OPTIMASI AMPLIFIKASI ITS rDNA KHAMIR MENGGUNAKAN METODE PCR YANG DIISOLASI DARI SARANG LEBAH MADU RAKSASA (*Apis dorsata*)

SKRIPSI

UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

Disusun Oleh :

CHUMAIDATUL CHOIRIYAH
H71216054

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

PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama	: Chumaidatul Choiriyah
NIM	: H71216054
Program Studi	: Biologi
Angkatan	: 2016

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul **"OPTIMASI AMPLIFIKASI ITS rDNA MENGGUNAKAN METODE PCR YANG DIISOLASI DARI SARANG LEBAH MADU APIS DORSATA (*Apis dorsata*)"**. 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, 7 Agustus 2020

Yang menyatakan,

Chumaidatul Choiriyah

NIM. H71216054

LEMBAR PERSETUJUAN PEMBIMBING

Proposal Skripsi oleh

NAMA : CHUMAIDATUL CHOIRIYAH

NIM : H71216054

JUDUL : OPTIMASI AMPLIFIKASI ITS rDNA KHAMIR MENGGUNAKAN METODE PCR YANG DIISOLASI DARI SARANG LEBAH MADU RAKSASA (*Apis dorsata*)

Telah diperiksa dan disetujui untuk diujikan.

Surabaya, 07 Agustus 2020

Dosen Pembimbing 1	Dosen Pembimbing 2
Nirmala Fitria Firdhausi, M.Si.	Esti Tyastirin, M.KM.
NIP 198506252011012010	NIP 198706242014032001

LEMBAR PENGESAHAN TIM PENGUJI

Skripsi Chumaidatul Choiriyah ini telah dipertahankan didepan Tim Penguji Skripsi di Surabaya, 07 Agustus 2020

Mengesahkan,

Dewan Penguji

Dosen Penguji I

Nirmala Fitria Firdhausi, M.Si.
NIP 198506252011012010

Dosen Penguji II

Esti Tyastirin, M.KM.
NIP 198706242014032001

Dosen Penguji III

Hanik Faizah, M.Si
NUP 201409019

Dosen Penguji IV

Ita Ainun Jariyah, M.Pd
NIP. 198612052019032012

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

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

Dipindai dengan CamScanner

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

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama	: CHUMAIDATUL CHOIRIYAH
NIM	: H71216054
Fakultas/Jurusan	: SAINS DAN TEKNOLOGI/ BIOLOGI
E-mail address	: Khoiriyahkoing@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 AMPLIFIKASI ITS rDNA KHAMIR MENGGUNAKAN METODE PCR YANG DIISOLASI DARI SARANG LEBAH MADU RAKSASA (Apis dorsata)

beserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Ekslusif 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

(Chumaidatul Choiriyah)

Dipindai dengan CamScanner

ABSTRAK

OPTIMASI AMPLIFIKASI ITS rDNA KHAMIR MENGGUNAKAN METODE PCR YANG DIISOLASI DARI SARANG LEBAH MADU RAKSASA (*Apis dorsata*)

Khamir merupakan salah satu jenis mikroorganisme uniselular yang dapat diperoleh dari sarang lebah madu seperti sarang lebah *Apis dorsata* yang selama ini belum banyak diteliti. Identifikasi pada isolat khamir dapat dilakukan dengan metode molekular menggunakan data sekuen gen yang terdapat pada rDNA salah satunya gen ITS. Keberhasilan identifikasi pada metode molekular dapat dipengaruhi oleh ekstraksi DNA dan amplifikasi DNA khamir harus dalam kondisi optimal. Oleh karena itu diperlukan optimalisasi dari metode ekstraksi DNA dan berbagai protokol amplifikasi agar diperoleh hasil yang baik. Tujuan penelitian ini yaitu mengetahui perbandingan hasil ekstraksi DNA dengan variasi suhu dan amplifikasi dari berbagai protokol PCR yang berbeda. Penelitian ini menggunakan protokol ekstraksi DNA referensi dari LIPI dengan variasi waktu inkubasi 10, 15, dan 20 menit pada suhu 98°C. Sedangkan amplifikasi DNA khamir menggunakan protokol dari Ediningsari (2008), Maulana (2011), dan Atit et al, (2018). Hasil dari penelitian diperoleh waktu yang paling optimal digunakan untuk ekstraksi DNA khamir dari sarang lebah Apis dorsata yaitu 10 menit yang di tunjukkan pada isolat K1 dengan konsentrasi 2.646 µl/mg dan kemurnian 1.896 dan isolat K4 dengan konsentrasi 1.052 µl/mg dan kemurnian 1.748. Hasil amplifikasi dari ketiga protokol menunjukkan panjang pita DNA yang berbeda-beda dan tidak semua isolat menghasilkan pita DNA. Protokol yang menghasilkan pita DNA pada semua isolat yaitu Atit et al (2018) dengan panjang pita masing-masing yaitu 503, 542, 492, dan 526 bp.

Kata Kunci : *Apis dorsata*, Khamir, Optimasi Amplifikasi ITS, , PCR

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF ITS rDNA KHAMIR AMPLIFICATION USING THE ISOLATION OF PCR METHOD FROM GIANT HONEY BEE (Apis dorsata)

Yeast is a type of unicellular microorganism that can be obtained from honey bee hives such as Apis dorsata beehive which has not been widely studied so far. Identification of yeast isolates can be done by molecular methods using gene sequence data contained in rDNA, one of which is the ITS gene. The success of identification in the molecular method can be influenced by DNA extraction and the amplification of yeast DNA must be in optimal conditions. Therefore, it is necessary to optimize the DNA extraction method and various amplification protocols in order to obtain good results. The purpose of this study is to determine the comparison of DNA extraction results with temperature variations and amplification from various different PCR protocols. This study uses a reference DNA extraction protocol from LIPI with incubation time variations of 10, 15, and 20 minutes at 98oC. Meanwhile, yeast DNA amplification used the protocol from Ediningsari (2008), Maulana (2011), and Atit et al, (2018). The results showed that the optimal time used for extracting yeast DNA from Apis dorsata bee hives was 10 minutes which was shown on K1 isolates with a concentration of 2,646 µl / mg and a purity of 1,896 and isolates of K4 with a concentration of 1,052 µl / mg and a purity of 1,748. The amplification results of the three protocols showed different lengths of DNA bands and not all isolates produced DNA bands. The protocol that produced DNA bands in all isolates was Atit et al (2018) with a band length of 503, 542, 492, and 526 bp.

Key Words : *Apis dorsata*, Optimization of ITS Amplification, PCR, Yeast

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

DAFTAR ISI

Halaman Judul i
Lembar Persetujuan Pembimbing ii
Lembar Pengesahan Penguji iii
Halaman Pernyataan Keaslian Karya Ilmiah. iv
Halaman Pernyataan Publikasi v
Halaman Motto vi
Lembar Persembahan vii
Kata Pengantar viii
Abstrak x
Abstract xi
Daftar Isi xii
Daftar Tabel xiv
Daftar Gambar xv
BAB I PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 7
1.3 Tujuan Penelitian 8
1.4 Manfaat Penelitian 8
1.5 Batasan Masalah 8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA 10
2.1 Khamir 10
2.2 Lebah Madu 21
2.3 Lebah Madu *Apis dorsata* 27
2.4 Identifikasi Khamir 34
2.5 Daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) 37
2.6 Isolasi DNA 38
2.7 *Polymerase Chain Reaction* (PCR) 39
2.8 Elektroforesis 41
BAB III METODE PENELITIAN 43
3.1 Rancangan Penelitian 43

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian 43
3.3 Alat dan Bahan Penelitian 44
3.4 Prosedur Penelitian 46
3.5 Analisis Data 50
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN 52
4.1 Isolasi Sampel Pada Medium PDA 52
4.2 Karakteristik Isolat Khamir 57
4.3 Ekstraksi DNA Khamir 58
4.4 Optimasi Amplifikasi ITS rDNA Khamir. 61
BAB V PENUTUP 68
5.1 Simpulan 68
5.2 Saran 69
DAFTAR PUSTAKA 70
LAMPIRAN 76

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Habitat Alami Khamir 21
Tabel 3.1 Jadwal Kegiatan Penelitian 43
Tabel 3.2 Resep Pembuatan *Cocktail* Reaksi PCR 49
Tabel 3.3 Pengaturan Suhu PCP Protokol Maulana 49
Tabel 3.4 Pengaturan Suhu PCR Protokol Ediningsari 50
Tabel 3.5 Pengaturan Suhu PCR Protokol Atit 50
Tabel 4.1 Hasil Isolat Khamir Secara Makroskopis 54
Tabel 4.2 Hasil Isolat Khamir Secara Mikroskopis 55
Tabel 4.3 Data Hasil Spektrofotometri Inkubasi 10 Menit 59
Tabel 4.4 Data Hasil Spektrofotometri Inkubasi 15 Menit 60
Tabel 4.5 Data Hasil Spektrofotometri Inkubasi 20 Menit 60
Tabel 4.6 Perbandingan Panjang Pita DNA 67

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Sel Khamir dan Organel-organelnya 11
Gambar 2.2 Macam-macam Bentuk Sel Khamir 13
Gambar 2.3 Macam-macam Taksa Lebah 25
Gambar 2.4 Struktur Eksternal Lebah..... 26
Gambar 2.5 Anatomi Ekternal Lebah 27
Gambar 2.6 Lebah Madu Pekerja Deawasa 29
Gambar 2.7 Drone *Apis dorsata* 30
Gambar 2.8 Sarang Lebah Madu 33
Gambar 2.9 Sarang Lebah Apis dorsata..... . 34
Gambar 2.10 Daerah Ribosomal DNA 37
Gambar 2.11 Susunan Dasar Elektroforesis..... 42
Gambar 4.1 Isolat Khamir Pada Medium PDA 53
Gambar 4.2 Isolat Khamir Secara Mikroskopis. 55
Gambar 4.3 Pita DNA Hasil Amplifikasi Protokol Ediningsari. 63
Gambar 4.4 Pita DNA Hasil Amplifikasi Protokol Maulana..... 64
Gambar 4.5 Pita DNA Hasil Amplifikasi Protokol Atit 64

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

BAB I
PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Khamir merupakan salah satu jenis mikroorganisme yang bersifat uniselular golongan eukariotik dan pada umumnya hidup sebagai saprofit maupun parasit. Reproduksi pada khamir dapat dilakukan secara aseksual yaitu membentuk budding atau fussion sedangkan reproduksi seksual dengan membentuk spora. Secara taksonomi, khamir termasuk dalam kingdom fungi dan termasuk ke dalam filum Ascomycota dan Basidiomycota (Anjani & Ilmi, 2018).

Di Indonesia khamir yang merupakan kelompok fungi uniselular banyak dijumpai dihutan hujan tropis. Isolat-isolat khamir yang telah teridentifikasi dari jumlah perkiraan keanekaragaman khamir di dunia masih sekitar 1% dari total 89 genera khamir yang ada dalam daftar monograf khamir (Ashliha & Alami, 2014).

Khamir sudah sejak lama dimanfaatkan dalam berbagai pembuatan makanan dan minuman terfermentasi seperti tuak, bir, tapai, dan wine. Peranan khamir pada proses fermentasi yaitu mendegradasi substrat supaya emembentuk struktur, aroma, dan juga tekstur pada makanan maupun minuman (Sumerta & Kanti, 2016). Seiring berkembangnya teknologi pemanfaatan khamir tidak hanya sebatas pada sektor industri, namun juga digunakan pada sektor energi yang mengembangkan energi terbaharukan seperti bioetanol dan biofuel yang menjadi pengganti alternatif bahan bakar fosil.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Penelitian terkait dengan peran khamir dalam menghasilkan etanol di Indonesia sudah banyak dilakukan dengan memanfaatkan berbagai substrat alternatif. Jenis khamir yang dipergunakan pada umumnya masih satu jenis khamir yaitu *Saccharomyces cerevisiae*. Oleh sebab itu, perlu adanya usaha *bioprospecting* untuk mendapatkan isolat-isolat khamir dalam menambah pengetahuan mengenai jenis-jenis khamir lokal yang dapat dimanfaatkan dalam berbagai sektor (Sumerta & Kanti, 2016).

Isolat-isolat khamir dapat diperoleh dari sarang lebah madu. Sarang lebah merupakan suatu sel-sel yang bentuknya hexagonal terbuat dari malam lebah tercampur dengan propolis yang berasal dari tumbuh-tumbuhan. Sarang lebah tersebut digunakan sebagai penampungan madu, tepung sari (pollen), dan larva (Situmorang & Aam Hasanudin, 2014). Madu yang dihasilkan lebah dari nektar dijadikan sebagai pakan yang disimpan dalam sarang. Nektar merupakan senyawa kompleks yang disekresikan dari kelenjar "*necterifier*" tanaman dalam bentuk larutan gula yang bervariasi. Nektar memiiki komponen utama yang terdiri atas sukrosa, glukosa, dan fruktosa. Selain itu, terdapat juga zat-zat gula lainnya yaitu maltose, rafinosa, melibiosa, dan turunan karbohidrat lainnya. Khamir yang ada di dalam madu berperan dalam proses fermentasi dengan mendegradasi gula menjadi alkohol. Jika alkohol tersebut bereaksi dengan oksigen, akan terbentuk asam bebas seperti asam oksalat dan asam asetat yang berpengaruh terhadap tingkat rasa, aroma madu dan keasaman (Savitri *et al*., 2017). Tingkat kadar keasaman dijadikan suatu indikator telah terjadinya proses perubahan alkohol menjadi asam organik. Hal tersebut yang membuat kandungan alkoholnya terkonversi. Standart

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

kadar keasaman madu berdasarkan SNI, (2004) yaitu maksimal 40 ml (Wulandari, 2017).

Madu merupakan substansi alam yang kental dan memiliki rasa yang manis. Jenis madu di Indonesia beragam-ragam, dibedakan dari jenis tanaman yang menjadi sumber nektarnya. Sumber madu yang beragam tersebut menjadikan madu sebagai sumber keragaman khamir yang menarik untuk diungkap. Lebah yang menghasilkan madu di Indonesia salah satunya adalah lebah madu raksasa (*Apis dorsata*). Lebah *Apis dorsata* adalah lebah madu asli Indonesia yang mempunyai ukuran tubuh terbesar dan menghasilkan madu lebih banyak daripada jenis lebah yang lainnya. Madu yang dihasilkan tersebut mempunyai banyak manfaat terutama bagi manusia. Di dalam Al-quran telah dijelaskan bahwa manfaat madu dapat dijadikan obat untuk menyembuhkan suatu penyakit, terutama pada penyakit jasmani. Sebagaimana yang tertuang dalam QS al-Nahl/16 ayat 68-69 yang berbunyi :

وَأَوْحَىٰ رَبُّكَ إِلَى النَّحْلِ أَنِ اتَّخِذِي مِنَ الْجِبَالِ بُيُوتًا وَمِنَ الشَّجَرِ وَمِمَّا يَعْرِشُونَ (68)

ثُمَّ كُلِي مِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلُلًا ۚ يَخْرُجُ مِنْ بُطُونِهَا شَرَابٌ مُخْتَلِفٌ أَلْوَانُه فِيهِ شِفَاءٌ لِلنَّاسِ ۗ

إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَآيَةً لِقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ (69)

Artinya :

Dan tuhanmu mengilhamkan kepada lebah,"buatlah sarang di gunung-gunung, di pohon-pohon dan di tempat-tempat yang dibikin manusia, kemudian makanlah dari segala (macam) buah-buahan lalu tempulah jalan tuhanmu yang telah dimudahkan (bagimu),"dari perut lebah itu keluar minuman (madu) yang bermacam-macam warnanya, di dalamnya terdapat obat yang menyembuhkan bagi manusia. Sungguh, pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berfikir.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Berdasarkan ayat diatas lebah telah dianugerahi menjadi sumber obat bagi manusia. Bahkan lebah sendiri memiliki kedudukan istimewa dalam islam dibuktikan dengan surat al-Nahl yang artinya sendiri adalah lebah. Nabi Muhammad SAW sendiri menggangap bahwa madu yang dihasilkan oleh lebah merupakan obat untuk segala penyakit sedangkan Al-quran penyembuh didalam dada.

Menurut Tafsir Al-Muyassar / Kementerian Agama Saudi Arabia ayat 68-69 pada surat An-Nahl "Dan Rabbmu – wahai Rasul- telah mengilhamkan kepada lebah dan membimbingnya agar mengambil sarang di gunung-gunung, pepohonan dan pada tempat-tempat yang dibangun dan diberi atap oleh manusia. Kemudian makanlah makanan yang kalian inginkan berupa buah-buahan, titilah jalan-jalan yang diilhamkan oleh tuhanmu agar kamu menitinya dengan mudah. Dari perut lebah itu keluar madu yang warnanya berbeda-beda, ada yang putih, kuning dan lainnya, ia mengandung kesembuhan bagi orang, dengannya mereka mengobati berbagai macam penyakit. Sesungguhnya dalam ilham tuhanmu kepada lebah dan pada madu yang keluar dari perutnya terdapat bukti kekuasaan Allah dan pengaturannnya terhadap urusan makhluk-makhluk-nya bagi kaum yang memikirkan, mereka adalah orang-orang yang mengambil pelajaran". Dari surat tersebut kita dapat mempelajari morfologi, sifat, dan manfaat dari lebah termasuk madu yang dihasilkannya serta mikroorganisme yang berhubungan didalamnya.

Berdasarkan latar belakang tersebut diperlukan penelitian dalam menemukan isolat-isolat khamir pada sarang lebah madu raksasa (*Apis dorsata*). Teknik identifikasi pada khamir umumnya menggunakan

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

identifikasi secara konvensional berdasarkan morfologi yaitu pengamatan makroskopis dan pengamatan mikroskopis. Identifikasi secara konvensional juga dapat dilakukan dengan uji biokimia dan fisiologi yang meliputi kemampuan fermentasi gula, kebutuhan vitamin, suhu yg dibutuhkan untuk pertumbuhan, uji urease dan kemampuan asimilasi unsur karbon dan nitrogen, ketahanan terhadap *cycloheximide* (Rukmana, 2015).

