

## ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER KHAMIR DARI MOLASE SERTA KEMAMPUANNYA DALAM PRODUKSI ETANOL

Fauziah Citra Rahmawati<sup>\*1)</sup>, Endang Kusdiyantini<sup>\*2)</sup>, dan Anto  
Budiharjo<sup>\*3)</sup>

<sup>\*1,2,3)</sup>Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro  
Email: <sup>\*1)</sup>fauziahcitra463@gmail.com

### ABSTRAK

Kebutuhan terhadap minyak bumi semakin meningkat, sedangkan ketersedian semakin harinya semakin berkurang. Minyak bumi merupakan energi yang tidak dapat diperbaharui atau *non renewable*. Etanol merupakan salah satu energi alternatif yang diproduksi secara fermentasi menggunakan substrat yang mengandung gula dengan bantuan khamir. Penelitian bertujuan untuk mengisolasi khamir yang dapat memfermentasi molase menjadi etanol dan mengidentifikasinya secara morfologi, biokimia, dan molekuler sehingga dapat diketahui spesiesnya. Isolasi dilakukan kedalam media PDA dengan cara digores. Identifikasi morfologi meliputi pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi biokimia meliputi uji pertumbuhan pada konsentrasi glukosa 50% dan fermentasi gula. Serta identifikasi secara molekuler dengan cara melihat genomnya berdasarkan urutan basa DNA daerah *Internal Transcribed Spacer (ITS)*. Hasil isolasi dari molase didapatkan empat isolat khamir, yaitu isolat 1C1, 1C2, 2C1, dan 3C2. Isolat 2C1 yang digunakan untuk fermentasi etanol menghasilkan etanol sebesar 0,9876 g/cm<sup>3</sup> atau sebesar 9,5%. Isolat 2C1 diamplifikasi menggunakan PCR dan analisis filogenetik menggunakan metode *Neighbor Joining*. Hasil *sequencing* menunjukkan isolat 2C1 memiliki *Query Length* sebesar 616 bp. Berdasarkan persamaan homologi melalui metode BLAST dan analisis pohon filogenetik, isolat 2C1 merupakan *Debaryomyces hansenii*.

*Kata kunci: Identifikasi, khamir, molase, molekuler, etanol*

### ABSTRACT

The need of petroleum is increasing while the availability is limited. Petroleum is an alternative energy source which is produced by fermentation using a sugar-containing substrate with the help of yeast. This research aims to isolate the yeast that can ferment molasses into ethanol and identify morphologically, biochemically, and molecular so the species can be known. The isolation is done into the PDA media by streak method. Morphological identification involves macroscopic and microscopic observation. Biochemical identification involves growth tests on 50% glucose concentration and sugar fermentation. Molecular identification is done by looking at its genome based on Internal Transcribed Spacer (ITS) DNA base order. From Molasses isolation was obtained four isolates of yeast, that are isolates 1C1, 1C2, 2C1, and 3C2. Isolates 2C1 which is used for ethanol fermentation produces 0,9876 g/cm<sup>3</sup> or 9,5% of ethanol. 2C1 Isolates was amplified using PCR and Phylogenetic Analysis using Neighbor Joining method. Sequencing results show that Isolates 2C1 has 616 bp Query Length. Based on Homology equation through BLAST method and phylogenetic tree analysis, isolates 2C1 is a *Debaryomyces Hansenii*.

*Keywords: Identification, Yeast, Molasses, Molecular, Ethanol*

### PENDAHULUAN

Indonesia masih menghadapi persoalan ketergantungan energi fosil terutama minyak

bumi dalam pemenuhan konsumsi dalam negeri. Kebutuhan terhadap minyak bumi semakin

meningkat, sedangkan ketersediaan semakin harinya semakin berkurang. Minyak bumi merupakan energi yang tidak dapat diperbaharui atau *non renewable*. Berdasarkan kondisi tersebut pemerintah mengeluarkan Peraturan Presiden No.5 tahun 2006 mengenai Kebijakan Energi Nasional untuk mengembangkan sumber energi alternatif. Pengembangan sumber energi alternatif ini melalui energi baru dan terbarukan.

Energi alternatif yang telah lama digunakan yaitu etanol. Etanol yang digunakan sebagai bahan bakar diproduksi dengan cara fermentasi menggunakan bahan baku yang mengandung gula. Molase sering digunakan sebagai bahan baku pembuatan etanol karena memiliki kandungan gula yang tinggi. Molase merupakan produk samping dari industri gula tebu yang masih mengandung gula dan asam-asam organik. Jumlah molase di Indonesia mencapai 1,3 juta ton/ tahun (Fifendy *et al.*, 2013). Proses produksi etanol menggunakan molase memerlukan mikroba untuk proses fermentasi. Mikroba yang digunakan dalam proses fermentasi biasanya adalah khamir. Namun, secara umum jenis khamir yang dipergunakan masih terbatas pada satu jenis, yaitu *Saccharomyces cerevisiae* (Sumerta dan Atit, 2017).

