

**OPTIMASI EKSTRAKSI DAN AMPLIFIKASI DNA KHAMIR PADA  
SARANG LEBAH MADU *Tetragonula* sp. MENGGUNAKAN  
TEKNIK PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*)  
UNTUK IDENTIFIKASI SPESIES**

**SKRIPSI**



**UIN SUNAN AMPEL  
S U R A B A Y A**

**Disusun Oleh :**

**AIMMATUL MAGHFIROH  
NIM: H71216048**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL  
SURABAYA  
2020**

## PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Aimmatul Maghfiroh

NIM : H71216048

Program Studi : Biologi

Angkatan : 2016

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul: **“OPTIMASI EKTRAKSI DAN AMPLIFIKASI DNA KHAMIR PADA SARANG LEBAH MADU *Tetragonula* sp. MENGGUNAKAN TEKNIK PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*) UNTUK IDENTIFIKASI SPESIES”**. Apabila suatu saat nanti terbukti saya melakukan tindakan plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian pernyataan keaslian ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 07 Agustus 2020

Yang menyatakan,



(Aimmatul Maghfiroh)  
NIM. H71216048

## LEMBAR PERSETUJUAN PEMBIMBING

Skripsi Oleh

NAMA : AIMMATUL MAGHFIROH

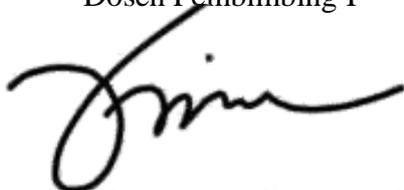
NIM : H71216048

JUDUL : OPTIMASI EKTRAKSI DAN AMPLIFIKASI DNA KHAMIR PADA SARANG LEBAH MADU *Tetragonula* sp. MENGGUNAKAN TEKNIK PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*) UNTUK IDENTIFIKASI SPESIES

Telah diperiksa dan disetujui untuk diujikan.

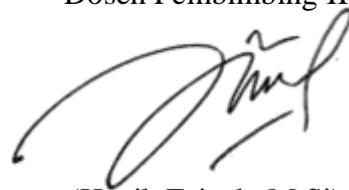
Surabaya, 07 Agustus 2020

Dosen Pembimbing I



(Nirmala Fitria Firdhausi, M.Si)  
NIP 198506252011012010

Dosen Pembimbing II



(Hanik Faizah, M.Si)  
NUP. 20140919

## LEMBAR PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI

Skripsi Aimmatul Maghfiroh ini telah dipertahankan di  
depan tim penguji skripsi di Surabaya, 07 Agustus 2020

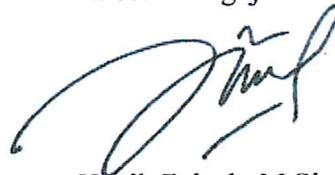
Mengesahkan,  
Dewan Penguji

Dosen Penguji I



Nirmala Fitria Firdhausi, M.Si  
NIP. 198506252011012010

Dosen Penguji II



Hanik Faizah, M.Si  
NUP. 20140919

Dosen Penguji III



Dr. Moch. Irfan Hadi, S.KM., M.KL.  
NIP. 198604242014031003

Dosen Penguji IV



Drs. Abdul Manan, M.Pd.I  
NIP. 197006101998031002

Mengetahui,  
Plt. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi  
UIN Sunan Ampel Surabaya



(Dr. Hj. Evi Fatimatur Rusydiyah, M.Ag)  
NIP. 197312272005012003



**KEMENTERIAN AGAMA**  
**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL SURABAYA**  
**PERPUSTAKAAN**

Jl. Jend. A. Yani 117 Surabaya 60237 Telp. 031-8431972 Fax.031-8413300  
E-Mail: [perpus@uinsby.ac.id](mailto:perpus@uinsby.ac.id)

---

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika UIN Sunan Ampel Surabaya, yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : AIMMATUL MAGHFIROH  
NIM : H71216048  
Fakultas/Jurusan : SAINS DAN TEKNOLOGI/BIOLOGI  
E-mail address : [AimmatulAM@gmail.com](mailto:AimmatulAM@gmail.com)

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif atas karya ilmiah :

Skripsi     Tesis     Disertasi     Lain-lain (.....)

yang berjudul :

OPTIMASI EKSTRAKSI DAN AMPLIFIKASI DNA KHAMIR PADA SARANG LEBAH

MADU *Tetragonula* sp. MENGGUNAKAN TEKNIK PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) UNTUK IDENTIFIKASI SPESIES

beserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya berhak menyimpan, mengalih-media/format-kan, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (database), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasikannya di Internet atau media lain secara **fulltext** untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan atau penerbit yang bersangkutan.

Saya bersedia untuk menanggung secara pribadi, tanpa melibatkan pihak Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta dalam karya ilmiah saya ini.

Demikian pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 07 Agustus 2020

Penulis

(Aimmatul Maghfiroh)

















Tingkat persebaran ekologi pada khamir tergolong sangat luas. Hal ini dapat dibuktikan dengan adanya jumlah khamir yang sangat melimpah di alam, baik habitatnya yang berada di daerah terestrial, akuatik, maupun udara (Ashliha dan Alami, 2014). Beberapa jenis khamir juga dapat ditemukan pada lingkungan yang bersifat khusus dengan kondisi ekstrim seperti lingkungan dengan kadar keasaman yang tinggi, dan lingkungan dengan kadar oksigen dan temperatur yang rendah (Prihartini dan Ilmi, 2018). Selain itu, khamir yang hidup berkoloni akan membentuk suatu komunitas yang dapat bersimbiosis dengan berbagai macam komponen biotik seperti buah, daun, nektar bunga, dan lingkungan dari kelompok insekta seperti pada saluran pencernaan dan produk yang dihasilkan dari aktivitasnya, seperti madu yang berasal dari lebah madu (Dunham dan Louis, 2011).

Proses pembuatan madu oleh lebah madu tidak lepas dari peranan khamir. Hubungan antara khamir dan madu pada sarang lebah madu bersifat mutualistik, dimana lebah berperan sebagai vektor untuk membawa khamir berpindah dari satu habitat ke habitat lain (Priyambada, 2015), sedangkan khamir memiliki peranan dalam beberapa proses seperti pembuatan *bee bread* dan pembuatan madu. Pembuatan *bee bread* yang digunakan sebagai makanan larva berasal dari serbuk sari. Khamir yang membantu proses pembuatan *bee bread* akan menghasilkan enzim invertase yang dapat merubah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa (Luhur, 2012). Khamir juga memiliki peranan dalam pembuatan madu melalui proses konversi yang bersifat enzimatik, dimana fermentasi tersebut akan mengkonversi gula yang terkandung dalam nektar menjadi alkohol. Alkohol hasil konversi tersebut

akan mengalami kontak dengan oksigen hingga nantinya akan terbentuk produk berupa asam asetat dan asam oksalat yang dapat berpengaruh pada aroma, tingkat keasaman, dan rasa pada madu (Savitri *et al.*, 2017).

Madu merupakan cairan alami, bertekstur kenyal, dan memiliki rasa manis yang dihasilkan melalui aktivitas lebah dari proses pengumpulan nektar bunga dan sekresi dari tubuh serangga penghisap nektar bunga yang nantinya akan disimpan dan dibiarkan matang di dalam sarang (Savitri *et al.*, 2017). Proses pengumpulan nektar dari berbagai jenis bunga untuk diolah menjadi madu tersebut dapat dijadikan sebagai faktor utama dalam keberagaman jenis madu. Keberagaman jenis madu inilah penyebab khamir yang membantu proses pembuatan madu juga memiliki keberagaman. Namun, madu hanya dapat diproduksi oleh lebah dari genus *Apis* (*stinging bee*) dan *Tetragonula* (*stingless bee*) (Riendriasari dan Krisnawati, 2017).

Lebah dari genus *Tetragonula* merupakan salah satu jenis lebah yang dapat memproduksi madu. Umumnya lebah madu *Tetragonula* digemari para peternak lebah untuk dibudidayakan karena kemudahan dalam pemeliharannya dan tidak berbahaya karena tidak memiliki sengat. Selain itu, produk yang dihasilkan dari lebah jenis ini juga memiliki nilai jual yang tinggi dengan manfaatnya yang besar, seperti madu dan propolis. Salah satu manfaat dari produk lebah jenis ini yaitu dapat digunakan sebagai obat untuk menyembuhkan berbagai penyakit pada manusia (Lamerkabel, 2011). Hal tersebut berbanding lurus dengan rentetan petunjuk keterkaitan ilmu sains dan islam yang telah dijelaskan didalam Al-Qur'an. Sampai saat ini, Al-Qur'an



dikaji dan dipelajari lebih dalam untuk dapat mengetahui berbagai aspek yang bermanfaat bagi makhluk hidup lainnya (Al-Mubarakfury, 2015).

Kelimpahan khamir di alam yang tersebar di beberapa habitat mengindikasikan bahwa dengan luasnya persebaran ekologi dari khamir, kegiatan eksplorasi yang berlangsung harus semakin intensif dikarenakan banyak spesies khamir yang belum teridentifikasi. Kegiatan eksplorasi tersebut dapat dilakukan dengan cara identifikasi, yaitu salah satu metode yang umum digunakan untuk mempelajari segala hal yang berkaitan dengan keberadaan khamir pada habitatnya, seperti khamir yang hidup dan berkembang pada lingkungan lebah (Ashliha dan Alami, 2014). Tujuan dilakukannya identifikasi pada khamir dari habitat yang berbeda yaitu untuk menemukan dan membandingkan isolat khamir yang belum teridentifikasi dengan taksa lain yang telah teridentifikasi, mengingat hingga saat ini persentase eksplorasi yang dilakukan pada khamir masih berkisar 1% dari total keseluruhan khamir yang ada di dunia (Priyambada, 2015).

Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan pada tahun 2011 melaporkan, setidaknya terdapat 1500 spesies khamir yang telah diketahui susunan taksonominya. Sedangkan perkiraan seluruh jenis khamir di dunia berkisar 150.000 spesies atau jika dipersentase sekitar 99% yang dinyatakan belum memiliki identitas. Data monogram khamir menyatakan diantara 1500 spesies yang telah berhasil diidentifikasi tersebut, dapat digolongkan kedalam 89 genus dan sebanyak 37 genus atau sekitar 42% dari total keseluruhan ditemukan di Indonesia (Priyambada, 2015). Hal ini membuktikan bahwa

potensi yang dimiliki oleh Indonesia sebagai tempat eksplorasi dan identifikasi khamir masih sangat besar (Diana dan Lasmini, 2016).

Identifikasi yang dilakukan pada khamir memiliki banyak manfaat seperti mengetahui tingkat biodiversitas khamir yang berada di alam, menganalisis hubungan kekerabatan (polimorfisme), dan dapat mengetahui peranan khamir pada berbagai bidang, seperti dalam sektor industri sebagai bahan baku pengembang adonan pada roti (Sumerta dan Kanti, 2017), dalam sektor energi sebagai bahan baku produksi energi yang bersifat dapat diperbaharui berupa bioetanol dan biodiesel (Nielsen *et al.*, 2013), dalam sektor lingkungan sebagai agen bioremediasi hidrokarbon dan dapat dijadikan indikator biologis dalam mendeteksi pencemaran air (Priadie, 2012), serta dalam sektor farmasi sebagai penghasil antibiotik (Bahi dan Anizar, 2013).

Pada umumnya, identifikasi pada khamir dapat dilakukan melalui dua jenis metode yakni secara konvensional dengan teknik mikrobiologi dan secara modern dengan teknik molekular. Identifikasi yang menggunakan metode konvensional, umumnya menggunakan beberapa parameter untuk menetapkan suatu identitas dari khamir seperti karakter fenotip, baik secara makroskopik maupun mikroskopik, biokimia, dan fisiologi, yang kemudian data yang di dapat tersebut akan dibandingkan dengan monograf dan beberapa literatur terdahulu. Kelemahan dari identifikasi menggunakan cara ini adalah waktu pengerjaan yang lama dan membutuhkan tenaga ahli untuk mendapatkan hasil yang maksimal pada proses penentuan identitas khamir (Khaerah, 2016).

Metode modern yang dilakukan dengan teknik molekular merupakan langkah baru yang dapat mengatasi permasalahan yang timbul dari metode konvensional. Pendekatan biologi molekular yang digunakan dalam mengidentifikasi khamir diyakini mampu mempersingkat waktu pengerjaan dan hasil yang didapat lebih akurat. Parameter untuk menetapkan suatu identitas dari khamir menggunakan metode ini adalah dengan cara melihat kesamaan (polimorfisme) yang terdapat pada *sequens* tiap gen-nya menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Sha *et al.*, 2016).

*Polymerase Chain Reaction* atau yang dapat disingkat dengan PCR merupakan suatu teknik sintesis dan replikasi DNA secara *in-vitro* menggunakan mesin *thermocycler*. Prinsip dasar dari teknik PCR ini adalah memperbanyak suatu fragmen pada DNA yang bersifat spesifik menggunakan bantuan sepasang oligonukleotida primer dan enzim DNA polimerase dengan urutan basa nukleotida yang telah diketahui. Produk akhir yang dihasilkan pada proses PCR berupa *sequens* gen spesifik yang nantinya dapat digunakan sebagai bahan dasar dalam teknik analisis DNA lainnya seperti penggunaannya dalam proses *Sequencing* (Muladno, 2010).

Keberhasilan terbentuknya produk PCR tersebut dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti pemilihan metode ekstraksi DNA, pemilihan primer, suhu pada saat tahapan *annealing* atau proses penempelan primer, hingga jumlah siklus dalam satu reaksi pada saat proses amplifikasi berlangsung (Joshi dan Deshpande, 2011). Menurut Roux (2009), penggunaan PCR dalam kondisi yang tidak optimum akan berdampak pada produk PCR yang tidak sesuai atau bahkan produk PCR tidak akan terbentuk.