Metode identifikasi isolat khamir konvensional berdasarkan uji fisiologi, biokimia, maupun morfologi tersebut mempunyai beberapa kekurangan yaitu proses pengerjaan membutuhkan waktu yang lama dan rentan terhadap kesalahan identifikasi terutama pada spesies yang berkerabat dekat. Hal tersebut disebabkan karakter morfologi pada khamir yang terbatas untuk identifikasi dan minimnya sumber referensi, oleh karena itu diperlukan metode yang dapat mengatasi kekurangan tersebut yaitu identifikasi menggunakan marka molekular untuk menambah keakuratan hasil identifikasi keragaman isolat khamir (Maulana, 2011).

Salah satu teknik molekular yang digunakan dalam identifikasi spesies adalah teknik molekular konvensional. Identifikasi khamir melalui teknik molekular saat ini dilakukan menggunakan data sequence gen. biasanya gen yang digunakan dalam identifikasi khamir dengan akurat dan cepat yaitu gen yang terdapat di ribosomal DNA (rDNA). Salah satu gen tersebut adalah *internal transcribed spacer* (ITS) yang merupakan daerah non-coding pada ribosomal DNA. Pada penelitian ini digunakan daerah tersebut karena ITS mempunyai variasi urutan nukleotida yang tinggi antar spesies bahkan daerah tersebut berguna dalam mengindentifikasi khamir yang memiliki kekerabatan

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

sangat dekat (Maulana, 2011).

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ediningsari (2008), menunjukkan bahwa dari 12 isolat khamir, 4 isolat diisolasi dari perairan mangrove Cagar Alam Pulau Rambut dan 8 isolat lainnya diisolasi dari perairan laut sekitar Cagar Alam Pulau Rambut menggunakan daerah *internal transcribed spacer* (ITS) terdiri dari 10 spesies yang tergolong dalam 4 genus dengan 4 spesies yang merupakan spesies baru, 2 genus dari Filum Ascomycota yaitu *Candida* dan *Debaromyces* dan 2 genus lainnya termasuk Filum Basidiomycota yaitu *Rhodotula* dan *Trichosporon*, sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Anggraini *et al.* (2019), menunjukkan bahwa isolat khamir dari batang tanaman tebu yang diidentifikasi secara morfologi, biokimia, dan menggunakan teknik molekular berdasarkan daerah ITS, isolat khamir tersebut adalah *Kodamaea ohmeri* atau *Pichia omeri.*

Penelitian yang dilakukan oleh Maulana (2011), menunjukkan bahwa spesies khamir yang diisolasi dari saluran pencernaan lebah madu Apis cerana. Terdapat 48 isolat khamir yang diidentifikasi secara morfologi dan teknik molekular berdasarkan data sekuen daerah ITS terdiri atas 8 genus dan 16 spesies yang termasuk dalam Filum Ascomycota Kelas Hemiascomycetes dan Filum Basidiomycota Kelas Urediniomycetes dari penelitian tersebut juga ditemukan spesies baru yaitu sejumlah 20 isolat khamir. Berdasarkan data tersebut menunjukkan bahwa sekuen daerah ITS dapat digunakan untuk identifikasi khamir.

Amplifikasi DNA khamir dilakukan menggunakan mesin *Thermo Cycler* dengan sepasang primer *forward* dan *reverse*. Hasil dari proses PCR

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

tersebut akan divisualisasi menggunakan *Gel documentary* untuk melihat pita DNA dari produk PCR. Keberhasilan dalam proses tersebut dipengaruhi oleh ekstraksi DNA khamir dan amplifikasi DNA khamir harus dalam kondisi yang optimal maka dari itu diperlukan optimalisasi amplifikasi ITS rDNA khamir menggunakan metode PCR yang di isolasi dari sarang lebah madu raksasa (*Apis dorsata*). Dari optimalisasi tersebut diharapkan dapat memperoleh protokol yang tepat untuk amplifikasi ITS rDNA khamir dan bermanfaat bagi penelitian terkait identifikasi menggunakan metode molekular.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang diteliti pada penelitian ini adalah :

1. Jenis-jenis khamir apa yang teridentifikasi pada sarang lebah madu raksasa (*Apis dorsata*) berdasarkan pengamatan makroskopis dan mikroskopis ?
2. Bagaimana perbandingan hasil ekstraksi DNA khamir dari sarang lebah madu (*Apis dorsata*) menggunakan beberapa variasi waktu inkubasi ?
3. Bagaimana perbandingan hasil amplifikasi ITS rDNA khamir menggunakan berbagai protokol suhu dan waktu PCR yang berbeda ?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian yang diteliti pada penelitian ini adalah :

1. Mengetahui jenis-jenis khamir yang teridentifikasi pada sarang lebah madu raksasa (*Apis dorsata*) berdasarkan pengamatan makroskopis dan mikroskopis

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

2. Mengetahui perbandingan hasil ekstraksi DNA khamir dari sarang lebah madu (*Apis dorsata*) menggunakan beberapa variasi waktu inkubasi
3. Mengetahui perbandingan hasil amplifikasi ITS rDNA khamir menggunakan berbagai protokol suhu dan waktu PCR yang berbeda ?

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah :

1. Menambah pengetahuan tentang jenis-jenis khamir yang teridentifikasi pada sarang lebah madu raksasa (Apis dorsata) berdasarkan pengamatan makroskopis dan mikroskopis
2. Memberikan informasi terkait perbandingan hasil ekstraksi DNA khamir dari sarang lebah madu (*Apis dorsata*) menggunakan beberapa variasi waktu inkubasi
3. Menggali informasi terkait perbandingan hasil amplifikasi ITS rDNA khamir menggunakan berbagai protokol suhu dan waktu PCR yang berbeda ?

1.5. Batasan Masalah

1. Sarang yang digunakan pada isolasi khamir adalah sarang *Apis dorsata***.**
2. Primer yang digunakan dalam amplifikasi yaitu ITS4 (5’TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’) sebagai primer *reverse* dan ITS5 (5’GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3’) sebagai primer *forward* [Sigma Genosys).
3. Teknik yang digunakan dalam optimasi amplifikasi ITS rDNA khamir adalah teknik molekular konvensional.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

4. Protokol optimasi amplifikasi ITS rDNA khamir yaitu protokol Ediningsari (2008), Maulana (2011), dan Atit, *et al* (2018).
5. Lokasi pengambilan sampel yaitu, di wilayah Resort Darungan Lumajang Jawa Timur.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

BAB 11
TINJAUAN PUSTAKA

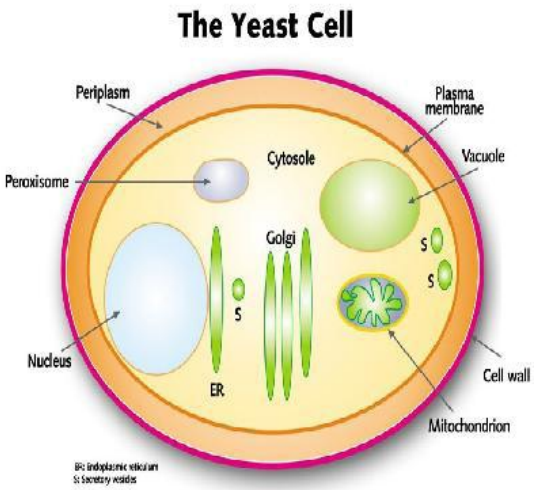
2.1. Khamir

2.1.1. Karakteristik Umum Khamir

Khamir merupakan fungi mikroskopis yang karakteristik utamanya uniselular, dan bereproduksi secara aseksual maupun seksual. Khamir adalah jamur eukariotik dengan sifat yang sangat berbeda dari bakteri yang bersifat Prokaryotes. Sebagai contoh, khamir memiliki resistensi terhadap antibiotik, sulfamida dan agen anti-bakteri lainnya. Perlawanan ini secara genetik dan alami, serta tidak dapat dimodifikasi atau ditransmisikan ke mikroba lain. Selain itu, ukuran partikel khamir (5 × 10μm) juga secara signifikan lebih tinggi dari ukuran bakteri (0,5 × 5μm) (Montes *et al.*, 2016).

Organel yang terdapat pada khamir, hampir sama seperti sel eukariotik pada umumnya. Nucleus, apparatus golgi, mitokondria, reticulum endoplasma, vakuola, dan sitoskeleton adalah organel yang paling penting pada khamir (Montes et al., 2016). Terdapat beberapa spesies khamir yang mempunyai sifat dimorphic yaitu dalam fase hidupnya dapat membentuk fase hifa atau mycelium phase dan fase uniseluler atau yeast-phase pada siklus hidupnya. Sifat khamir yang dimorphic tersebut dikenal juga dengan yeast-like fungi (Maulana, 2011).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id



Gambar 2.1. Sel Khamir dan Organel-organelnya
(Sumber : (Montes *et al.*, 2016).

Sel khamir umumnya memiliki ukuran lebih besar dibandingkan kebanyakan bakteri, akan tetapi khamir yang paling kecil ukurannya tidak sebesar bakteri yang terbesar. Ukuran pada sel khamir beragam-ragam, biasanya berbentuk bulat telur. Terdapat juga beberapa yang berbentuk bola atau memanjang. Setiap spesies khamir memiliki bentuk yang khas, meskipun dalam biakan murni terdapat variasi yang luas dalam segi ukuran dan bentuk sel-sel individu. Hal tersebut tergantung pada umur dan lingkungannya (Pelczar & Chan, 2013). Ukuran yang berbeda-beda pada khamir tersebut telah dijelaskan dalam ayat Al-quran yang menerangkan bahwa Allah SWT telah menciptakan segala sesuatu dipermukaan bumi yang beranekaragam jenis dengan sifatnya masing-masing, baik yang dapat dilihat secara kasat mata ataupun tidak. Hal tersebut menunjukkan kebesaran Allah SWT yang dijelaskan dalam Al-Quran surah Al-Furqon (25):2

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

الَّذِي لَهُ مُلْكُ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَلَمْ يَكُنْ لَهُ شَرِيكٌ فِي الْمُلْكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَّرَهُ تَقْدِيرًا

Artinya

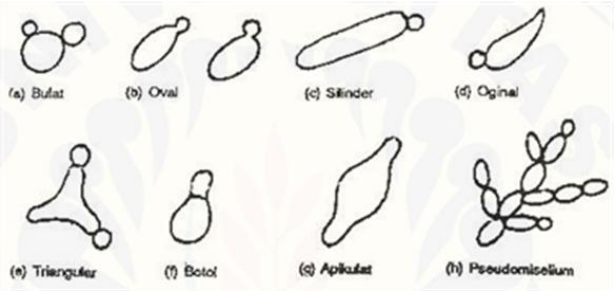
"*Yang memiliki kerajaan langit dan bumi, tidak mempunyai anak, tidak ada sekutu baginya dalam kekuasaannya dan dia menciptakan segala sesuatu, lalu menetapkan ukuran-ukurannya dengan tepat*."(Q.S Al-Furqon:2).

Menurut tafsir al-Misbah yang menjelaskan bahwa Allah SWT telah menciptakan segala sesuatu yang terdapat di alam semesta ini dengan bervariasi, terciptalah makhluk dengan karakter dan ukuran yang berbeda-beda.

Khamir adalah organisme heterotrofik yang memerlukan senyawa organik untuk nutrisinya. Khamir umumnya hidup sebagai parasite ataupun saprofit yaitu hidup dari benda organik mati yang terlarut. Khamir dapat dijumpai ditanah, udara, perairan, dan kulit binatang. Selain itu, khamir juga dapat ditemukan pada makanan yang mengandung gula, buah-buahan serta biji-bijan (Suryaningsih *et al.*, 2018).

Khamir mempunyai sel vegetatif uniseluler yang biasanya mebentuk miselium sejati atau palsu yang disebut pseudomiselium. Koloni berwarna mengkilat terlihat seperti mentega. Terdapat berbagai macam bentuk pada sel khamir meliputi : bentuk silinder, bentuk botol, oval, bulat, bentuk lemon atau alpukat, dan segitiga melengkung. Khamir adalah organisme non-motil karena tidak memiliki alat gerak seperti flagella atau flagellum (Rini, 2017).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id



Gambar 2.2. Macam-macam bentuk sel khamir
(Sumber : Rini, 2017)

2.1.2. Taksonomi Khamir

Khamir merupakan mikroorganisme yang termasuk dalam kingdom Fungi yang terbagi atas dua filum yaitu Ascomycota dan Basidiomycota. Pada filum Ascomycota terdiri dari tiga kelas yaitu Hemiascomycetes, Archiascomycetes, dan kelas Euascomycetes. Pada khamir golongan Ascomycota memiliki fase reproduksi secara seksual dengan terbentuknya spora dalam struktur seperti kantung yang disebut askospora dan reproduksi secara aseksual yaitu dengan membentuk tunas holoblastik. Sedangkan pada filum Basidiomycota ada tiga kelas yaitu, Ustilaginomycetes, Urediniomycetes, dan Hymenomycete (Maulana, 2011).

Kelompok khamir ini bereproduksi secara seksual dengan menghasilkan basidiospora pada basidium yaitu suatu struktur yang berbentuk gada dan reproduksi aseksualnya dengan membentuk tunas secara enteroblastik. Selain itu, kelompok khamir Basidiomycota dari beberapa genusnya bisa menghasilkan teliospora yaitu suatu spora seksual yang mempunyai dinding tebal sebagai tempat terjadinya kariogami untuk menghasilkan basidiospora. Perbedaan khamir pada filum Ascomycota dan Basidiomycota dapat dilihat dari dinding

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

selnya yaitu dinding sel khamir dari kelompok Ascomycota terdiri atas dua lapis atau bilayer dan dinding sel khamir pada kelompok Basidiomycota memiliki banyak lapis atau multilayer (Maulana, 2011).

Khamir berdasarkan jenis reproduksi seksualnya terbagi menjadi dua tipe yakni khamir teleomorfik dan khamir anamorfik. Khamir yang memiliki tipe teleomorfik merupakan khamir yang telah diketahui jenis reproduksi seksualnya, sedangkan khamir yang memiliki tipe anamorfik merupakan khamir yang belum diketahui jenis reproduksi seksualnya. Masing-masing kelompok khamir ini memiliki contoh organismenya antara lain, *Candida* adalah contoh dari khamir Ascomycota anamorfik. *Rhodotorula F.C.* adalah contoh dari khamir Basidiomycota anamorfik. Genus *Debaryomyces* dan *Pichia E.C* adalah contoh dari khamir Ascomycota teleomorfik. *Filobasidium olive* adalah contoh dari khamir Basidiomycota teleomorfik. Khamir juga dapat diklasifikasikan berdasarkan tipe pertumbuhannya pada makanan, antara lain *alkohol yeast, apiculate* atau *lemon shape yeast, film yeast, food* dan *feed yeast,lactose fermenting yeast,* dan *osmofilic yeast* (Kurtzman *et al.*, 2011).

Alkohol yeast merupakan tipe khamir yang berfungsi dalam fermentasi alkohol. Adapun khamir yang termasuk ke dalam tipe ini adalah *Saccharomyces*. *Apiculate* atau *lemon shape yeast* merupakan khamir yang memiliki kemampuan dalam mengacaukan proses fermentasi wine, menimbulkan adanya *off-flavor*, mampu membentuk

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

asam volatil tinggi dan alkohol. Adapun contoh khamir yang termasuk ke dalam tipe ini adalah *Kloeckera, Hanseniospora, Nadsodia,* dan *Sacchomycodes*. *Film yeast* merupakan tipe khamir yang dapat melakukan metabolisme pada permukaan makanan dengan sifat yang asam, memiliki kemampuan dalam oksidasi asam organik, dan resisten terhadap kondisi lingkungan yang asam. Adapun contoh khamir yang termasuk ke dalam tipe ini adalah *Trichosperon, Pichia, Hansenulla, Debaryomyces,* dan *Candida* (Maulana, 2011).

Food dan *feed yeast* merupakan tipe khamir yang sering dimanfaatkan sebagai bahan pangan dan bahan pakan ternak, biasanya khamir ini di gunakan dalam bentuk protein sel tunggal atau yang akrab disebut PST. *Lactose fermenting yeast* merupakan tipe khamir yang memiliki kemampuan dalam memfermentasi jenis karbohidrat sederhana seperti laktosa yang terkandung di dalam susu. Adapun contoh khamir yang termasuk ke dalam tipe ini adalah *Saccharomyces lactis* dan *Saccharomyces fragilis*. *Osmofilic yeast* merupakan tipe khamir yang resisten terhadap lingkungan dengan kandungan gula dan garam yang tinggi (Sumerta & Atit Kanti, 2017).

Khamir dengan tipe ini mampu hidup pada lingkungan yang memiliki *aw* sebesar 0,62 hingga 0,65 bahkan ada yang mampu tumbuh pada *aw* 0,78. Adapun contoh tipe khamir yang termasuk ke dalam tipe ini adalah *Saccharomyces mellis* dan *Saccharomyces rouxii*, bahkan hampir semua khamir yang resisten terhadap kondisi lingkungan yang mengandung garam tinggi juga termasuk ke dalam

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

khamir tipe *film yeast* yakni seperti *Trichosporon, Torulopsis, Pichia, Debaryomyces, Candida,* dan *Brettanomyces* (Maulana, 2011).

Aturan pada taksonomi khamir dan jamur lain berada di bawah wewenang Kode Nomenklatur Botani Internasional. Versi terbaru dari Kode Nomenklatur ini diadopsi di Fifteenth Kongres Botani Internasional, Yokohama, Jepang, pada tahun 1993, dan telah diterbitkan oleh Koeltz Scientific Books, D-61453 Konigstein, Jerman (Kurzmant & Fell, 1998).

