

ARTIKEL

PENGEMBANGAN GALUR *Pichia kudriavzevii* TOLERAN CEKAMAN OSMOTIK GLUKOSA MELALUI EVOLUSI LABORATORIUM ADAPTIF

[*Strain Development of Yeast Pichia kudriavzevii* Mutant Tolerant to Glucose-Induced Osmotic Stress through Adaptive Laboratory Evolution]

Muhammad Raffel Sidiq¹, Rika Indri Astuti^{1,2*}, Anja Meryandini^{1,2}

¹ Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Kampus IPB Dramaga, Institut Pertanian Bogor, Dramaga, Bogor, 16680, Jawa Barat.

² Biotech Center, Lembaga Riset Internasional Teknologi Maju, Institut Pertanian Bogor, Dramaga, Bogor, 16680, Jawa Barat.

ABSTRAK

Bioetanol merupakan salah satu komoditas energi terbarukan terbesar di dunia di samping biodiesel. Efisiensi proses fermentasi etanol dapat dilakukan melalui penggunaan khamir fermentatif yang toleran cekaman fermentasi di antaranya cekaman osmotik yang dapat terjadi akibat penggunaan konsentrasi glukosa tinggi sebagai substrat fermentasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengkonstruksi khamir mutan *Pichia kudriavzevii* galur RWT yang toleran cekaman osmotik glukosa melalui teknik evolusi laboratorium adaptif. Khamir *P. kudriavzevii* toleran cekaman osmotik glukosa 35% berhasil diperoleh dan diberi kode isolat *P. kudriavzevii* RM. Namun, *P. kudriavzevii* RM tumbuh optimum pada kadar glukosa 20% dan tidak memiliki perbedaan morfologi dengan isolat tipe liarnya (RWT). Isolat khamir mutan memiliki fase log yang lebih lama dibandingkan isolat tipe liarnya (RWT) dan khamir etanologenik *Saccharomyces cerevisiae*. Hal ini mengindikasikan potensinya sebagai agen fermentasi bioetanol, karena bioetanol diproduksi pada fase pertumbuhan ini. Melalui pengamatan aktivitas mitokondria diketahui terjadi pergeseran sistem metabolisme dari respirasi aerobik menjadi fermentatif terlihat pada khamir *P. kudriavzevii* mutan ketika ditumbuhkan pada medium dengan kadar glukosa 20%. Penelitian lebih lanjut terkait produktivitas khamir mutan *P. kudriavzevii* mutan osmotoleran dalam memproduksi etanol perlu dilakukan untuk pemanfaatannya sebagai agen fermentasi.

Kata Kunci: bioetanol, evolusi adaptif, *Pichia kudriavzevii*, toleransi osmotik

ABSTRACT

Bioethanol is one of the primary renewable energy commodities in the world, besides biodiesel. Efficiency in the ethanol fermentation process can be achieved by implementing fermentative yeast exhibiting tolerance against fermentation-related stresses. One of the environmental stresses during fermentation is osmotic stress that can result from using a high concentration of glucose as a substrate. Thus, our study aimed to obtain mutant yeast of *Pichia kudriavzevii* RWT possessing tolerance against osmotic stress by evolutionary adaptive mutagenesis. Osmotic stress tolerant-yeast *P. kudriavzevii* has been successfully constructed (*P. kudriavzevii* RM). This isolate could tolerate a high concentration of glucose (35%) while optimally grown in 20% glucose. However, no morphological differences were found between the mutant yeast and its wild-type strain. The particular mutant yeast was found to have a longer period of log phase compared to its wild-type strain and reference strain yeast *Saccharomyces cerevisiae*. This suggests its potential as a fermentation agent since bioethanol was produced during this growth phase. Based on the mitochondrial activity observation, a metabolic switch from aerobic respiration to fermentation occurred as the mutant yeast was grown in a high glucose medium (20%). Further study is needed to determine the ethanol productivity of the mutant yeast to support its potential use in sustainable ethanol fermentation.

Keywords: bioethanol, adaptive evolution, osmotic tolerance, *Pichia kudriavzevii*

PENDAHULUAN

Pertumbuhan penduduk yang diiringi dengan aktivitas antropologi menuntut produksi energi baru dan terbarukan (EBT) yang efektif, berkelanjutan dan ramah lingkungan. Salah satu EBT yang menjanjikan untuk dapat mendukung pemenuhan energi adalah bioetanol (Maryana *et al.*, 2021; Tse *et al.*, 2021). Produksi bioetanol ini berkontribusi pada lebih dari 60% pertumbuhan komoditas bioenergi dunia (Azhar *et al.*, 2017). Produksi bioetanol dilakukan melalui proses biokimia fermentasi yang diperantarai oleh agen hayati, salah satunya khamir (Radecka *et al.*, 2015).

Pada penelitian sebelumnya berhasil diisolasi khamir *Pichia kudriavzevii* galur RWT dari buah semangka (Astuti, Alifianti, *et al.*, 2018; Astuti, Nurhayati, *et al.*, 2018). Isolat ini terbukti mampu menggunakan substrat gula berkarbon enam (heksosa) dan lima (pentosa) (Martha *et al.*, 2020; Rahmadhani *et al.*, 2022). Karakter ini menjadikan isolat RWT berpotensi besar untuk digunakan sebagai agen fermentasi bioetanol. Salah satunya adalah penggunaan isolat RWT untuk produksi bioetanol generasi kedua yang menggunakan substrat hidrolisat lignoselulosa yang mengandung berbagai tipe senyawa gula baik berkarbon enam maupun lima (Watcharawipas *et al.*, 2022).