Oleh karena itu, optimasi menjadi hal yang sangat penting untuk dilakukan, baik optimasi dalam proses ekstraksi maupun pada proses amplifikasi DNA. Optimasi yang dilakukan pada suatu metode dilakukan untuk memastikan parameter-parameter penting dalam metode yang digunakan tersebut dapat memberikan hasil yang optimal. Selain itu, optimasi juga dapat mempersingkat waktu pengerjaan dan dapat menghemat bahan yang digunakan sehingga proses yang dilakukan lebih cepat dan tepat (Joko *et al.*, 2011).

Beberapa penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Restu *et al.* (2012), Iqram (2015), dan Aqzayunarsih (2015), membuktikan bahwasannya variasi nukleotida yang dimiliki oleh tiap organisme akan mempengaruhi tiap proses identifikasinya sehingga optimasi metode yang dilakukan memiliki perbedaan. Optimasi dengan kondisi yang sesuai akan menghasilkan produk PCR yang baik dan hal tersebut dapat dijadikan sebagai parameter penentuan identitas spesies. Penelitian lainnya yang telah dilakukan oleh (Pertiwi *et al.*, 2015) menunjukkan tingginya variasi *sequence* DNA pada famili Pseudochromidae berpengaruh nyata terhadap perbedaan suhu pada proses amplifikasi DNA dikarenakan gen yang berada pada tiap organisme belum tentu sama dengan persentase 100% meskipun dalam satu famili.

Berdasarkan uraian diatas, optimasi metode yang dalam hal ini adalah optimasi proses ekstraksi dan amplifikasi DNA menggunakan PCR sangat diperlukan untuk dapat mengidentifikasi keberadaan khamir di sarang lebah madu *Tetragonula* sp. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk menetapkan kondisi optimum proses ekstraksi dan amplifikasi DNA isolat











*Tetragonula* akrab disebut dengan nama 'kele-kele' (Erniwati,2013). Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Rasmussen dan Cameron (2010), terdapat beberapa spesies *Tetragonula* yang telah berhasil diidentifikasi di Indonesia yakni *Tetragonula laeviceps*, *Tetragonula apicalis*, *Tetragonula terminata*, *Tetragonula thoracica*, *Tetragonula minangkabau*, *Tetragonula itama*, dan *Tetragonula apikalis*.

### **2.1.1. Persebaran habitat**

*Stingless honey bees* atau yang lebih dikenal sebagai lebah tak bersengat dikelompokkan dalam famili Apidae, hidup secara berkoloni di hutan-hutan diseluruh dunia yang memiliki suhu yang hangat dan lembab. Jenis spesies lebah ini dapat dijumpai disepanjang daerah yang memiliki iklim tropis dan subtropis seperti negara-negara di benua Australia, Afrika, Asia, dan Amerika (Putra *et al.*, 2016).

Persebaran insekta di dunia sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor geologi dan ekologi seperti iklim, perubahan musim, ketinggian tempat tinggal, dan jenis makanan, hingga dapat meyebabkan keragaman pada lebah. Berdasarkan hasil riset yang dilakukan ahli taksonomi diketahui lebah *Tetragonula* sp. adalah lebah tertua yang pernah ditemukan di dunia (Roubik dan Patino, 2009). Sejak ditemukannya lebah *Tetragonula*, keberadaan lebah ini dianggap berperan aktif dalam ekosistem. Sebagai contoh spesies *Tribus Meliponini* diketahui dapat menjadi polinator alami untuk vegetasi di daerah Amerika Selatan tepatnya di negara Mexico. Salah satu penyebab spesies lebah *Tetragonula* cocok dijadikan sebagai polinator

adalah karena keberlimpahan jumlah spesies dan tingkah laku yang kompleks (Sanjaya *et al.*, 2019).

Penelitian dari Pauly *et al.* (2013) memaparkan bahwa spesies lebah yang berada di negara French Guiana, yaitu negara yang terletak di benua Amerika bagian selatan memiliki tingkat keragaman vegetasi yang tinggi dengan dominasi topografi berupa hutan dataran rendah. Dengan keadaan topografi tersebut, terdapat sekitar 80 jenis dari lebah *Tetragonula* yang dapat hidup dan berkembang di wilayah ini seperti dari golongan spesies *Ptilotetragonula lurida*, *Tetragonula pallens*, dan *Tetragonula cilipes*.

Di benua Afrika, beberapa spesies lebah *Tetragonula* dari genus *Meliponula* dibudidayakan masyarakat setempat untuk dimanfaatkan sebagai obat demam, sesak napas, dan untuk menyembuhkan luka bakar dan memar. Di benua Asia, spesies lebah *Tetragonula* yang tersebar di wilayah ini berasal dari genus *Tetragonula* dengan lokasi persebaran di wilayah hutan negara Laos, Thailand, Vietnam, Kambodja, Semenanjung Malaysia hingga Indonesia, mulai dari dataran rendah hingga ketinggian 2500 kaki atau 762 m di atas permukaan air laut (Pauly dan Hora, 2013).

### **2.1.2. Karakterisasi dan Struktur Tubuh**

Pada umumnya, segala jenis insekta khususnya lebah akan hidup berkerumun membentuk koloni, termasuk lebah dari genus *Tetragonula*. Berukuran sekitar 1.8 mm-13.5 mm, lebah *Tetragonula* dikelompokkan kedalam jenis lebah yang tidak memiliki sengat.







Jika dilihat berdasarkan rupa dan warna tubuh, lebah ratu memiliki karakteristik mencolok dan berukuran dua kali lipat lebih panjang dengan bobot 2.8 kali lebih berat dibandingkan dengan lebah pekerja (Kapitanhиту *et al.*, 2018). Lebah ratu berperan penting sebagai penghasil telur dan sebagai sumber penghasil feromon, salah satu senyawa kimia yang digunakan sebagai alat komunikasi pada lebah madu yang memuat informasi tentang hal yang akan dilakukan oleh suatu koloni lebah atau perilaku yang harus dilakukan saat menghadapi keadaan di luar koloni. Sebagai tanda pengenalan koloni satu dengan yang lain, lebah ratu mengeluarkan senyawa kimia yang berbeda-beda sehingga lebah pekerja dapat mengenali koloninya dan tidak akan tersesat masuk kedalam koloni yang berbeda (Mujiono *et al.*, 2015).

Jenis spesies yang termasuk kedalam koloni reproduktif selain lebah ratu adalah lebah jantan. Lebah jantan hanya memiliki satu peranan penting di dalam koloni yakni mengawini lebah ratu untuk mendapatkan keturunan. Apabila ditinjau dari segi perilaku dan tingkah laku dalam satu koloni, lebah jantan dianggap tidak mampu bertanggungjawab terhadap dirinya sendiri sehingga pada masa pakeklik atau masa saat persediaan bahan makanan semakin sedikit, lebah jantan dianggap sebagai hama dan akan dikeluarkan dari sarang atau dibunuh oleh lebah pekerja (Putra *et al.*, 2014). Dalam hal ini lebah pekerja merupakan lebah betina yang organ reproduksinya tidak berfungsi secara sempurna, tetapi lebah betina ini memiliki peranan yang besar dan terstruktur, baik di dalam sarang maupun di luar sarang.

Peranan utama lebah pekerja di dalam sarang yakni membuat sarang lengkap dengan elemennya seperti madu, polen, dan telur (Syafriзал *et al.*, 2012).

#### 2.1.4. Struktur Sarang Lebah

Lebah *Tetragonula* sp. tergolong kedalam famili Apidae, yakni jenis lebah yang tidak memiliki sengatan (*stingless bee*), akan tetapi terdapat beberapa spesies yang memiliki sengatan mematikan yang digunakan sebagai alat untuk melindungi diri saat merasa adanya ancaman yang mendekat. Setiap spesies dari genus *Tetragonula* hidup berkoloni yang setiap koloninya terdapat di dalam satu sarang dengan satu lebah ratu, ratusan ekor lebah jantan, dan sekitar 30.000-60.000 lebah pekerja (Michener, 2013). Koloni lebah tersebut dapat ditemukan pada sarang yang berada di lubang-lubang pohon seperti pohon bambu, rongga-rongga kayu, dan celah di dinding pada rumah-rumah warga (Putra *et al.*, 2014).

Sarang yang dibuat oleh semua jenis lebah termasuk lebah *Tetragonula*, pada umumnya berasal dari material resin dari berbagai jenis tumbuhan dengan bentuk yang berbeda, tergantung dari jenis koloninya. Sarang lebah tersebut memiliki kegunaan sebagai tempat berlindung, tempat menyimpan cadangan makanan, dan tempat untuk bereproduksi (Erniwati, 2013). Berbeda dari struktur sarang yang dimiliki oleh lebah bergenus *Apis*, lebah dengan genus *Tetragonula* memiliki struktur internal sarang yang terdiri dari lima bagian utama







manis yang dihasilkan oleh kelenjar nektar yang letaknya di dasar *perianthum*. Nektar berperan sebagai sumber energi untuk melakukan aktivitas gerak pada lebah madu. Kelebihan nektar akan disimpan menjadi cadangan makanan dan diproses menjadi madu (Guntoro, 2013).

Nutrisi lain yang diperlukan oleh lebah madu *Tetragonula* sp. adalah protein. Sumber protein alami yang dibutuhkan oleh lebah madu *Tetragonula* sp. hanya dapat diperoleh dari serbuk sari (Luhur, 2012). Serbuk sari merupakan organ reproduksi jantan pada bunga yang menyimpan protein sebesar 6-40%. Protein tersebut berperan dalam pembentukan tubuh lebah madu. Selain itu, protein juga dapat berpengaruh pada perkembangan kelenjar hipofaringeal lebah pekerja dan perkembangan ovarium ratu lebah (Black, 2006).

Selain karbohidrat dan protein, seluruh jenis lebah madu membutuhkan lemak dengan jumlah yang lebih sedikit jika dibandingkan dengan karbohidrat dan protein. Sumber lemak alami juga dapat diperoleh dari serbuk sari yang berkisar antara 0,8-18,9 (Luhur, 2012). Menurut Guntoro (2013) lemak memiliki peranan dalam proses metabolisme tubuh selama masa larva hingga pupa dan sebagai sumber energi. Selain itu, nutrisi tambahan yang dibutuhkan oleh lebah madu adalah vitamin dan mineral. Vitamin dan mineral termasuk kedalam *mikronutrient* yang dapat diperoleh dari nektar dan serbuk sari. Walaupun kebutuhan vitamin dan mineral sangat sedikit, kecukupan







(kelembapan), konsentrasi oksigen, temperatur, nutrisi, pH, dan ada tidaknya inhibitor (dapat berupa senyawa).

Khamir dapat tumbuh optimal jika berada pada lingkungan yang memiliki pH sekitar 4.0 hingga 4,5 dengan interval  $a_w$  0,89 hingga 0,94 dengan temperatur pertumbuhan sekitar 25°C hingga 30°C dan temperatur maksimum yang dapat ditoleransi oleh khamir yaitu sekitar 35°C. Namun, terdapat beberapa khamir yang dapat tumbuh pada suhu yaitu  $\leq 0^\circ\text{C}$ . Selain itu beberapa khamir dapat bertahan hidup pada lingkungan ekstrem seperti lingkungan yang memiliki konsentrasi gula, garam, dan pH yang tinggi serta lingkungan yang memiliki temperatur, ketersediaan oksigen, dan air yang rendah. Umumnya, Khamir dapat dibedakan menjadi dua kelompok berdasarkan sifat metabolismenya yaitu kelompok yang bersifat oksidatif dan fermentatif. Khamir yang mampu melakukan metabolisme pada lingkungan aerob disebut kelompok oksidatif. Sedangkan khamir yang mampu melakukan metabolisme pada lingkungan anaerob disebut kelompok fermentatif (Rini, 2017).

Khamir dapat ditemukan di tanah, air, tanaman, hewan, dan serangga. Khamir termasuk ke dalam kelompok mikroorganisme dengan penyebaran ekologi yang cukup luas. Keberadaan khamir di alam sangat melimpah meliputi daratan (tanah), udara, dan perairan (laut) (Ashliha dan Alami, 2014). Khamir banyak ditemukan pada komponen biotik seperti daun, buah, nektar bunga, dan saluran

pencernaan beberapa hewan khususnya pada kelompok serangga (Prihartini dan Ilmi, 2018).

### 2.2.2. Reproduksi Pada Khamir

Khamir memiliki dua sistem reproduksi yakni sistem reproduksi secara seksual dan sistem reproduksi secara aseksual (Lasmini, 2016). Reproduksi aseksual pada khamir dapat dilakukan dengan teknik *fission* (pembelahan) dan *budding* (menghasilkan tunas), yang nantinya akan menghasilkan konidia pada daerah ujung sterigma, balistokonidia, blastokonidia, klamidokonidia, dan arthrokonidia. Sebagai mikroorganisme yang memiliki sel tunggal, proses reproduksi aseksual pada khamir akan mengalami pertumbuhan dan perkembangan lebih cepat jika dibandingkan dengan kapang yang pertumbuhannya membentuk filament-filament panjang dan tipis (Hafsari dan Asterina, 2013).