Khamir bisa didapatkan dengan cara isolasi dari berbagai medium, seperti pada molase. Pemisahan satu populasi khamir yang ada pada sampel molase dari populasi campuran mikroba lainnya memerlukan suatu teknik yang disebut dengan isolasi. Isolasi mikroba dilakukan untuk menemukan manfaat berbagai macam mikroba yang mungkin dapat digunakan untuk berbagai keperluan manusia terutama dalam bidang industri.

## **BAHAN DAN CARA KERJA**

### **Isolasi khamir**

Sebanyak 1 ose molase diambil dan digores menggunakan ose bulat di atas medium PDA yang telah ditambah kloramfenikol sebagai antibiotik dalam cawan petri. Diinkubasi 48 jam pada suhu ruang. Selanjutnya masing-masing koloni yang tumbuh dimurnikan dan diinokulasikan ke dalam media agar miring.

### **Identifikasi morfologi**

Identifikasi morfologi mengacu pada *The Yeast: A taxonomic study* (Kurtzman *et al.*, 2011), yaitu secara mikroskopis meliputi bentuk sel dan morfologi sel aseksual, serta secara makroskopis meliputi bentuk koloni, tekstur, warna, tepian, dan elevasi.

### **Identifikasi biokimia**

Identifikasi biokimia pada penelitian ini mengacu pada *YEAST: Characteristics and identification* (Barnett *et al.*, 1990), yaitu fermentasi gula dan uji pertumbuhan pada konsentrasi glukosa 50%.

### **Fermentasi gula**

Medium *yeast* ekstrak 0,5% dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 10-15mL. 2% gula yang meliputi glukosa, sukrosa, dan laktosa ditambahkan pada masing-masing tabung reaksi. Setiap media uji diinokulasikan 100  $\mu$ L inokulum dengan kerapatan sel  $10^7$ . Diinkubasi pada suhu ruang selama 1 minggu.

### **Uji pertumbuhan pada konsentrasi glukosa 50%**

Isolat diinokulasi dengan cara gores kedalam medium YEA yang ditambah dengan 50% glukosa. Diinkubasi pada suhu ruang selama 2 minggu.

### **Produksi etanol**

Produksi etanol diawali dengan pembuatan starter. Starter yang akan digunakan dibuat terlebih dahulu dengan cara 100 ml media pertumbuhan cair YGP (*Yeast Glucose Peptone*) ditambahkan dengan 0,1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,04 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , dan 10 ml buffer sitrat 0,1 M dengan pH 4,0. Kemudian larutan disterilkan di dalam autoklaf dengan suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 20 menit, lalu didinginkan. Suspensi diinokulasi dengan 10 mL sub kultur khamir murni dan diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam. 1 mL suspensi yang telah diinkubasi dihitung kerapatan selnya menggunakan *spektrofotometer* ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ).

Setelah itu 100 mL molase dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambah dengan 0,346 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,036 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, dan 10 mL buffer sitrat. Kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 20 menit, lalu dinginkan. 1 mL starter diinokulasi ke dalam medium molase dan diinkubasi pada suhu ruang selama 240 jam.

$$\text{massa jenis sampel} = \frac{\text{massa piknometer} + \text{sampel} - \text{massa piknometer}}{\text{massa piknometer} + \text{air} - \text{massa piknometer}}$$

Hasil fermentasi didestilasi menggunakan destilator dengan suhu 80°C. Destilat diukur berat jenisnya menggunakan piknometer dan kemudian penetapan kadar etanol berdasarkan tabel daftar bobot jenis dan kadar etanol dalam Farmakope Indonesia (Depkes RI, 1972). Penetapan berat jenis berdasarkan rumus:

### Identifikasi molekuler metode chelex

Identifikasi molekuler diawali dengan ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan metode Chelex. Metode ini dilakukan dengan cara, 3 ose kultur khamir umur 48 jam ke dalam *tube* yang telah diberi 100 µL ddH<sub>2</sub>O dan 1 mL saponin 0,5%, perendaman kultur dalam saponin dilakukan pada suhu 4°C selama 24 jam (*overnight*).

Sampel disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Kemudian supernatan dibuang menggunakan mikropipet untuk menghilangkan saponin tanpa merusak pelet. Setelah itu PBS 1x sebanyak 1 mL ditambahkan dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya sampel ditambahkan ddH<sub>2</sub>O sebanyak 100µL dan 20 % larutan Chelex 50 µL. Sampel kemudian dididihkan selama 10 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipisahkan dari pelet.