Salah satu faktor pembatas pada produktivitas bioetanol adalah kondisi cekaman osmotik dalam bioreaktor (Mukherjee *et al.*, 2017). Cekaman osmotik dapat timbul akibat penggunaan substrat konsentrasi tinggi. Sistem fermentasi yang menerapkan kadar gula tinggi merupakan salah satu strategi efisiensi produksi dalam rangka meningkatkan hasil akhir per *batch*. Salah satu sistem fermentasi yang menerapkan kadar gula tinggi sebagai substrat dikenal dengan *very high gravity fermentation* (Tse *et al.*, 2021). Sistem fermentasi dengan kadar substrat tinggi akan mendukung penggunaan limbah industri makanan/minuman dan pertanian yang kaya gula (misalnya molase, whey, air limbah buah) sehingga memberikan nilai tambah dalam sistem yang berkelanjutan. Penelitian sebelumnya melaporkan, peningkatan produktivitas etanol seiring peningkatan pemberian substrat hidrolisat kelapa sawit (15 hingga 25%) pada bioreaktor (Triwahyuni *et al.*, 2015).

Dalam rangka menerapkan fermentasi etanol berkadar substrat gula tinggi, diperlukan khamir toleran cekaman osmotik. Perbaikan performa dari sifat yang diinginkan pada khamir dapat dilakukan melalui rekayasa genetik, pemetaan sifat lokus kuantitatif, hibridisasi dengan penanda, dan evolusi laboratorium adaptif (Watcharawipas *et al.*, 2022). Dalam penelitian ini dilakukan teknik evolusi adaptif untuk memperoleh khamir mutan yang toleran terhadap cekaman osmotik. Teknik evolusi adaptif ini merupakan salah satu metode mutagenesis evolusi terarah melalui mekanisme mutasi spontan di level DNA akibat pengaruh dari lingkungan eksternal maupun internal organisme itu sendiri (Mans *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2022). Teknik ini telah digunakan untuk konstruksi khamir *P. kudriavzevii* mutan yang toleran terhadap cekaman suhu dan etanol (Astuti, Alifianti, *et al.*, 2018; Rahmadhani *et al.*, 2022). Penerapan teknik ini juga telah terbukti dapat meningkatkan toleransi

khamir *S. cerevisiae* terhadap kadar bioetanol selama proses fermentasi berlangsung (Mavrommati *et al.*, 2023).

Proses evolusi laboratorium adaptif pada *P. kudriavzevii* galur RWT diterapkan untuk meningkatkan kemampuan khamir ini dalam menghadapi cekaman osmotik seiring peningkatan konsentrasi substrat gula. Pengembangan galur khamir mutan *P. kudriavzevii* RWT belum pernah dilakukan sehingga teknik mutagenesis ini diharapkan dapat menghasilkan khamir toleran cekaman osmotik yang potensial digunakan dalam produksi bioetanol berkelanjutan.

BAHAN DAN METODE

Kultivasi Isolat Khamir

Isolat khamir yang digunakan adalah isolat *P. kudriavzevii* galur RWT (tipe liar) dan *Saccharomyces cerevisiae* galur BY4741 (Astuti, Nurhayati, *et al.*, 2018). Kedua isolat ditumbuhkan pada media *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) umum dengan komposisi D-glukosa 2% (m/v), ekstrak khamir 1% (m/v), pepton 2% (m/v). Media YPD dimodifikasi konsentrasi D-glukosanya pada beberapa konsentrasi dari 5% hingga 35% (m/v).

Prekultur, Peremajaan, dan Penyimpanan Kultur

Tahapan prekultur dilakukan dengan membuka ampul *freeze dried* isolat *P. kudriavzevii* RWT dan menginokulasikannya pada medium YPD cair (b/v). Kultur isolat kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam dengan agitasi 100 rpm. Peremajaan isolat dilakukan dengan menumbuhkan isolat-isolat tersebut pada 5-10 mL media YPD cair lalu disimpan pada kulkas dengan suhu 4 °C. Selain pada media YPD cair 2% glukosa, penyimpanan kultur dilakukan dalam bentuk agar miring (peremajaan setiap 30 hari) dan media semi padat (peremajaan setiap 30 sampai 60 hari). Isolat *P. kudriavzevii* RWT dan *S. cerevisiae* BY4741 dikulturkan pada YPD cair 2% glukosa.

Evolusi Laboratorium Adaptif

Teknik evolusi laboratorium adaptif dilakukan mengacu pada penelitian sebelumnya dengan modifikasi (Astuti, Alifianti, *et al.*, 2018). Modifikasi dilakukan pada variabel konsentrasi glukosa (b/v). Isolat *P. kudriavzevii* RWT dikulturkan di 50 mL media cair YPD, selama 24 jam pada suhu 28°C. Sebanyak 10 µL kemudian dipindahkan pada media YPD cair untuk kemudian disebar pada media padat YPD. Koloni yang berukuran besar kemudian diambil dan dipindahkan ke medium YPD cair (glukosa 5%) selama 24 jam, pada suhu 28 °C. Kultur kemudian disebar pada medium YPD padat dengan konsentrasi glukosa 5%. Tahapan ini kemudian dilanjutkan dengan secara bertahap meningkatkan konsentrasi glukosa pada medium YPD hingga konsentrasi tertinggi dimana koloni khamir tidak dapat tumbuh. Koloni yang menunjukkan kemampuan mampu tumbuh pada konsentrasi glukosa lebih tinggi dari tipe liarnya, dijadikan kandidat khamir *P. kudriavzevii* mutan osmotoleran (*P. kudriavzevii* RM). Karakter morfologi sel khamir dilakukan melalui pengamatan menggunakan mikroskop cahaya.

Analisis Kurva Pertumbuhan

Kurva pertumbuhan khamir dianalisis secara spektrofotometri. Isolat *P. kudriavzevii* RWT, *P. kudriavzevii* RM dan *S. cerevisiae* BY4741 ditumbuhkan pada medium YPD cair dan diinkubasi selama 32 jam. Setiap 2 jam, kekeruhan kultur diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Pengukuran dilakukan dalam dua kali ulangan. Nilai OD terkoreksi dihitung dari selisih antara OD terukur dan OD medium cair tanpa kultur.