2.1.3. Deskripsi Taxa Baru pada Khamir

Publikasi spesies baru harus mencakup deskripsi karakter yang penting untuk membedakan takson dari spesies yang sudah ada sebelumnya. Sejak tahun 1 januari 1935, uraian atau diagnosis harus diberikan dalam bahasa latin. Kegagalan untuk mematuhi persyaratan ini menghasilkan spesies yang dideskripsikan secara tidak benar yang disebut "nomen invalidum" (nom.inval). Nomen invalidum juga terjadi jika publikasi tidak dalam jumlah ilmiah yang di akui. Spesies baru yang ditetapkan tanpa deskripsi atau diagnosis, maka spesies tersebut tidak valid dan disebut "nomen nudum" (nom.nud). Nama taksa harus diberikan dalam bahasa latin atau dirubah sedemikian rupa sehingga mengikuti aturan deri;gvasi latin. Jika sebuah nama dibuat secara tidak benar, dapat di anggap sebagai "kesalahan ortografis" dan harus segera diperbaiki. Sedangkan aturan untuk mendeskripsikan genera baru, family, dan ordo sama dengan aturan untuk menggambarkan spesies baru (Kurzmant & Fell, 1998).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

2.1.4. Phylum Khamir

a. Phylum Ascomycota

Filum Ascomycota merupakan kelompok jamur terbesar, diperkirakan mencakup lebih dari 32.000 spesies yang dijelaskan dalam 3400 genera. Ciri khas dari kelompok ini adalah bahwa spora yang diproduksi secara seksual, askospora, terkandung di dalam kantung, ascus. Pada kebanyakan ascomycota, ascus mengandung delapan ascospora. Kebanyakan ascomycota dikenali dari tubuh buahnya atau ascocarps, yaitu struktur yang mengelilingi ASCI. Terdapat tiga Class pada Phylum Ascomycota yaitu sebagai berikut :

1) Class Archiascomycetes

Khamir Pada Class Archiascomycetes mempunyai ciri-ciri yaitu, askusnya tidak tertutupi oleh askokarp atau tubuh buah, dinding selnya bilayer, dan reproduksi secara aseksual dengan membentuk pertunasan melalui pembelahan sel (fussion) atau enteroblastik. Beberapa analisis filogenetik independen dari data sekuens DNA telah mengelompokkan berbagai genera ascomycetes yang tampaknya sangat beragam. Kelompok ini dianggap sebagai yang tertua dari tiga garis keturunan evolusi luas Ascomycota dan dengan demikian dinamakan Archiascomycetes. Class Archiascomycetes terdiri dari genus Taphrina dan Protomyces, yang merupakan patogen tanaman biotropik

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

fakultatif, dan khamir fisi saprotropik Schizosaccharomyces. dan khamir anamorphic Saitoella. Secara total, kelas Archiascomycetes saat ini mengandung sekitar 150 spesies dalam 10 genera (Webster & Weber, 2007).

2) Class Hemiascomycetes

Khamir Pada Class Hemiascomycetes mempuanyai ciri-ciri yaitu, , askusnya tidak tertutupi oleh askokarp atau tubuh buah, dinding selnya bilayer, dan reproduksi secara aseksual dengan membentuk pertunasan melalui pembentukan arthrokonidia atau holoblastik.

3) Class Euascomycetes

Khamir pada Class Euascomycetes mempunyai askus yang ditutupi oleh askokarp atau tubuh buah. Kelompok khamir yang termasuk Class ini yaitu yeast-like fungi (Maulana, 2011).

b. Phylum Basidiomycota

Istilah “basidiomycota” berasal dari bahasa Yunani, yaitu dari kata basidium yaitu suatu tahapan diploid dalam daur hidup Basidiomycota yang berbentuk seperti gada. Pada umumnya jamur ini merupakan saproba yang penting. Aktivitasnya adalah menguraikan polimer lignin pada kayu dan berbagai bagian stumbuhan yang lain. Cara perkembangbiakan Basidiomycota dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu secara generatif (seksual) dan secara vegetatif (aseksual). Jamur ini bereproduksi

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

secara seksual dengan membentuk basidia yang kemudian menghasilkan basidiospora di dalam tubuh buah yang disebut basidioma atau basidiokarp. Sedangkan Reproduksi secara aseksual terjadi dengan membentuk konidiospora. Konidia adalah spora yang dihasilkan dengan jalan membentuk sekat melintang pada ujung hifa atau dengan diferensiasi hingga terbentuk banyak konidia. Hifa haploid yang sudah dewasa akan menghasilkan konidiofor (tangkai konidia).Pada ujung konidiofor kemudian terbentuk spora. Lalu spora tersebut akan diterbangkan oleh angin. Apabila kondisi lingkungan menguntungkan, maka konidia akan berkecambah menjadi hifa yang haploid (Webster & Weber, 2007).

1) Class Ustilaginomycetes

Khamir pada Class Ustilaginomycetes mempunyai dinding sel yang mengandung gula seperti mannosa, galaktosa, dan glukosa. Khamir yang termasuk dalam Class Ustilaginomycetes teleomorfik yaitu genus Ustilago dan yang termasuk anamorfik yaitu genus Pseudozyma.

2) Class Urediniomycetes

Khamir pada Class Urediniomycetes berdasarkan ciri morfologi dan ekologinya adalah golongan khamir yang beragam-ragam yang bersifat parasit maupun saprofit. Khamir yang termasuk Class Urediniomycetes teleomorfik yaitu genus Rhodosporidium, dan Filobasidium sedangkan yang anamorfik

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

contohnya yaitu genus Rhodotorula, Vuillemin, dan Cryptococcus.

3) Class Hymenomycetes

Khamir pada Class Hymenomycetes mempunyai dinding sel dengan kandungan gula meliputi xylosa, mannosa, dan glukosa serta khamir Class ini mempunyai septa tipe dolipore. Khamir yang termasuk Class Hymenomycetes teleomorfik yaitu genus Bulleromyces dan Khamir yang anamorfik yaitu dari genus Trichosporan Behrand dan Bullera Derx (Maulana, 2011).

2.1.5. Ekologi dan Habitat Alami Khamir

Distribusi khamir tidak seperti bakteri yang terdapat di lingkungan alami, namun demikian khamir dapat di isolasi dari tanah, air, tanaman, hewan, dan serangga. Adapun tabel persebaran khamir sebagai berikut :

Tabel 2.1. Habitat alami khamir

Habitat	Deskripsi
Hewan	Beberapa khamir non-patogen dikaitkan dengan saluran usus dan kulit hewan berdarah panas; khamir (mis., *Candida albicans*) adalah patogen oportunistik bagi manusia dan hewan; khamir secara komersial terkait dengan serangga yang bertindak sebagai vektor penting dalam distribusi alami.
Atmosfer	Beberapa sel khamir seperti *Cryptococcus, Debaryomyces spp., Rhodotorula,* dan *Sporobolomyces* tersebar melalui udara dari lapisan di atas permukaan tanah.
Lingkungan Buatan	Khamir cukup banyak ditemukan di bangunan. mis., *Pullure aureobasidium* umum pada wallpaper rumah tangga yang lembab
Tanaman	Penyebaran khamir di phyllosphere dibantu oleh serangga. Kehadiran beberapa senyawa organik di permukaan dan daerah yang membusuk menciptakan kondisi yang menguntungkan bagi pertumbuhan khamir.
Tanah	Tanah mungkin hanya merupakan reservoir untuk kelangsungan hidup khamir jangka panjang, bukan sebagai habitat untuk pertumbuhan. Khamir ada di mana-mana di tanah budidaya (hampir 10.000 sel / g tanah) dan hanya ditemukan di lapisan tanah aerobik bagian atas (10-15 cm). *Lipomyces* dan *Schwanniomyces* diisolasi secara eksklusif dari tanah.
Air	

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Khamir mendominasi lapisan permukaan air tawar dan garam, tetapi tidak ada dalam jumlah besar (hampir 1000 sel / L). Sebagian besar isolat khamir air berasal dari genera berpigmen merah (*Rhodotorula*). Spesies *Debaryomyces hansenii* adalah khamir halotoleran yang dapat tumbuh dalam larutan air garam yang hampir jenuh.

* Jaringan tanaman (mis. Daun, bunga, dan buah-buahan) lebih disukai sebagai habitat ragi, tetapi beberapa spesies ditemukan secara komersial atau dalam hubungan parasit dengan hewan. Beberapa spesies ragi dapat diisolasi dari lingkungan khusus atau ekstrem, dengan konsentrasi gula atau garam yang tinggi (yaitu, potensi air rendah), dengan suhu rendah, dan dengan ketersediaan oksigen rendah. (Sumber : Walker, 2009).

2.2. Lebah Madu

Seperti halnya belalang, kecoa, dan kupu-kupu lebah madu adalah hewan dari golongan insecta yang tidak mempunyai tulang belakang. Di Indonesia lebah madu yang paling banyak ditemui yaitu spesies *Apis florea*, *Apis cerana*, *Apis mellifera* dan *Apis dorsata*. Lebah madu merupakan salah satu jenis serangga yang hidupnya bergerombol sehingga membentuk koloni. Koloni tersebut terbagi menjadi ratu lebah yaitu lebah betina yang subur, ribuan lebah pekerja atau lebah betina steril dan ratusan drone atau lebah jantan., Di musim panas, koloni lebah yang baik akan memiliki 50.000 hingga 60.000 pekerja, 1.000 atau lebih drone, dan satu ratu. Lebah merupakan hewan penyerbuk terbaik pada tanaman berbunga. Adapun karakteristik dan peran masing-masing lebah yaitu sebagai berikut :

2.2.1. Ratu Lebah

Ratu lebah atau lebah betina yang subur : peran ratu lebah hanya untuk bertelur karena memilki ovarium yang berkembang dengan baik dan memiliki perut panjang, runcing yang dirancang

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

untuk bertelur. Ia dapat bertelur, baik telur yang dibuahi maupun yang tidak dibuahi. Jenis telur yang ia tentukan ditentukan oleh ukuran sel sisir tempat ia akan disimpan. Lebah pekerja yang membangun sel menentukan ukuran sel. Telur yang dibuahi berkembang menjadi pekerja (perempuan). Telur yang tidak dibuahi berkembang menjadi jantan. Lebah jantan disebut drone. Ratu tidak memerintah koloni, tetapi dia mengaturnya. Dia melepaskan bahan kimia (bau) dari tubuhnya yang menjaga tatanan sosial di koloni. Koloni akan segera mati tanpa ratu baru (Miller *et al.*, 2009).

Lebah ratu biasanya hidup selama dua atau tiga tahun, meskipun beberapa telah diketahui hidup selama sepuluh tahun. Peternak lebah biasanya menggantikan ratu setelah satu atau dua tahun. Ratu baru terbentuk dari larva yang diberi makan makanan khusus. Biasanya larva dari telur yang dibuahi dipelihara sebagai pekerja. Ratu baru hanya dibesarkan dalam kondisi khusus, seperti, untuk menggantikan ratu yang hilang atau gagal atau sebelum kawanan (divisi koloni). Ratu lebah memiliki ukuran tubuh terbesar jika dibandingkan dengan lebah lainnya yang ada pada sarang, ratu lebah berwarna merah kehitam-hitaman, memiliki kemampuan dalam hidupnya bisa menyengat berkali-kali dan tidak mengakibatkan kerusakan pada tubuhnya atau tidak menyebabkan mati seperti halnya lebah pekerja. Selain itu, ratu lebah semasa hidupnya selalu di atur dan diberi makan serta dijaga kebersihan tubuhnya oleh lebah pekerja

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

namun, mereka akan berhenti merawatnya jika dia gagal menghasilkan telur yang cukup (Miller *et al.*, 2009).

2.2.2. Lebah Jantan

Lebah jantan : Drone merupakan sebutan untuk lebah jantan yang memiliki karakteristik yaitu memiliki tubuh yang berat dan sayap yang kuat, mempunyai warna tubuh hitam, tidak memiliki sengatan, rahang kecil, dan ukuran tubuh lebih kecil dibandingkan dengan ratu lebah. Mulut drone tidak cukup panjang untuk menyedot nektar, jadi mereka harus diberi makan oleh pekerja atau mereka harus makan dari sel-sel madu di dalam sarang. Drone tidak bekerja di sarang, satu-satunya fungsi mereka dalam hidup adalah kawin dengan ratu lebah. Perkawinan terjadi di luar sarang sementara ratu dan drone terbang tinggi di udara. Drone akan mati segera setelah kawin. Suara drone yang keras sehingga menyebabkan kebisingan tetapi lebah ini tidak suka berkelahi, memiliki sifat yang rakus terhadap makanan, pemalas, umur drone sekitar 70 hari, sel telurnya lebih besar dan tutupnya menonjol (Situmorang & Aam, 2014).

2.2.3. Lebah Pekerja

Lebah pekerja : lebah ini merupakan lebah betina yang steril sehingga tidak menghasilkan telur, memilki ukuran tubuh yang lebih kecil dibandingkan lebah jantan dan warnanya kecoklat-coklatan, lebah pekerja merupakan lebah yang bersifat disiplin, bertanggung jawab, dan lebah yang agresif. Sengatan pada lebah pekerja membuat tubuhnya mengalami keruskan dan hanya mampu bertahan sekitar 3

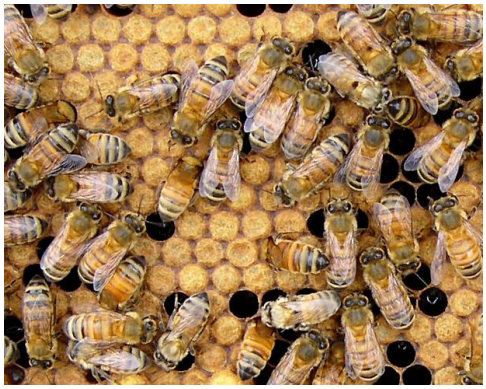
digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

hari kemudian mati. Lebah pekerja mempunyai peran yang sangat berat seperti memberi makan ratu lebah dan larva, mencari air dan makan berupa nektar dan bee pollen lalu memprosesnya serta menyimpan madu, lebah pekerja biasanya hidup hanya selama empat hingga lima minggu jika mereka muncul di musim panas (musim kerja). Namun, mereka dapat hidup selama enam bulan hingga satu tahun jika mereka muncul dari kepompong di musim gugur atau musim dingin (Situmorang & Aam, 2014).

Pekerja mengeluarkan lilin dari kelenjar khusus di bagian bawah perut mereka untuk membangun sarang lebah. Mereka juga mengumpulkan bahan untuk digunakan dalam konstruksi sarang. Peran dan tugas pada lebah pekerja terbagi atas : lebah pekerja dewasa yang mencari makan bagi semua lebah yang berada di sarang, lebah pekerja agak dewasa berperan sebagai penjaga diluar maupun didalam sarang dari segala macam gangguan dan ancaman, yang terakhir yaitu lebah pekerja muda berperan dalam membuat sarang sekaligus merawat, dan menjaga kebersihannya (Situmorang & Aam, 2014).

(a) (b)

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id



(c)

Gambar 2.3. (a) lebah jantan (drone), (b) ratu lebah, (c) lebah pekerja
(Sumber : Miller *et al.*, 2009)

Spesies pada lebah berpotensi dikembangkan berdasarkan dari keragaman genetik. Semakin tinggi tingkat keragamaanya semakin diuntungkan sebab memiliki peluang agar mudah dalam adaptasi untuk bertahan hidup dengan adanya perubahan lingkungan. Keragaman tersebut dapat ditinjau dari segi morfologi yang penting dalam penentuan pertumbuhan pada spesies lebah dikaitkan dengan polen yang dikumpulkan. Polen mengandung nutrisi yang tinggi berguna untuk perkembangan fisiologis lebah pekerja dan pertumbuhan larva (Novia *et al*., 2013).

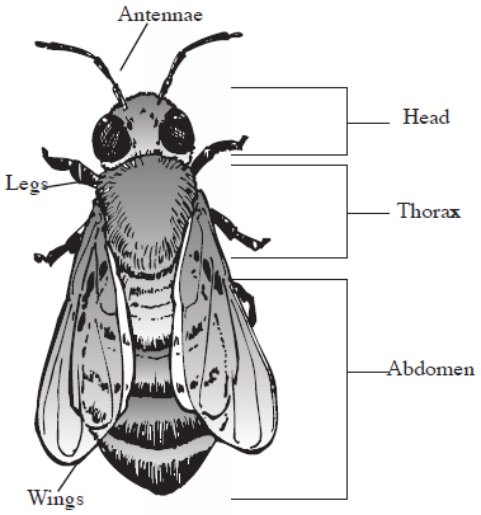
2.2.1 Struktur Lebah Madu

a. Struktur Eksternal Lebah Madu

Lebah madu mempunyai bagian-bagian tubuh yang secara umum terbagi menjadi 3 yaitu : 1. Caput (kepala) yang terdiri atas mulut, mata, dan antena berfungsi untuk mendeteksi bau dan getaran atau sebagai radar, 2. Thorax (dada) yang terdiri atas kaki sejumlah 3 pasang, dan sayap sejumlah 2 pasang, 3. Abdomen (perut) yang terdiri atas kantong bisa (racun), dan kantong madu

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

(nektar). Lebah tidak memiliki tulang belakang sama seperti insecta lainnya, akan tetapi lebah memiliki penutup tubuh eksternal sebagai pelindung organ dalam dan terkandung Chitin pada penutup tubuh tersebut (Sartika, 2011).

