccharomyces* spp., mikosin PMKT yang disekresikan oleh *Pichia membranifaciens* dapat menghambat pertumbuhan dari *Z. rouxii*. *P. membranifaciens* mensekresi dua macam mikosin dengan berat molekul 30 kDa (El-Banna *et al.*, 2011) dan 18 kDa (Santos dan Marquina, 2004). Sedangkan isolat LW 1.1 menghasilkan beberapa macam mikosin dengan berat yang berbeda. Sehingga dimungkinkan bahwa mikosin hasil sekresi isolat LW 1.1. bukanlah kelompok PMKT.

Isolat LW 1.1 menghasilkan mikosin dengan aktivitas ekstrak kasar yang cukup rendah yaitu dengan nilai IP 1,28. Dimungkinkan ekstrak murni mikosin isolat LW 1.1 dapat dijadikan sumber anti *Z. rouxii*. Mikosin ini dapat dimanfaatkan sebagai biokontrol kontaminasi *Z. rouxii* pada produk makanan dan minuman bergula tinggi, yang mana *Z. rouxii* memiliki toleransi tinggi terhadap asam, alkohol dan bahan preservatif makanan yang umum dipakai.

## KESIMPULAN

Kami menyimpulkan bahwa khamir osmofilik memiliki potensi sebagai penghasil mikosin anti *Zygosaccharomyces rouxii*. Aktivitas ekstrak kasar mikosin tertinggi yaitu ekstrak kasar mikosin dari isolat LW 1.1 dengan nilai Indeks penghambatan 1,28. Aktivitas tersebut masih tergolong rendah apabila dibandingkan dengan aktivitas khamir lain



yang telah dilaporkan. Mikosin yang dihasilkan isolate LW 1.1 memiliki berat molekul monomer berkisar antara 12,88 kDa hingga 72,92 kDa. Penelitian terkait pemurnian dan karakterisasi mikosin, serta identifikasi isolat LW 1.1 dibutuhkan untuk mengetahui secara spesifik jenis dan aktivitas dari mikosin yang dihasilkan.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Endah Retnaningrum dan Dr. Tri Rini Nuringyas dari Fakultas Biologi UGM yang telah memberikan masukkan dalam penelitian ini. Kami juga mengucapkan terima kasih kepada Sumarno, M.Si. dari Fakultas Biologi UGM yang telah memberikan bantuan teknis selama penelitian. Data penelitian ini merupakan bagian dari penelitian tugas akhir untuk jenjang S1 oleh Sovia Nur Janah yang dibimbing oleh Dr. Miftahul Ilmi.