Uji Aktivitas Mitokondria

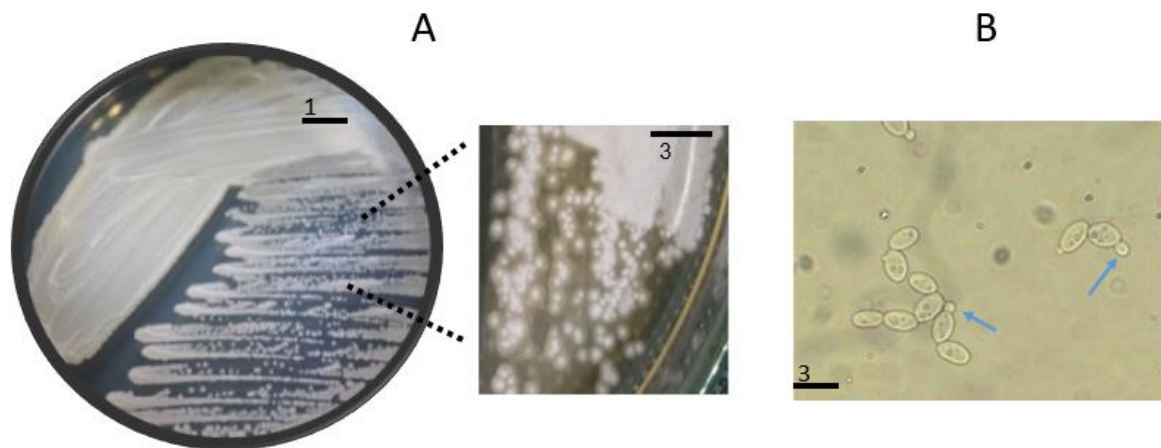
Uji aktivitas mitokondria dilakukan melalui pengamatan fluoresensi (Yusuf *et al.*, 2021). Khamir dikulturkan pada medium YPD dengan berbagai konsentrasi glukosa 0.5%, 2%, dan 20% selama 24 jam. Pelet sel dipanen dari kultur khamir melalui sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 3 menit. Pelet sel kemudian dilarutkan menggunakan 1 ml larutan penyangga fosfat (pH 7) untuk kemudian direaksikan dengan 100nM rhodamine B dan diinkubasi selama 25 menit pada

kondisi gelap. Sebanyak 10 μL sampel dipreparasi untuk diamati menggunakan mikroskop fluoresens pada *filter* G (λ_{emisi} 627 nm, $\lambda_{\text{eksitasi}}$ 555 nm) perbesaran 1000 $\times$. Pendaran merah pada sel khamir menandakan aktivitas membran potensial mitokondria.

HASIL

Karakter Morfologi Khamir

Khamir *P. kudriavzevii* RWT berhasil diremajakan pada medium *Yeast Peptone Dextrose* (YPD). Permukaan koloni RWT tampak berwarna putih krem (Gambar 1A). Isolat RWT merupakan kelompok khamir bertunas (*budding yeast*) (Gambar 1B).



Gambar 1. (A) Morfologi koloni dan (B) sel khamir *Pichia kudriavzevii* RWT yang ditumbuhkan pada medium YPD dengan konsentrasi glukosa 2%. Pengamatan sel khamir dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000 $\times$. Sel anak berupa tunas ditunjukkan oleh panah. ((A) Colony and (B) cells morphology of the yeast *Pichia kudriavzevii* RWT grown on YPD medium with 2% glucose concentration. Yeast cell observation was carried out using a light microscope at 1000 $\times$ magnification. Budding daughter cells are indicated by arrows)

Evolusi Laboratorium Adaptif

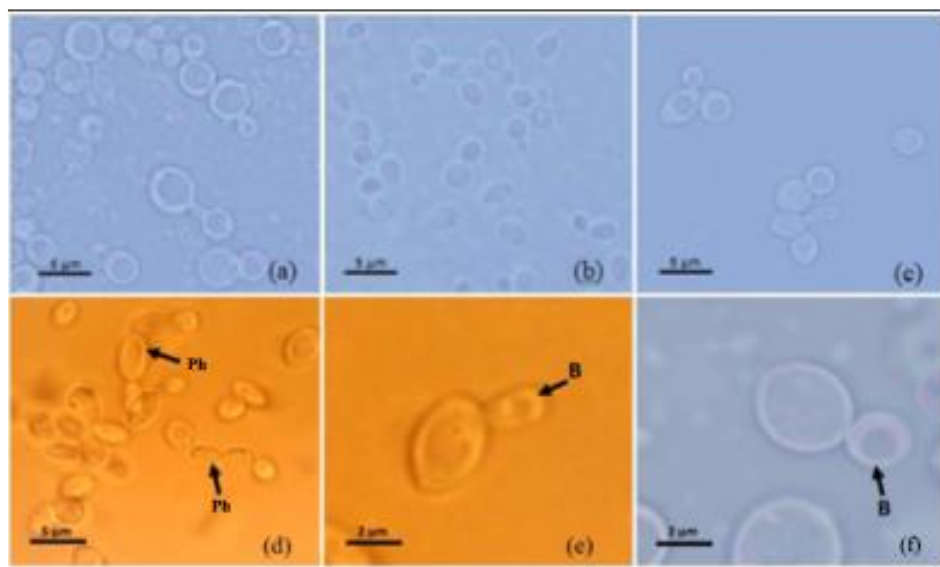
Melalui teknik evolusi laboratorium adaptif, koloni khamir *P. kudriavzevii* toleran cekaman osmotik berhasil diperoleh. Isolat khamir *P. kudriavzevii* mutan (*P. kudriavzevii* RM) mampu toleran terhadap cekaman osmotik oleh glukosa dengan konsentrasi 35% (b/v) (Tabel 1). Khamir *P. kudriavzevii* RWT terbukti tidak toleran terhadap cekaman osmotik glukosa 35% yang ditunjukkan oleh tidak adanya koloni yang tumbuh apabila khamir ini secara langsung ditumbuhkan pada konsentrasi glukosa 35% (Tabel 1).