Pada sistem reproduksi secara seksual dapat ditandai dengan terbentuknya askospora dan basidiospora (Indratmi, 2012). Beberapa diantara spesies khamir juga dapat bersifat *dimorphic*, yang berarti pada siklus hidup spesies tersebut dapat mengalami dua fase sekaligus yakni dapat membentuk *yeast phase* atau fase khamir dan *mycelium phase* atau fase hifa. Jenis khamir yang tergolong bersifat *dimorphic* akan membentuk *pseudohypha* (hifa semu) hingga berkembang menjadi *pseudomycelium* (miselium semu). *Pseudomycelium* yang dihasilkan dari perkembangan khamir dapat dideskripsikan berupa sel-sel tunas yang bentuknya memanjang dan saling berhubungan membentuk



Maneveldt, 2011). Beberapa Beberapa filum yang tergolong kedalam kingdom Chromista antara lain Oomycota, Cryptista, Haptista, Bygra, dan Ochrophyta (Cavalier-Smith, 2018). Dikarenakan sebagian besar anggota dari kingdom Fungi telah beralih menjadi kingdom Chromista dan sisanyanya memiliki ciri yang dapat dikatakan sama, maka kingdom ini membentuk kindom baru yang bernama kingdom Eumycota atau yang dapat disebutkan sebagai kerajaan dari jamur yang sebenarnya. Khamir secara taksonomi masuk kedalam kindom Eumycota, yang didalamnya terdiri dari 2 filum yakni filum Ascomycota dan Basidiomycota (Mclaughlin *et al.*, 2009).

a. Filum Ascomycota

Bermula dari penciptaan kata yang menggunakan bahasa yunani, Ascomycota bersumber dari kata 'Asco' yang memiliki makna kantong. Ascomycota merupakan salah satu fungi yang berkantong, dimana kantong tersebut adalah kantong spora yang didalamnya terdapat alat perkembangbiakan (Fenina, 2012). Ahli mikologi dari segala penjuru dunia telah mengemukakan bahwasannya terdapat sekitar 65.000 spesies dari 3400 genus yang tergolong dari berbagai macam habitat, baik yang berada di perairan air asin (laut), perairan air tawar, dan daratan, telah berhasil di deskripsikan (Jumiati *et al.*, 2012).

Simbolon *et al.* (2018), mengutarakan bahwa sebagian jenis dari filum Ascomycota dapat hidup sebagai saprofit di tanah, seperti spesies *Tuber melanosporum* dan *Morcella esculanta* yang

membentuk mikoriza dengan cara bergabung dan bersimbiosis dengan akar tanaman tinggi. Namun sebagian jenis Ascomycota lainnya juga dapat hidup sebagai parasit pada flora dan fauna. Selain itu, Ascomycota juga hidup di wilayah lautan dan tergolong kedalam salah satu mikroba saproba, yakni mikroba yang dapat berasal dari sisa-sisa makhluk hidup lainnya (bangkai) maupun sampah organik. Salah satu jenis Ascomycota yang berupa khamir dapat hidup pada lingkungan yang mengandung glukosa, seperti buah dan bunga.

Pada umumnya, spesies yang tergolong kedalam filum Ascomycota memiliki ciri '*khas*' yang membedakannya dengan filum lainnya di kingdom Eumycota, yakni memiliki askokarp yang bentuknya bervariasi, dapat berbentuk botol, bola, hingga setengah lingkaran. Di dalam askokarp tersebut terdapat askus yang struktur morfologinya seperti kantong dengan banyak askospora yang dihasilkan dari proses reproduksi secara seksual (Houbraken dan Dyer, 2015). Selain itu, Ascomycota juga mempunyai miselium berseptat dan bercabang dari hifa yang tumbuh dan berkembang dengan sempurna.

Jika dilihat secara taksonominya yang berdasarkan pada perbaharuan data identifikasi secara mikrobiologi dan dari hasil beberapa analisis *sequens* pada gen rDNA, khamir yang tergolong kedalam filum Ascomycota dapat dibedakan lagi dalam lima



ditemukan adanya bilah-bilah (lembaran) yang nantinya akan membentuk basidium sebagai penghasil spora generatif. Selain itu, pada filum ini terbentuk tiga miselium yakni miselium primer, sekunder, dan tersier (Rahma, 2018).

Miselium primer merupakan miselium yang terbentuk dari sel yang hanya memiliki satu inti dan merupakan hasil dari pertumbuhan basidiospora. Sedangkan Miselium sekunder merupakan miselium yang memiliki dua inti pada tiap selnya yang diakibatkan oleh adanya konjugasi antar dua miselium primer. Berbeda dari miselium primer dan sekunder, miselium tersier merupakan miselium yang berasal dari kumpulan miselium sekunder yang nantinya akan membentuk jaringan teratur pada proses pembentukan basidiokarp dan basidiofor, sehingga hasil akhirnya dapat memproduksi basidiospora (Rahma, 2018).

Filum Basidiomycota biasa hidup sebagai saprofit pada sisa-sisa jasad renik, misalnya pada serasah daun yang berada di tanah, sekam padi (merang), dan batang pohon yang telah mati. Namun, beberapa spesies dari filum ini juga hidup sebagai parasit yang selalu menempel pada sel inang, yang dapat berupa tumbuhan hingga manusia, dan sebagian lainnya lagi dapat bersimbiosis dengan bagian tumbuhan seperti akar dengan membentuk mikoriza (Sumerta dan Kanti, 2017).

Jika dilihat secara taksonominya yang berdasarkan pada perbaharuan data identifikasi secara mikrobiologi dan dari hasil

beberapa analisis *sequens* pada daerah rDNA, khamir yang tergolong kedalam filum Basidiomycota membagi dirinya kedalam empat tingkatan class yakni Hymenomyces, Urediniomyces, dan Ustilaginomyces (Zhao *et al.*, 2017).

### 2.3. Asosiasi Lebah Madu *Tetragonula* sp. dan Khamir

Khamir termasuk kedalam kelompok mikroorganisme dengan penyebaran ekologi yang cukup luas. Keberadaan khamir di alam sangat melimpah meliputi daratan/terrestrial (tanah), atmosfer (udara), dan perairan/akuatik (laut) (Ashliha dan Nur, 2014). Khamir banyak ditemukan pada komponen biotik seperti buah, daun, kotoran hewan, nektar bunga, dan saluran pencernaan beberapa hewan khususnya pada kelompok serangga (insecta). Beberapa khamir dapat bertahan hidup pada lingkungan ekstrem seperti lingkungan yang memiliki konsentrasi gula, garam, dan pH tinggi serta lingkungan yang memiliki ketersediaan oksigen, temperatur, dan air yang rendah (Prihartini dan Ilmi, 2018). Selain itu, khamir yang berada di alam juga dapat berasosiasi dengan banyak jenis insekta, sebagai contoh khamir *Debaryomyces hansenii* yang dapat berasosiasi dengan *Drosophila* sp., khamir *Aureobasidium pullulans* yang berasosiasi dengan *Andrena* sp., dan *Candida powellii* yang berasosiasi dengan *Tetragonula* sp (Maulana, 2011).

Bentuk asosiasi yang terjadi antara komponen biotik seperti pada lebah, umumnya dapat dibedakan menjadi dua bentuk yaitu ektosimbiosis dan endosimbiosis. Asosiasi ektosimbiosis terjadi apabila khamir hidup pada lingkungan insekta seperti pada permukaan tubuh, sarang, atau bagian lain yang berhubungan dengan insekta. Sedangkan Asosiasi endosimbiosis terjadi

pada bagian dalam tubuh insekta, seperti khamir yang terdapat pada saluran pencernaan (Nowack dan Melkonian, 2010).

Belum banyak penelitian yang dilakukan berkaitan dengan asosiasi khamir dan lebah *Tetragonula*. Namun, penelitian yang dikemukakan oleh Rosa *et al.* pada tahun 2003 melaporkan dari 93 isolat khamir yang berhasil diidentifikasi hingga tingkat taksonomi spesies, 18 spesies yang dikelompokkan ke dalam clade *Starmerella* diketahui berasosiasi dengan lebah dari golongan *Tetragonula* sp. secara ektosimbiosis pada sarang lebah. Aktivitas khamir yang ditemukan pada sarang lebah ini memiliki beberapa manfaat seperti dapat menghasilkan zat antioksidan, antivirus, antijamur, dan antibakteri (Amos *et al.*, 2018).

Kemampuan khamir dalam suatu proses yang melibatkan lebah telah dianggap sebagai simbiosis yang bersifat mutualisme. Lebah memiliki peranan sebagai vektor bagi khamir untuk dapat memperluas persebarannya, sedangkan khamir dapat berperan pada beberapa proses seperti pembuatan *bee bread* dan pematangan madu. Pembuatan *bee bread* yang digunakan sebagai makanan larva berasal dari serbuk sari. Khamir yang membantu proses pembuatan *bee bread* akan menghasilkan enzim invertase yang dapat merubah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa (Luhur, 2012). Khamir juga memiliki peranan dalam pembuatan madu melalui proses konversi yang bersifat enzimatik. Fermentasi tersebut akan mengkonversi gula yang terkandung dalam nektar menjadi alkohol. Alkohol hasil konversi tersebut akan mengalami kontak dengan oksigen hingga nantinya akan terbentuk



Identifikasi yang dilakukan pada khamir dapat dilakukan menggunakan dua metode identifikasi yakni metode identifikasi secara konvensional menggunakan teknik mikrobiologi dan metode identifikasi yang dilakukan dengan bantuan teknologi molekular (Maulana, 2011). Pada umumnya spesies yang tergolong kedalam kingdom fungi (salah satunya adalah khamir), ditemukan dan identifikasi dengan menggunakan identifikasi konvensional berdasarkan karakter morfologi. Terdapat dua karakter morfologi yang dapat digunakan untuk penentuan identifikasi yakni pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis. Kenampakan makroskopis yang biasanya diamati pada spesies fungi adalah warna, bentuk permukaan, tekstur, tepi, dan elevasi yang terdapat pada koloni. Sedangkan, kenampakan mikroskopis dapat diamati dari bentuk sel, ukuran yang dapat meliputi panjang dan lebar dari sel, susunan sel hingga tipe pertunasan (Shofiana *et al.*, 2015).

Sumerta dan Kanti (2017) menyatakan identifikasi menggunakan karakter morfologi yang dimiliki oleh tiap jenis fungi tidak cukup kuat untuk dapat digunakan sebagai dasar penentuan identitas karena identifikasi dengan cara ini tidak dapat mengelompokkan setiap jenis fungi hingga pada taksa spesies. Selain itu, identifikasi secara konvensional juga dapat dilakukan dengan menggunakan uji fisiologi dan biokimia. Parameter uji yang dapat digunakan dalam uji fisiologi dan biokimia dapat berupa pengujian kemampuan fermentasi dari khamir untuk menghasilkan berbagai jenis gula, pengujian kemampuan mengasimilasi berbagai jenis unsur kimia seperti unsur C (Carbon) dan N (Nitrogen), dan ketahanan khamir terhadap lingkungan tertentu. Namun, identifikasi yang dilakukan secara konvensional

ini, baik menggunakan karakter morfologi maupun menggunakan uji fisiologi dan biokimia memiliki beberapa kelemahan seperti lamanya waktu yang dibutuhkan untuk proses identifikasi dan hanya dapat dilakukan oleh tenaga ahli guna mengurangi kesalahan pada saat identifikasi (Maulana, 2011).

Seiring dengan perkembangan waktu dan tuntutan kebutuhan identifikasi fungi yang semakin meningkat, maka dikembangkan metode identifikasi dengan melibatkan teknologi molekular untuk memperkecil kesalahan dan menutup kelemahan dari metode identifikasi konvensional. Teknologi molekular merupakan ilmu terapan yang berasal dari beberapa disiplin ilmu lain dengan cangkupan sains dan teknologi, seperti bidang biologi molekular, biokimia, dan biofisika. Salah satu bentuk keterkaitan teknologi molekular dengan biologi molekular adalah terciptanya kajian-kajian ilmiah yang berhubungan dengan asam amino, protein, dan sistem regulasinya. Hal ini berbanding lurus dengan orientasi biologi molekular sebagai disiplin ilmu yang mempelajari tentang molekul penyusun tubuh beserta dengan sifat fungsional dan strukturalnya (Yuwono, 2009). Hasil dari kajian antara teknologi molekular dan biologi molekular inilah yang nantinya dapat digunakan sebagai metode baru dalam dunia taksonomi melalui identifikasi.

Berbeda dari identifikasi secara konvensional yang menggunakan karakter morfologi, sifat fisiologi dan biokimia dalam penentuan identitas suatu mikroorganisme, identifikasi dengan menggunakan teknologi molekular menggunakan gen target yang terdapat dalam mikroorganisme tersebut sebagai penentu identitasnya (Sha *et al.*, 2016). Kurtzman dan



*Sub-Unit* (LSU) ini dapat digunakan sebagai penentu identitas karena memiliki variasi *sequens* nukleotida yang tinggi jika dibandingkan dengan daerah gen *coding* yang lain. Namun, daerah D1/D2 LSU tidak dapat menjadi gen target ketika akan digunakan untuk menganalisis jenis khamir yang memiliki kekerabatan dekat (Rini, 2017).

Penggunaan salah satu daerah *non-coding* yakni daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) menjadi pilihan gen target yang paling sesuai untuk identifikasi pada khamir. *Sequens* yang berada pada daerah ini umumnya tidak dapat mengkode protein fungsional, namun daerah ini memiliki variasi *sequens* nukleotida yang tinggi pada spesies yang sama, bahkan jika dibandingkan dengan daerah *coding* seperti gen SSU dan LSU (Saksinchai *et al.*, 2012). Rini (2017), memaparkan daerah ITS rDNA dapat digunakan untuk menganalisis dan mengidentifikasi seluruh spesies khamir meskipun memiliki kekerabatan yang sangat dekat.

Hal ini dapat dibuktikan ketika persentase DNA *relatedness* yang dimiliki isolat khamir sebesar 80-100%, homologi *sequens* pada daerah ITS isolat khamir tersebut dapat mencapai 99-100%. Tingginya penggunaan gen target ITS pada proses identifikasi khamir menjadikan *sequens* nukleotida daerah ini dapat diakses dengan mudah melalui *database gene international* seperti pada NCBI (*National Center For Biotechnology Information*), DDBJ (*Data Bank of Japan*), dan YPG (*Yeast Genome Project*) (Maulana, 2011). Selain itu, alasan digunakannya daerah ITS ini adalah ukurannya yang hanya berjumlah 300-900 pasang basa dan memiliki banyak *copy replaced* sehingga dapat dengan mudah dianalisis *sequens*-nya. Lokasi dari ITS dapat dilihat







yang dapat digunakan secara spesifik pada organisme tertentu atau kit yang bersifat universal. Kit ekstraksi dan permurnian DNA ini banyak dipilih dan digunakan oleh para peneliti karena prosesnya yang cukup sederhana dengan waktu pengerjaan yang cepat, dan langsung dapat digunakan sesuai dengan petunjuk yang telah disediakan di dalam kit. Umumnya kit yang dapat ditemukan secara komersial yaitu DNAzol Reagent (Invitrogen), QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen), Iso Hair Kit (Nippon GeneCo. Ltd), GenElute Mammalian Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich), Blood DNA Isolation Kit (Amershan Pharmacia Biotech), dan Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega) (Ip *et al.*, 2015).