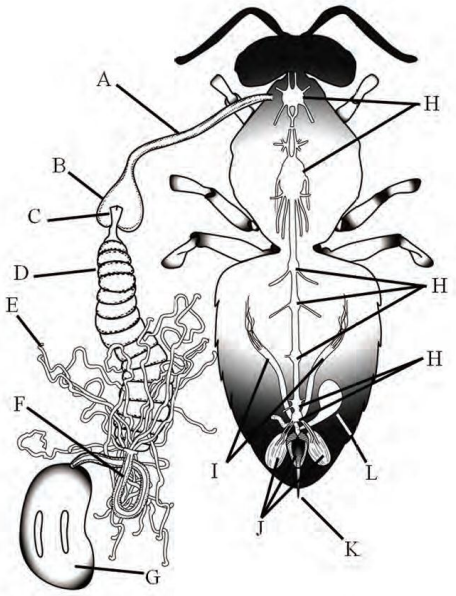


Gambar 2.4. Struktur eksternal lebah madu
(Sumber :Miller *et al*., 2009)

b. Struktur Internal Lebah Madu

Struktur internal pada lebah madu terdiri atas sistem reproduksi, sistem penginderaan, dan sistem pencernaan. Organ reproduksi yang berkembang sempurna pada lebah madu yaitu pada ratu lebah dan pejantan dan tidak berlaku pada lebah pekerja karena tidak dapat bertelur. Ratu lebah dewasa per hari dapat bertelur 1000 hingga 2000 sel telur. Sedangkan urutan sistem pencernaannya yaitu, mulut, osafagus, kantong madu, proventriculus, ventriculus, usus halus, usus besar, colon, dan rectum. Pengindraan pada lebah madu yaitu, indera peraba, pencium, dan indera penglihatan (Sartika, 2011).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id



Gambar 2.5. Anatomi internal lebah madu. A - esophagus; B - crop; C - proventriculus; D - ventriculus (midg ut); E - Malpighian tubules; F-ileum; G-rectum; H - ganglia; I - ovaries; J - sting apparatus; K - sting shaft; L - poison sac (Sumber : Ellis, 2015).

2.3. Lebab Madu *Apis Dorsata*

Lebah madu adalah serangga eusocial dan karenanya memiliki generasi yang tumpang tindih, perawatan induk yang kooperatif, dan kasta reproduksi. Setiap koloni *Apis dorsata* biasanya berisi satu ratu, beberapa drone, dan ribuan lebah pekerja. *Apis dorsata* terlihat sangat mirip dengan *Apis mellifera*, tetapi ukurannya lebih besar. Pekerja *Apis dorsata* dapat berukuran hingga 3 cm (1,2 in) panjangnya, yang hampir dua kali panjang pekerja *Apis mellifera*; dengan demikian mereka dikenal sebagai lebah madu "raksasa". Pada sebagian besar spesies lebah madu, lebah reproduksi (ratu dan drone) lebih besar daripada pekerja; namun, ada sedikit perbedaan ukuran tubuh antara lebah reproduksi dan pekerja di *Apis dorsata* (Jack *et al.*, 2016).

Apis dorsata atau yang dikenal dengan sebutan lebah hutan merupakan lebah yang dapat dijumpai pada kawasan subtropis dan tropis

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Asia termasuk Indonesia. Lebah madu Asia ini adalah jenis lebah yang produktif untuk menghasilkan madu. Sarang yang dibuat oleh lebah Apis dorsata biasanya tergantung di ranting-ranting pepohonan, langit-langit terbuka, tebing jurang bebatuan, dan dahan yang dibuat hanya satu sisiran dengan variasi ukuran mulai dari tertinggi dan terpanjang hingga dua meter. Selain itu, lebah Apis dorsata juga dikenal dengan sifat ganas dan agresif yang menyebabkan budidaya lebah ini masih minim (Hartini, 2017).

Adapun taksonomi dari lebah madu *Apis dorsata* sebagai berikut :

Klasifikasi Apis dorsata

Kingdom: Animalia

Phylum: Arthropoda

Class: Insecta

Ordo: Hymenoptera

Family: Apida

Genus: *Apis*

Spesies: *Apis Dorsata*

(Sumber : Lamerkabel, 2011)

Lebah madu raksasa (*Apis dorsata*) adalah penghasil utama madu di Indonesia yang mendukung sektor ekonomi nasional dan berkontribusi pada regenerasi hutan dan berbagai tanaman melalui jasa penyerbukan. Hutan mungkin sangat bergantung pada penyerbuk hewan, seperti lebah madu karena mereka diperlukan untuk pergerakan serbuk sari jarak jauh di antara pohon-pohon tertentu yang terpisah secara spasial yang sering tidak kompatibel atau dioecious. *Apis dorsata* memiliki perilaku migrasi berulang

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

kali, pergi dan kembali bersarang sebelumnya, jika kondisi lingkungan dipertahankan dan tidak berubah menjadi lebih buruk. Koloni lebah tinggal di sarang menggunakan bunga di sekitarnya dalam periode waktu tertentu, dan kemudian pada periode waktu lain meninggalkan tempat untuk tinggal di pohon bersarang yang memiliki musim semi berbeda dari yang sebelumnya. Koloni Apis dorsata bermigrasi ke lokasi dengan musim berbunga. Keberadaan koloni lebah di habitat didukung oleh ketersediaan sumber daya makanan dan kondisi bersarang. *Apis dorsata* juga memanfaatkan tanaman liar dan tanaman di sekitar hutan sebagai sumber makanan mereka (Nagir *et al.*, 2016).

Gambar 2.6. Lebah madu pekerja dewasa Apis dorsata
(Sumber : Jack *et al.*, 2016)

Lebah madu raksasa (*Apis dorsata*) adalah serangga dari genus Apis yang berperan dalam menghasilkan madu untuk dimanfaatkan oleh manusia. Apis dorsata juga dapat menghasilkan produk lain yang bermanfaat dan dapat dikonsumsi manusia seperti bee pollen, propolis, royal jelly dan lilin (malam). Produk terbanyak dari sisiran sarang lebah madu *Apis dorsata* adalah bee wax atau yang biasa disebut dengan lilin lebah. Produk lilin yang dihasilkan tersebut berkaitan dengan ukuran sarang lebah madu apis dorsata yang memiliki lebar hingga satu meter dan panjangnya dua meter bahkan bisa lebih besar. Madu yang di hasilkan oleh

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

lebah *Apis dorsata* bisa sampai 10-20 kg per koloni per tahunnya dan lebah ini juga berperan sebagai polinator alami sekitar lingkungan tempat bersarangnya lebah tersebut yaitu hutan industri dan hutan lindung. Kehidupan lebah *Apis dorsata* sangat bergantung pada alam sehingga sangat penting dalam melestarikan lingkungan. Kelimpahan sumber pakan membuat Apis dorsata mampu bertahan hidup dilingkungan tersebut. Jika lingkungan tidak lagi nyaman dan sumber makan sudah berkurang lebah ini akan melakukan migrasi ketempat lain (Bertoni R, 2013).

Gambar 2.7. Drone *Apis dorsata* (kiri), lebah pekerja *Apis dorsata* (kanan)
(Sumber:Jack *et al*., 2016)

2.3.1. Distribusi *Apis dorsata*

Lebah madu raksasa, *Apis dorsata* Fabricius memiliki distribusi luas di seluruh Asia selatan, dan tidak ditemukan di Amerika Utara. *Apis dorsata* dapat ditemukan di seluruh negara selatan Asia, termasuk Malaysia, Indonesia, dan Filipina. Jumlah terbesar dari koloni *Apis dorsata* ditemukan di daerah hutan lebat atau di tebing, tetapi sarang kadang-kadang ditemukan di daerah perkotaan di tepian bangunan (Jack *et al.*, 2016).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Lebah madu raksasa (*Apis dorsata*) adalah satu dari lima spesies yang ditemukan di Indonesia. Spesies tersebut adalah *Apis andreniformis, Apis dorsata, Apis cerana, Apis koschevnikovi, dan Apis nigrocincta*. Apis dorsata tersebar luas di Indonesia dari Sumatera ke Sulawesi, Timor dan pulau-pulau kecil di sekitarnya (Nagir *et al.*, 2016). Nama lain untuk *Apis dorsata* adalah lebah batu, lebah madu raksasa, atau lebah tebing. Di tepi barat distribusinya, *Apis dorsata* hanya ditemukan sejauh Afghanistan tetapi kemunculan tenggaranya meluas ke timur Bali. Distribusi utara dibatasi oleh Himalaya. Ada bukti morfometrik dan genetik untuk banyak subspesies berbeda dari *Apis dorsata* yang pada akhirnya dapat dibuktikan sebagai spesies yang terpisah. (Bradbear, 2009).

Di Indonesia, lebah madu raksasa dikelompokkan menjadi dua subspesies, yaitu *Apis dorsta dorsata* menghuni di wilayah barat garis Wallacea termasuk pulau Nusa Tenggara dan *Apis dorsata binghami* yang hanya ditemukan di Sulawesi dan pulau-pulau sekitarnya sebagai lebah endemik. Secara morfologis, kedua spesies ini dapat dibedakan berdasarkan warna perut pekerja. Warna perut *Apis dorsata binghami* berwarna hitam dengan garis-garis putih, sedangkan warna perut *Apis dorsata* berwarna kecoklatan dengan strip oranye. Perilaku bersarang *A. d. binghami* dan *A. d. dorsata* juga berbeda. Dalam satu pohon, *A. d. binghami* umumnya hanya ditemukan 2-3 koloni (maksimum 10 koloni), sedangkan *A. d. dorsata* dapat ditemukan remaja atau bahkan ratusan koloni. Pemilihan lokasi sarang sangat penting karena pilihan

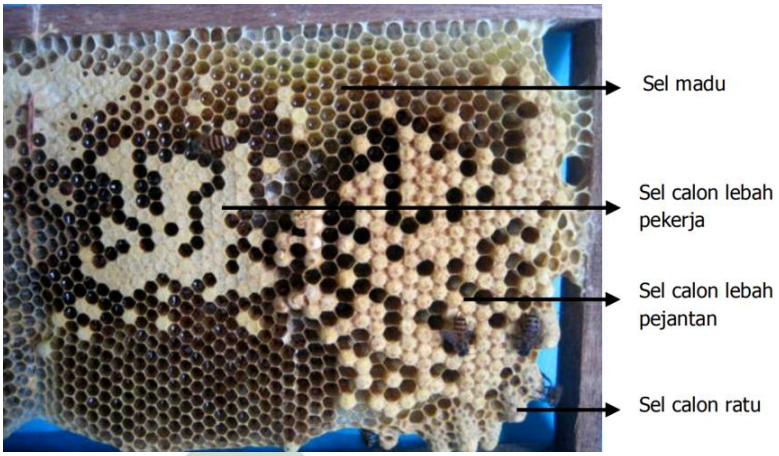
digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

yang salah dapat meningkatkan risiko pemangsaan, ancaman cuaca buruk dan kegagalan reproduksi yang menyebabkan kerusakan pada koloni serangga sosial, seperti koloni lebah (Nagir *et al*., 2016).

2.3.2. Sarang Lebah Madu *Apis Dorsata*

Sarang lebah merupakan suatu sel-sel yang berbentuk segienam atau hexagonal terbuat dari malam lebah dicampur dengan propolis atau perekat lebah yang berasal dari tumbuh-tumbuhan. Sarang lebah yang dibuat tersebut digunakan sebagai tempat meletakkan madu, bee pollen atau tepung sari dan larva lebah. Dalam pembuatan sarang tidak semua lebah pekerja yang bertanggung jawab tetapi lebah pekerja muda yang masih berumur 12-17 hari dengan kelenjar malamnya masih dapat berperan dalam pembuatan sarang. Terdapat jenis-jenis tabung sel di dalam sisiran yaitu : sel calon pekerja memiliki ukuran kecil dengan jumlah yang paling banyak dan tutupnya rata, sel calon drone atau lebah jantan ditandai dengan adanya titik hitam di tengah dan tutupnya yang menonjol, yang terakhir yaitu sel calon ratu lebah yang biasanya terdapat di pinggir sarang, tidak teratur serta memiliki ukuran yang paling besar dibandingkan yang lainnya (Situmorang & Aam, 2014).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id



Gambar 2.8. Sarang Lebah Madu
Sumber: (Rospita O. P. Situmorang and Aam Hasanudin, 2014).

Lebah madu Apis dorsata terdiri dari tiga subspesies yang diakui yaitu: *Apis dorsta dorsata*, *Apis dorsta binghami*, dan *Apis dorsta breviligula*. Spesies ini memiliki desain sarang yang berbeda dari lebah madu barat seperti *Apis mellifera L*. Di mana lebah madu ini membangun sisir tunggal, besar, terbuka di bawah pohon. cabang atau di bawah tebing. Mereka membangun sisir besar tunggal hingga 150 cm dan tinggi 70 cm. Ukuran tubuh yang besar dari *Apis dorsata* memungkinkan peningkatan jarak terbang dan jangkauan mencari makan dibandingkan dengan spesies lebah madu lainnya. Koloni *Apis dorsata* dapat melakukan migrasi jarak jauh musiman untuk mengeksploitasi sumber daya nektar dan serbuk sari yang tersedia pada waktu yang berbeda di banyak bagian Asia Selatan. Koloni itu meninggalkan sisir kosong ketika berangkat dari sarang. Menariknya, koloni yang sama telah diamati untuk kembali ke cabang yang sama persis enam bulan kemudian, meskipun lebah yang menghuni lokasi bersarang lama akan mati jauh sebelumnya (Jack *et al.*, 2016).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Gambar 2.9. Sarang lebah *Apis dorsata* yang bergantung di pohon
(Sumber : Jack *et al*., 2016)

Koloni *Apis dorsata* bersarang secara berkelompok; Namun, menempatkan sisir kosong di pohon yang sebelumnya ditempati, atau di pohon terdekat dari spesies yang sama, tidak menarik lebih banyak kawanan; jumlah koloni yang sama yang meninggalkan pohon kembali ke pohon yang sebelumnya ditempati. Meskipun diyakini bahwa beberapa individu mungkin hidup cukup lama untuk melakukan perjalanan kembali ke sarang asli mereka, beberapa koloni tetap kembali ke pohon-pohon bekas mereka yang sebelumnya ditempati.

2.4. Identifikasi Khamir

Identifikasi merupakan tahapan untuk mencari tau identitas suatu organisme yang belum diketahui sebelumnya yaitu membandingkan dengan organisme yang sudah diketahui identitasnya. Khamir dapat dilakukan identifikasi dengan cara molekular dan konvensional yaitu didasarkan pada karakteristik fenotopiknya yang terdiri dari karakter morfologi khamir (mikroskopis dan makroskopis), karakter fisiologi biokimia, fase reproduksi khamir secara aseksual maupun seksual. Untuk identifikasi khamir

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

berdasarkan dari morfologi secara makroskopis parameter yang diamati yaitu tekstur koloni, permukaan koloni khamir, tepi koloni, profil koloni dan warna koloni sedangkan secara mikroskopis parameter yang di amati yaitu tipe reproduksi aseksual (budding, fussion, blastokonidia, balistokonidia, sterigmatokonidia, atau membentuk hifa), bentuk dan ukura selnya (Maulana, 2011).

Identifikasi khamir berdasarkan karakter fisiologi biokimia parameter yang di amati yaitu kemampuan khamir untuk tumbuh dalam substrat yang mengandung garam atau gula yang tinggi, kemampuan khamir dalam memfermentasi gula dan asimilasi unsur nitrogen serta karbon, kemampuan khamir yang dapat tumbuh tanpa adanya vitamin tertentu, kemampuan untuk tumbuh dengan adanya *cycloheximide*, dan kemampuan tumbuh khamir pada suhu 37°C. Namun identifikasi khamir menggunakan karakter fenotipik mempunyai beberapa kekurangan dan sulit digunakan dalam membedakan spesies-spesies khamir dikarenakan morfologi khamir yang sederhana dan bentuknya yang mirip antar spesies khamir.

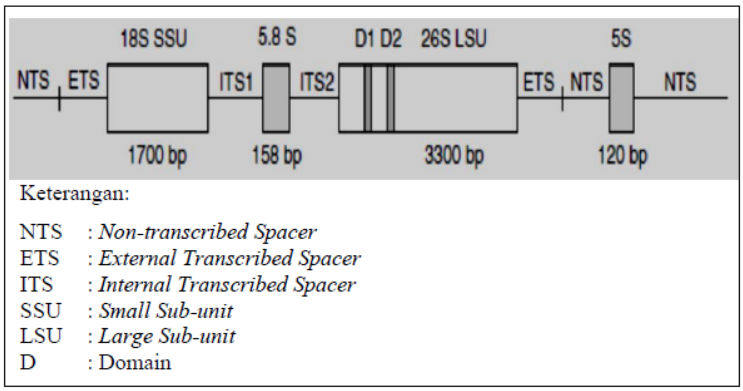
Selain itu, identifikasi khamir dengan cara konvensional memerlukan evaluasi 60-90 tes, prosesnya rumit, membutuhkan interpretasi yang subjectif, memakan waktu yang lama, dan melelahkan. Identifikasi khamir menggunakan teknik molekular diperlukan untuk mendukung dan memperkuat identifikasi dengan cara konvensional dikarenakan teknik molekular mempunyai beberapa keuntungan seperti waktu yang dibutuhkan lebih cepat dan hasilnya lebih akurat dan lebih stabil terhadap pengaruh lingkungan (Rukmana, 2015).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Identifikasi khamir melalui teknik molekular saat ini dilakukan menggunakan data sequence gen. biasanya gen yang digunakan dalam identifikasi khamir dengan akurat dan cepat yaitu gen yang terdapat di ribosomal DNA yang mempunyai beberapa keuntungan seperti : dapat digunakan pada semua makhluk hidup karena primer yang digunakan bersifat universal sehingga mudah di sequence, berasal dari nenek moyang yang sama dan ada di semua makhluk hidup. Gen-gen yang mengkode rDNA terdiri dari daerah non-coding dan coding. Daerah non-coding tediri dari intergenic spacer (IGS) dan internal transcribed spacer (ITS1 dan ITS2). Sedangkan daerah coding terdiri dari large sub-unit (LSU rDNA 28S) dan small sub-unit (SSU rDNA 18S), gen 5.8S, gen 5S.