Tabel 1. Pertumbuhan isolat *Pichia kudriavzevii* dalam tahapan evolusi laboratorium adaptif dan inokulasi langsung (*Growth of Pichia kudriavzevii during adaptive laboratory evolution and direct inoculation stages*).

Konsentrasi D-glukosa (m/v) pada media YPD (<i>D-glucose concentration (m/v) in YPD medium</i>)	Evolusi laboratorium adaptif (<i>Adaptive laboratory evolution</i>)		Inokulasi langsung (<i>direct inoculation</i>)	
	Konsentrasi sel khamir (CFU/mL) (<i>Yeast concentration (CFU/mL)</i>)			
	I	II	I	II
2 % (20g/L)	5,6 x 10 ⁵	4,5 x 10 ⁵	5,9 x 10 ⁵	4,5 x 10 ⁵
5% (50g/L)	6,3 x 10 ⁵	5,9 x 10 ⁵	t.d	t.d
10% (100g/L)	4,0 x 10 ⁵	3,7 x 10 ⁵	t.d	t.d
15% (150g/L)	2,8 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁵	t.d	t.d
20% (200g/L)	1,3 x 10 ⁵	9,0 x 10 ⁵	t.d	t.d
25% (250g/L)	8,0 x 10 ⁵	6,0 x 10 ⁵	t.d	t.d
30% (300g/L)	7,0 x 10 ⁵	3,0 x 10 ⁵	t.d	t.d
35% (350g/L)	7,0 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁵	0	0

Ket.: I= Ulangan-1 (*first trial*), II= Ulangan-2 (*second trial*); t.d = tidak dilakukan (*not determined*).

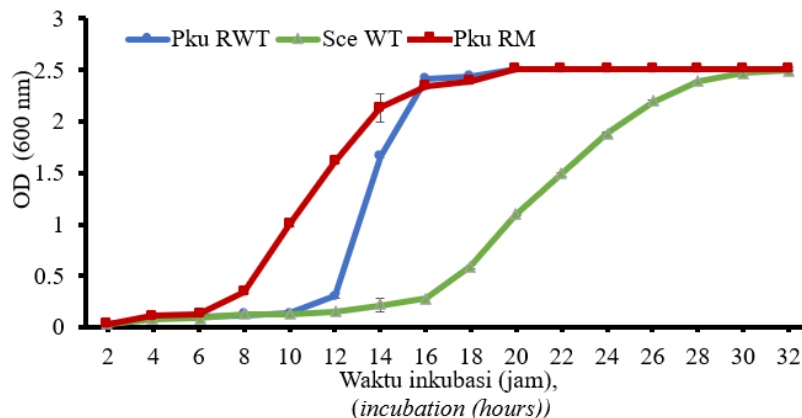
Morfologi sel khamir mutan *P. kudriavzevii* RM menunjukkan ukuran diameter sel antara 3,0 sampai 4,0 μm , memiliki bentuk sel ovoid, dan morfologi aseksual berupa tunas unipolar. Karakter tersebut tidak berbeda dengan karakter isolat *P. kudriavzevii* RWT dan *S. cerevisiae* BY4741 (Gambar 2A-C). Namun, isolat khamir *P. kudriavzevii* RWT dan RM ini memiliki pertunasan berbeda dengan khamir *S. cerevisiae*. Isolat khamir *P. kudriavzevii* RWT memiliki tipe pertunasan multipolar sedangkan *S. cerevisiae* unipolar (Gambar 2C-F).



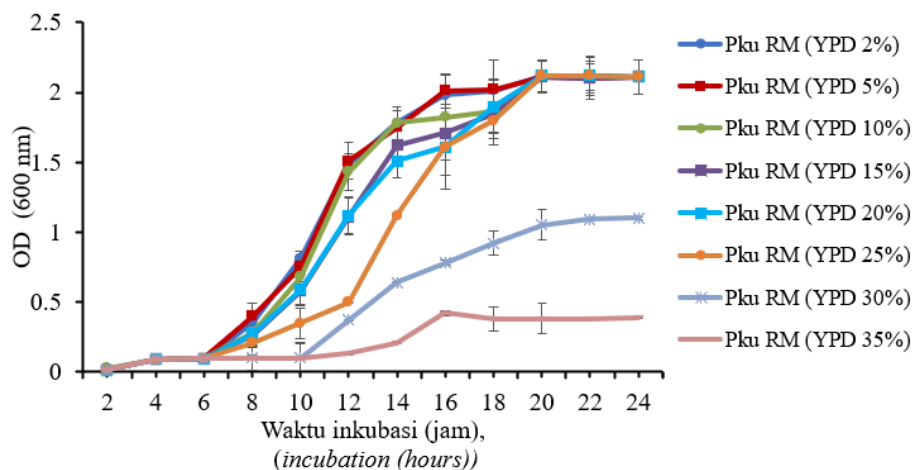
Gambar 2. Morfologi seluler isolat khamir: (a) *Pichia kudriavzevii* RWT, (b) *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, (c) *P. kudriavzevii* RM, (d) Struktur pseudohifa *P. kudriavzevii* RM; (e) dan (f) Pertunasan (*budding*) *P. kudriavzevii* RM. Ket.: NIE= *Negative Image Effect* (a, b, c, f); CI= *Color Image* (d, e); B= *Bud/Tunas*; Ph= *Pseudohifa*. (*Cellular morphology of yeast strain : (a) Pichia kudriavzevii RWT, (b) Saccharomyces cerevisiae BY4741, (c) P. kudriavzevii RM, (d) Pseudohyphae of P. kudriavzevii RM; (e) dan (f) budding of P. kudriavzevii RM. Note: NIE= Negative Image Effect (a, b, c, f); CI= Color Image (d, e); B= Bud; Ph= Pseudohyphae*)