Uji kuantitas DNA hasil ekstraksi dilakukan menggunakan NanoDrop spektrofotometer. *Software* dibuka, kemudian pilih *Nucleid acid*. Kalibrasi dilakukan sebelum pengukuran menggunakan blanko berupa aquadest steri sebanyak 3 µL selama 3 menit. ddH<sub>2</sub>O sebanyak 1µL dimasukkan lalu klik *blank*. Sampel DNA sebanyak 1µL dimasukkan dan ditutup lalu klik *Measure*. Konsentrasi DNA dilihat pada perangkat komputer.

Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan PCR dengan tiga tahapan, yaitu

denaturasi awal pada suhu 94°C selama 2 menit, *denaturasi* 94°C selama 15 detik, kemudian *annealing* pada suhu 53°C selama 30 detik, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit, setelah itu *ekstensi* akhir pada suhu 72°C selama 10 menit 40 detik dan suhu penyimpanan pada tahap akhir 4°C. *Primer* yang digunakan yaitu ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG 3') dan ITS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3').

Keberhasilan PCR diuji melalui elektroforesis dengan *gel agarose* 1% ditambah dengan 2 µL *GoodView Nucleic Acid Stain*. 5µL produk PCR dan *marker* (1 µL *loading dye* dan 1 µL *DNA low mass ladder marker*) dimasukkan ke dalam sumuran *gel agarose* 1% yang telah direndam larutan buffer TAE 1x. Kemudian dielektroforesis dengan tegangan 100 volt selama 45 menit. Hasil produk PCR akan divisualisasikan menggunakan *gel documentation*.

Produk PCR disekuensing untuk mengetahui jumlah dan urutan basanya di PT. Genetika Science Indonesia. Sekuens yang diperoleh dianalisis dengan cara penyejajaran dengan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) untuk menentukan presentase kesamaan pasangan basa dengan referensi yang terdapat di *Genbank*.

Pembuatan pohon filogenetik dilakukan menggunakan software MEGA 7. Sekuen isolat dianalisis dan dibandingkan dengan isolat lainnya. Pohon filogenetik direkonstruksi menggunakan *Neighbour joining* dan diuji menggunakan *Bootstrap method*.

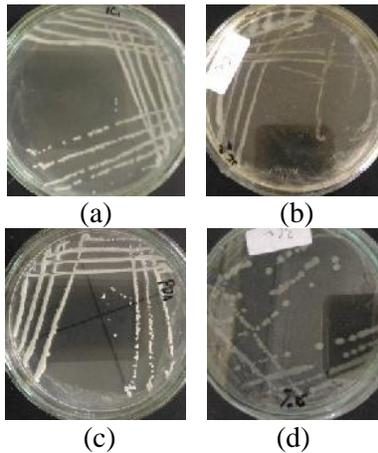
**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Hasil isolasi yang telah dilakukan, terdapat empat isolat khamir dengan karakter

morfologi koloni (Tabel 1) dan morfologi sel (Tabel 2).

Tabel 1. Morfologi koloni khamir hasil isolasi dari molase

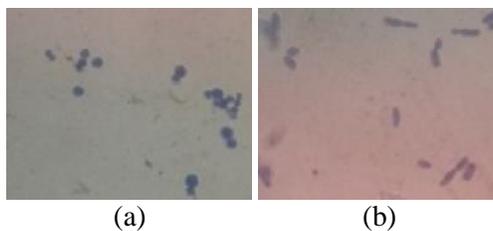
Isolat	Karakteristik				
	Bentuk Koloni	Warna Koloni	Elevasi	Tekstur	Tepian Koloni
1C1	Bulat	Putih gading	Cembung	<i>Butyrous</i>	Utuh
1C2	Bulat	Putih gading	Cembung	<i>Butyrous</i>	Bergelombang
2C1	Bulat	Putih gading	Cembung	<i>Butyrous</i>	Utuh
3C2	Bulat	Putih	Cembung	<i>Butyrous</i>	Bergelombang

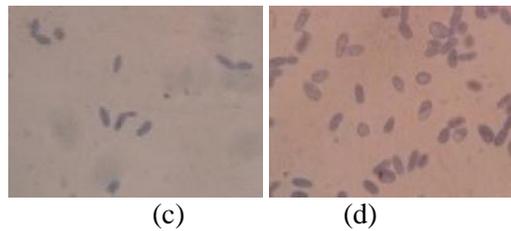


Gambar 1. Morfologi koloni isolat (a) 1C1, (b) 1C2, (c) 2C1, dan (d) 3C2 pada media PDA