#### **2.4.2. Pengukuran Kualitas dan Kuantitas Pada DNA**

Proses penilaian kualitas dan kuantitas pada DNA dapat dilakukan menggunakan alat spektrofotometer. Prinsip kerja dari alat spektrofotometer adalah dengan menghitung perbandingan hasil absorpsi sinar ultra violet (UV) untuk mengetahui konsentrasi DNA pada sampel, yang nantinya akan diteruskan pada gelombang tertentu. Nilai absorbansi maksimal pada sampel yang mengandung DNA dan RNA terdapat pada panjang gelombang 260 nm, Sedangkan nilai absorbansi maksimal pada sampel yang mengandung protein terdapat pada panjang gelombang 280 nm (Fatchiyah *et al.*, 2011).

Penentuan kuantitas dari DNA pada sampel dapat diukur berdasarkan konsentrasi yang muncul pada panjang gelombang yang telah ditentukan tersebut. Sedangkan penentuan kualitas DNA pada

sampel dapat diukur dengan membandingkan nilai absorbansi yang muncul pada panjang gelombang 260 nm dan panjang gelombang 280 nm, yang berarti membandingkan nilai absorbansi yang dimiliki oleh DNA dan protein. DNA dikatakan murni dan memiliki kualitas yang baik ketika nilai perbandingan absorbansi 260/280 menunjukkan angka 1,8-2,0 (Sambrook dan Russell, 2001).

### **2.4.3. Amplifikasi DNA Menggunakan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR)**

Pada tahun 1985, teknik PCR pertama kali diperkenalkan dan dikembangkan oleh Kary Mullis. PCR merupakan teknik yang digunakan untuk memperbanyak (amplifikasi) DNA secara *in vitro* menggunakan mesin *thermocycler*. Melalui pembatasan daerah dengan menggunakan primer yang bersifat komplementer, untai DNA tunggal dapat disalin mirip dengan pasangan dari cetaknya (Rini, 2017). Berkat penemuannya tersebut, pada tahun 1993 PCR karya Mullis mendapatkan hadiah nobel dalam nominasi di bidang kimia (Zein dan Prawiradilaga, 2013).

Secara garis besar, prinsip dasar dari teknik PCR adalah memperbanyak suatu fragmen pada DNA yang bersifat spesifik menggunakan bantuan sepasang oligonukleotida primer dan enzim DNA polimerase dengan urutan basa nukleotida yang telah diketahui. Umumnya proses PCR melibatkan banyak siklus, dimana tiap siklusnya akan melewati tiga tahapan untuk dapat menghasilkan sebuah produk berupa *band* (pita) DNA yaitu tahap denaturasi (pemisahan rantai



### b. *Annealing*

Pada tahap ini akan terjadi proses penempelan primer di daerah tertentu dari gen target. Ikatan hidrogen yang telah dirusak di tahap denaturasi akan dibentuk kembali di tahap *annealing* ini, yakni dibentuk diantara primer dan pasangan basa yang telah komplemen pada DNA *template*. Proses penempelan primer pada tahap *annealing* ini dapat dipengaruhi oleh dua faktor utama yaitu tingkat pemisahan primer dari kompleks primer sebelum awal polimerisasi atau pada saat pengenceran primer dan kemampuan DNA polimerase dalam proses pemanjangan primer hingga nantinya dapat membentuk DNA *template* yang stabil (Ludyasari, 2014).

Waktu pada proses *annealing* yang umum digunakan adalah 30 – 45 detik dengan suhu 36°C hingga 72°C. Penentuan suhu *annealing* paling optimum dapat ditentukan berdasarkan panjang dan komposisi basa nitrogen pada primer. Namun, disarankan suhu pada tahapan ini 5°C lebih rendah dibawah *Melting Temperature* ( $T_m$ ) yang dapat dihitung dengan rumus:

$$T_m = 4(G + C) + 2(A + T)^{\circ}\text{C}$$

Pemilihan primer yang terlalu pendek pada proses amplifikasi akan berdampak pada produk PCR yang tidak akan terbentuk dikarenakan primer akan sulit menempel pada DNA *template*. Sedangkan pemilihan primer yang terlalu panjang akan berdampak pada produk PCR yang tidak spesifik (Robertson dan Walsh-weller, 1998).

### c. Ekstensi

Tahap akhir dari proses PCR adalah tahap ekstensi, dimana pada tahapan ini terjadi proses pemanjangan rantai DNA salinan. Saat setelah primer menempel pada DNA *template* di tahap *annealing*, DNA polimerase yang dibantu oleh dNTPs akan mensintesis salinan DNA dengan cara mengikat deoksinukleotida pada ujung 3'-OH dari primer serta mengisi basa nitrogen yang berada di DNA *template* sehingga pemanjangan utas DNA yang baru akan terjadi dengan lajur pemanjangan menjadi 5'-P ke 3'-OH. Terjadinya proses pemanjangan atau ekstensi DNA inilah yang menyebabkan kembalinya struktur DNA yang awalnya *single strain* menjadi *double strain* (Yusuf, 2010).

Pada umumnya suhu yang digunakan pada tahap ekstensi ini cukup tinggi, yaitu sekitar 72°C. Hal ini dikarenakan suhu tersebut diyakini merupakan suhu paling optimum untuk melakukan proses pemanjangan untai DNA salinan. Beberapa penelitian mengungkapkan waktu yang dibutuhkan untuk satu siklus pada proses pemanjangan DNA dan penyusunan nukleotida sebanyak 35-100 basa adalah sekitar satu detik. Namun, lamanya waktu yang diperlukan pada tahap ini dapat dipicu oleh kondisi pH, larutan *buffer* yang digunakan, kandungan garam, serta DNA target yang digunakan (Zein dan Prawiradilaga, 2013). Pada tahap akhir proses ekstensi, waktu akan diperpanjang sekitar 5-10 menit untuk





daerah akhir dari *sequence* target atau membatasi pada ujung 5' (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Proses perancangan (*design*) primer merupakan hal yang sangat penting dilakukan sebelum proses amplifikasi berlangsung, karena pemilihan susunan primer yang tepat dapat menjadi salah satu kunci keberhasilan proses amplifikasi DNA. Perancangan primer dapat dilakukan berdasarkan urutan *sequence* DNA atau protein yang telah diketahui sebelumnya atau dapat diambil dari *database* GenBank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Namun, apabila urutan *sequence* DNA atau protein target belum diketahui, maka proses perancangan primer dapat dilakukan dengan analisis homologi dari *sequence* DNA atau protein yang telah diketahui memiliki kekerabatan terdekat (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Pada proses perancangan tersebut, primer harus memiliki beberapa parameter tertentu untuk dapat dipilih dan digunakan pada proses amplifikasi DNA, seperti panjang primer tidak boleh kurang atau lebih dari ketentuan yang telah ditetapkan karena pemilihan *sequence* primer yang tidak sesuai akan menghasilkan produk PCR non spesifik, perhitungan suhu leleh (*Melting temperature*) primer yang tepat untuk menentukan kinerja yang konsisten pada saat proses amplifikasi, serta kandungan *GC content* pada *sequence* primer yang berada diantara 40%-60%. Parameter parameter







lebih sulit, sedangkan penambahan konsentrasi  $MgCl_2$  yang terlalu rendah akan menyebabkan aktivitas enzimatik dari *Taq DNA Polymerase* tidak efektif (Joshi dan Deshpande, 2011).

#### 2.4.4. Visualisasi Hasil Amplifikasi DNA dengan Elektroforesis

Elektroforesis merupakan suatu teknik analisis hasil PCR yang berpedoman pada prinsip migrasi molekul bermuatan dalam aliran medan listrik. Teknik ini memiliki dua komposisi utama yaitu media yang terbuat dari gel untuk memisahkan molekul (DNA atau protein) dan aliran listrik yang digunakan untuk membantu perpindahan molekul tersebut. Melalui perhitungan laju perpindahan pada molekul DNA, hasil amplifikasi PCR dapat dibaca dalam ukuran *basepair* (bp) (Zein dan Prawiradilaga, 2013).

Secara umum, elektroforesis terbagi menjadi dua macam tipe, yaitu elektroforesis vertikal dan elektroforesis horizontal (Zein dan Prawiradilaga, 2013). Kedua macam tipe elektroforesis ini memiliki perbedaan kegunaan dan bahan yang digunakan. Elektroforesis vertikal biasanya menggunakan medium gel jenis polyacrilamide untuk memisahkan protein, kemudian proses visualisasinya dibantu oleh zat kimia berupa *silver staining*. Sedangkan, elektroforesis horizontal biasanya menggunakan medium gel agarosa untuk memisahkan DNA dengan bantuan visualisasi oleh zat kimia berupa *ethidium bromide* (Sulandari dan Zein, 2003).

Prinsip kerja dari proses elektroforesis adalah perpindahan molekul menggunakan bantuan aliran listrik. Molekul-molekul seperti









### 3.3. Alat dan Bahan

#### 3.3.1. Alat

Beberapa macam alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain yakni *glass ware* seperti *beaker glass*, *petri disk*, gelas ukur, erlemeyer, tabung reaksi, batang pengaduk, spatula, pipet tetes, jarum ose, bunsen, corong dan sejenisnya, serta inkubator, *elektric stove*, *laminar flow cabinet*, *laboratory freezer*, *vortex mixer*, autoklaf, *hot plate magnetic stirer*, mikropipet (ukuran P10, P20, P100, P1000), *waterbath*, sentrifuge, spindown, *spektrophotometer DNA quantitative analysis* (BioDrop®), *thermocycler*, UV Transilluminator, *electrophoresis horizontal*, *power supply*, dan refrigenerator.

Sedangkan alat habis pakai yang digunakan berupa kapas steril, mikrotube, tip mikropipet 100-1000  $\mu\text{l}$ , tip mikropipet 0.5-10  $\mu\text{l}$ , tip mikropipet 20-200  $\mu\text{l}$ , sarung tangan, masker, aluminium foil, *wrapping plastic*, plastik tahan panas, karet, pemantik api, dan tisu.

#### 3.3.2. Bahan

Beberapa macam bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain sebagai berikut.

##### a. Khamir

Isolat khamir yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari sarang lebah madu klanceng (*Tetragonula* sp.) dengan lokasi pengambilan sampel di Dusun Andung Utara Desa Ngembal Kecamatan Tukur Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur.







### 3.5.3 Proses Isolasi dan Inokulasi Khamir

Isolasi pada khamir dilakukan pada media YMA sebagai media selektif *yeast* dengan menggunakan metode *spread plate*. Selanjutnya diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruangan hingga didapatkan koloni tunggal dan dapat mewakili satu macam koloni (representatif). Setelah didapatkan biakan koloni, kemudian isolat khamir tersebut diinokulasikan pada media pertumbuhan yakni media PDA dengan metode *streak plating*, dan diinkubasi kembali selama 48 jam pada suhu kamar.

Pengamatan morfologi pada khamir dilakukan saat biakan kultur telah mencapai umur 72 jam dalam medium PDA yang disimpan pada suhu ruang yaitu 20-25°C. Adapun parameter yang dapat diamati secara makroskopis adalah warna, bentuk, tekstur, tepi, dan elevasi yang terdapat pada koloni. Sedangkan parameter pengamatan morfologi khamir secara mikroskopis dapat dilihat dari bentuk, ukuran, dan susunan sel, serta tipe pertunasan.

### 3.5.4 Ekstraksi DNA

Pada penelitian ini digunakan empat metode ekstraksi yang berbeda untuk dapat menemukan dan menentukan metode ekstraksi yang paling optimum sebagai langkah identifikasi khamir secara molekular, meliputi:

#### a. Metode 1

Ekstraksi DNA pada khamir dengan menggunakan metode 1 dilakukan berdasarkan prosedur modifikasi dari Lööke *et al.*

(2011). Empat biakan kultur khamir (I1, I2, I3, dan I4) yang digunakan dalam metode ini adalah biakan dengan masa inkubasi selama 48 jam hingga satu minggu. Langkah pertama yang dilakukan yaitu mengambil biakan kultur khamir dari cawan petri dengan jarum ose steril sebanyak 3 oles. Biakan kultur tersebut kemudian disuspensikan kedalam *tube* berukuran 1.5 ml yang telah berisi 100  $\mu$ l *Nuclease Free Water* (NFW) dan 100  $\mu$ l SDS 1%. setelah itu dihomogenkan dengan cara divorteks hingga biakan kultur khamir larut dalam campuran NFW dan SDS.

Setelah kultur khamir larut secara sempurna di dalam NFW dan SDS, dilakukan proses inkubasi dengan suhu 70°C selama 5 menit. Selesai proses inkubasi, suspensi khamir ditambahkan dengan 300  $\mu$ l etanol 96% dan divorteks selama 5 detik. Proses selanjutnya adalah memisahkan DNA dengan molekul lain berdasarkan berat molekulnya melalui sentrifugasi dengan kecepatan 15.000 $\times$ g selama 3 menit. Hasil dari proses sentrifugasi yaitu terbentuk 2 lapisan, pellet DNA dan supernatant.