Analisis Kurva Pertumbuhan

Isolat *P. kudriavzevii* RWT, *P. kudriavzevii* RM dan *S. cerevisiae* BY4741 ditumbuhkan pada medium YPD cair dan diinkubasi selama 32 jam. Periode fase lag isolat *P. kudriavzevii* lebih singkat dibandingkan dengan isolat *S. cerevisiae* (Gambar 3). Fase *log* isolat khamir mutan yang ditumbuhkan pada medium YPD dengan konsentrasi glukosa 2-20% teramati pada rentang waktu inkubasi jam ke-8 hingga ke-20. Isolat *P. kudriavzevii* RM pada konsentrasi 25% menunjukkan fase *log* pada jam ke-12 dan berlangsung selama kurang lebih 8 jam. Adapun isolat *P. kudriavzevii* RM pada konsentrasi 30% dan 35% tidak menunjukkan fase *log* yang jelas sebab tidak teramati peningkatan pertumbuhan yang tinggi jika dibandingkan dengan data pengamatan densitas optik di sepanjang kurva pertumbuhan (Gambar 4).



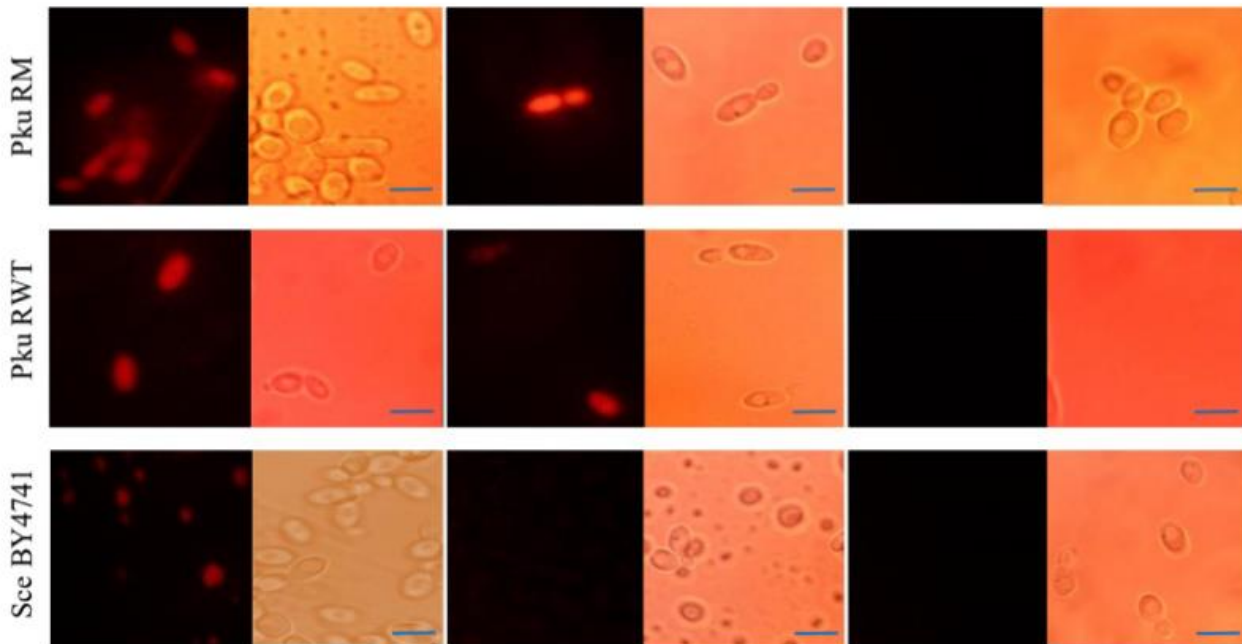
Gambar 3. Kurva pertumbuhan isolat *Pichia kudriavzevii* mutan osmotoleran (*Pku* RM) dibandingkan dengan isolat *P. kudriavzevii* tipe liarnya (*Pku* RWT) dan *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (*Sce* WT) pada medium YPD dengan konsentrasi glukosa 2%. Pertumbuhan khamir diukur berbasis nilai *optical density* (OD) pada panjang gelombang 600 nm (*Growth curve of Pichia kudriavzevii* mutan osmotoleran (*Pku* RM) compared to that *P. kudriavzevii* wild type strain (*Pku* RWT) and *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (*Sce* WT) in YPD medium with 2% glucose. The growth of yeast was measured based on optical density of the culture at wavelength 600 nm).



Gambar 4. Kurva pertumbuhan isolat *Pichia kudriavzevii* mutan osmotoleran (*Pku* RM) pada medium YPD dengan berbagai konsentrasi glukosa (2 hingga 35%). Pertumbuhan khamir diukur berbasis nilai *optical density* ((OD) pada panjang gelombang 600 nm (*Growth curve of Pichia kudriavzevii* mutan osmotolerant (*Pku* RM) at various concentration of glucose (2 to 35%). The growth of yeast was measured based on optical density of the culture at wavelength 600 nm).

Aktivitas Mitokondria Isolat Khamir Mutan Osmotoleran

Fenotipe toleransi cekaman hiperosmotik erat kaitannya dengan aktivitas organel mitokondria yang merupakan tempat berlangsungnya fosforilasi oksidatif dan pengaturan respon seluler terhadap cekaman. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa aktivitas mitokondria isolat *P. kudriavzevii* tipe liar (RWT) dan mutan (RM) cenderung tidak berbeda ketika ditumbuhkan pada medium dengan kadar glukosa tinggi (20%). Sebaliknya, pada konsentrasi glukosa rendah (0,5%), pendaran fluoresensi terlihat lebih kuat dibandingkan pada medium dengan kandungan glukosa normal (2%) dan tinggi (20%) (Gambar 5).