Tabel 2. Morfologi sel khamir hasil isolasi dari molase

Isolat	Bentuk Sel	Morfologi Sel Aseksual
1C1	Bulat	<i>Budding</i>
1C2	Oval	<i>Budding</i>
2C1	Oval	<i>Budding</i>
3C2	Bulat	<i>Budding</i>





Gambar 2. Morfologi sel isolat (a) 1C1, (b) 1C2, (c) 2C1, dan (d) 3C2 dengan perbesaran 1000x

Seleksi terhadap isolat khamir yang akan digunakan untuk produksi etanol dilakukan dengan karakterisasi biokimia berdasarkan Barnett *et al.* (1990), menggunakan uji fermentasi gula dan uji pertumbuhan pada

konsentrasi glukosa 50%. Hasil uji fermentasi gula diperlihatkan pada Tabel 3. dan uji pertumbuhan pada konsentrasi glukosa 50% diperlihatkan pada Tabel 4.

Tabel 3. Pertumbuhan pada uji fermentasi gula

Isolat	Warna			Adanya Gas		
	Glukosa	Sukrosa	Laktosa	Glukosa	Sukrosa	Laktosa
1C1	+	+	-	+	-	-
1C2	+	+	-	+	-	-
2C1	+	+	-	+	+	-
3C2	+	+	-	+	-	-

Uji fermentasi gula digunakan untuk mengetahui kemampuan isolat dalam memfermentasi gula. Kemampuan isolat dalam fermentasi ditandai dengan adanya perubahan warna pada media dari warna merah menjadi warna kuning dan adanya gas dalam tabung durham (Barnett *et al.*, 1990). Perubahan warna media terjadi karena perubahan pH menjadi asam saat proses fermentasi, sedangkan munculnya gas dalam tabung durham terjadi karena adanya proses fermentasi gula menjadi ethanol dan CO<sub>2</sub> (Talaro, 2012). Dari hasil uji diketahui bahwa tiga isolat yaitu isolat 1C1, 1C2, dan 3C2 hanya mampu memfermentasi glukosa, sedangkan isolat 2C1 mampu memfermentasi glukosa dan sukrosa.

Keempat isolat dapat tumbuh pada medium yang mengandung 50% glukosa, namun pada isolat 3C2 pertumbuhannya lambat ditunjukkan dengan lebih sedikitnya koloni yang tumbuh dibanding isolat 1C1, 1C2, dan 2C1. Hal tersebut menunjukkan bahwa keempat isolat tersebut bersifat toleran terhadap tekanan osmosis tinggi (osmotoleran). Bubnova *et al.* (2014), menyatakan bahwa osmotoleran merupakan kemampuan tumbuh pada tekanan osmotik tinggi.

Tabel 4. Pertumbuhan pada uji konsentrasi glukosa 50%

Isolat	Pertumbuhan 24 jam
1C1	++
1C2	++
2C1	++
3C2	+

Keterangan: + : pertumbuhan lambat  
++ : pertumbuhan cepat

Isolat 2C1 mempunyai pertumbuhan yang berbeda dengan isolat lainnya, yaitu dengan adanya gas pada fermentasi sukrosa, untuk itu isolat ini digunakan dalam proses fermentasi molase menjadi etanol. Fermentasi dilakukan selama 10 hari menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Tahap selanjutnya yaitu dilakukan destilasi menggunakan destilator dengan suhu 80°C untuk memisahkan etanol dari bahan lainnya. Destilat yang diperoleh diukur berat jenisnya menggunakan piknometer, kemudian penetapan kadar etanol menggunakan daftar bobot jenis dan kadar etanol dalam Farmakope Indonesia (Depkes RI,

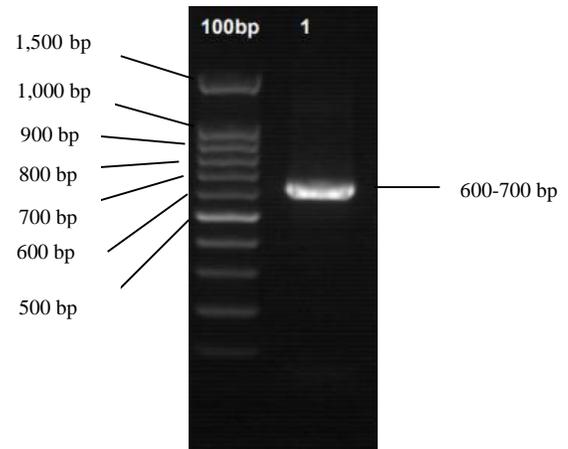
1972). Hasil yang diperoleh yaitu isolat 2C1 mampu menghasilkan etanol sebesar 9,5%.