Identifikasi khamir menggunakan gen 5,8S hanya sampai tingkat filum dan kelas dan untuk gen LSU rDNA 28S yang mempunyai variasi nukleotida lebih tinggi dibandingkan gen SSU rDNA 18S dan 5.8S. Hal tersebut yang membuat gen 28S dapat digunakan untuk identifikasi sampai tingkat genus dan spesies. Daerah non coding yaitu internal transcribed spacer (ITS) rDNA mempunyai kecepatan mutasi lebih tinggi daripada daerah coding seperti SSU, 5,8S, dan LSU. Hal tersebut menjadikan daerah ITS mempunyai variasi urutan nukleotida yang tinggi antar spesies bahkan daerah tersebut berguna dalam mengindentifikasi khamir yang memiliki kekerabatan sangat dekat (Maulana, 2011).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id



Gambar 2.10. Daerah ribosomal DNA (Sumber : Maulana, 2011)

2.5. Daerah *Internal Transcribed Spacer (ITS)*

DNA ribosomal (rDNA) merupakan daerah penyandi genom pada komponen RNA ribosom. Ribosomal DNA pada organisme eukariotik berada pada mitokondria dan inti sel (nukleus). Terdapat suatu pembatas yang dinamakan spacer untuk memisahkan daerah ribosom DNA. External transcribed spacer (ETS) dan intergenic spacer (IGS) merupakan suatu pembatas untuk memisahkan subunit ribosom DNA yang besar ataupun yang kecil. Dua pembatas tadi biasanya disebut nontranscribed spacer (NTS). Fungi termasuk golongan eukariotik, terdapat daerah konservatif (lestari) pada ribosom DNA yaitu gen penyandi rRNA 18S, 5.8S, 28S, dan daerah internal transcribed spacer (ITS) (Mulyatni *et al*., 2011).

Internal transcribed spacer (ITS) merupakan urutan RNA dalam proses transkripsi utama yang ada di antar prekusor ribosomal subunit dan pada proses splicing akan dihilangkan saat RNA prekusor tanda molekul struktural di proses pada suatu ribosom. Internal transcribed spacer (ITS) dari DNA ribosomal (rDNA) adalah salah satu penanda molekuler yang paling banyak diurutkan. Wilayah ini merupakan bagian dari cistron rDNA, yang terdiri dari 18S, ITS1, 5.8S, ITS2, dan 26S, dan terdapat dalam beberapa ratus

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

salinan di sebagian besar eukariota. ITS1 dan ITS2 sebagai struktur yang tidak setara, meskipun mereka kadang-kadang panjangnya konvergen serta pola substitusi; ITS1 berevolusi dari spacer intergenik dan ITS2 dari segmen ekspansi di subunit besar rDNA (Won & Renner, 2005).

Daerah ITS terletak di antara gen-gen yang sangat lestari yang mengkode 18S dan 28S rRNA. Daerah ITS mencakup dua wilayah pengkodean ITS1 dan ITS2, yang dipisahkan oleh gen 5.8SrRNA yang sangat terkonservasi. Variabilitas genetik yang lebih besar dari daerah ITS1 dan ITS2 memungkinkan identifikasi yang lebih baik dari spesies terkait erat selain gen rRNA yang berdekatan (Nagla *et al*., 2019).

2.6. Isolasi DNA

DNA (*Deoxyribose Nucleic Acid*) merupakan salah satu materi genetik selain RNA, yang mengode semua informasi untuk digunakan pada proses metabolisme dalam setiap organisme (Hapsari, 2015). Struktur DNA memnpunyai untai ganda yang antiparallel dengan komponen-komponennya, seperti gula pentosa, gugus fosfat, dan basa nukleotida yang terdiri dari dua macam yaitu pirimidin dan purin (Faatih, 2009).

Isolasi DNA merupakan langkah kerja awal yang harus dilakukan dalam berbagai pengerjaan analaisis molecular. Keberhasilan pada tahap isolasi DNA sangat menentukan hasil langkah selanjutnya. Kualitas DNA yang dihasilkan pada proses isolasi DNA, sangat tergantung dari materi genetik yang digunakan. Ada beberapa hal yang perlu diperhatikan pada proses isolasi DNA yakni metodenya harus efektif, dapat menghasilkan DNA

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

tanpa terdapatnya kontaminasi dari protein atau RNA, metode yang digunakan tidak boleh mengubah fungsi dan struktur DNA (Nugroho, 2017).

Isolasi DNA terdiri dari tiga teknik utama yaitu, ekstraksi organik (fenol-kloroform), ekstraksi *Chelex* dan *FTA paper*. Hasil dari isolasi DNA merupakan tahapan penting untuk proses analisis DNA selanjutnya, sehingga dalam proses pengerjaanya harus dilakukan dengan benar dan bebas dari kontaminasi. Isolasi DNA menggunakan teknik ekstraksi organik prinsip kerjanya yaitu pelarut organik akan mengikat, menarik, dan mengendapkan protein sehingga fase air yang terpisah akan mengandung DNA. Pada ekstraksi organik menggunakan beberapa tambahan bahan kimia seperti Sodium Dodecylsulfate (SDS) dan Proteinase K digunakan untuk melisiskan dinding sel serta campuran fenol/kloroform untuk memisahkan protein dari DNA. sedangkan ekstraksi DNA metode Chelex merupakan lebih cepat dibandingkan dengan metode ekstraksi organik. Ekstraksi DNA dengan metode Chelex yaitu sebuah prosedur alternatif untuk penarikan DNA yang telah terkenal dikalangan ahli forensik, dengan penggunaan dari suspensi resin kombinasi yang dapat ditambahkan langsung pada sampel contohnya semen, bercak darah atau darah (Zein & Prawiradilaga, 2013).

2.7. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

PCR adalah metode yang melibatkan beberapa tahap yang berulang atau siklus dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. PCR yaitu reaksi polimerase berantai, yaitu reaksi yang melibatkan enzim polimerase dan dilakukan secara berulang-ulang. Proses berulang dimana terjadi proses pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal,

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

hibridisasi *primer* untuk mengawali replikasi DNA dilanjutkan dengan proses penambahan basa pada cetakan DNA oleh enzim polimerase, untuk melakukan kegiatan ini dibutuhkan suatu mesin yang dapat menaikkan dan menurunkan suhu dengan cepat, dan bahan- bahan untuk membuat reaksi PCR (Zuhriana,2010).

Pada proses PCR komponen yang dibutuhkan meliputi : enzim polimerase DNA, DNA template, primer yang merupakan oligonukleotida pendek, memiliki urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA template, buffer PCR, magnesium klorida (MgCl2), Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs). Tahapan dalam proses PCR terdiri atas : pra-denaturasi DNA template, denaturasi, Anneling, extension dan, poistextension. Tahapan tersebut meruapakan tahapan yang berulang-ulang (siklus). Pada setiap siklusnya terjadi penggandaan DNA. Polymerase chain reaction (PCR) merupakan metode amplifikasi DNA yang berulang-ulang yang disetiap siklusnya terjadi duplikasi jumlah DNA target. Struktur untai ganda pada DNA template akan memisah menjadi untai tunggal pada tahap denaturasi termal. Penempelan primer (anneling) pada daerah tertentu dari DNA target terjadi jika sudah mencapai suhu tertentu biasanya suhu yang dibutuhkan yaitu 40-60°C. enzim polimerase DNA berperan dalam memperpanjang primer dengan terdapatnya buffer dan dNTPs yang sesuai. Umumnya siklus yang terjadi pada proses PCR yaitu 20-40 siklus (Handoyo & Rudiretna, 2001).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

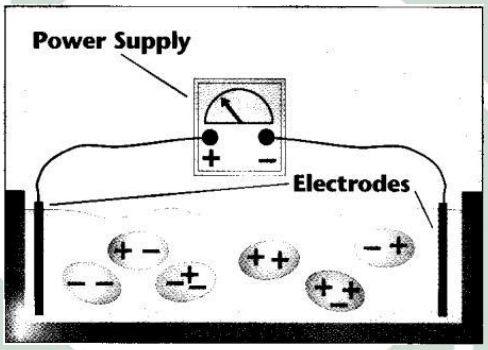
2.8. Elektroforesis

Elektroforesis adalah gerakan partikel koloid relatif terhadap medium cairan di bawah pengaruh medan listrik yang jaraknya seragam. Fenomena elektrokinetik ini pertama kali dicatat oleh Reuss pada tahun 1809 dan tetap banyak digunakan dalam berbagai praktik perangkat dan proses untuk menghasilkan efek skala makro. Contoh aplikasi dan operasi termasuk pengukuran, deposisi elektroforetik, sidik jari elektroforetik, serta elektroforesis gel. Pada prinsipnya, ketika catu daya aXrus langsung diperkenalkan, molekul dan partikel, biasanya dalam larutan berair, akan bermigrasi ke arah elektroda bantalan muatan yang berlawanan. Karena mereka bervariasi dalam hal massa dan muatan, molekul yang berbeda dan partikel campuran akan bermigrasi dengan kecepatan yang berbeda dan karenanya, akan dipisahkan menjadi fraksi tunggal. Pada dasarnya, mobilitas asam nukleat dalam gel dipengaruhi oleh faktor seperti konsentrasi gel, kondisi penyangga, ukuran dan konformasi, dengan sedikit pengaruhdari komposisi dasar atau urutan (Ven & Rani, 2012).

Hasil PCR nantinya akan dibaca menggunakan elektroforesis. Elektroforesis DNA adalah suatu teknik untuk memisahkan sampel DNA berdasarkan atas struktur fisik molekulnya dan ukuran (berat molekul). Gel yang biasa digunakan antara lain yaitu agarose. Prinsip kerja gel elektroforesis dimulai saat molekul yang bermuatan listrik ditempatkan pada medium berisi tenaga listrik. Molekul yang digunakan dalam praktikum elektroforesis adalah molekul DNA yang bermuatan negatif. Molekul akan berpindah menuju ke kutub positif atau kutub negatif berdasarkan dengan muatan yang terkandung

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

di dalamnya. Molekul- molekul yang bermuatan negatif (anion) akan bergerak menuju ke kutub positif (anoda), sedangkan molekul-molekul yang memiliki muatan positif (kation) akan bergerak ke kutub negatif (katoda) DNA memiliki muatan negatif karena mengandung gugus O dan menyebabkan arah migrasi DNA adalah dari kutub negatif ke kutub positif. Berat molekul suatu fragmen DNA dapat diperkirakan dengan membandingkan laju migrasinya dengan laju migrasi fragmen-fragmen molekul DNA strandar (marker) yang telah diketahui ukurannya (Kusuma *et al*.,2006).



Gambar 2.11. Susunan dasar elektroforesis
(Sumber : Widyarti, 2018)

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk jenis penelitian deskriptif kualitatif dengan mengumpulkan, menganalisis dan menjelaskan data yang diperoleh. Sampel yang digunakan pada penelitian ini, merupakan khamir yang berasal dari madu pada sarang lebah madu *Apis dorsata.* Hasil dari estraksi DNA khamir akan dilakukan optimasi amplifikasi DNA dengan tiga protokol pengaturan suhu dan waktu PCR selanjutnya hasil PCR dilakukan elektroforesis dan visualisasi pita DNA khamir menggunakan *Gel Documentation*.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Genetika Laboratorium Terintegrasi Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya yang dilaksanakan pada bulan November 2019 – April 2020. Adapun jadwal kegiatan penelitian yaitu sebagai berikut :

Tabel 3.1 Jadwal kegiatan penelitian

No	Kegiatan	Bulan Ke-									
		2019		2020							
		11	12	1	2	3	4	5	6	7	8
1.	Persiapan dalam pembuatan draft proposal skripsi										
2.	Sidang seminar proposal skripsi										
3.	Pengkoleksian dan pemurnian sampel										
4.	Pembuatan medium pertumbuhan										
5.	Pembuatan *working* dan *stock culture isolate* khamir										
6.	Pengamatan secara makroskopik dan mikroskopik										
7.	Ekstraksi DNA khamir dengan beberapa variasi waktu inkubasi										

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

No	Kegiatan	Bulan Ke-									
		2019		2020							
		11	12	1	2	3	4	5	6	7	8
8.	Amplifikasi daerah ITS rDNA khamir menggunakan PCR										
9.	Analisis data										
10.	Persiapan dan pembuatan draft skripsi										
11.	Sidang dan seminar hasil penelitian										

3.3. Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu petri disk, gelas ukur, beaker glass, labu erlenmeyer, jarum ose, kompor listrik [Maspion S-301], timbangan analitik, Micropipet [Biopette plus Labinet], 0.5-10 µl pipet tips [Axygen], 200 µl pipet tips dan 1000 µl pipet tips [Biologix], Microtube [Biologix], *Laminar Flow cabinet* [ESCO], spatula, batang pengaduk, autoclave [Hirayama HICLAVE HG-50], hot plate magnetic stirrer [Thermo Scientific], Vortex mixer [Thermo Scientific], *Microsentrifuge* [Thermo Scientific Heraus Fresco 21] , oven, incubator [Thermo Scientific], Spectrophotometer DNA quantitave analysis [BioDrop], Mikroskope [Nikon ECLIPSE E100], *waterbath* [Clifon], DNA *documentation/transiluminator* [Enduro^{TM} GDS Labinet], Bunsen, PCR [Multigene optimax], Elektroforesis horizontal [Thermo Scientific Owl Easycast B1], Power supply [Hoefer PS300-B], sarung tangan [Safe Glove], masker (Sensi Mask], plastik wrap [Total wrap], alumunium foil [Total wrap], tissue, kapas steril [OneMed], *laboratory freezer* [Thermo Scientific], *Refrigenerator* [Thermo Scientific], pemantik api, kertas

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

saring, corong kaca, plastic tahan panas, karet pentil, tabung [Eppendorf], batang sumpit.

3.3.2. Bahan Penelitian

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sebagai berikut :

a. Khamir

Isolat-isolat khamir yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari sarang lebah *Apis dorsata*. Lokasi pengambilan sampel sarang lebah yaitu di sekitar Resort Darungan Kabupaten Lumajang, Jawa Timur, Indonesia.

b. Medium

Medium yang digunakan pada penelitian ini untuk isolasi khamir dan pemurnian, peremajaan, serta pengamatan makroskopis adalah *potato dextrose agar* (PDA).

c. Bahan Kimia

Beberapa bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari agar (bacto agar), alkohol 70%, akuabides (ddH2O), akuades, antibiotik *chloramphenicol* 500 mg [RITEMED], PDA [Merck], spirtus. Beberapa bahan kimia yang berasal dari Promega yakni, *buffer* TAE (*Tris-Acetate* EDTA), DNA *ladder* 100 bp, DNA marker 1 kb, pewarna *diamond*, *gel agarose*, *loading dye*, *nuclease-free water*, dan *PuReTaq Ready-To-Go* (RTG) 6 PCR *beads*. Beberapa bahan kimia yang berasal dari Sigma diantaranya, primer ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), dan primer ITS 5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3').

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

3.4. Prosedur Penelitian

1. Pengambilan Sampel dan Penyimpanan Sampel

   Sampel sarang lebah madu *Apis dorsata* di ambil dari wilayah sekitar Resort Darungan Kabupaten Lumajang Jawa Timur dan dilakukan penyimpanan sementara di dalam *cooler box* yang berisi beberapa *ice gel*. Sampel yang telah didapatkan selanjutnya dilakukan isolasi yaitu sebanyak 10 gram sampel sarang madu dilarutkan dalam 90 ml akuades steril dalam Erlenmeyer 250 ml dan di vortex. Sampel dapat disimpan pada Frezeer dengan suhu -80°C.

2. Sterilisasi Alat, Bahan, dan Medium

   Proses sterilisasi perlu diletakkan diawal tahap penelitian, karena bertujuan untuk menjauhkan dari segala macam hal yang dapat menyebabkan kontaminasi pada alat, bahan, medium pertumbuhan, dan terutama sampel. Proses sterilisasi dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, dengan tekanan 2 atm, selama 15 menit. Alat dan bahan yang disterilisasi harus bersifat tahan panas dan tidak dapat meleleh ketika terkena suhu panas seperti batang pengaduk, batang sumpit, beaker glass, corong kaca, gelas ukur, labu erlenmeyer, petri dish, spatula, dan tabung reaksi.