Gambar 5. Aktivitas mitokondria isolat khamir *Pichia kudriavzevii* mutan osmotoleran (*Pku RM*) dibandingkan dengan isolat *P. kudriavzevii* tiper liarnya (*Pku RWT*) dan *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (*Sce WT*) yang ditumbuhkan pada medium YPD dengan konsentrasi glukosa 0,5, 2 dan 20%. Aktivitas mitokondria diamati menggunakan mikroskop fluoresens setelah diberi pewarna rhodamine B (RhoB). (*Mitochondrial activity of the osmotolerant mutant yeast isolate Pichia kudriavzevii (Pku RM) compared to the wild-type isolate P. kudriavzevii (Pku RWT) and Saccharomyces cerevisiae BY4741 (Sce WT), grown on YPD medium with glucose concentrations of 0.5%, 2%, and 20%. Mitochondrial activity was observed using a fluorescence microscope after staining with rhodamine B (RhoB).*)

PEMBAHASAN

Khamir *P. kudriavzevii* RWT memiliki bentuk koloni yang bulat, berwarna putih krem. Penelitian sebelumnya juga melaporkan koloni *P. kudriavzevii* 1P4 dan GBT37, yang masing-masing berhasil diisolasi dari fermentasi kakao dan dadih, memiliki karakter koloni yang sama (Chihombori *et al.*, 2025; Wulan *et al.*, 2021). Khamir *P. kudriavzevii* merupakan kelompok khamir non-konvensional yang dijumpai di berbagai habitat. Spesies khamir ini umum ditemukan pada fermentasi spontan makanan atau minuman tradisional (Chu *et al.*, 2023), yang diduga terlibat dalam pembentukan rasa dan aroma produk fermentasi, termasuk sebagai probiotik (Astuti *et al.*, 2023).

Teknik evolusi laboratorium adaptif terhadap isolat *P. kudriavzevii* RWT, bertujuan mendapatkan isolat mutan yang memiliki karakter toleransi terhadap variabel cekaman yang lebih baik dibanding tipe liarnya. Pertumbuhan khamir pada serial mutagenesis memiliki kecenderungan untuk turun seiring dengan naiknya konsentrasi glukosa pada media YPD. Pertumbuhan tertinggi teramati pada tingkat konsentrasi 5%, yakni sebanyak 6.3×10^5 CFU/mL (Tabel 1). Hal ini menandakan preferensi kondisi tumbuh isolat yang diujikan. Konstruksi mutan (*Pku RM*) ini menjadi salah satu contoh bahwa sifat resistensi terhadap cekaman dapat ditingkatkan tanpa proses insersi gen asing ke dalam sel khamir. Teknik mutagenesis serupa juga telah dilakukan pada khamir *P. kudriavzevii* untuk meningkatkan kemampuannya dalam menghadapi cekaman suhu (45 °C).

Mekanisme toleransi khamir termotoleran tersebut diduga terjadi melalui akumulasi senyawa protektan L-prolin di dalam sel (Astuti, Alifianti, *et al.*, 2018) yang kemudian meningkatkan kemampuan khamir tersebut dalam menghasilkan bioetanol (Khotimah *et al.*, 2023; Martha *et al.*, 2020).

Periode fase log Isolat khamir mutan lebih lama dibandingkan isolat tipe liarnya (RWT) dan khamir etanologenik *S. cerevisiae*. Hal ini mengindikasikan potensinya sebagai agen fermentasi bioetanol, karena bioetanol diproduksi pada fase pertumbuhan ini. Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya terkait profil metabolik *Pichia (Scheffersomyces) stipitis* yang tergolong kelompok *Crabtree-negative* dengan *S. cerevisiae* yang merupakan kelompok *Crabtree-positive*, dimana pada *P. stipitis* produksi etanol terjadi terutama selama fase pertumbuhan logaritmik dalam kondisi aerobik, sementara pada fase stasioner, produksi etanol menurun (Papini *et al.*, 2012).

Isolat *P. kudriavzevii* RM yang mampu tumbuh pada tingkat cekaman glukosa 35% (b/v) memiliki potensi untuk diaplikasikan pada sistem produksi bioetanol generasi kedua. Hal ini disebabkan oleh kombinasi sifat osmotoleran isolat dan kemampuan isolat khamir ini untuk mengolah substrat pentosa yang terkandung dalam bahan lignoselulosa (Rahmadhani *et al.*, 2022). Peningkatan sifat toleransi terhadap D-glukosa ini menjadi penting sebab molekul ini berperan sebagai sumber karbon utama khamir *P. kudriavzevii* dan mayoritas khamir lainnya. Glukosa menjadi salah satu substrat utama dalam reaksi fermentasi bioetanol yang diketahui efektif secara metabolisme namun mempunyai kelemahan yakni kurang efisien dalam aspek ekonomi industri (Azhar *et al.*, 2017).

Mekanisme toleransi khamir terhadap tekanan osmotik diatur oleh lintasan *High Osmolarity Glycerol* (HOG) yang merupakan lintasan pensinyalan berbasis fosforilasi sekuensial oleh protein kinase. Lintasan HOG bersifat conserved pada khamir seperti dilaporkan pada *Candida albicans*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, dan *Pichia pastoris* (Cheetham *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2021). Mutasi pada gen *bul1*, salah satu komponen dalam lintasan HOG, yang menyandikan ubiquitin ligase pada *S. cerevisiae* dilaporkan mampu meningkatkan kemampuan khamir ini dalam menghadapi cekaman osmotik (Gonzalez *et al.*, 2016). Selain itu, penelitian sebelumnya juga melaporkan mutasi titik (F427L) pada gen *stl1* yang menyandikan protein transporter gula meningkatkan kemampuan khamir dalam menghadapi cekaman osmotik akibat kadar gula dan garam yang meningkat (Liu *et al.*, 2025). Mutasi delesi pada gen *TIS11* (berperan dalam katabolisme mRNA) dan overekspresi gen *SDS23* (berperan dalam pembelahan sel) pada *S. cerevisiae* juga mampu meningkatkan kemampuan khamir ini dalam menghadapi cekaman osmotik (30% glukosa) (Kim & Kim, 2018). Penelitian kami sebelumnya juga melaporkan mutasi acak melalui paparan mutagen pada khamir *P. kudriavzevii* mampu meningkatkan kemampuannya dalam mengakumulasi osmolit prolin yang penting dalam menghadapi cekaman fermentasi (Astuti, Alifianti, *et al.*, 2018).