Isolat 2C1 kemudian diidentifikasi secara molekuler dengan tujuan untuk mengetahui jenisnya. Identifikasi secara molekuler isolat 2C1 diawali dengan melakukan ekstraksi DNA menggunakan metode chelex. Metode chelex memiliki kelebihan yaitu prosesnya lebih cepat, tahapan yang dilakukan lebih sederhana sehingga resiko untuk terkontaminasi dapat dihindari (Sutrisno *et al.*, 2013). Supernatan hasil sentrifugasi yang diperoleh pada tahap akhir metode ini merupakan DNA yang akan digunakan untuk proses PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA isolat 2C1 dilakukan menggunakan NanoDrop spektrofotometer. Hasil ekstraksi DNA isolat 2C1 menunjukkan konsentrasi sebesar 480,4 ng/ $\mu$ l dengan kemurnian 2,25 dalam rasio 260/280 nm. Hasil ekstraksi DNA yang diperoleh kemudian diamplifikasi menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), menggunakan ITS1 sebagai *primer forward* dan ITS4 sebagai *primer reverse*. Daerah ITS merupakan daerah sekuen DNA yang tidak menyandikan protein fungsional dan berada di daerah RNA ribosomal (rRNA). Daerah ini dapat digunakan sebagai penanda genetika karena memiliki variasi sekuen yang cukup tinggi bahkan dalam spesies yang sama, dan semua fungi memiliki ITS rDNA (Purnamasari *et al.*, 2012). Amplifikasi dilakukan sebanyak 40 kali siklus. Amplifikasi ini bertujuan untuk memperbanyak DNA untuk kemudian dilakukan sekuensing. Hasil produk PCR isolat 2C1 kemudian dianalisis menggunakan elektroforesis untuk mengetahui ukuran DNA dan kemudian divisualisasi menggunakan *gel documentation*.

Hasil amplifikasi DNA menunjukkan pita DNA pada panjang *base pair* antara 600-700 bp (Gambar 3.). Marker 100 bp digunakan sebagai pembanding ukuran DNA isolat 2C1. Ballemain *et al.* (2010), menyatakan bahwa daerah ITS jamur berkisar antara 450-700 bp.

Gambar 3. merupakan hasil visualisasi produk PCR isolat 2C1 dalam 1% *gel agarose*.



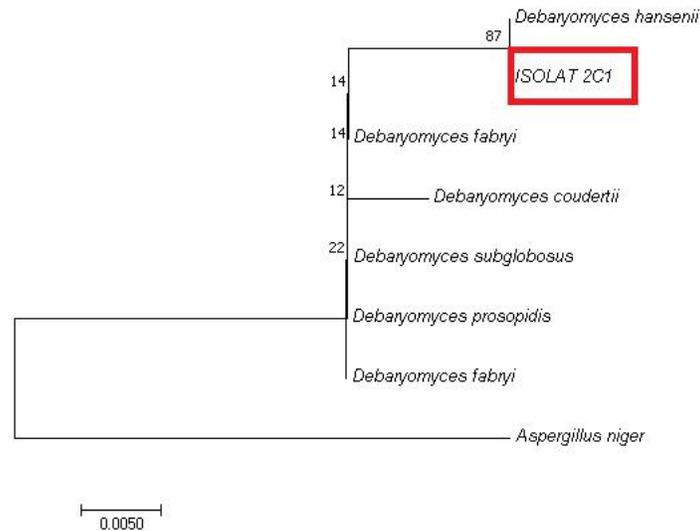
Gambar 3. Visualisasi produk PCR isolat 2C1 dalam 1% *gel agarose*.

Produk PCR selanjutnya dilakukan sekuensing untuk mengetahui urutan nukleotida isolat 2C1. Hasil sekuensing kemudian dilakukan penjajaran menggunakan *Basic Local Aligment Search Tool* (BLAST) untuk mengetahui homologinya dengan spesies yang memiliki kemiripan sekuen dengan isolat 2C1. *Query cover* yang menunjukkan keselarasan *query*, menunjukkan nilai tertinggi sebesar 98% pada spesies *Debaryomyces hansenii* dengan *Max score* dan *total score*, yaitu 1098 *E.value* 0.0 yang diperoleh menunjukkan penjajaran yang signifikan berarti pencarian sekuen pada penelitian ini identik dari genus yang sama bahkan sampai tingkat spesies. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa isolat 2C1 merupakan spesies *D. hansenii* karena memiliki nilai kemiripan (*Ident*) 99%.