3. Pembuatan Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)

   Media PDA dibuat dengan cara sesuai petunjuk kemasan kemudian dipanaskan sambil diaduk sampai mendidih dan homogeni. Setelah mendidih media PDA, disterilkan dalam autoklaf selama 30 menit dengan suhu 121°C tekanan 1 atm. Setelah media steril

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

dimasukkan pada masing-masing cawan petri sebanyak 20 ml dan ditambahkan antibiotik *chrolamphenicol* 1 ml.

d. Isolasi Khamir

Pembuatan isolat khamir dilakukan dengan cara, suspensi sarang sebanyak 10 µL dituang pada permukaan medium PDA dengan teknik spreader agar merata. Selanjutnya diinkubasi selama 3 hari pada suhu ruangan hingga didapatkan koloni – koloni khamir. Kemudian masing-masing koloni tersebut dimurnikan dan dipindahkan dalam media PDA dan diinkubasi selama 3 hari pada suhu ruangan.

e. Peremajaan Isolat Khamir

Kultur pada masing-masing isolat khamir diambil 1 ose dan diinokulasikan dalam medium PDA kemudian diinkubasi selama 3 hari pada suhu ruang. Penginokulasian isolat ke medium PDA bertujuan untuk meremajakan isolat agar menjadi aktif kembali. Keberhasilan peremajaan isolat khamir ditandai dengan tumbuhnya isolat pada medium PDA.

f. Pengamatan Khamir Secara Makroskopis dan Mikroskopis

Pengamatan khamir secara makroskopis parameter yang diamati yaitu permukaan koloni, tekstur, dan warna. Dilakukan pengamataan pada biakan dalam media PDA yang berumur 72 jam dengan suhu ruang 20-25°C. Sedangkan pengamatan secara mikroskopis parameter yang di amati yaitu tipe pertunasan, bentuk sel vegetatif, ukuran sel, ada tidaknya spora seksual khamir (askospora atau basidiospora), dan ada tidaknya miselium sejati atau palsu.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

g. Ekstraksi DNA Khamir

Isolasi DNA dari isolat khamir dilakukan berdasarkan referensi dari LIPI. Isolasi ini dilakukan pada biakan kultur khamir yang mencapai umur 48 jam hingga satu minggu. Adapun langkah-langkahnya sebagai berikut :

1) Diambil isolat khamir dengan ose steril.
2) Dimasukkan dalam tube yang telah berisi 50 µl NFW (*nuclease free water*).
3) Dihomogenkan dengan vortex hingga larut.
4) Dipanaskan pada suhu 98°C selama 10 menit, 15 menit, dan 20 menit (terdapat tiga variasi waktu inkubasi).
5) Di *spin down* hingga terbentuk dua lapisan (bagian atas DNA dan bagian bawah *pellet*).
6) Dipindahkan bagian atas (DNA) ke tube baru.

h. Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Pengukuran kuantitas dan kualitas produk amplifikasi DNA dilakukan dengan bantuan spektrofotometer (Biodrop) pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Langkah pertama yang dilakukan yaitu menginisiasi spektrofotometer dengan NFW (*nuclease free water*). NFW ini yang akan digunakan sebagai blanko. Setiap setelah memberikan blanko ataupun hasil amplifikasi DNA, tempat penetesan harus dibersihkan terlebih dahulu dengan tisu. Sampel hasil amplifikasi DNA sebanyak 1,5 µl diteteskan pada tempat penetesan dan diukur. Pengukuran ini secara otomatis diolah oleh software yang terdapat pada

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

spektrofotometer. Pengukuran dengan spektrofotometer dilakukan pada semua sampel hasil amplifikasi DNA (Maulana, 2011**).**

i. Amplifikasi DNA Khamir

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan protokol Go Taq® Green Master Mix [Promega]. Resep pembuatan *cocktail* dalam reaksi PCR dengan protokol ini dapat dilihat pada tabel 3.2.

Tabel 3.2. Resep pembuatan *cocktail* reaksi PCR

Bahan	Volume (µl)
DNA template	6
Nuclease Free Water	5,5
Go Taq® Green Master Mix	12,5
Primer *reverse* (ITS 4)	1
Primer *forward* (ITS 5)	1
Total per sampel	25

Cocktail reaksi PCR yang telah berisi komposisi diatas, diletakkan pada tabung eppendorf PCR berukuran 0,2 ml. setelah pembuatan *cocktail* PCR, proses amplifikasi PCR dilakukan dengan pengulangan siklus sebanyak 40x menggunakan *Thermal cycler* Thermal Scientific. Adapun pengaturan suhu dan waktu selama proses PCR menggunakan protokol dari Maulana (2011), Ediningsari (2008) dan Atit, *et al* (2018) dapat dilihat pada tabel 3.3., tabel 3.4., dan tabel 3.5.

Tabel 3.3. Pengaturan suhu pada proses PCR protokol Maulana (2011)

Proses	Pre-denaturasi	Denaturasi	Anneling	Elongasi	Post-elongasi
Suhu	95ºC	95ºC	58ºC	68ºC	68ºC
Waktu	2’	15”	30”	1’	10’.40”

Keterangan
‘ menit
“ detik

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Tabel 3.4. Pengaturan suhu pada proses PCR protokol Ediningsari (2008)

Proses	**Pre-denaturasi**	**Denaturasi**	**Anneling**	**Elongasi**	**Post-elongasi**
Suhu	94ºC	94ºC	56ºC	68ºC	68ºC
Waktu	2’	15”	30”	1’	10’.40”

Keterangan
‘ menit
“ detik

Tabel 3.5. Pengaturan suhu pada proses PCR protokol Atit, *et al* (2018)

Proses	**Pre-denaturasi**	**Denaturasi**	**Anneling**	**Elongasi**	**Post-elongasi**
Suhu	95ºC	95ºC	53ºC	72ºC	72ºC
Waktu	1.5’	30”	30”	1’	15’

Keterangan
‘ menit
“ detik

j. Elektroforesis Gel Agarose

Sebelum dilakukan tahapan elektroforesis, dilakukan pembuatan gel agarose yang mengacu pada penelitian Sambrook dan Russel (2001). Gel agarose sebanyak 2 gr ditambahkan dengan akuades hingga volume akhir mencapai 100 ml, dipanaskan dan diaduk hingga mendidih dan homogen, ditunggu hingga gel agarose hangat lalu ditambahkan pewarna *diamond* 1 µl , dituangkan ke dalam cetakan (*tray*) yang telah dipasangi sisir (*comb*), dan dibiarkan pada suhu ruangan hingga memadat. Setelah gel agarose memadat maka di letakkan dalam mesin elektroforesis, ditambahkan *buffer* TAE. Selanjutnya hasil amplifikasi DNA sebanyak 5 µl ditambahkan dengan *loading dye* sebanyak 1 µl, dimasukkan dalam sumuran gel agarose 2%, dimasukkan DNA *ladder* dan marker dan dialirkan arus listrik 50 V selama 1 Jam 15 menit. Setelah itu dimasukkan

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

dalam gel documentation. Hasil produk amplifikasi DNA akan terlihat ukuran fragmen DNA nya.

4.5. Analisis dan Pengolahan Data Penelitian

Adapun analisis dan pengolahan data yang digunakan pada penelitian ini adalah analisis secara deskriptif kualitatif dengan berdasarkan hasil pengamatan secara makroskopik, mikroskopik, dan molekuler berdasarkan hasil optimasi amplifikasi ITS rDNA khamir dan divisualisasi dibawah sinar UV menggunakan *Gel Documentation*. Hasil penelitian akan diolah, disusun, dan disajikan dalam bentuk tabel dan gambar pengamatan menjadi suatu susunan urutan data sehingga dapat ditarik sebuah kesimpulan .

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

BAB IV

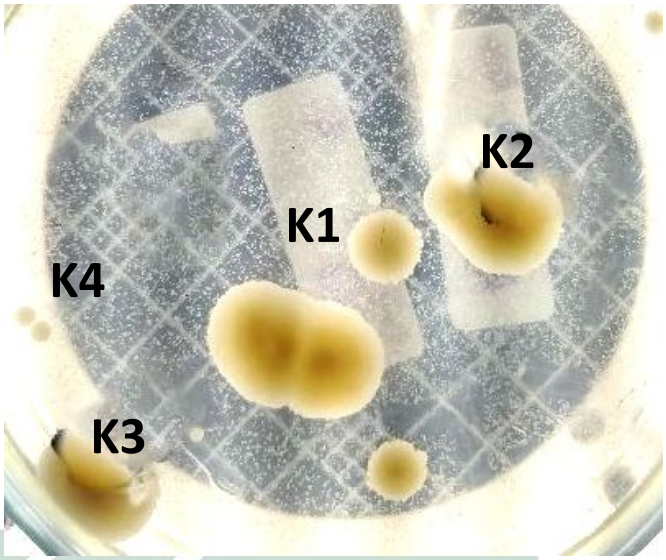
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan dengan dua analisis yaitu analisis secara morfologi berdasarkan karakteristik makroskopis dan mikroskopis. Analisis selanjutnya secara molekular menggunakan metode ekstraksi DNA referensi dari LIPI dengan tiga variasi suhu inkubasi yaitu 10 menit, 15 menit, dan 20 menit. Sedangkan optimasi amplifikasi ITS rDNA khamir menggunakan tiga protokol pengaturan suhu dan waktu yaitu protokol dari Maulana (2011), kedua protokol dari Ediningsari (2008), dan ketiga protokol dari (Kanti *et al*., 2018). Penelitian ini dilakukan di laboratorium terintegrasi UIN Sunan Ampel Surabaya.

4.1. Isolasi Sampel Sarang Lebah Apis Dorsata pada Medium PDA

Sampel sarang dari lapangan langsung di bawa ke laboratorium genetika UIN Sunan Ampel Surabaya untuk di isolasi pada medium PDA. Diketahui bahwa medium PDA merupakan medium pertumbuhan untuk fungi. Setelah inkubasi selama 3 hari didapatkan beberapa isolat-isolat khamir (Gambar 4.1.). Masing-masing isolat khamir tersebut kemudian dilakukan peremajaan dan permurnian pada mediun PDA yang baru untuk mendapatkan isolat khamir yang murni kemudian diinkubasi selama tiga hari pada suhu ruang.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id



Gambar 4.1. Isolat khamir K1,K2,K3, dan K4 pada medium PDA
(Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2020)

Isolat khamir yang didapatkan pada penelitian ini di beri kode K1, K2, K3, dan K4. Dari keempat isolat yang tumbuh pada medium PDA yang berumur 72 jam menunjukkan ukuran yang berbeda-beda. Hal tersebut dapat dikarenakan kemampuan adaptasi khamir untuk tumbuh pada media pertumbuhan berbeda- beda, sehingga khamir tersebut ada yang pertumbuhannya lambat dan ada yang cepat (Maulana, 2011). Isolat khamir yang berasal dari sarang lebah madu *Apis dorsata* pada penelitian ini, lebih di dominasi oleh khamir yang pertumbuhannya lambat pada medium PDA. Khamir yang tumbuh pada medium PDA tersebut dari isolat K1 – K4 menunjukkan warna putih hingga krem. Hal tersebut diduga isolat khamir yang ditemukan termasuk dalam kelompok *Ascomycetes.* Menurut Fell, dkk (1998) dalam Maulana, (2011) bahwa khamir dari kelompok *Ascomycetes* umumnya tidak berwarna (putih hingga krem), sedangkan khamir dari kelompok *Basidiomycetes* umumnya memiliki warna jingga, merah, dan merah muda.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

4.2. Karakteristik Isolat Khamir secara Makroskopis dan Mikroskopis

Dari data hasil isolasi khamir pada media PDA terdapat empat isolat khamir yaitu K1, K2, K3, dan K4. Isolat khamir yang diperoleh tersebut dilakukan pengamatan morfologi meliputi pengamatan makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan koloni khamir yang tumbuh pada medium PDA ini bertujuan untuk mengetahui warna, bentuk, ukuran, tekstur, margin, dan elevasi sedangkan pengamatan morfologi sel khamir dilakukan untuk mengetahui bentuk, pola pertunasan, dan pseudohifa/hifa (Jumiyanti *et al.*, 2012). Hasil pengamatan makroskopis maupun mikroskopis masing-masing isolat khamir dapat dilihat pada Tabel 4.1. dan Tabel 4.2.

Tabel 4.1 Hasil pengamatan isolat khamir secara makroskopis

Kode Isolat	Bentuk	Ukuran	Warna	Tekstur	Margin	Elevasi
K1	Bulat	Medium	Putih krem	Kental, Licin	Bergerigi	Timbul
K2	Bulat	Large	Putih krem	Kental, Licin	Berombak	Timbul
K3	Bulat	Large	Putih krem	Kental	Rata	Timbul
K4	Bulat	Medium	Putih Krem	Kental	Rata	Timbul

Karakter makroskopis dari ketiga isolat khamir yang diisolasi dari sarang lebah madu raksasa (*Apis dorsata*) di antarannya yaitu ketiga isolat khamir memiliki bentuk bulat dengan ukuran isolat K1 medium, isolat K2, isolat K3 berukuran large, dan isolat K4 berukuran medium. Keempat

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

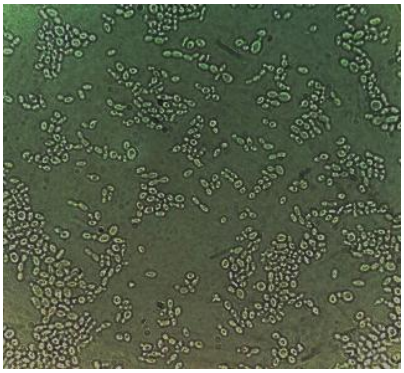
isolat memiliki warna putih krem, tekstur kental licin dan memiliki margin atau tepian yang berbeda tiap isolat yaitu isolat K1 bergerigi, K2 berombak, K3 dan K4 rata serta keempat isolat memiliki elevasi timbul.

Tabel 4.2. Hasil pengamatan isolat khamir secara mikroskopis

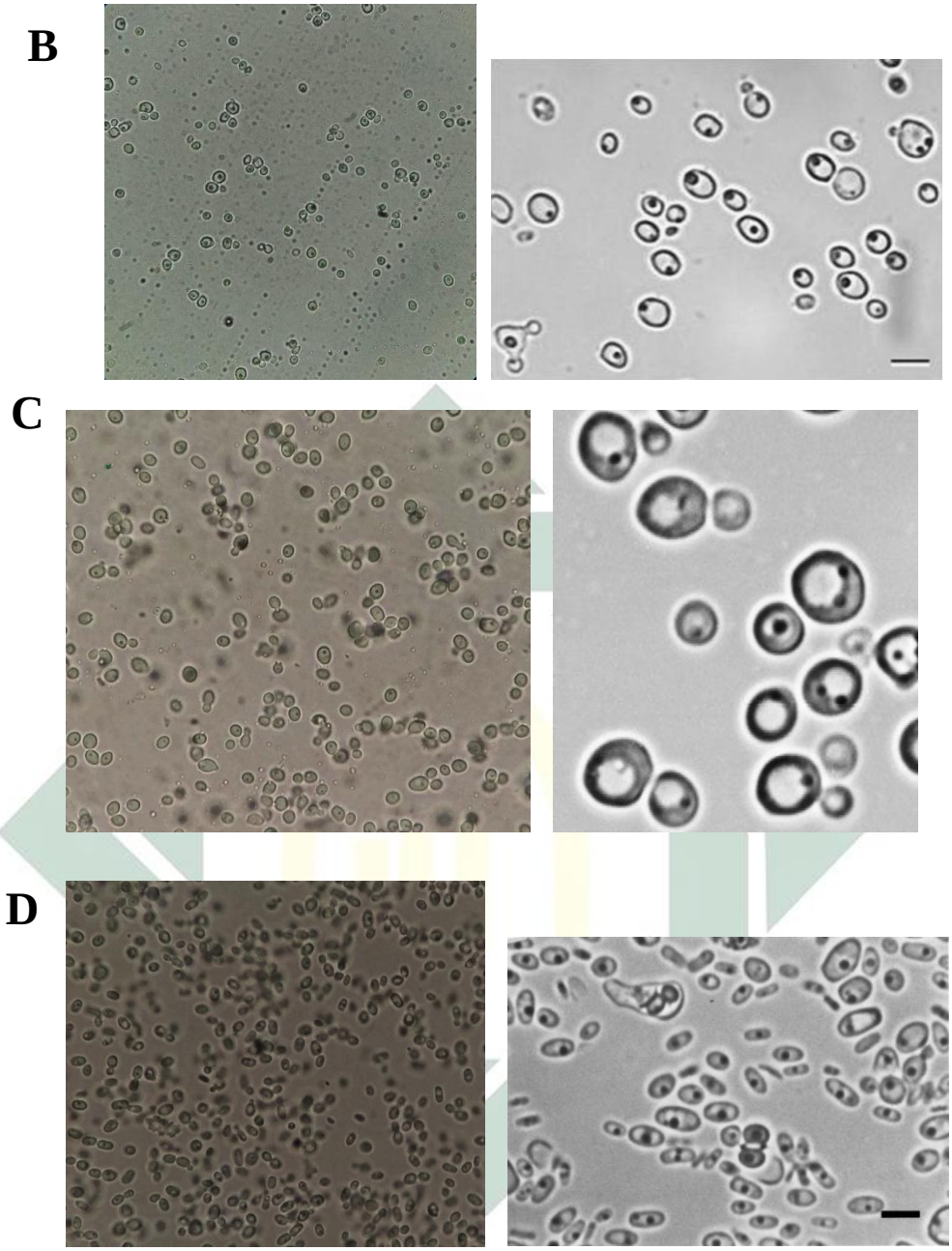
Kode Isolat	Bentuk Sel	Pola Pertunasan	Pseudohifa/ Hifa
K1	Oval, Silinder	Monopolar	Pseudohifa
K2	Bulat, Oval	Multilateral	-
K3	Bulat, Oval	Multilateral	-
K4	Silinder	Multilateral	-

Karakter mikroskopis dari keempat isolat khamir memiliki bentuk oval silinder (K1) dan bulat oval (K2 dan K3), serta silinder (K4). Pola pertunasan pada keempat isolat khamir adalah multilateral kecuali isolat K1 dengan pola pertunasan monopolar. Isolat K1 memperlihatkan pseudohifa. Adapun kenampakan keempat isolat khamir secara mikroskopis di bawah mikroskop perbesaran 1000x seperti gambar berikut ini.