Kondisi glukosa rendah (0,5%) telah dilaporkan menjadi salah satu kondisi cekaman yang dapat menginduksi aktivitas mitokondria (Pan *et al.*, 2011). Jika dibandingkan dengan isolat khamir pembanding *S. cerevisiae*, aktivitas mitokondria isolat khamir *P. kudriavzevii* mutan dan tipe liar lebih kuat pada kultur medium dengan kandungan glukosa 2%. Data pengamatan menunjukkan potensi terjadinya pergeseran mekanisme metabolisme seluler yang terjadi pada khamir pada lingkungan dengan kadar glukosa dari 0,5, 2, hingga 20% (Gambar 5). Kondisi ini memiliki asosiasi dengan proses deaktivasi potensial elektrik membran dalam mitokondria. Penurunan jumlah sel yang berpondar menunjukkan adanya deaktivasi mitokondria. Hal ini dapat diakibatkan oleh meningkatnya suplai D-glukosa sehingga membuat isolat khamir melakukan pergeseran metabolisme dari respirasi aerob menjadi fermentasi yang mana tidak berlangsung di organel mitokondria (Olivares-Marin *et al.*, 2018). Hal ini konsisten dengan penelitian-penelitian sebelumnya, yakni penurunan aktivitas mitokondria khamir ditandai oleh meningkatnya aktivitas fermentasi dibandingkan terhadap respirasi aerob. Kebanyakan khamir memiliki preferensi penggunaan glukosa ketika terdapat alternatif sumber karbon lain yang mana hal ini akan menurunkan aktivitas respirasi aerob sel khamir (Ji *et al.*, 2016).

KESIMPULAN

Khamir *P. kudriavzevii* mutan osmotoleran berhasil diperoleh melalui teknik evolusi laboratorium adaptif. Isolat mutan memiliki tingkat resistensi cekaman osmotik gula yang lebih baik 75% dibanding tipe liarnya dan mampu toleran pada cekaman osmotik glukosa 35% (b/v) glukosa. Morfologi sel isolat khamir mutan tidak berbeda dengan isolat tipe liarnya. Pertumbuhan *P. kudriavzevii* RM berlangsung optimum pada kondisi cekaman glukosa 20% dan semakin menurun seiring peningkatan glukosa hingga 35%. Sistem metabolisme melalui respirasi aerobik menjadi fermentatif terjadi ketika khamir *P. kudriavzevii* ditumbuhkan pada kadar glukosa 20%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Tim peneliti mengucapkan terimakasih kepada Laboratorium Terpadu IPB untuk analisis seluler dengan menggunakan mikroskop fluoresensi. Penelitian ini didanai mandiri oleh RIA.

KONTRIBUSI PENULIS

MRS: mengumpulkan data penelitian, membuat draf artikel, merevisi naskah akhir; RIA: Membuat konsep penelitian, membuat draf artikel, merevisi naskah akhir; AM: Membuat konsep penelitian, merevisi naskah akhir.

REFERENSI

- Astuti, R. I., Alifianti, S., Maisyitoh, R. N., Mubarik, N. R., & Meryandini, A. 2018. Ethanol Production by Novel Proline Accumulating *Pichia kudriavzevii* Mutants Strains Tolerant to High Temperature and Ethanol Stresses. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 18(3), pp. 349–357. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2018.349.357>
- Astuti, R. I., Nurhayati, N., Ukit, Alifiyanti, S., Sunarti, T. C., & Meryandini, A. 2018. Exogenous L-proline Increases Stress Tolerance of Yeast *Pichia kudriavzevii* Against Inhibitors in Lignocellulose Hydrolysates and Enhances its Ethanol Production. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 197(2018), pp. 1–8. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/197/1/012052>
- Astuti, R. I., Prastya, M. E., Wulan, R., Anam, K., & Meryandini, A. 2023. Current trends and future perspective of probiotic yeasts research in Indonesia. *FEMS Yeast Research*, 23, pp. 1–13. <https://doi.org/10.1093/FEMSYR/FOAD013>
- Azhar, M. S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., & Rodrigues, K. F. 2017. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, pp. 52–61. <https://doi.org/10.1016/J.BBREP.2017.03.003>
- Cheetham, J., MacCallum, D. M., Doris, K. S., Da Silva Dantas, A., Scorfield, S., Odds, F., Smith, D. A., & Quinn, J. 2011. MAPKKK-independent Regulation of the Hog1 Stress-activated Protein Kinase in *Candida albicans*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(49), pp. 42002–42016. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.265231>
- Chihombori, T. C., Mustopa, A. Z., Astuti, R. I., Mutiara, I., Refli, R., Umami, R. N., Fatimah, Irawan, H., Ekawati, N., Trinugroho, J. P., Akmaliyah, R., Chairunnisa, S., Amani, F. N., Manguntungi, B., Hertati, A., & Mamangkey, J. 2025. Potential Probiotic Yeasts of the *Pichia* Genus Isolated from ‘Dadih’, a Traditional Fermented Food of West Sumatra, Indonesia. *HAYATI Journal of Biosciences*, 32(2), pp. 320–340. <https://doi.org/10.4308/HJB.32.2.320-340>
- Chu, Y., Li, M., Jin, J., Dong, X., Xu, K., Jin, L., Qiao, Y., & Ji, H. 2023. Advances in the Application of the Non-Conventional Yeast *Pichia kudriavzevii* in Food and Biotechnology Industries. *Journal of Fungi*, 9(2), pp. 170. <https://doi.org/10.3390/JOF9020170>
- Gonzalez, R., Morales, P., Tronchoni, J., Cordero-Bueso, G., Vaudano, E., Quirós, M., Novo, M., Torres-Pérez, R., & Valero, E. 2016. New Genes Involved in Osmotic Stress Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP), pp. 1545. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01545>