Pohon filogenetik dibuat untuk mengidentifikasi isolat 2C1 dengan genus khamir lainnya sebagai pembanding. Pembuatan pohon filogenetik menggunakan *software* MEGA 7 dan dikonstruksi dengan cara *test neighbor joining tree* serta *bootstrap method*. Hasil analisis pohon filogenetik menunjukkan bahwa isolat 2C1 memiliki nilai kesamaan tinggi dengan spesies *D. hansenii* dengan nilai *bootstrap* 87 dengan *scale bar* 0.0050. *Scale bar* 0.0050 menunjukkan adanya jarak genetik

dengan perubahan nukleotid sebanyak 50 kali setiap 10.000 bp. Menurut Lamey *et al.* (2009), nilai *bootstrap* lebih dari 70 menunjukkan

bahwa data relatif lebih stabil sehingga baik dalam analisis *neighbor joining*.



Gambar 4. Pohon filogenetik isolat 2C1 menggunakan *neighbor joining* dengan uji *bootstrap* method 1000 replicates dan *Aspergillus niger* sebagai *outgroup*.

Karakteristik morfologi dan biokimia isolat 2C1 dibandingkan dengan *D. hansenii* sebagai uji konfirmasi. Berdasarkan perbandingan morfologi isolat 2C1 dan *D. hansenii* diketahui

bahwa keduanya memiliki karakteristik morfologi seperti pada Tabel 6., serta karakteristik biokimia pada Tabel 7.

Tabel 4.6 Perbandingan morfologi koloni dan sel isolat 2C1 dan *Debaryomyces hansenii*

Karakter	Morfologi isolat 2C1		<i>Debaryomyces hansenii</i> (Barnet <i>et al.</i> , 1990; Kurtzman <i>et al.</i> , 2011)	
	Koloni	Sel	Koloni	Sel
Bentuk koloni	Bulat	-	Bulat	-
Warna koloni	Putih gading	-	Putih - krem	-
Elevasi	Cembung	-	-	-
Tekstur	<i>Butyrous</i>	-	<i>Butyrous</i>	-
Tepian koloni	Utuh	-	-	-
Bentuk sel	-	Oval	-	Bulat - oval
Sel aseksual	-	<i>Budding</i>	-	<i>Budding</i>

Tabel 4.7 Perbandingan karakteristik biokimia isolat 2C1 dan *Debaryomyces hansenii*

Karakter Biokimia	Isolat 2C1	<i>Debaryomyces hansenii</i> (Barnett <i>et al.</i> , 1990)
Fermentasi glukosa	+	+
Fermentasi sukrosa	+	+
Fermentasi laktosa	-	-
Pertumbuhan pada konsentrasi glukosa 50%	+	+

Hasil identifikasi berdasarkan morfologi, biokimia, dan molekuler yang dimiliki oleh isolat 2C1 menunjukkan bahwa isolat 2C1 memiliki karakteristik yang sama dengan *D. hansenii*, sehingga isolat 2C1 dinyatakan sebagai spesies *D. hansenii*. *D. hansenii* merupakan khamir halotoleran non patogen yang merupakan anggota dari divisi Ascomycota dengan perkembangan aseksual secara *budding*. Karakter koloni *D. hansenii*, yaitu berbentuk bulat, tekstur *butyrous*, warna putih hingga krem, dan memiliki bentuk sel bulat hingga oval (Barnett *et al.*, 1990; Kurtzman *et al.*, 2011).

*D. hansenii* dapat menjadi mikroba alternatif dalam memproduksi etanol selain *Saccharomyces cerevisiae*, karena memiliki kemampuan memfermentasi substrat yang mengandung gula. Menurut penelitian yang telah dilakukan oleh Kurin *et al.* (2010), *D. hansenii* diketahui merupakan khamir halotoleran yang dapat memproduksi produk komersial seperti arabitol, xylitol, dan etanol. *D. hansenii* dapat memproduksi etanol dari *D-glucose*, *D-mannose*, dan *D-xylose*. Produksi etanol oleh *D. hansenii* konsentrasi maksimum dapat mencapai 37,08 g/L pada 144 jam inokulasi.