#### KONTRIBUSI PENULIS

S.N.J. melakukan pengambilan dan analisis data, serta menulis manuskrip publikasi. M.I. merencanakan dan mengawasi jalannya penelitian, menganalisis data, serta menulis manuskrip publikasi.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Alonso, A., I. Belda, A., Santos, E., Navascues and D.M. Arquina., 2014. Advances in the control of the spoilage caused by *Zygosaccharomyces* species on sweet wines and concentrated grape musts. *Food Control*, 51, pp.129–134.
- Al-Qaysi, S.A., H., Al-Haidaeri, Z.A., Thabit, W.H., Abd Al-Razzaq Al-Kubaisy and J. Abd Al-Rahman Ibrahim., 2017. Production, characterization, and antimicrobial activity of mycocin produced by *Debaryomyces hansenii* DSMZ70238. *Hindawi International Journal of Microbiology*, 2017, pp. 1–9.
- Belda, I., J., Ruiz, A., Alonso, D., Marquina and A., Santos., 2017. The biology of *Pichia membranifaciens* killer toxins. *Toxins*, 9(4).
- Chang, S.L., J.Y., Leu and T.H., Chang., 2015. A population study of killer viruses reveals different evolutionary histories of two closely related *Saccharomyces sensu stricto* yeast. *Mol. Ecol*, 24, pp. 4312–4322.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)., 2015. *Performance standard for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement*. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne. pp. 146–156.
- El-Banna, A.A., M.A., El-Sahn and M.G., Shehata., 2011. Yeast producing killer toxins: an overview. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 8(2), pp. 41–53.
- Escott, C., J.M., del Freno, I., Loira, A., Morata and J.A., Suarez-Lepe., 2018. *Zygosaccharomyces rouxii*: control strategies and applications in food and winemaking. *Fermentation*, 4(3), pp. 69.
- Fleet. G.H., 2011. *Yeast Spoilage of Food and Beverages*. In: Kurtzman, C.P.J., W. Fell and T. Boekhout (Eds), *The Yeast a Taxonomic Study 5<sup>th</sup> edition vol 1*. Elsevier. London, Burlington, San Diego. pp. 53–56.
- Gohel, V., A., Singh, M., Vimal, P., Ashwini and H.S., Chhatpar., 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *African Journal of Biotechnology*, 5(2), pp. 54–72.
- Golubev, W.I., 1998. *Mycocins (killer toxins)*. In: Kurtzman C.P., Fell J.W., eds. *The Yeasts. A Taxonomic Study 4th edition*. Elsevier, Amsterdam: pp. 55–6
- Golubev, W.I., 2006. *Antagonistic interactions among yeast*. In: Peter, G and R., Carlos, Biodiversity and ecophysiology of yeast, 10.1007/3-540-30985-3. pp. 197.
- Gou, W., Y., Liu, X., Zhu and S., Wang., 2011. Dielectric properties of honey adulterated with sucrose syrup. *Journal of Food Engineering*, 107(1), pp. 1–7.
- Hatoum R., S., Labrie and I., Fliess., 2012. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology*, 3, pp. 421.
- Hettiarachchi, S.A., S., Lee, Y., Lee, Y., Kwon, M., De Zoysa, S., Moon, E., Jo, T., Kim, D., Kang, S., Heo and C., Oh., 2017. A rapid and efficient screening method for antibacterial compound-producing bacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(8), pp. 1441–1448.
- Kuanyshev, N., G.M., Adamo, D., Porro and P., Branduardi., 2017. Yeast Primer: The Spoilage Yeast *Zygosaccharomyces bailii*: Foe or Friend ?. *Yeast* 34:9, pp. 357–396.
- Liu, G.L., Z., Chi, G.Y., Wang, Z.P., Wang, Y., Li and Z.M., Chi., 2015. Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their action and their applications. *Critical Reviews in Biotechnology* 35(2): 222–234.
- Martorell, P., M., Stratford, H., Steels, M., Fernandez-Espinar and A., Querol., 2007. Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environment. *International Journal of Food Microbiology*, 114, pp. 234–242.
- Pamminger, T., R., Bekker, S., Himmelreich, C.W., Scheider and M., Bergtold., 2019. The nectar report: quantitative review of nectar sugar

- concentrations offered by bee visited flowers in agricultural and non-agricultural landscape. *PeerJ* 7, pp. e6329.
- Prihartini, M dan M., Ilmi., 2018. Karakterisasi dan klasifikasi numerik khamir madu hutan dari Sulawesi Tengah. *Jurnal Mikologi Indonesia*, 2(2), pp. 112–127.
- Santos, A and D., Marquina., 2004. Ion channel activity by *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Yeast*, 21(2), pp. 151–162.
- Setiady, C.E.B dan M., Ilmi., 2018. Analisis numerik khamir dari nectar bunga kebun raya baturraden dan pangeran Hargobinangun. *Jurnal Mikologi Indonesia*, 2(2), pp. 91–99.
- Stratford, M., 2006. *Food and Beverage Spoilage Yeast*. In: A., Querol and G.H., Fleet (Eds), *Yeast in Food and Beverages*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 335–380.
- Tokuoka, K., 1993. Sugar and salt-tolerant yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, pp. 101–110.
- Waema, S., J., Maneesri and P., Masniyom., 2009. Isolation and identification of killer yeast from fermented vegetables. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 2, pp. 126–134.