- Ji, M., Miao, Y., Chen, J. Y., You, Y., Liu, F., & Xu, L. 2016. Growth characteristics of freeze-tolerant baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* AFY in aerobic batch culture. *SpringerPlus*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2151-3>
- Khotimah, H., Astuti, R. I., Rafi, M., & Yuliana, N. D. 2023. Metabolomics Study Reveals Biomarker L-Proline as Potential Stress-Protectant Compound for High-Temperature Bioethanol Fermentation by Yeast *Pichia kudriavzevii* 1P4. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(8). <https://doi.org/10.1007/S12010-023-04554-2>
- Kim, B., & Kim, H. S. 2018. Identification of novel genes to assign enhanced tolerance to osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 365(14). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny149>
- Liu, Z., Shangguan, L., Xu, L., Zhang, H., Wang, W., Yang, Q., Zhang, X., Yao, L., Yang, S., Chen, X., & Dai, J. 2025. Enhanced multistress tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* with the sugar transporter-like protein Stl1F427L mutation in the presence of glycerol. *Microbiology Spectrum*, 13(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00089-24>
- Mans, R., Daran, J. M. G., & Pronk, J. T. 2018. Under pressure: evolutionary engineering of yeast strains for improved performance in fuels and chemicals production. *Current Opinion in Biotechnology*, 50, pp. 47–56.
- Martha, M. I., Astuti, R. I., & Wahyuni, W. T. 2020. Enhanced Ethanol Production by High Temperature-Tolerance Mutant *Pichia kudriavzevii* T-T2 in various Carbon and Nitrogen Sources. *Microbiology Indonesia*, 14(2), pp. 3. <https://doi.org/10.5454/mi.14.2.3>
- Maryana, R., Muryanto, Triwahyuni, E., Beuna Bardant, T., Irawan, Y., & Sudiyani, Y. 2021. Potency and challenges in the commercialization of bioethanol first and second generation in Indonesia. *Procee*, 2021, pp. 79–84. <http://publikasikr.lipi.go.id/index.php/satreps>
- Mavrommati, M., Papanikolaou, S., & Aggelis, G. 2023. Improving ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* through adaptive laboratory evolution using high ethanol concentrations as a selective pressure. *Process Biochemistry*, 124, pp. 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.11.027>
- Mukherjee, V., Radecka, D., Aerts, G., Verstrepen, K. J., Lievens, B., & Thevelein, J. M. 2017. Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/S13068-017-0899-5>
- Olivares-Marin, I. K., Gonzalez-Hernandez, J. C., Regalado-Gonzalez, C., & Madrigal-Perez, L. A. 2018. *Saccharomyces cerevisiae* exponential growth kinetics in batch culture to analyze respiratory and fermentative metabolism. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(139). <https://doi.org/10.3791/58192>
- Pan, Y., Schroeder, E. A., Ocampo, A., Barrientos, A., & Shadel, G. S. 2011. Regulation of yeast chronological life span by TORC1 via adaptive mitochondrial ROS signaling. *Cell Metabolism*, 13(6), pp. 668–678. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.018>
- Papini, M., Nookaew, I., Uhlén, M., & Nielsen, J. 2012. *Scheffersomyces stipitis*: a comparative systems biology study with the Crabtree positive yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 11, pp. 136. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-136>
- Radecka, D., Mukherjee, V., Mateo, R. Q., Stojiljkovic, M., Foulquié-Moreno, M. R., & Thevelein, J. M. 2015. Looking beyond *Saccharomyces*: The potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Research*, 15(6). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov053>
- Rahmadhani, N., Astuti, R. I., & Meryandini, A. 2022. Ethanol Productivity of Ethanol-Tolerant Mutant Strain *Pichia kudriavzevii* R-T3 in Monoculture and Co-culture Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *HAYATI Journal of Biosciences*, 29(4), pp. 435–444. <https://doi.org/10.4308/HJB.29.4.435-444>
- Sun, Y., Kong, M., Li, X., Li, Q., Xue, Q., Hou, J., Jia, Z., Lei, Z., Xiao, W., Shi, S., & Cao, L. 2022. Metabolic and Evolutionary Engineering of Diploid Yeast for the Production of First- and Second-Generation Ethanol. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, pp. 835928.

- Triwahyuni, E., Muryanto, Sudiyani, Y., & Abimanyu, H. 2015. The effect of substrate loading on simultaneous saccharification and fermentation process for bioethanol production from oil palm empty fruit bunches. *Energy Procedia*, 68, pp. 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2015.03.242>
- Tse, T. J., Wiens, D. J., & Reaney, M. J. T. 2021. Production of Bioethanol—A Review of Factors Affecting Ethanol Yield. *Fermentation*, 7(4), pp. 268.
- Wang, R., Zhao, T., Zhuo, J., Zhan, C., Zhang, F., Linhardt, R. J., Bai, Z., & Yang, Y. 2021. MAPK/HOG signaling pathway induced stress-responsive damage repair is a mechanism for *Pichia pastoris* to survive from hyperosmotic stress. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 96(2), pp. 412–422.
- Watcharawipas, A., Mat Nanyan, N. S. B., & Astuti, R. I. 2022. Waste to Wealth: The Importance of Yeasts in Sustainable Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass. *Waste Management, Processing and Valorisation*, pp. 265–283. https://doi.org/10.1007/978-981-16-7653-6_14
- Wulan, R., Astuti, R. I., Rukayadi, Y., & Meryandini, A. 2021. Evaluation of indigenous *Pichia kudriavzevii* from cocoa fermentation for a probiotic candidate. *Biodiversitas*, 22(3), pp. 1317–1325. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220331>
- Yusuf, S. M., Astuti, R. I., Batubara, I., & Chavasiri, W. 2021. Anti-Aging Activity of *Xylocarpus Granatum* Phytoextracts and Xylocensins K Compound. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 32(3), pp. 365–375. <https://doi.org/10.22146/IJP.1430>