## SIMPULAN

1. Isolasi dari sampel molase didapatkan empat isolat khamir, yaitu isolat 1C1, 1C2, 2C1, dan 3C2.
2. Isolat 2C1 yang digunakan untuk fermentasi etanol, menghasilkan etanol sebesar 9,5%.
3. Identifikasi morfologi meliputi warna koloni, bentuk koloni, benyuk sel, elevasi, dan tepian koloni. sedangkan secara biokimia meliputi

fermentasi gula dan uji pertumbuhan pada konsentrasi glukosa 50%. Isolat 2C1 yang diidentifikasi secara molekuler merupakan *Debaryomyces hansenii*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, L., 2004, *Menghitung Mikroba Pada Bahan Makanan*. Cakrawala (Suplemen pikiran rakyat untuk iptek), Farmasi FMIPA ITB : Bandung.
- Almargo, A., P, Catarina., C, Santiago., Q, Celia., A.M, Lopes., J, Ramos., dan M.C.L, Dias. 2000. Effects of Salt on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *International Journal of Food Microbiology* 56 (2000) 191-197
- Asnani, N.I. 2007. *Penuntun Praktikum Mikrobiologi Akuatik*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Unhalu : Kendari.
- Ballemain, E., T, C., C, Brochmann., E, Coissac., P, Taberlet., dan H, Kauserud. 2010. Research article ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *Artikel. BMC Microbiology* 2010, 10:189
- Barnett, J. A., R. W. Payne., dan I. J. Yarrow. 1990. *Yeast: characterization and identification*, 2nd. Cambridge University Press, London
- Baxenavis, S.D., D.B. Davidson., R.D.M. Page., G.A. Petsko., L.D. Stein., dan G.D. Stromo.2002. *Current Protocols In Bioinformatics*. John Wiley & Sons, Inc. US
- Bubnova, M., J. Zemancikova., dan H. Sychrova. 2014. Osmotolerant yeast species differ in basic physiological

- parameters and in tolerance of non-osmotic stresses. *Yeast* 2014; 31: 309–321.
- Camacho, R.L., G.N, Pérez., dan Roses, R.P. 2003. *Factors Affecting The Growth of Saccharomyces cerevisiae in Batch Culture and in Solid State Fermentation*. Electron J Environment Agricultur Food Chemistry 2
- Campbell, N.A., B.R, Jane., dan G.M, Lawrence.2003. *Biologi Jilid II*. Jakarta: Penerbit Erlangga
- \_\_\_\_\_. 2008. *Biologi Jilid I*. Jakarta: Penerbit Erlangga
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1972. *Farmakope Indonesia edisi II*.
- Fifendy, M, Eldini, dan Irdawati. 2013. *Pengaruh Pemanfaatan Molase Terhadap Jumlah Mikroba dan Ketebalan Nata Pada Teh Kombucha*. Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung
- Fried, G.H. dan J.H, George. 2005. *Schaum's Outlines: Biologi Edisi Kedua*. Jakarta: Erlangga.
- Hartawan, Z., N. Dharmayanti. 2015. Pendekatan Molekuler untuk Identifikasi dan Karakterisasi Virus Marek Serotipe 1 WARTAZOA Vol. 25 No. 1 Th. 2015 Hlm. 001-014
- Gandjar, I, S, Wellyzar., Dan Ariyanti, O. 2006. *Mikologi Dasar dan Terapan*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia
- Harti, A.S. 2015. *Mikrobiologi Kesehatan*. Yogyakarta: CV. Andi Offset
- Hogg, S. 2013. *Essential Microbiology*. UK: Wiley-Blackwell
- Indrawan, M., R.B. Primack., dan J. Supriatna. 2007. *Biologi Konservasi*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia
- Kitahara, M., M, Sakamoto., dan Y, Benno. 2010. *Lactobacillus similis sp. nov., isolated from fermented cane molasses*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2010), 60, 187–190
- Kobilinsky, L., L. Levine., dan H.M Nunno. 2010. *Forensic DNA Analysis*. Chelsea House Publishers. New York
- Kumdam, H., S.N, Narayana., dan S.N, Gummadi. 2013. Production of ethanol and arabitol by *Debaryomyces nepalensis*: influence of process parameters. *Artikel*. AMB Express 2013, 3:23
- Kurian, J.B., A.K, Minu., A. Banerji., dan V.V.N,Kishore. 2010. Bioconversion Of Hemicellulose Hydrolysate Of Sweet Sorghum Bagasse To Ethanol By Using *Pichia stipitis* NCIM 3497 and *Dabaryomyces hansenii* sp. *Artikel*. BioResources 5(4), 2404-2416
- Kurtzman C.P., dan Piškur J. (2006). Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts (in Comparative Genomics: Using Fungi as Models. Sunnerhagen P, Piskur J, eds.). Berlin: Springer. pp. 29–46. ISBN 978-3-540-31480-6.
- Lamey, P., M, selemi., dan A.M vandamme. 2009. *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Cambridge University Press. Uk
- Larena, I., O. Salazar., V. Gonzalez., M.C. Julian., dan V. Rubio. 1999. Design of a primer for ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *Journal Of Biotechnology* 75 (1999) 187-194
- Madigan, M.T, Martinko, J.M, Stahl, D.A, dan Clark, D.P. 2012. *Biology of Microorganisms*. San Francisco: Benjamin Cummings
- Meyendorf, G. 1965. *Laborgeräte und Chemikalien; Volk und Wissen Volkseigener Verlag Berlin*
- Mulyatni, A., S, Priyatmojo, Ahmadi, dan P, Agus. 2011. Sekuen Internal Transcribed Spacer (ITS) DNA Ribosomal *Oncobasidium theobromae* dan Jamur Sekerabat Pemandang. *Jurnal Menara Perkebunan*. 79(1):1-5
- Nuria, M.C., A. Faizatun, dan Sumantri. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherchia coli*