Supernatant yang terbentuk dibuang hingga menyisakan pellet DNA yang nantinya akan dicuci menggunakan etanol 70%, kemudian di sentrifuge kembali dengan kecepatan 15.000 $\times$ g selama 1 menit. Setelah proses sentrifugasi, etanol 70% dibuang hingga menyisakan pellet DNA. Tube yang berisi pellet DNA tersebut kemudian ditambahkan dengan 100  $\mu$ l buffer TE dan



Supernatant yang terbentuk dibuang dan pellet (endapan) pada *tube* ditambahkan dengan 300 µl larutan NLS (*Nuclei Lysis Solution*). Untuk menghomogenkan pellet (endapan) dengan cairan dilakukan proses inversi selama 30 detik. Langkah selanjutnya adalah menambahkan larutan PPS (*Protein Precipitation Solution*) sebanyak 100 µl kedalam *tube* sampel lalu dihomogenkan dengan cara divorteks selama 20 detik. Kemudian sampel didiamkan pada suhu dingin selama 5 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 16.000×g selama 3 menit.

Pada tahapan ini, supernatant yang terbentuk mengandung DNA sehingga supernatant dipindahkan ke *tube* baru yang sebelumnya telah berisi 300 µl isopropanol, sedangkan pellet (endapan) dibuang. Sampel dihomogenkan dengan cara diinversi hingga terlihat benang-benang DNA lalu disentrifugasi kembali dengan kecepatan 16.000×g selama 2 menit. Supernatan hasil dari sentrifugasi kali ini dibuang sehingga hanya menyisakan pellet (endapan) yang merupakan DNA. Kemudian pellet DNA dikering anginkan dengan cara membalikkan *tube* diatas tisu selama ± 10 menit.

Pellet DNA yang telah melewati tahap pengeringan akan ditambahkan dengan larutan etanol 70% sebanyak 300 µl dan kemudian di homogenkan dengan cara diinversi selama 5 detik. Setelah itu, pellet DNA di sentrifugasi dengan kecepatan 16.000×g selama 2 menit. Supernatant yang terbentuk dibuang









Setelah memadat, *gel agarose* tersebut akan diletakkan pada alat elektroforesis yang nantinya akan ditambahkan dengan *buffer* TBE hingga menutup permukaan dari *gel agarose*. Selanjutnya hasil aplikasi DNA sebanyak 5  $\mu$ l ditambahkan dengan *loading dye* sebanyak 1  $\mu$ l, kemudian dihomogenkan produk PCR dan *loading dye* dengan menggunakan mikropipet. Campuran antara produk PCR dan *loading dye* tersebut dimasukkan dalam sumuran (*well*) gel agarose 2%. Pada *well agarose* tersebut juga dimasukkan DNA *ladder* atau *marker* 1  $\mu$ l yang telah dicampur dengan *loading dye* 1  $\mu$ l sebagai penanda panjang dari basa nukleotida yang diletakkan pada *well* pertama. Tahapan akhir adalah *running* elektroforesis dengan dialirkan arus listrik 100 V selama 30 menit.

- b. Interpretasi hasil elektroforesis melalui visualiasi pita DNA dengan bantuan DNA *gel documentation*

Setelah proses *running* elektroforesis, gel agarose akan direndam dalam larutan EtBr selama 20 menit dan dibilas dengan aquades steril. Gel agarose tersebut divisualisasikan dengan bantuan sinar UV dari alat DNA *gel documentation*. Hasil yang terbentuk adalah band atau pita DNA yang berbentuk garis.

### 3.6. Analisis Data

Analisis dan pengolahan data yang digunakan pada penelitian ini adalah analisis secara deskriptif kualitatif dan kuantitatif, dimana data yang diolah tersebut didapat dengan cara membandingkan hasil akhir pada setiap





buatan, sedangkan proses inokulasi merupakan proses memindahkan kultur mikroba dari medium pertumbuhan yang lama ke medium pertumbuhan baru. Tujuan dilakukannya kedua proses ini adalah untuk mendapatkan isolat mikroba murni tanpa adanya kontaminasi dari mikroba lainnya (Sumerta dan Kanti, 2017), dalam hal ini isolat mikroba yang digunakan yaitu khamir.

Media pertumbuhan yang digunakan dalam proses isolasi khamir di sarang lebah madu *Tetragonula* sp. adalah media sintetis YMA (*Yeast Extract-Malt Extract Agar*). Umumnya media YMA bersifat selektif, dimana komposisi dan kondisi yang terkandung pada media yang diformulasikan oleh Wickerham ini hanya dapat mendukung pertumbuhan dari mikroba yang berasal dari golongan khamir dan dapat mencegah pertumbuhan dari spesies mikroba lainnya. Hal tersebut dikarenakan formulasi media ditambahkan dengan bahan antibakteri seperti sodium propionate dan diphenyl kedalam media YMA dengan pH yang berkisar antara 3.0-4.0 untuk menghambat pertumbuhan dari bakteri (Difco dan BBL Team, 2009).

Sedangkan media pertumbuhan yang digunakan dalam proses inokulasi adalah media PDA (*Potato Dextrose Agar*). Penggunaan media ini didasari atas sifatnya sebagai media universal yang dapat digunakan untuk menumbuhkan segala jenis fungi, yang diantaranya termasuk khamir. pH yang berkisar antara 4.5 hingga 5.6 yang terkandung pada media ini dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang membutuhkan lingkungan netral dengan pH 7.0. (Cappuccino dan Sherman, 1987).

Metode penanaman mikroba yang digunakan dalam proses isolasi khamir adalah metode *spread plating* atau metode cawan sebar. Prinsip dasar dari









dimiliki oleh setiap makhluk bergerak yang bernyawa seperti manusia, binatang-binatang ternak, dan tumbuhan, ataupun organisme kecil sekalipun, yang dapat diamati dari jenis, bentuk, dan warnanya (Shihab, 2002).

Hal tersebut dapat dikaitkan dengan keberagaman isolat-isolat khamir yang telah berhasil diidentifikasi dari sampel sarang lebah madu *Tetragonula* sp. pada penelitian ini, baik keberagaman yang dapat dilihat secara kasat mata seperti warna, bentuk, tekstur, tepi, dan elevasi dari isolat khamir tersebut, maupun keberagaman yang dapat dilihat menggunakan bantuan alat berupa mikroskop seperti bentuk sel, ukuran, susunan sel, hingga tipe pertunasannya.

Keberhasilan proses karakterisasi melalui pengamatan makroskopis dan mikroskopis yang dilakukan pada isolat-isolat khamir tersebut memberikan keuntungan dalam penelitian ini, karena menghasilkan suatu analisis bahwa isolat-isolat khamir tersebut berasal dari filum Ascomycetes. Analisis tersebut dapat menjadi parameter penentu pemilihan metode ekstraksi DNA yang tepat untuk mendapat DNA murni dari isolat khamir dengan mempertimbangkan struktur dinding selnya, sehingga nantinya hasil yang diperoleh pada proses ekstraksi DNA menjadi lebih maksimal (Kurtzman dan Fell, 1998).

#### **4.2. Optimasi Metode Ekstraksi DNA Khamir**

*Deoxyribonucleic acid* (DNA) merupakan komponen penting yang sangat berpengaruh dalam penelitian berbasis biomolekular. Keberadaan DNA menjadi parameter utama sebagai instruksi genetik dan *barcoding* pada setiap organisme, yang dapat digunakan untuk mengungkapkan identitas hingga menelusuri tingkat kekerabatan dari organisme itu sendiri (Dewi, 2012). Pada



## A. Ekstraksi DNA Khamir dengan Metode modifikasi L $\ddot{o}$ oke *et al.* (2011) (Metode 1)

Salah satu metode ekstraksi DNA secara konvensional yang sering digunakan adalah metode ekstraksi organik, dimana pelarut organik seperti deterjen, kloroform, atau fenol digunakan untuk melisis sel sehingga nantinya didapatkan genom DNA (Zein dan Prawiradilaga, 2013). Pada penelitian ini metode ekstraksi organik dilakukan dengan penambahan deterjen jenis SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) dengan konsentrasi 1%. Penambahan SDS disini digunakan untuk merusak struktur sekunder dan struktur tersier pada protein yang terdapat pada membran sel sehingga struktur dari membran sel lisis dan hancur. Selain itu, SDS juga memiliki kemampuan untuk mengurangi aktivitas enzim pendegrasi DNA dan dapat melarutkan komponen lipid pada membran inti sehingga kestabilan dari membran inti akan terganggu (destabilisasi) (Natarajan *et al.*, 2016).

Metode ekstraksi DNA berdasarkan prosedur dari L $\ddot{o}$ oke *et al.* (2011) yang digunakan pada penelitian ini mengalami sedikit modifikasi dengan mengurangi penggunaan salah satu reagen yaitu LiOAc (*Lithium Acetat*). Reagen-reagen yang digunakan selain SDS 1% antara lain etanol 96%, etanol 70%, dan *buffer* TE. Fungsi dari penggunaan etanol 96% dan etanol 70% secara berturut-turut adalah untuk tahapan presipitasi atau pemisahan DNA dari partikel lain seperti protein dan selulosa, serta untuk pemurnian DNA (purifikasi). Sedangkan fungsi dari *buffer* TE adalah untuk menjaga

kondisi dari DNA hasil proses ekstraksi sehingga DNA tidak rusak dan dapat digunakan dalam proses amplifikasi (Marwayana, 2015). Menurut Farmawati *et al.* (2015) penggunaan buffer TE pada proses ekstraksi DNA juga dapat berfungsi untuk memisahkan RNA dari DNA sehingga DNA yang dihasilkan tidak terkontaminasi oleh RNA.

Pada saat proses presipitasi DNA, terbentuk 2 lapisan yaitu supernatant dan pellet. Lapisan atas atau supernatant merupakan campuran NFW dan SDS, sedangkan lapisan bawah yang mengendap atau pellet merupakan DNA. Hal ini dapat terjadi karena perbedaan massa jenis, dimana massa jenis dari DNA lebih besar (1,724 g/mL) dibandingkan dengan massa jenis dari NFW dan SDS (1,01 g/mL), sehingga DNA dapat mengendap didasar *tube*. Selain itu, penggunaan etanol 96% pada tahap presipitasi ini akan membuat DNA menjadi kurang hidrophil (sukar larut) sehingga DNA mengendap melalui proses sentrifugasi (Hartawan *et al.*, 2015).

Ekstraksi organik menggunakan SDS ini memiliki beberapa keunggulan seperti prosedur yang sederhana, waktu pengerjaan yang relatif cepat, reagen yang diperlukan hanya sedikit dan dapat dengan mudah ditemukan dipasaran, biaya yang terjangkau, serta dapat digunakan untuk banyak reaksi. Sedangkan kelemahan dari penggunaan metode ini adalah genom DNA yang dihasilkan memiliki konsentrasi yang sedikit dan tingkat keamanan yang harus

lebih diperhatikan karena kontak dengan bahan toksik dan karsinogenik seperti etanol 96% dan *buffer* TE (Lööke *et al.*, 2011).

Cara untuk melihat keberhasilan proses ekstraksi DNA khamir dengan metode ini adalah dengan mengukur kualitas dan kuantitas dari genom DNA yang dihasilkan dengan menggunakan *spektrophotometer DNA quantitative analysis* [BioDrop®]. Hasil pengukuran menunjukkan konsentrasi yang diperoleh empat sampel khamir berkisar antara 0.796-3.404 ng/µl dengan tingkat kemurnian DNA 1.0-1.6 (Lampiran 3). Hal tersebut mengindikasikan bahwa proses ekstraksi yang dilakukan menggunakan metode ini masih belum mampu menghasilkan nilai konsentrasi yang besar dengan nilai kemurnian yang baik.

#### **B. Ekstraksi DNA Khamir dengan Metode Wizard® Genomic DNA Purification KIT [Promega™] (Metode 2)**

Wizard® Genomic DNA Purification Kit merupakan salah satu kit komersial yang dikeluarkan oleh perusahaan Promega™ Corporation. Kit ini terdiri dari lima reagen terpisah yang masing-masingnya memiliki fungsi dan kegunaan dalam proses ekstraksi DNA. Reagen-reagen tersebut antara lain *Cell Lysis Solution* (CLS) yang berfungsi untuk melisiskan sel, *Nuclei Lysis Solution* (NLS) yang berfungsi menghancurkan inti sel, *Protein Precipitation Solution* (PPS) yang berfungsi mengendapkan sisa protein dan garam mineral, *DNA Rehydration Solution* berfungsi untuk menjaga

stabilitas dari DNA hasil proses ekstraksi, serta *RNAse A Solution* sebagai reagen pendegradasi RNA (Promega Corp., 2020).

Pada beberapa kasus ekstraksi DNA, seperti proses ekstraksi yang dilakukan pada khamir, prosedur kit ini akan ditambahkan dengan penggunaan larutan EDTA dan enzim litikase. Penggunaan larutan EDTA ini bertujuan untuk mengikat kation divalen pada ikatan fosfodiester DNA sehingga ikatan tersebut putus dan kinerja dari DNase terganggu, sedangkan keberadaan enzim litikase berfungsi dalam proses pemecahan dinding sel dari khamir (Soteropoulos dan Perlin, 1998). Namun, pada penelitian ini penggunaan enzim litikase digantikan dengan proses inkubasi pada suhu 80°C selama 15 menit, yang telah diketahui memiliki fungsi yang sama. Promega™ mendesain kit ini untuk dapat digunakan pada seluruh jenis dan bagian organisme, atau dengan kata lain kit komersial ini merupakan kit yang bersifat universal, dimana beberapa contoh sampel yang berasal dari organisme seperti sel darah, jaringan hewan dan tumbuhan, *yeast cell*, bakteri gram-positif dan bakteri gram-negatif dapat melalui tahapan ekstraksi DNA hanya dengan menggunakan reagen-reagen siap pakai pada kit ini (Promega Corp., 2020).