A



digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id



Gambar 4.2. (a) Isolat K1 (kiri), gambar literatur Pichia membranifaciens (kanan) (b) Isolat K2 (kiri), gambar literatur Candida pomicola (kanan) (c) Isolat K3 (kiri), gambar literatur Torulospora delbrueckii (kanan) (d) Isolat K4 (kiri), gambar literatur Wickerhamomyces silvicola NRRL Y-1678 (kanan) (Sumber: Kurtzman et al, 2011)

Berdasarkan data hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis dari keempat isolat khamir yang diisolasi dari sarang lebah madu raksasa *Apis dorsata* dan dibandingkan dengan literatur buku dari Kurtzman *et al*, 2011 yaitu "*The Yeast a Taxonomic Study"* bahwa isolat K1 memiliki ciri yang mirip dengan khamir dari genus *Pichia* sedangkan isolat K2 mirip

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

khamir dari genus *Candida* dan isolat K3 mirip khamir dari genus *Torulospora* serta isolat K4 mirip dengan khamir dari genus *Wickerhamomyces*. Namun, dari keempat isolat khamir yang diperoleh tersebut perlu dilakukan analisis lebih lanjut agar didapatkan data dan hasil yang lebih akurat dan tepat. Menurut penelitian terdahulu oleh Candra (2015) keragaman isolat khamir pada sarang lebah *Apis dorsata* yaitu pada lokasi Desa Bligo didapatkan 9 isolat khamir dan 3 isolat khamir dari Desa Sukomulyo. Isolat khamir yang teridentifikasi mirip dengan Debaryomyces vindobonensis strain CBS:11666 dan Debaryomyces prosopidis sedangkan isolat khamir yang lainnya dengan similaritas dibawah 97% yaitu khamir dari genus Rhotorula, Candida, dan Debaryomyces. Sedangkan keragaman isolat khamir menurut literatur Prihartini M & Ilmi (2018) dari hasil penelitian diperoleh 27 isolat khamir dengan karakteristik khamir yang merupakan khamir dari kelompok Ascomycota yang bersifat osmofilik. Penelitian terkait dengan eksplorasi keragaman khamir pada sarang lebah madu raksasa (*apis dorsata*) masih jarang dilakukan sehingga referensi dan data keragaman khamir pada sarang apis dorsata sangat terbatas dan minim.

4.3. Ekstraksi DNA Khamir

Analisis molekular DNA khamir menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) diawali dengan ekstraksi DNA khamir yang dilakukan di laboratorium genetika UIN Sunan Ampel Surabaya. Tahapan ekstraksi DNA khamir ini mengacu pada protokol sederhana referensi dari LIPI dengan variasi waktu pada saat inkubasi yaitu 10 menit, 15 menit,

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

dan 20 menit. Metode ini digunakan karena lebih cepat, tidak membutuhkan biaya yang mahal dan lebih minim bahan. Ekstraksi DNA sendiri merupakan salah satu kunci dari tahapan analisis molekular, dalam tahapan tersebut bertujuan untuk menghasilkan isolat DNA. Hasil ekstraksi DNA tersebut sangat menentukan keberhasilan pada proses analisis DNA selanjutnya, maka dari itu dalam proses ekstraksi DNA harus dilakukan dengan baik dan aseptis agar terhindar dari kontaminasi.

Prinsip ekstraksi DNA khamir sama dengan prinsip ekstraksi DNA pada umumnya yaitu perusakan dinding sel, pemisahan DNA, dan pemurnian DNA. Pada umumnya khamir memiliki dinding sel yang mengandung polisakarida glukan dan mannan (Fardiaz, 1992). Sehingga dalam ekstraksi DNA khamir untuk memecah dinding sel.nya memerlukan enzim akan tetapi, dalam penelitian ini menggunakan pemanasan dengan suhu 98°C dan ada tiga waktu yang digunakan untuk mendapatkan kemurnian hasil isolasi dengan optimal. Selain itu, adanya variasi waktu ini dikarenakan variasi ketebalan dinding sel yang berbeda-beda tiap isolat khamir. Ketebalan dinding sel pada isolat khamir merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi keberhasilan ekstraksi DNA khamir (Maulana, 2011).

Berdasarkan Moore (1998), sel khamir mempunyai ketebalan dinding yang berbeda-beda yaitu khamir dari kelompok Basidiomycetes terdiri dari banyak lapis atau multilayer sedangkan khamir dari kelompok Ascomycetes terdiri dari dua lapis dinding sel. Hasil dari ekstraksi DNA khamir kemudian dilakukan pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

khamir hasil dari ekstraksi menggunakan spektrofotometri *Bio-Drop*. *Bio-Drop* adalah suatu alat yang digunakan untuk mengukur konsentrasi DNA. Pengukuran DNA menggunakan *Bio-Drop* mempunyai beberapa keunggulan yaitu dapat menganalisis secara akurat isolat dengan minimum 0.5µl, dan mudah dalam membersihkannya sehingga mencegah DNA tercampur seperti dalam penggunaan pembersihan berulang menggunakan air (BioDrop, 2019).

Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA diawali dengan penggunaan NFW (*nuclease free water*) 1 µl sebagai blanko, selanjutnya 1 µl sampel DNA hasil ekstraksi. Hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA khamir menggunakan spektrofotometri, dilakukan secara bertahap dari waktu inkubasi 10, 15 dan 20 menit. Adapun hasil konsentrasi dari masing-masing pengukuran, disajikan pada tabel 4.3. – 4.5. berikut :

Tabel 4.3. Data Hasil Spektrofotometri dengan waktu inkubasi 10 menit pada saat ekstraksi DNA khamir

Kode Sampel	Waktu Inkubasi	Hasil Spektrofotometri	
		Konsentrasi (µl/mg)	Å260/Å280
K1	10’	2.646 µl/mg	1.896
K2	10’	14.15 µl/mg	2.246
K3	10’	11.98 µl/mg	2.335
K4	10’	1.052 µl/mg	1.748

Hasil spektrofotometri dengan waktu inkubasi 10 menit pada tabel 4.3. menunjukkan bahwa konsentrasi tertinggi terdapat pada isolat khamir yang berkode K2 yaitu sebesar 14.15 µl/mg namun kemurnian.nya 2.246 yang berarti hasil ekstraksi DNA tidak murni. Sedangkan hasil ekstraksi

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

DNA yang murni terdapat pada isolat K1 dengan konsentrasi yaitu 2.646 µl/mg dan kemurnian 1.896 dan isolat K4 dengan konsentrasi yaitu 1.052 µl/mg dan kemurnian 1.748.

Tabel 4.4. Data Hasil Spektrofotometri dengan waktu inkubasi 15 menit pada saat ekstraksi DNA khamir

Kode Sampel	Waktu Inkubasi	Hasil Spektrofotometri	
		Konsentrasi (µl/mg)	Å260/Å280
K1	15’	4.922 µl/mg	1.656
K2	15’	8.501 µl/mg	2.698
K3	15’	8.436 µl/mg	2.491
K4	15’	0.663 µl/mg	2.119

Hasil spektrofotometri dengan waktu inkubasi 15 menit pada tabel 4.4. menunjukkan bahwa konsentrasi tertinggi terdapat pada isolat khamir yang berkode K2 yaitu sebesar 8.501 µl/mg dan kemurnian.nya 2.698.

Tabel 4.5. Data Hasil Spektrofotometri dengan waktu inkubasi 20 menit pada saat ekstraksi DNA khamir

Kode Sampel	Waktu Inkubasi	Hasil Spektrofotometri	
		Konsentrasi (µl/mg)	Å260/Å280
K1	20’	6.127 µl/mg	1.644
K2	20’	8.558 µl/mg	1.413
K3	20’	12.35 µl/mg	1.387
K4	20’	1.749 µl/mg	8.721

Hasil spektrofotometri dengan waktu inkubasi 20 menit pada tabel 4.4. menunjukkan bahwa konsentrasi tertinggi terdapat pada isolat khamir yang berkode K3 yaitu sebesar 12.35 µl/mg dan kemurnian.nya 1.387.

Berdasarkan Tabel 4.3 – 4.5 menunjukkan hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA khamir, hasil ekstraksi referensi dari LIPI dengan variasi waktu inkubasi 10 menit, 15 menit, dan 20 menit pada

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

suhu 98°C. Berdasarkan data tersebut diperoleh bahwa isolat DNA dengan konsentrasi tertinggi berada pada waktu inkubasi 10 menit sampel K2 yaitu 14.15 µl/mg kadar kemurnian.nya 2.246 dan konsentrasi terendah berada pada waktu inkubasi 15 menit sampel K4 yaitu 0.663 µl/mg kadar kemurnian.nya 2.119. Menurut Sambrook, *et al.* (1989), isolat DNA dikatakan murni apabila nilai absorbansi 260 nm dan 280 nm berada diantara 1.75-2.0. Apabila rasio tersebut kurang dari 1.75 maka DNA dikatakan masih terkandung protein dan apabila rasionya lebih dari 2.0 maka DNA masih terkandung RNA. Pada penelitian ini isolat DNA yang menunjukkan DNA murni tanpa kontaminasi protein atau RNA adalah isolat DNA kode sampel K1 dengan waktu inkubasi 10 menit konsentrasinya yaitu 2.646 µl/mg dan kemurnian.nya 1.896. dan isolat K4 waktu inkubasi 10 menit dengan konsentrasi yaitu 1.052 µl/mg dan kemurnian 1.748

4.4. Optimasi Amplifikasi ITS rDNA Khamir

Isolat khamir yang telah diketahui konsentrasi dan kemurnian.nya dilakukan amplifikasi menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). PCR merupakan suatu metode untuk perbanyakan (amplifikasi) potongan DNA secara *in vitro* pada daerah spesifik yang dibatasi oleh sepasang primer oligonukelotida. Sedangkan primer sendiri merupakan pembatas daerah yang diperbanyak yaitu DNA untai tunggal yang urutannya komplemen dengan template DNA (Zein & Prawiradilaga, 2013).

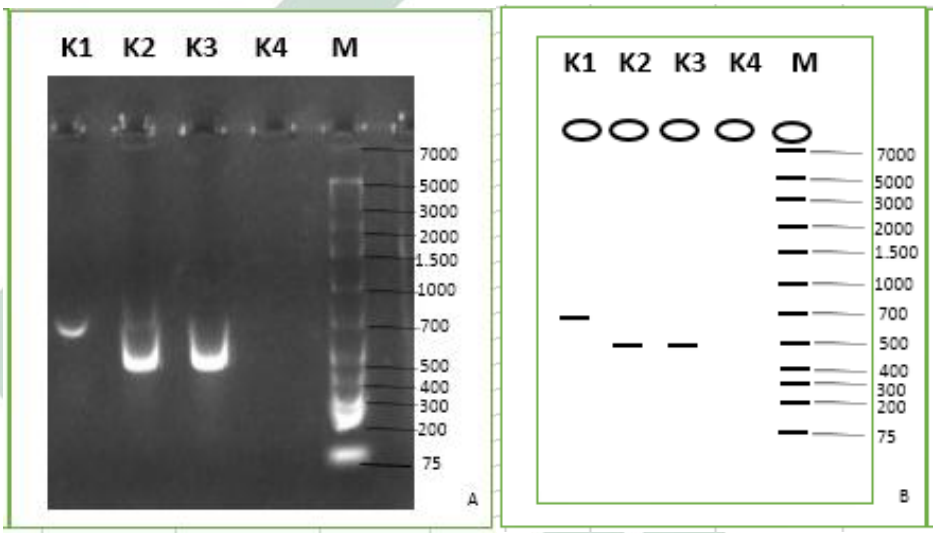
digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Pada penelitian ini amplifikasi DNA dilakukan menggunakan protokol Go Taq® Green Master Mix [Promega] untuk resep *coctail* pada reaksi PCR. Primer yang digunakan pada target daerah ITS rDNA khamir yaitu primer ITS4 (*reverse*) dan primer ITS5 (*forward*). Daerah ITS rDNA dipilih untuk amplifikasi DNA khamir karena mempunyai keunggulan yaitu, berukuran kecil (± 700 bp), dan mempunyai banyak salinan pada genom inti yang membuat daerah ITS relatif mudah untuk diisolasi, diamplifikasi, serta dianalisis (Ekasari *et al*., 2012). Sedangkan primer ITS4 dan ITS5 adalah primer universal yang digunakan untuk memperbanyak (amplifikasi) semua daerah ITS rDNA pada fungi (Maulana, 2011). Pengaturan suhu dan waktu pada proses PCR menggunakan tiga protokol yang berbeda yaitu protokol Ediningsari (2008), Maulana (2011), dan Atit et al (2018), hal tersebut dilakukan untuk optimalisasi. Optimasi amplifikasi ITS rDNA khamir perlu dilakukan, agar didapatkan produk PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ITS rDNA khamir yang cukup baik. Selain itu, hasil produk PCR yang optimal dapat digunakan untuk analisis selanjutnya. Keberhasilan dalam memperbanyak DNA dengan PCR bergantung pada suhu annealing, DNA templat yang cukup, dan pemilihan primer yang tepat (Nugroho *et al*., 2013).

DNA hasil amplifikasi produk PCR dilakukan visualisasi dengan elektroforesis. Gel elektroforesis merupakan suatu teknik yang digunakan dalam memisahkan molekul asam nukleat (DNA/ RNA) atau protein didasarkan pada ukuran molekul yang dipicu oleh muatan listrik

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

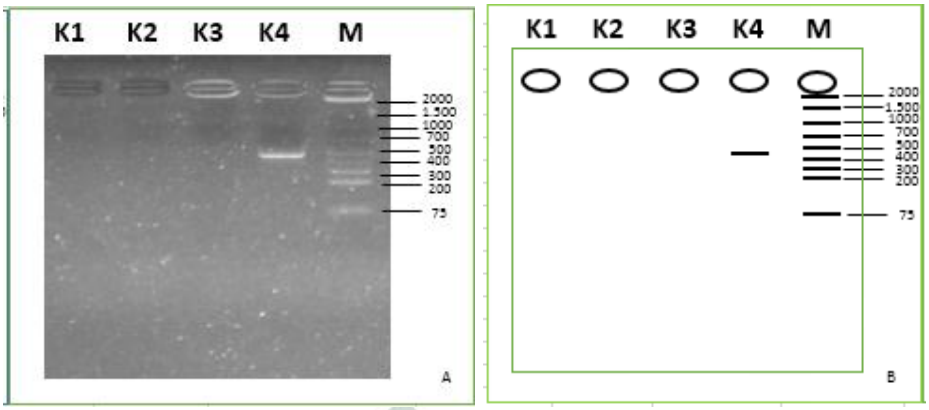
(Wahyuningsih, 2019). Teknik elektroforesis dilakukan dengan medium yang dibuat dari gel. Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi pemisahan molekul dalam medium gel yaitu komposisi dan konsentrasi gel, ukuran partikel, kuat medan listrik, dan densitas muatan (Zein & Prawiradilaga, 2013). Visualisasi DNA hasil optimasi PCR dari ketiga protokol ditunjukkan adanya pita DNA tunggal yang disajikan pada gambar berikut ini :



Gambar 4.3. A. Pita DNA hasil amplifikasi protokol Ediningsari (2008), B. Sketsa pita DNA hasil amplifikasi protokol Ediningsari (2008), (Sumber : A. UV Transluminator, B. Dokumen Pribadi, 2020)

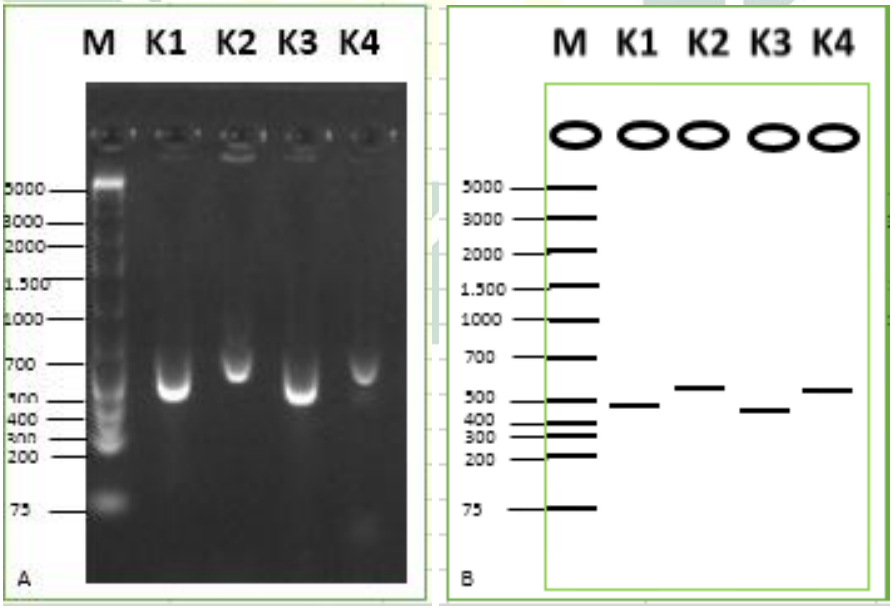
Berdasarkan gambar 4.3. hasil amplifikasi menggunakan protokol Ediningsari (2008), menunjukkan bahwa panjang pita DNA yang dihasilkan isolat khamir yang memiliki kode K1 yaitu berkisar 719 bp dan untuk isolat khamir K2, K3 masing-masing yaitu 579 bp dan 588 bp sedangkan isolat khamir berkode K4 tidak memunculkan pita DNA.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id



Gambar 4.4. A. Pita DNA hasil amplifikasi protokol Maulana (2011), B. Sketsa pita DNA hasil amplifikasi protokol Maulana (2011), (Sumber: A. UV Transluminator, B. Dokumen Pribadi, 2020)

Amplifikasi DNA khamir menggunakan protokol Maulana (2011), ditunjukkan pada gambar 4.4. terlihat dari gambar tersebut bahwa isolat khamir yang menghasilkan pita DNA yaitu isolat khamir berkode K4 dengan panjang 457 bp. Untuk isolat khamir berkode K1, K2, dan K3 tidak menghasilkan pita DNA pada protokol ini.



Gambar 4.5. A. Pita DNA hasil amplifikasi protokol Atit, *et al* (2018), B. Sketsa pita DNA hasil amplifikasi protokol Atit, *et al* (2018), (Sumber: A. UV Transluminator, B. Dokumen Pribadi, 2020).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Dilihat dari gambar 4.5. amplifikasi DNA khamir menggunakan protokol Atit, *et al* (2018), dari keempat isolat khamir masing-masing menghasilkan pita DNA dengan panjang yang berbeda-beda yaitu untuk isolat khamir dengan kode K1 panjang pita DNA yang dihasilkan 503 bp, isolat K2 542 bp, isolat K3 492 bp, dan isolat khamir dengan kode K4 panjang DNA.nya 526 bp.