- ATCC 25922 dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. *Mediagro* 5 (2): 26-37
- Okunowo, W.O. dan A.A, Osuntoki. 2007. Quantitation of alcohols in orange wine fermented by four strains of yeast. *African Journal of Biochemistry Research* Vol.1 (6), pp. 095-100, November, 2007
- Pelczar, M.J., dan E.C.S. Chan. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Press
- Poczai, P. Dan Hyvönen, J. 2009. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects. *Molecular Biology Reports* 37: 1897-1912
- Purnamasari, M.I., C. Prihatna., A.W. Gunawan., dan A. Suwanto. 2012. Isolasi dan Identifikasi Secara Molekuler *Ganoderma* spp. yang Berasosiasi dengan Penyakit Busuk Pangkal Batang di Kelapa Sawit. *Jurnal Fitopatologi Indonesia* ISSN: 0215-7950. Volume 8, Nomor 1, Feb 2012
- Rahayu, A, S. Slamet., S.P, Bambang., dan S.D. Iswari, 2012. Karakterisasi Morfologi dan Biokimia Aksesori Pamelon {*Citrus maxima* (Burm) Merr} Berbiji dan Tidak Berbiji Asli Indonesia. *Prosiding Seminar Nasional PERHORTI* 2012. ISBN: 978-979-25-1265-6
- Retnowati, Y. 2011. Isolasi dan Identifikasi bakteri Pengguna Merkuri dari Sedimen Sungai yang Terkontaminasi Limbah Tambang Emas. *Saintek* Vol 6, No 1 Tahun 2011
- Rosyadi, F.A, P.P, Kurnia., dan W. Tri. 2013. Optimasi Proses Produksi Etanol Dari Molases Menggunakan Teknik Fermentasi-Ekstraktif. *Jurnal Teknik Pomits* Vol. 3, No. 2, (2013) ISSN: 2337-3539
- Salinas, M.B, L. Lappe., M. Ulloa., M.G, Garlbay., dan L.G, Ruiz. 1995. Isolation and Identification of Killer yeast From Sugar Cane Molasses. *Letters In Applied Microbiology* 1995, 21, 115-116
- Sandy, Y.A., S. Djauhari., dan A.W. Sektiono. 2015. Identifikasi Molekuler Jamur Antagonis *Trichoderma Harzianum* Diisolasi Dari Tanah Pertanian Di Malang, Jawa Timur. *Skripsi. Teknologi Hasil Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang*
- Sarlin, P.J., dan R. Philip. 2013. A Molasses Based fermentation Medium Yeast Biomass Production. *International Journal of Research in Marine Sciences* 2013; 2(2): 39-44
- Sebayang, F. 2006. Pembuatan Etanol dari Molase Secara Fermentasi Menggunakan Sel *Saccharomyces cerevisiae* yang Terimobilisasi pada Kalsium Alginat. *Jurnal Teknologi Proses* 5 (2) Juli 2006:68-74 ISSN 1412-7814
- Sudjadi. 2012. *Bioteknologi Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius
- Sumerta, I.N., K, Atit. 2017. Keragaman Jenis Khamir Penghasil Etanol yang Diisolasi dari Makanan Fermentasi di Kepulauan Riau. *Jurnal Biologi Indonesia* 13(1): 61-69 (2017)
- Suryana, R.T., S, Titin., dan Feryanto. 2012. Kelayakan Industri Kecil Bioetanol Berbahan Baku Molases di Jawa Tengah. *Jurnal Manajemen & Agribisnis*, Vol. 9 No. 2, Juli 2012
- Sutrisno, I.K., A, Ira., dan S, Agung. 2013. Identifikasi bite marks dengan ekstraksi DNA metode Chelex. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya. *Dental Journal* Volume 46 Number 2 June 2013
- Talaro, K. P., dan C, Barry. 2012. *Foundations in Microbiology*. New York: McGraw-Hill Companies
- Umayah, A., dan A. Purwantara. Identifikasi isolat *Phytophthora* asal kakao. *Menara Perkebunan*, 2006, 74(2), 75-85