Keunggulan lain dari penggunaan kit komersial Wizard® Genomic DNA Purification Kit selain reagen yang siap pakai adalah prosedur kerja yang sudah terstruktur dengan baik melalui protokol yang telah disediakan dan lebih aman karena tidak menggunakan

bahan-bahan yang bersifat toksik seperti kloroform dan deterjen. Selain itu, genom DNA hasil dari proses ekstraksi DNA menggunakan kit ini telah terbukti memiliki kuantitas yang tinggi dengan kualitas (rasio absorbansi A260/A280) antara 1.7-2.0. Namun, hasil tersebut sangat bergantung pada kondisi sampel yang akan diekstraksi seperti usia sampel, jumlah sel, dan kandungan lain yang terdapat pada sampel seperti kandungan flavonoid pada tumbuhan dan protein pada jaringan hewan. Sedangkan kelemahan dari penggunaan kit ini adalah waktu pengerjaan yang relatif lama dan biaya yang dikeluarkan cukup besar (Hanum *et al.*, 2018).

Cara untuk melihat keberhasilan proses ekstraksi DNA khamir dengan metode ini adalah dengan mengukur kualitas dan kuantitas dari genom DNA yang dihasilkan dengan menggunakan *spektrophotometer DNA quantitative analysis* [BioDrop®]. Hasil pengukuran menunjukkan konsentrasi yang diperoleh empat sampel khamir berkisar antara 21.64-24.36 ng/ $\mu$ l dengan tingkat kemurnian DNA 2.103-2.133 (Lampiran 3). Hal tersebut mengindikasikan bahwa proses ekstraksi yang dilakukan menggunakan metode ini mampu menghasilkan nilai konsentrasi yang cukup besar, namun nilai kemurniannya belum cukup baik untuk dapat digunakan dalam tahapan selanjutnya.

### C. Ekstraksi DNA Khamir dengan Metode Modifikasi Wizard®

#### Genomic DNA Purification KIT + Proteinase-K (Metode 3)

Ekstraksi DNA menggunakan metode 3 ini tidak jauh berbeda dengan metode ekstraksi DNA dengan menggunakan metode 2, hanya mengalami sedikit modifikasi dengan penambahan larutan Proteinase-K untuk menggantikan proses inkubasi pada suhu 80°C selama 15 menit. Penggunaan larutan tersebut berdasarkan arahan dari beberapa protokol kit ekstraksi DNA dan dilakukan ketika prosedur ekstraksi DNA sebelumnya tidak mendapatkan hasil yang optimum.

Pemilihan penggunaan larutan proteinase-K didasari pada perannya yaitu menstimulus kinerja dari reagen CLS dan NLS untuk melisiskan membran sel dan nukleus, serta mendegradasi protein pada proses presipitasi sehingga genom DNA yang dihasilkan memiliki kadar kemurnian tinggi dengan tingkat kontaminasi protein yang kecil (Marwayana, 2015).

Cara untuk melihat keberhasilan proses ekstraksi DNA khamir dengan metode ini adalah dengan mengukur kualitas dan kuantitas dari genom DNA yang dihasilkan dengan menggunakan *spektrophotometer DNA quantitative analysis* [BioDrop®]. Hasil pengukuran menunjukkan dari empat sampel yang diekstraksi, hanya satu sampel yang melalui proses pengukuran yaitu sampel II dengan nilai konsentrasi sebesar 1.981 ng/μl dan nilai kemurnian sebesar 1.384 (Lampiran 3). Hal tersebut mengindikasikan bahwa

proses ekstraksi yang dilakukan menggunakan metode ini masih belum mampu menghasilkan nilai konsentrasi yang cukup besar dengan nilai kemurnian yang baik.

#### **D. Ekstraksi DNA Khamir dengan Metode InaCC LIPI (Metode 4)**

Ekstraksi DNA isolat khamir dengan menggunakan metode 4, dilakukan berdasarkan Panduan Pengelolaan Koleksi Mikroorganisme dari Indonesian Culture Collection (InaCC) LIPI. Prinsip dasar dari ekstraksi DNA menggunakan metode ini adalah dengan melakukan proses pemanasan pada suhu yang tinggi, dimana pada kondisi tersebut terjadi peningkatan permeabilitas dari dinding sel sehingga cairan dan materi lain yang berada di sekitar sel akan masuk ke dalam sel, sedangkan materi yang terdapat di dalam sel akan keluar dari sel, termasuk DNA. Selain itu, suhu tinggi yang digunakan pada saat pemanasan dapat mengakibatkan enzim pendegradasi DNA atau DNase menjadi inaktif (Sunarno *et al.*, 2014). Umumnya, metode ekstraksi dengan prosedur seperti ini dapat disebut juga dengan metode *boiling cell* (Barbosa *et al.*, 2016).

Metode *boiling cell* merupakan salah satu metode ekstraksi yang paling efektif untuk mendapatkan DNA secara cepat. Prosedur kerja sederhana dengan periode waktu yang tergolong singkat membuat metode *boiling cell* banyak digunakan untuk ekstraksi DNA pada mikroba seperti khamir (Silva *et al.*, 2012). Pada penelitian ini, proses pemanasan dilakukan pada suhu 98°C selama

10 menit seperti yang tercantum pada manual prosedur InaCC LIPI. Pemilihan suhu tersebut didasari atas ketebalan dinding sel dari khamir. Menurut Dashti *et al.* (2009), pemanasan menggunakan suhu yang terlalu tinggi dalam waktu lama akan menyebabkan DNA target rusak sehingga proses ekstraksi harus diulang kembali.

Kelemahan dari metode ini adalah tidak menggunakan proses presipitasi dan purifikasi DNA pada prosesnya, melainkan hanya proses ekstraksi DNA saja sehingga sangat memungkinkan eliminasi partikel asing (seperti protein) tidak berjalan sempurna dan genom DNA yang dihasilkan memiliki kualitas yang rendah (Sunarno *et al.*, 2014). Namun, hal tersebut dapat diatasi dengan penambahan prosedur pada bagian sentrifugasi yang awal mulanya hanya satu kali menjadi beberapa kali sehingga debris sel akan terpisah secara maksimal dan kualitas genom DNA yang didapatkan relatif lebih tinggi dari sebelumnya (Barbosa *et al.*, 2016).

Cara untuk melihat keberhasilan proses ekstraksi DNA khamir dengan metode ini adalah dengan mengukur kualitas dan kuantitas dari genom DNA yang dihasilkan dengan menggunakan *spektrophotometer DNA quantitative analysis* [BioDrop®]. Hasil pengukuran menunjukkan konsentrasi yang diperoleh empat sampel khamir berkisar antara 25.43-102.8 ng/ $\mu$ l dengan tingkat kemurnian DNA 1.83-2.4 (Lampiran 3). Hal tersebut mengindikasikan bahwa proses ekstraksi yang dilakukan menggunakan metode ini mampu

menghasilkan nilai konsentrasi yang cukup besar dengan nilai kemurnian yang baik.

Tahapan ekstraksi DNA yang dilakukan pada sampel isolat khamir hasil dari proses isolasi sarang lebah madu *Tetragonula* sp. merupakan salah satu tahapan yang cukup sulit untuk dilakukan. Beberapa metode ekstraksi yang telah terbukti efektif pada penelitian-penelitian sebelumnya, tidak menjamin keberhasilan untuk mendapatkan genom DNA yang murni pada penelitian ini. Hal tersebut dapat terjadi karena beberapa faktor seperti, ketebalan dinding sel yang berbeda-beda pada setiap jenis khamir, umur dan kepadatan sel koloni khamir yang digunakan pada saat proses ekstraksi, serta beberapa kesalahan yang disebabkan oleh peneliti (*human error*), sehingga DNA tidak dapat terekstrak dengan optimal (Marwayana, 2015).

Menurut Madigan *et al.* (2012) setiap jenis khamir umumnya memiliki dinding sel yang tersusun atas beberapa komponen seperti glukukan khamir (30-35%), mannan (30%), protein (6%), khitin (1-2%), dan lipid (8.5-13%), yang masing-masing dapat diukur dari berat kering dinding sel. Namun, persentase kandungan dari komponen yang berbeda-beda tersebut menyebabkan ketebalan dari tiap golongan khamir juga berbeda. Selain itu, perbedaan pada jenis protein juga dapat mempengaruhi ketebalan dari dinding sel seperti keberadaan dua protein yakni *xylanomanno* protein dan *galactomanno* protein pada golongan khamir basidiomycetes menyebabkan dinding sel dari golongan ini menjadi lebih tebal jika dibandingkan dengan kelompok

khamir dari golongan Ascomycetes yang hanya terdapat satu jenis protein saja yaitu *galactomanno* protein (Kurtzman dan Fell, 1998).

Selain ketebalan dinding sel, umur dan kepadatan sel dari koloni khamir juga sangat berpengaruh pada proses ekstraksi DNA. Hal itu dikarenakan umur sel yang masih muda memiliki struktur dinding sel yang tipis dan akan semakin tebal saat umurnya semakin tua, sehingga penggunaan koloni khamir yang memiliki umur muda dapat meningkatkan presentase keberhasilan untuk mendapatkan genom DNA dengan kuantitas dan kualitas yang tinggi (Fardiaz, 1989).

#### 4.2.2. Pengukuran Kualitas dan Kuantitas DNA

Pengukuran DNA yang dilakukan dengan *spektrophotometer DNA quantitative analysis* (BioDrop®) terhadap hasil dari proses ekstraksi bertujuan untuk mengetahui tingkat kontaminasi pada sampel DNA (Amanda dan Cartealy, 2015). Prinsip kerja dari BioDrop® ini adalah dengan penyerapan sinar ultraviolet (UV) oleh DNA dan protein yang terdapat didalam suatu larutan. Banyaknya sinar ultraviolet yang dapat diserap oleh DNA dan protein inilah yang menentukan hasil pengukuran, karena semakin besar penyerapan sinar ultraviolet oleh sampel maka hasil yang didapatkan semakin baik (Fatchiyah *et al.*, 2011).

Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Pada panjang gelombang 260 nm DNA dapat menyerap sinar ultraviolet secara maksimal, sedangkan kontaminan seperti protein dapat menyerap sinar ultraviolet pada panjang gelombang 280 nm,

sehingga untuk menentukan kemurnian dari DNA digunakan perhitungan nilai rasio  $\lambda$  260 nm dibagi dengan  $\lambda$  280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) (Fatchiyah *et al.*, 2011).

Berdasarkan hasil pengukuran kualitas dan kuantitas DNA yang telah dilakukan pada empat sampel isolat khamir (lampiran 3), dapat diketahui bahwasannya kemurnian (kualitas) dan konsentrasi (kuantitas) dari empat metode tersebut menunjukkan hasil yang bervariasi, dimana nilai rata-rata kemurnian DNA yang diperoleh dari hasil penelitian ini berkisar antara 1.079-2.406, sedangkan rata-rata konsentrasi DNA yang diperoleh cukup baik yaitu berkisar antara 0.796-102.8.

Analisis yang dilakukan pada data pengukuran kualitas DNA menunjukkan isolat-isolat khamir yang diekstraksi menggunakan metode 4 memiliki tingkat kualitas tertinggi jika dibandingkan dengan tiga metode lainnya yaitu metode 1, 2, dan 3. Hal ini dikarenakan dari empat isolat khamir yang diekstraksi, tiga isolat (I1, I2, dan I3) menghasilkan DNA yang murni dengan rasio  $\lambda_{260}/280$  berturut-turut 1.835, 1.945, dan 1.937, sedangkan satu isolat khamir lainnya (I4) masih mengandung kontaminan dengan rasio  $\lambda$  260/280 melebihi 2.0 yaitu 2.406.

Penyataan tersebut didukung oleh Sambrook dan Russell (2001) bahwasannya hasil pengukuran kualitas DNA dapat dikatakan murni jika nilai rasio  $\lambda$  260/280 berkisar antara 1.8-2.0. Kemurnian DNA yang berada di kisaran tersebut telah memenuhi persyaratan untuk dilakukan

analisis molekular lanjutan seperti amplifikasi DNA menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Jika nilai rasio  $\lambda$  260/280 yang dihasilkan masih berada dibawah 1.8, kemungkinan besar DNA yang didapatkan tersebut belum murni karena terkontaminasi oleh pelarut. Sedangkan jika nilai rasio  $\lambda$  260/280 yang dihasilkan melebihi 2.0, maka sampel tersebut diduga terkontaminasi oleh protein maupun bahan organik lainnya.

Selain itu, proses analisis juga dilakukan pada data pengukuran kuantitas DNA yang dapat dilihat pada kolom konsentrasi (lampiran 3), dimana pada tabel tersebut menunjukkan metode 4 memiliki konsentrasi terbaik dengan kisaran 25.43-102.8. Nilai konsentrasi tersebut sangat besar jika dibandingkan dengan ketiga metode lainnya yang hanya menghasilkan konsentrasi dengan kisaran 0.796-3.404 pada metode 1, 21.64-24.36 pada metode 2, dan 1.981 pada metode 3. Dari data tersebut dapat diketahui bahwasannya hanya isolat-isolat khamir yang diekstraksi menggunakan metode 2 dan 4, yang dapat dijadikan sebagai DNA *template* pada proses amplifikasi DNA menggunakan PCR, dikarenakan telah memenuhi kadar minimum konsentrasi untuk proses amplifikasi yaitu 10  $\mu\text{g/ml}$  (Sambrook dan Russell, 2001).

Perbedaan nilai kemurnian (kualitas) dan konsentrasi (kuantitas) DNA pada tiap metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor. Beberapa diantaranya disebabkan oleh aspek teknis pelaksanaan proses ekstraksi DNA seperti kondisi sampel, modifikasi metode, penggunaan komposisi *buffer*





Selain itu, metode ini juga menunjukkan efisiensi waktu pengerjaan yang tergolong sangat baik dibandingkan dengan ketiga metode lainnya. Hal ini dikarenakan prosedur atau langkah kerja dari metode ini sederhana. Biaya yang dikeluarkan untuk satu kali reaksi juga relatif murah karena tidak membutuhkan banyak reagen. Oleh karena itu, isolat-isolat khamir yang diekstraksi menggunakan metode 4 ini akan digunakan sebagai DNA *Template* pada tahapan berikutnya yaitu tahap amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR.