Hasil visualisasi dari produk PCR setelah elektroforesis menghasilkan pita DNA pada isolat khamir yang berhasil di amplifikasi menggunakan tiga protokol pengaturan suhu dan waktu yang berbeda meskipun tidak semua isolat khamir menunjukkan ketebalan dan panjang pita DNA yang sama. Hal tersebut dapat diakibatkan oleh perbedaan konsentrasi dan kemurnian DNA hasil ekstraksi di dalam *template* yang digunakan pada saat PCR dan dapat juga dikarenakan perbedaan konsentrasi DNA hasil amplifikasi dari berbagai protokol yang digunakan (Pertiwi *et al*., 2015).

Ketiga protokol amplifikasi DNA khamir yang digunakan dalam penelitian ini, menunjukkan bahwa protokol dari Atit, *et al* (2018) menghasilkan pita DNA untuk semua isolat khamir. Berbeda dengan protokol dari Maulana (2011) dan Ediningsari (2008) yang tidak semua isolat khamir menghasilkan pita DNA. Namun, kualitas DNA yang dihasilkan kurang baik karena terlihat smear. Smear adalah DNA yang terpotong-potong dan berukuran kecil (Ekasari et al., 2012). Smear tersebut berbentuk noda memanjang dan tidak terlihat sebagai pita tunggal pada gel elektroforesis dibawah sinar UV. Adanya smear kemungkinan

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

diakibatkan karena polisakarida yang terdapat pada isolat khamir ikut terekstraksi selama ekstraksi DNA dilakukan. Selain polisakarida yang sering terekstraksi bersama DNA, hal yang dapat menyebabkan adanya smear yaitu RNA sebagai pengotor juga ikut terekstraksi saat proses ekstraksi DNA berlangsung (Rahayu et al., 2015).

Pada penelitian ini pita DNA yang dihasilkan terlihat sebagai pita DNA tunggal yang kompak dan tidak smear yaitu hasil amplifikasi menggunakan protokol Maulana (2011) yang terdapat pada isolat khamir berkode K4, hal tersebut menunjukkan DNA yang dihasilkan selama proses ekstraksi dan amplifikasi DNA berkualitas baik. Tetapi, protokol ini untuk isolat KI, K2, dan K3 tidak memunculkan pita DNA yang disebabkan oleh beberapa faktor seperti tidak menempelnya primer pada DNA target, DNA belum terdenaturasi, atau suhu annealing yang digunakan tidak cocok untuk isolat K1, K2, dan K3. Pengaturan suhu annealing dalam proses PCR sangat mempengaruhi proses melekatnya primer sehingga berubahnya suhu satu derajat menyebabkan gagalnya primer untuk melekat (Gusmiaty *et al*., 2012). Hal ini juga berlaku pada protokol Ediningsari (2008) akan tetapi perbedaanya pada protokol tersebut isolat khamir yang memunculkan pita DNA yaitu isolat berkode K1, K2, K3, dan untuk isolat K4 tidak memunculkan pita DNA. perbandingan panjang pita DNA yang dihasilkan dari ketiga protokol pengaturan waktu dan suhu PCR tersebut disajikan pada tabel 4.6.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Tabel 4.6 Perbandingan Panjang Pita DNA

NO	Protokol Pengaturan Suhu dan Waktu PCR	Panjang Pita DNA (bp)			
		K1	K2	K3	K4
1	Ediningsari (2008)	719 bp	579 bp	588 bp	-
2	Maulana (2011)	-	-	-	457 bp
3	Atit et al (2018)	503 bp	542 bp	492 bp	526 bp

(Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2020)

Berdasarkan tabel 4.6 perbandingan panjang pita DNA khamir menggunakan tiga protokol pengaturan suhu dan waktu PCR menunjukkan panjang pita DNA yang berbeda-beda. Akan tetapi, ukuran panjang daerah ITS berkisar antara 300-900 bp (Citra, 2019). Hal tersebut sesuai dengan hasil amplifikasi dari ketiga protokol yang digunakan. Perbedaan ukuran fragmen DNA (polimorfisme fragmen DNA) hasil amplifikasi DNA khamir dikarenakan oleh sebaran lokasi basa nukleotida dalam genom yang menjadi tempat menempelnya primer. Pita DNA hasil amplifikasi yang berbeda ini yaitu, ukuran pita DNA sangat berpengaruh untuk menentukan tingkat keragaman populasi (Gusmiaty, et al., 2012).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

BAB V
PENUTUP

5.1. Simpulan

Penelitian yang berjudul "Optimasi Amplifikasi ITS rDNA Khamir Menggunakan Metode PCR yang Diisolasi dari Sarang Lebah Madu Raksasa (Apis dorsata) dapat disimpulkan sebagai berikut.

1. Isolat khamir yang diisolasi dari sarang lebah madu raksasa (*Apis dorsata*) diperoleh empat isolat yang menunjukkan karakteristik berbeda-beda, dilihat dari morfologi secara makroskopis dan mikroskopis.
2. Isolat khamir yang didapatkan dalam penelitian, dilakukan ekstraksi DNA khamir menggunakan protokol sederhana referensi dari LIPI dengan tiga variasi waktu inkubasi yaitu 10, 15, dan 20 menit. Waktu yang paling optimal digunakan dari hasil penelitian yaitu 10 menit dari isolat K1 dengan konsentrasi 2.646 µg/ml dan kemurnian 1.896. dan isolat K4 dengan konsentrasi yaitu 1.052 µl/mg dan kemurnian 1.748.
3. Hasil amplifikasi menggunakan protokol Atit el al (2018) memunculkan pita DNA untuk semua isolat tetapi terlihat smear sedangkan protokol maulana (2011) hanya isolat K4 yang memunculkan pita DNA dan terlihat sebagai pita DNA tunggal serta protokol ediningsari (2008) yang memunculkan pita DNA pada semua isolat kecuali isolat K4.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

5.2. Saran

Penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk mendapatkan informasi terkait spesies – spesies khamir yang diisolasi dari sarang lebah madu raksasa Apis dorsata secara tepat dan akurat.

1. Meningkatkan proses ekstraksi DNA agar lebih mendapatkan konsentrasi dan kemurnian yang baik untuk semua isolat.
2. Mencari protokol amplifikasi DNA khamir yang lain untuk membandingkan hasil amplifikasi yang paling optimal agar didapatkan pita DNA untuk semua isolat dan terlihat sebagai pita DNA tunggal. ,

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

DAFTAR PUSTAKA

Anggraini, I., Ferniah, R.S., Kusdiyanti, E., 2019. Isolasi Khamir Dari Batang Tanaman Tebu dan Identifikasinya Berdasarkan Sekuen Internal Transcribed Spacer. Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia Vol 6 No 1.

Ashliha, I.N., Alami, N.H., 2014. Karakterisasi Khamir dari Pulau Poteran Madura. JURNAL SAINS DAN SENI POMITS Vol 3 No 2, 2337–3520.

Bertoni R, 2013. Perbandingan Ukuran-Ukuran Bagian Tubuh Lebah Pekerja Apis dorsata (Lebah Hutan) Pada Empat Lokasi. Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor. Bogor.

BioDrop, 2019. Using a Biodrop uLITE Spektrofotometer to Measure the Concentration of Low Volume Samples of dsDNA. BioDropTM uLITE dsDNA Apliction Note.

Boekhout, T.E.U.N, Robert, V.I.N.C.E.N.T, 2003. Methods to Identify Yeast. Yeast in Food, Beneficial and Detrimental Aspects.

Bradbear, N., 2009. Bees and their role in forest livelihoods A guide to the services provided by bees and the sustainable harvesting, processing and marketing of their products. Food and Agriculture Organization of The United Nations, Rome, Italy.

Candra R P, 2015. Keragaman Khamir Dari Sarang Lebah Madu Hutan (Skripsi). Mikrobiologi Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Ediningsari, A.R., 2008. Identifikasi Khamir dari Perairan Mangrove dan Laut Cagar Alam Pulau Rambut Berdasarkan Daerah Internal Transcribed Spacer (ITS) (Skripsi). Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Depok.

Ekasari, T.W.D., Retnoningsih, A., Widianti, T., 2012. Analisis Keanekaragaman Kultivar Pisang Menggunakan Penanda PCR-RFLP pada Internal Transcribed Spacer (ITS) DNA Ribosom. Jurnal MIPA 35 (1).

Ellis, J., 2015. The Internal Anatomy of The Honey Bee. American Bee Journal.

Faatih, M., 2009. Isolasi dan Digesti DNA Kromosom. Jurnal penelitian Sains dan teknologi Vol 10 No 1, 61–67.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Fardiaz S., 1992. Mikrobiologi Pangan. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.

Gusmiaty, Restu, M., pongtuluran, I., 2012. Seleksi Primer untuk Analisis Keragaman Genetik Jenis Bitti (Vitex coffassus). Jurnal Perennial Vol 8 No 1, 25–29.

Handoyo, D., Rudiretna, A., 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). Unitas Vol 9 No 1, 17–29.

Hapsari, Ari. I., 2015. Isolasi DNa Tanaman Baam dan Ikan Lele dalam Morfologi Molekular. Didaktita Vol 13 No 2, 23–30.

Hartini, 2017. Uji Aktivitas Antifungi Ekstrak Sarang Lebah Dan Madu Hutan Luwu Utara Terhadap Candida Albicans (Skripsi). Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar, Makassar.

Jack, C.J., Lucky, A., Ellis, J.D., 2016. Giant Honey Bee Apis dorsata Fabricius (Insecta: Hymenoptera: Apidae). the Entomology and Nematology Department, UF/IFAS Extension, University of Florida.

Jumiyanti, Bintari, S.H., Mubarok, I., 2012. Isolasi dan Identifikasi Khamir secara Morfologi di Tanah Kebun Wisata Pendidikan Universitas Negeri Semarang. Biosantifika Vol 4 No 1.

Kanti, A., Ilyas, M., Nurkanto, A., Sulistiyani, T.R., Siti Meliah, 2018. Panduan Pengelolaan Koleksi Mikroorganisme Indonesian Culture Collection (InaCC). LIPI Press, Jakarta.

Kurtzman, C., Fell, J.W., Boekhout, T., 2011. The Yeast : A Taxonomic Study, 5th Edition. ed. Elsevier Science, U.S.A.

Kurtzman, C.P., Jack W. Fell, Teun Boekhout, Vincent Robert, 2011. Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeast. Elsevier B.V., USA.

Lamerkabel, J.S.A., 2011. Mengenal Jenis-Jenis Lebah Madu, Produk-Produk dan Cara Budidayanya. Jurnal Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Vol 9 No 1.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Maulana, I., 2011a. Identifikasi Isolat-Isolat Khamir dari Saluran Pencernaan Apis cerana (FABRICIUS, 1793) di Apiari Berdasarkan Data Sequence Daerah ITS rDNA (Skripsi). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Departemen Biologi, Depok.

Maulana, I., 2011b. Identifikasi Isolat-isolat Khamir dari Saluran Pencernaan Apis cerana (FABRICIUS, 1793) di Apiari Berdasarkan Data Sequence Daerah ITS rDNA. Universitas Indonesia, Depok.

Miller, D.M., Jamison, K., Wallace, R., 2009. The Buzz About Bees: Honey Bee Biology and Behavior, 4th-H Honey Bee Leaders Guide Book I ed. Virginia Cooperative Extension 380-071.

Montes de Oca, R., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Monroy, H., Pérez,, L.S., Zamora, J.L. and Gutiérez, A., 2016. Yeast : Description And Structure. ResearchGate.

Moore, R.T, 1998. Cytology and Ultrastructure of Yeast and Yeastlike Fungi. Dalam: Kurtzman, C.P. & J.K. Fell (eds)., 4th ed. Elsevier. ed. The Yeast: A Taxonomic Study, Amsterdam.

Mulyatni, A.S., Priyatmojo, A., Purwantara, A., 2011. Sekuen Internal Transcribed Spacer (ITS) DNA ribosomal Oncobasidium theobromae dan jamur sekerabat pembanding. Menara Perkebunan Vol 79 No 1, 1–5.

Nagir, M.T., Atmowidi, T., Kahono, S., 2016. The distribution and nest-site preference of Apis dorsata binghami at Maros Forest, South Sulawesi, Indonesia. Journal of Insect Biodiversity Vol 4 No 23, 1–14.

Nagla, M.M.A., Fadil, O.E.E., Muzamil, A.H.M., Hisham, A.N., Bahaeldeen, M.B., El-Nour, E.-A., 2019. Internal transcribed spacer for identification of yeast species isolated from cancer patients at the Isotope and Radiation Center, Khartoum, Sudan: A cross-sectional, case-control study [version 1; peer review: 1 approved, 1 approved with reservations]. F1000Research 7:443. https://doi.org/10.12688/f1000research.14019.1

Novia, Saepudin, R., Sutriyono, 2013. Analisis Morfometrik Lebah Madu Pekerja Apis Cerana Budidaya pada Dua Ketinggian Tempat yang Berbeda. Jurnal Sain Peternakan Indonesia Vol 8 No 1.

Nugroho, E.D, 2017. Pengantar Bioteknologi (Teorii dan Aplikasi). Deepublish, Yogyakarta.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Nugroho, T.T., Rambe, E., Dewi, A., Fitri, R.M., Sepryani, H., Restuhadi, F., Haryani, Y., 2013. Optimasi Isolasi dan Amplifikasi ITS DNA Ribosomal Fungi Karbolitik Isolat Zona Inti Cagar Biosfer Giam Siak Kecil-Bukit Batu. Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung.

Pelczar, M.J., E.C.S. Chan, 2013. Dasar-Dasar Mikrobiologi 1. Penerbit Universitas Indonesia (UI-PRESS).

Pertiwi, N.P.D., Mahardika, I.G.N.K., Watiniasih, N.L., 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), 1–5.

Prihartini M, Ilmi M, 2018. Karakterisasi dan Klasifikasi Numerik Khamir Madu Hutan dari Sulawesi Tengah. Jurnal Mikologi Indonesia Vol 2 No 2, 112–127.

Rahayu, F., Saryono, Nugroho, T.T., 2015. Isolasi DNA dan Amplifikasi PCR Daerah ITS rDNA Fungi Endofit Umbi Tanaman Dahlia (Dahlia variabilis) LBKURCC69. JOM FMIPA Vol 2 No 1.

Rini, A.W.E., 2017. Isolasi dan Identifikasi Khamir Toleran Alkohol dari Molasses (Skripsi). Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember, Jember.

Rukmana, S., 2015. Perbandingan Sekuen Kapang Trichoderma sp. Berdasarkan Internal Transcribed Spacer (ITS) rDNA Dengan Menggunakan Database NCBI (Skripsi). Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

Sambrook, J, E.F. Fritsch, T. Maniatis, 1989. Molecular Cloning Laboratory Manual 3rd Ed. Cold Spring Harbour Lab. Press, New York.

Sartika, 2011. Analisis Kadar Glukosa dan Fruktosa Pada Beberapa Madu Murni yang Beredar di Pasaran Dengan Menggunakan Metode Spektrofotometri Visible (Skripsi). Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Alaudin Makassar.

Savitri, N.P.T., Hastuti, E.D., Suedy, S.W.A., 2017. Kualitas Madu Lokal dari Beberapa Wilayah di Kabupaten Temanggung. Buletin Anatomi dan Fisiologi Vol 2 No 1.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Situmorang, R., O.P., Aam, H., 2014. Panduan Manual Budidaya Lebah Madu. Balai Penelitian Kehutanan Aek Nauli.

Situmorang, Rospita O.P., Aam Hasanudin, 2014. Panduan Manual Budidaya Lebah Madu. Kementerian Kehutanan Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan Balai Penelitian Kehutanan Aek Nauli.

Situmorang, Rospita O. P., Aam Hasanudin, 2014. Panduan Manual Budidaya Lebah Madu. Balai Penelitian Kehutanan Aek Nauli, Aek Nauli.

Sumerta, I.N., Atit Kanti, 2017. Keragaman Jenis khamir Penghasil Etanol yang Diisolasi dari Makanan Fermentasi di Kepulauan Riau. Jurnal Biologi Indonesia 13, 61–69.

Sumerta, I.N., Kanti, A., 2016. Keragaman Jenis Khamir Penghasil Etanol yang Diisolasi dari Makanan Fermentasi di Kepulauan Riau. Jurnal Biologi Indonesia Vol 13 No 1, 61–69.

Suryaningsih, V., Ferniah, R.S., Kusdiyantini, E., 2018. Karakteristik Morfologi, Biokimia, dan Molekuler Isolat Khamir IK-2 Hasil Isolasi Dari Jus Buah Sirsak (Annona muricata L.). Jurnal Biologi Vol 7 No 1, Hal. 18-25.

Wahyuningsih, A., 2019. Keragaman Genetik Pisang (Musa spp.) Berdasarkan Karakter Fenotip dan Molekular Menggunakan Penanda Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) di Kabupaten Lumajang (Skripsi). Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya, Surabaya.

Webster, J., Weber, R., 2007. Introduction to Fungi. United States of America by Cambridge University Press, New York.

Widyarti, S., 2018. Elektroforesis Gel poliakrilamid. JBUB, Malang.

Won, H., Renner, S.S., 2005. The internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA in the gymnosperm Gnetum. Molecular Phylogenetics and Evolution 36, 581–597. https://doi.org/doi:10.1016/j.ympev.2005.03.011

Zein, M.S.A., Prawiradilaga, D.M., 2013. DNA Barcode Fauna Indonesia, Pertama. ed. Kencana Prenadamedia Group, Jakarta.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Zuhriana, K.Y. 2010. Polymerase Chain Reaction *(PCR). Jurnal Saintek*. Vol 5 No 6

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id