#### **4.3. Optimasi Protokol Amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*)**

Tahapan amplifikasi DNA isolat khamir yang berasal dari sarang lebah madu *Tetragonula* sp. dilakukan dengan teknik PCR menggunakan mesin *thermocycler*. Prinsip dasar dari alat ini adalah memperbanyak fragmen DNA target menggunakan bantuan oligonukleotida primer (Zein dan Prawiradilaga, 2013). Umumnya, beberapa penelitian terdahulu yang mengkaji tentang deteksi DNA pada golongan fungi seperti penelitian yang telah dilakukan oleh Maulana (2011), Rahayu *et al.* (2015), dan Hasyiyati *et al.*, (2017) menunjukkan primer yang sering digunakan untuk mengamplifikasi DNA khamir adalah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) 4 sebagai primer *reverse* dan *Internal Transcribed Spacer* (ITS) 5 sebagai primer *forward*. Abliz *et al.* (2004) menyatakan bahwasannya primer ITS 4 dan ITS 5 merupakan primer yang bersifat universal, dimana primer tersebut mampu mengamplifikasi seluruh fragmen gen dari golongan fungi, termasuk gen-gen yang terdapat pada daerah *non-coding* rDNA khamir.

Pada penelitian ini, metode PCR yang digunakan mengacu pada beberapa protokol antara lain protokol dari Maulana (2011), Ediningsari (2008), Anggraini *et al.* (2019), dan dari Panduan Pengelolaan Koleksi Mikroorganisme Indonesian Culture Collection (InaCC) LIPI. Penggunaan beberapa protokol tersebut bertujuan untuk mendapatkan kondisi yang sesuai dan optimal sehingga mampu menghasilkan produk PCR yang spesifik (Pertiwi *et al.*, 2015). Komposisi *cocktail* PCR dibuat dalam volume 25  $\mu$ l dengan komposisi 5  $\mu$ l DNA *Template* (genom DNA hasil dari proses ekstraksi), 5.5  $\mu$ l *Nuclease Free Water* (NFW), 12.5  $\mu$ l Go Taq® Green Master Mix, serta *primer reverse* (ITS 4) dan *primer forward* (ITS 5) yang masing-masing sebanyak 1  $\mu$ l.

Keberhasilan proses amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR dapat ditunjukkan melalui analisis elektroforesis gel agarose 1%, yang kemudian hasil dari proses analisis tersebut divisualisasikan dibawah sinar UV dengan bantuan UV Transilluminator (*DNA Gel Documentation*). Proses analisis elektroforesis ini bertujuan untuk memisahkan molekul DNA, RNA, dan protein berdasarkan ukuran dengan menggunakan tegangan arus listrik, sehingga nantinya pita DNA (amplikon) dapat terbentuk (Yusuf, 2010). Pita DNA inilah yang digunakan sebagai parameter utama dalam menentukan protokol amplifikasi DNA yang paling optimal untuk mendeteksi isolat-isolat khamir yang diisolasi dari sarang lebah madu *Tetragonula* sp. Profil DNA hasil dari amplifikasi dengan empat protokol dapat dilihat pada gambar berikut.







lainnya yaitu dari Anggraini *et al.* (2019) tidak berhasil mengamplifikasi seluruh isolat khamir yang digunakan pada penelitian ini.

Hasil dari proses amplifikasi DNA menggunakan protokol dari Maulana (2011) dan InaCC LIPI tidak jauh berbeda yaitu menunjukkan adanya 3 pita DNA tunggal pada 3 sampel, hanya saja kondisi pita DNA dari kedua protokol tersebut sedikit berbeda. Produk PCR yang diamplifikasi menggunakan protokol dari InaCC LIPI memiliki pita DNA yang lebih tebal, jelas, dan terang dibandingkan dengan produk PCR yang diamplifikasi menggunakan protokol dari Maulana (2011). Hal ini dapat terjadi karena suhu *annealing* yang digunakan pada protokol Maulana (2011) sedikit lebih tinggi sehingga diduga primer tidak dapat menempel secara sempurna.

Prakoso *et al.* (2016) menyatakan penggunaan suhu *annealing* yang terlalu tinggi dan tidak sesuai pada saat proses PCR dapat berdampak pada sensitifitas antara primer dan DNA *Template* sehingga kemungkinan terjadinya *mispriming* sangat besar hingga mampu mempengaruhi produk PCR yang terbentuk. Menurut Zein dan Prawiradilaga (2013) hal tersebut dapat diatasi dengan cara menurunkan suhu *annealing* secara bertahap setiap 1°C hingga didapat pita band yang sesuai.

Selain itu, hasil dari proses amplifikasi menggunakan kedua protokol ini juga membentuk produk nonspesifik band pada satu sampel isolat khamir. Terbentuknya produk nonspesifik band tersebut dapat disebabkan karena beberapa faktor seperti konsentrasi sampel isolat DNA khamir yang terlalu tinggi, DNA yang belum terdenaturasi dengan sempurna, hingga suhu *annealing* yang tidak sesuai. Hal ini dapat diatasi dengan menerapkan beberapa

strategi seperti mengecurkan DNA *Template* hingga didapatkan hasil yang sesuai apabila konsentrasi sampel terlalu tinggi, serta dapat menaik-turunkan suhu atau durasi pada tahapan denaturasi dan *annealing* secara bertahap (Zein dan Prawiradilaga, 2013) .

Hasil dari proses amplifikasi DNA menggunakan protokol dari Ediningsari (2008) menunjukkan dari empat sampel isolat khamir yang digunakan pada penelitian ini, dua sampel isolat mampu menghasilkan pita DNA tunggal yang cukup tebal dan jelas, satu isolat membentuk nonspesifik band, dan satu isolat lainnya tidak membentuk pita DNA maupun nonspesifik band. Permasalahan ini diduga disebabkan oleh suhu *annealing* dan jumlah siklus yang tidak pas dengan kondisi DNA target sehingga produk PCR yang dihasilkan tidak sesuai. Penyelesaian dari permasalahan tersebut adalah dengan menaik-turunkan suhu *annealing* secara bertahap setiap 1°C atau dapat juga mengurangi jumlah siklus secara bertahap mulai dari 25×, 30×, hingga 35× (Zein dan Prawiradilaga, 2013).

Hasil dari proses amplifikasi DNA menggunakan protokol dari Anggraini *et al.* (2019) menunjukkan seluruh sampel isolat khamir pada penelitian ini tidak berhasil membentuk pita DNA, melainkan hanya membentuk nonspesifik band pada 3 sampel dan 1 sampel lainnya tidak terbentuk sama sekali. Hal tersebut mengindikasikan bahwa kondisi dari tiap tahapan PCR yang digunakan pada protokol ini tidak sesuai dengan kondisi DNA target. Zein dan Prawiradilaga (2013) menyatakan bahwa untuk mengatasi hasil analisis elektroforesis gggg pada produk PCR yang menghasilkan nonspesifik band dapat dilakukan dengan mengganti primer





Optimasi amplifikasi menggunakan teknik PCR yang telah dilakukan terhadap empat protokol memperlihatkan bahwa tingkat keberhasilan proses amplifikasi dengan protokol InaCC LIPI dan Maulana (2011) sangat tinggi jika dibandingkan dengan dua protokol lainnya yaitu protokol dari Ediningsari (2008) dan Anggraini *et al.* (2019), baik dari segi durasi waktu pengerjaan maupun amplicon yang terbentuk. Sha *et al.* (2016) menyatakan keberhasilan proses amplifikasi DNA sangat tergantung pada kondisi dan komposisi dari setiap protokol. Kondisi tersebut dapat meliputi suhu, lama durasi tiap satu siklus, dan jumlah siklus dalam satu reaksi. Sedangkan komposisi yang dimaksud berupa konsentrasi dan kemurnian dari DNA *Template* serta pemilihan primer yang sesuai dengan DNA target.

Gen ribosomal DNA (rDNA) daerah *non-coding* merupakan gen yang paling umum digunakan dalam proses identifikasi khamir secara molekular (Kurtzman dan Sugiyama, 2015). *Internal Transcribed Spacer* (ITS) sebagai salah satu gen yang berada didaerah *non-coding* menjadi pilihan gen target yang paling sesuai untuk mendeteksi keberadaan khamir, dikarenakan gen ITS bersifat *conserved* atau gen yang memiliki laju mutasi yang rendah. Selain itu, variasi *sequens* nukleotida yang terdapat pada gen ini juga tergolong tinggi walaupun pada spesies yang sama sehingga sangat mudah untuk dilihat polimorfismenya (Saksinchai *et al.*, 2012).





- Cavalier-Smith, T. 2018. Kingdom Chromista and its Eight Phyla: A New Synthesis Emphasising Periplastid Protein Targeting, Cytoskeletal and Periplastid Evolution, and Ancient Divergences, *Protoplasma*. 255(1): 297-357.
- Costa, K. F., R. M. Brito, dan C. S. Miyazawa. 2004 Karyotypic Description of Four Species of *Tetragonula* (Jurine, 1807) (*Hymenoptera*, *Apidae*, *Meliponini*) from the State of Mato Grosso, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 27(2): 187–190.
- Darajati, W., S. Pratiwi, E. Herwinda, A. D. Radiansyah, V. S. Nalang, B. Nooryanto, J. S. Rahajoe, R. Ubaidillah, I. Maryanto, R. Kurniawan, T. A. Prasetyo, A. Rahim, dan J. Jefferson. 2016. *Indonesian Biodiversity Strategy and Action Plan 2015-2020*. Kementerian Perencanaan Pembangunan Nasional, Jakarta.
- Dashti, A. A., M. M. Jadaon, A. M. Abdulsamad, dan H. M. Dashti. 2009. Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. *Kuwait Medical Journal*. 41(2): 117–122.
- Deak, T. 2008. *Handbook of Food Spoilage Yeast*. 2<sup>nd</sup> Edition. CRC Press, Boca Raton.
- Dewi, A. K., C. S. Utama dan S. Mukodiningsih. 2014. Kandungan Total Fungi Serta Jenis Kapang dan Khamir pada Limbah Pabrik Pakan yang Difermentasi dengan Berbagai Aras Starter “Starfung”, *Jurnal Agripet*, 14(2): 102-106.
- Dewi, C. L. 2012. Analisis Biomolekuler Gen Internal Transcribed Spacer (ITS) Dalam Studi Filogenetik *Zingiber loerzingii* Valetton (*ZINGIBERACEAE*). *Skripsi*. Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Diana, L. dan T. Lasmini. 2016. Isolasi dan Identifikasi Khamir Selulolitik dari Tanah Rizosfer Angrek Puser Bumi (*Pecteilis susannae* L.) di Hutan Wonosadi Gunung Kidul DIY. *Biogenesis*. 4(1): 21–28.
- Difco., dan BBL Team. 2009. *Manual of Microbiology Culture Media: Yeast Mold (YM) Agar Yeast Mold (YM) Borth*. 2<sup>nd</sup> Edition. Becton, Dickinson and Company, New York.
- Djajasaputra, M. R. 2010. Potensi Budidaya Lebah *Tetragonula* dan Pemanfaatan Propolis Sebagai Antibiotik Alami untuk Sapi PO. *Skripsi*. Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Dunham, M. J. dan E. J. Louis. 2011. Yeast Evolution and Ecology Meet Genomics. *European Molecular Biology Organization Report*. 12(1): 8–10.
- Ediningsari, A. R. 2008. Identifikasi Khamir dari Perairan Mangrove dan Laut Cagar Alau Pulau Rambut Berdasarkan Daerah *Internal Transcribed Spacer (ITS)*. *Skripsi*. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Depok.

- Erniwati. 2013. Kajian Biologi Lebah Tak Bersengat (*Apidae: Tetragnola*) di Indonesia. *Fauna Indonesia*. 12(1): 37–39.
- Fardiaz, S. 1989. *Mikrobiologi Pangan*. Pusat Antar-Institut Pertanian Bogor Bidang Pangan dan Gizi, Bogor.
- Farmawati, D. A., I. N. Wirajana, dan S. C. Yowani. 2015. Perbandingan Kualitas DNA dengan Menggunakan Metode BOOM Original dan BOOM Modifikasi Pada Isolat *Mycobacterium tuberculosis* 151. *Jurnal Kimia*. 9(1): 41–46.
- Fatchiyah., E. L. Tyas, S. Widyarti, dan S. Wahyuni. 2011. *Biologi Molekular: Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga, Jakarta.
- Fell, J. W., T. Boekhout, A. Fonseca, J. P. Sampaio. 2001. Basidiomycetous Yeast, in *Systematic and Evolution Microbiology*. Springer, Heidelberg, Berlin.
- Fenina, S. 2012. Kemampuan Antagonisme Khamir Filum Basidiomycota Dari Tanaman Saeh (*Broussonetia papyrifera* Vent.) Asal Trowulan Terhadap *Aspergillus spp.* UICC. *Skripsi*. Department Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Depok.
- Guntoro, Y. P. 2013. Aktivitas dan Produktivitas Lebah *Tetragnola laeviceps* di Kebun Polikultur dan Monokultur Pala (*Myristica fragrans*). *Skripsi*. Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Hafsari, A. R. dan I. Asterina. 2013. Isolasi dan Identifikasi Kapang Endofit dari Tanaman Obat Surian (*Toona Sinensis*). *Jurnal Biodjati*. 8(2): 175–191.
- Handoyo, D. dan A. Rudiretna. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. *Unitas*. 9(1): 17–29.
- Hanum, L., Y. Windusari, A. Setiawan, Muharni, F. Adriansyah, dan A. A. Mubarak. 2018. Comparison Of CTAB Method and Wizard Genomic Dna Purification System Kit From Promega On DNA Isolation Of Local Varieties Of Rice Of South Sumatera. *Science & Technology Indonesia*. 3: 26–29.
- Hartawan, I. G., M. Arsyah, N. K. Ariati, dan I. N. Wirajana. 2015. Isolasi DNA Metagenomik dari Madu Dengan dan Tanpa Pengayaan Media LB (Luria-Bertani). *Jurnal Kimia*. 9(2): 189–195.
- Hasyiyati, N. S., A. Supriyadi, B. Raharjo, dan K. Dwiatmi. 2017. Isolasi dan Karakterisasi Kapang Endofit dari Pegagan (*Centella asiatica* (L.) URBAN)', *Jurnal Biologi*. 6(2): 66–74.
- Hidayati., E. Saleh, dan T. Aulawi. 2016. Identifikasi Keragaman Gen BMPR-1B (*Bone Morphogenetic Protein Receptor IB*) Pada Ayam Arab, Ayam Kampung, dan Ayam Ras Petelur Menggunakan PCR-RFLP. *Jurnal Peternakan*. 13(1): 1–12.
- Houbraken, J. dan P. S. Dyer. 2015. Induction of the Sexual Cycle in Filamentous

Ascomycetes, in *Genetic Transformation System in Fungi*. Volume 2. Springer International Publishing, Switzerland.

- Ichwan, F., D. Yoza, dan E. S. Budiani. 2016. Prospek Pengembangan Budidaya Lebah *Tetragonula sp.* di Sekitar Hutan Larangan Adat Rumbio Kabupaten Kampar. *Jom Faperta UR*. 3(2): 1–10.
- Indratmi, D. 2012. Pengembangan Teknologi Produksi Khamir *Rhodotorula sp.* Sebagai Agensia Pengendali Hayati Penyakit Antraknosa Pada Cabai. *Jurnal Gamma*. 7(2): 14–22.
- Ip, S. C., S. Lin, dan K. Lai. 2015. An Evaluation of The Performance of Five Extraction Methods: Chelex® 100, QIAamp® DNA Blood Mini Kit, QIAamp® DNA Investigator Kit, QiAsymphony® DNA Investigator® Kit and DNA IQ™. *Forensic Science Society*. 55(3): 200–208.
- Iqram, M. 2015. Optimasi PCR: Siklus dan Volume Templat DNA Pada Amplifikasi mtDNA Ikan Medaka *Oryzias spp.* di Daerah Aliran Sungai (DAS) Saddang. *Skripsi*. Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Joko, T., N. Kusumandari, dan S. Hartono. 2011. Optimasi Metode PCR untuk Deteksi *Pectobacterium carotovorum*, Penyebab Penyakit Busuk Lunak Angrek. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*. 17(2): 54–59.
- Joshi, M. dan J. D. Deshpande. 2011. Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research*. 2(1): 81–97.
- Jumiati., S. H. Bintari., dan I. Mubarak. 2012. Isolasi dan Identifikasi Khamir Secara Morfologi di Tanah Kebun Wisata Pendidikan Universitas Negeri Semarang. *Biosantifika*. 4(1): 27–35.
- Jutono., J. Soedarsono, S. Hartadi, S. Kabirun, D. Suhadi, dan Soesanto. 1980. *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum (Untuk Perguruan Tinggi)*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Kapitanhиту, R., T. D. Cahyono dan F. Kaliky. 2018. Keeratan Hubungan antara Dimensi Sarang Bambu dan Perkembangbiakan Lebah *Tetragonula sp.* *Jurnal Riset Industri*. 10(2): 83–92.
- Katsu, M., S. Kidd, A. Ando, M. L. Moretti-branchini, Y. Mikami, K. Nishimura, dan W. Meyer. 2004. The Internal Transcribed Spacers and 5.8s rRNA Gene Show Extensive Diversity Among Isolates of The *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *FEMS Yeast Research*. 4: 377–388.
- Khaerah, N. 2016. Isolasi dan Identifikasi Serta Uji Aktivitas Selulase Khamir dari Symbion Larva *Cossus-cossus*. *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar, Makassar.
- Kishan-Tej, M., M. R. Srinivan, K. Vijayakumar, N. Natarajan, dan S. M. Kumar. 2017. Morphometry Analysis of Stingless Bee *Tetragonula iridipennis* Smith (1854). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*.



2009. The Search for the Fungal Tree of Life. *Trends in Microbiology*. 17(11): 488–497.
- Michener, C. D. 2013. The Meliponini in *Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees*. Springer Science, New York.
- Mujiono, K., Witjaksono dan N. S. Putra. 2015. The Sex Pheromone Content of The Spodoptera Exigua (Hubner) Under Artificial and Natural Diets. *Internasional Journal of Science and Engineering*. 8(2):146–150.
- Muladno. 2010. *Teknologi Rekayasa Genetik Edisi Kedua*. Institut Pertanian Bogor Press., Bogor.
- Natarajan, V. P., X. Zhang, Y. Morono, F. Inagaki, dan F. Wang. 2016. A Modified SDS-Based DNA Extraction Method for High Quality Environmental DNA from Seafloor Environments. *Frontiers in Microbiology*. 7(986): 2–13.
- Nielsen, J., C. Larsson., A. V. Maris., dan J. Pronk. 2013. Metabolic Engineering of Yeast for Production of Fuels and Chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*. 24: 1–7.
- Nowack, E. C., dan M. Melkonian. 2010. Endosymbiotic Associations Within Protists. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences*. 365: 699–712.
- Pauly, A., S. R. Pedro., C. Rasmussen., dan D. W. Roubik. 2013. *Stingless Bees (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini) of French Guiana*. Chapter 5, *ResearchGate*.
- Pauly, A. dan Z. A. Hora. 2013. Apini and Meliponini from Ethiopia (*Hymenoptera: Apoidea: Apidae: Apinae*). *Belgian Journal of Entomology*, 16: 1–35.
- Pertiwi, N. P., I. G. Mahardika, dan N. L. Watiniasih. 2015. Optimasi Amplifikasi DNA Menggunakan Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Pada Ikan Karang Anggota Famili Pseudochromidae (DOTTYBACK) Untuk Identifikasi Spesies Secara Molekular. *Jurnal Biologi*. 19(2): 53–57.
- Pradhana, R. A., G. Mudjiono., dan S. Karindah. 2014. Keanekaragaman Serangga dan Laba-Laba Pada Pertanaman Padi Organik dan Konvensional. *Jurnal HPT Tropika*. 2(2): 58–66.
- Prakoso, S. P., I. N. Wirajana, dan I. W. Suarsa. 2016. Amplifikasi Fragmen Gen 18s rRNA Pada DNA Metagenomik Madu dengan Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). *Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences*. 2(3): 45–47.
- Priadie, B. 2012. Teknik Bioremediasi Sebagai Alternatif Dalam Upaya Pengendalian Pencemaran Air. *Jurnal Ilmu Lingkungan*. 10(1): 38–48.
- Prihartini, M. dan M. Ilmi. 2018. Karakterisasi dan Klasifikasi Numerik Khamir Madu Hutan dari Sulawesi Tengah. *Jurnal Mikologi Indonesia*. 2(2):112–127.
- Priyambada, C. R. 2015. Keragaman Khamir dari Sarang Lebah Madu Hutan.



- Roubik, D. W. dan J. E. Patino. 2009. *Tetragonula corvina*: An Ecological Study Based on Unusual Nest Structure and pollen Analysis. *Psyche*. 2(6): 1–7.
- Roux, K. H. 2009. Optimization and Troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harbor Protocols*. 4(4): 1–6.
- Ryan, S. J., D. R. Hinton., S. R. Sadda., P. Wiedemann., A. P. Schatchat., dan C. P. Wilkinson. 2013. *Retina*. 5<sup>th</sup> Edition. Elsevier Inc, Philadelphia, USA
- Saksinchai, S., M. Suzuki., P. Chantawannakul, M. Ohkuma., dan S. Lumyong. 2012. A Novel Ascosporeogenous Yeast Species, *Zygosaccharomyces siamensis*, and The Sugar Tolerant Yeasts Associated with Raw Honey Collected in Thailand. *Fungal Diversity*. 52: 123–139.
- Sambrook, J. dan D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanjaya, V., D. Astiani dan L. Sisillia. 2019. Studi Habitat dan Sumber Pakan Lebah Kelulut di Kawasan Cagar Alam Gunung Nyiut Desa Pisak Kabupaten Bengkayang. *Jurnal Hutan Lestari*. 7(2): 786–798.
- Sari, P. H., K. Nazip., dan E. Dayat. 2016. Jenis-Jenis Basidiomycota di Kawasan Air Terjun Curug pandan Kabupaten Lahat Serta Sumbangannya Pada Pembelajaran Biologi di SMA. *Jurnal Pembelajaran Biologi*. 3(1): 66–74.
- Savitri, N. P., E. D. Hastuti., dan S. W. Suedy. 2017. Kualitas Madu Lokal dari Beberapa Wilayah di Kabupaten Temanggung. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*. 2(1). 58–66.
- Schoch, C. L., G. Sung., F. Lopez-Giraldez., J. P. Townsend., J. Miadlikowska., V. Hofstetter., B. Robbertse., P. B. Matheny., F. Kauff., Z. Wang., C. Gueidan., R. M. Andrie., K. Trippe., L. M. Ciuffetti., A. Wynn., E. Fraker., B. P. Hodkinson., G. Bonito., J. Z. Groenewald., M. Arzanlou., G. S. Hoog., P. W. Crous., D. Hewitt., D. H. Pfister., K. Peterson., M. Gryzenhout., M. J. Wingfield., A. Aptroot., S. Suh., M. Blackwell., D. M. Hillis., G. W. Griffith., L. A. Castlebury., A. Y. Rossman., H. T. Lumbsch., R. Lücking., B. Budel., A. Rauhut., P. Diederich., D. Ertz., D. M. Geiser., K. Hosaka., P. Inderbitzin., J. Kohlmeyer., B. Volkman-Kohlmeyer., L. Mostert., K. O'Donnell., H. Sipman., J. D. Rogers., R. A. Shoemaker., J. Sugiyama., R. C. Sumerbell., W. Untereiner., P. R. Johnston., S. Stenroos., A. Zuccaro., P. S. Dyer., P. D. Crittenden., M. S. Cole., K. Hansen., J. M. Trappe., R. Yahr., F. Lutzoni., dan J. W. Spatafora. 2009. The Ascomycota Tree of Life: A Phylum-wide Phylogeny Clarifies the Origin and Evolution of Fundamental Reproductive and Ecological Traits. *Society of Systematic Biologists*. 58(2): 224–239
- Sha, S. P., A. Anupama., P. Pradhan., G. S. Prasad., dan J. P. Tamang. 2016. Identification of Yeasts by Polymerase-Chain-Reaction-Mediated Denaturing Gradient Gel Electrophoresis in *Marcha*, an Ethnic Amylolytic Starter of India. *Journal of Ethnic Foods*. 3(4): 292–296.
- Shihab, M. Q. 2002. *Tafsir Al-Misbah*. Lentera Hati, Jakarta.

- Shofiana, R. H., L. Sulistyowati., dan A. Muhibuddin. 2015. Eksplorasi Jamur Endofit dan Khamir Pada Tanaman Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) Serta Uji Potensi Antagonismenya Terhadap Jamur Akar Putih (*Rigidoporus microporus*). *Jurnal HPT*. 3(1): 75-83.
- Silva, G. A., T. L. Bernardi, P. D. Schaker, Menegotto, dan P. Valente. 2012. Rapid Yeast DNA Extraction By Boiling and Freeze-Thawing Without Using Chemical Reagents and DNA Purification. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 55(2): 319–327.
- Simbolon, N. C., I. M. Wijaya., dan I. B. Gunam. 2018. Isolasi dan Karakterisasi khamir Potensial Penghasil Bioetanol dari Industri Arak di Karangasem Bali. *Jurnal Rekayasa dan manajemen Agroindustri*. 6(4): 316–326.
- Soteropoulos, P. dan D. S. Perlin. 1998. Genetic Probing of the Stalk Segments Associated with M2 and M3 of the Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(41): 26426–26431.
- Sulandari, S. dan M. S. A. Zein., 2003. *Panduan Praktis Laboratorium DNA*. Bidang Zoologi Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Bogor.
- Sumerta, I. N. dan A. Kanti. 2017. Keragaman Jenis Khamir Penghasil Etanol yang Diisolasi dari Makanan Fermentasi di Kepulauan Riau. *Jurnal Biologi Indonesia*. 13(1): 61–69.
- Sunarno., F. Muna, N. Fitri, A. Malik, A. Karuniawati, dan A. Soebandrio. 2014. Metode Cepat Ekstraksi DNA *Corynebacterium diphtheriae* untuk Pemeriksaan PCR. *Buletin Penelitian Kesehatan*. 42(2): 85–92.
- Syafrizal, A., A. Bratawinata., M. Sila., dan D. Marji. 2012. Jenis Lebah Kelulut (*Trigona sp.*) di Hutan Pendidikan Lempake. *Mulawarman Scientifie*, 11(1): 11–18.
- Sym, S. D. dan G. W. Maneveldt. 2011. Chromista.. *Engineering in Life Science*, 3: 1–18.
- White, B. A. 2005. Polymerase Chain Reaction (PCR): Design and Optimization of Reactions. *Encyclopedia of Life Science*. 1(1): 1–4.
- Yurliasni dan Y. Zakaria, Y. 2013. Kajian Penambahan Khamir *Kluyveromyces lactis*, *Candida curiosa*, dan *Brettanomyces custersii* Asal Dadih Terhadap Konsentrasi Asam-Asam Amino, Lemak, Organik, dan karbohidrat Susu Kerbau Fermentasi (Dadiah). *Bionatura-Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati dan Fisik*. 15(1): 54–59.
- Yusuf, Z. K. 2010. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. *Saintek*. 5(6): 1–6.
- Yuwono, T. 2009. *Biologi Molekular*. Erlangga, Jakarta.
- Zein, M. S. dan D. M. Prawiradilaga. 2013. *DNA Barcode Fauna Indonesia*. Prenada Media, Jakarta

