

**OPTIMASI ISOLASI DNA DAN PROTOKOL PCR (*Polymerase
Chain Reaction*) UNTUK IDENTIFIKASI KHAMIR DARI
SARANG LEBAH MADU *Apis mellifera***

SKRIPSI



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

Disusun oleh:

**AYUDYA FITRI ARIFA
H71216051**

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

PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Ayudya Fitri Arifa

NIM : H71216051

Program Studi : Biologi

Angkatan : 2016

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul **“OPTIMASI ISOLASI DNA DAN PROTOKOL PCR (*Polymerase Chain Reaction*) UNTUK IDENTIFIKASI KHAMIR DARI SARANG LEBAH MADU *Apis mellifera*”**. 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, 3 Agustus 2020

Yang menyatakan,



Ayudya Fitri Arifa
NIM. H71216051

LEMBAR PERSETUJUAN PEMBIMBING

Skripsi oleh

NAMA : AYUDYA FITRI ARIFA

NIM : H71216051

JUDUL : OPTIMASI ISOLASI DNA DAN PROTOKOL PCR
(*Polymerase Chain Reaction*) UNTUK IDENTIFIKASI
KHAMIR DARI SARANG LEBAH MADU *Apis mellifera*

Telah diperiksa dan disetujui untuk diujikan.

Surabaya, 3 Agustus 2020

Dosen Pembimbing I



Nirmala Fitria Firdhausi, M.Si.
NIP. 198506252011012010

Dosen Pembimbing II



Irul Hidayati, M.Kes.
NIP.198102282014032001

LEMBAR PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI

Skripsi Ayudya Fitri Arifa ini telah dipertahankan
di depan tim penguji skripsi
di Surabaya, 3 Agustus 2020

Mengesahkan,
Dewan Penguji

Penguji I



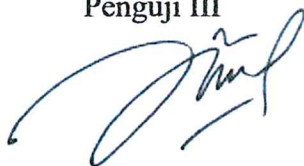
Nirnala Fitria Firdhausi, M.Si.
NIP. 198506252011012010

Penguji II



Irul Hidayati, M.Kes.
NIP.198102282014032001

Penguji III



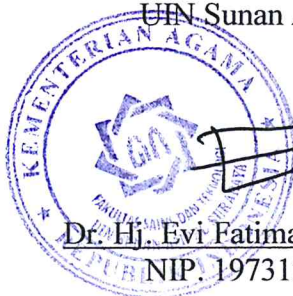
Hanik Faizah, M.Si
NUP. 201409019

Penguji IV



Ita Airtun 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



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 : AYUDYA FITRI ARIFA
NIM : H71216051
Fakultas/Jurusan : SAINS DAN TEKNOLOGI/BIOLOGI
E-mail address : ayudyafitri15@gmail.com

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

Sekripsi Tesis Desertasi Lain-lain (.....)
yang berjudul :

OPTIMASI ISOLASI DNA DAN PROTOKOL PCR (*Polymerase Chain Reaction*) UNTUK

IDENTIFIKASI KHAMIR DARI SARANG LEBAH MADU *Apis mellifera*

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

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

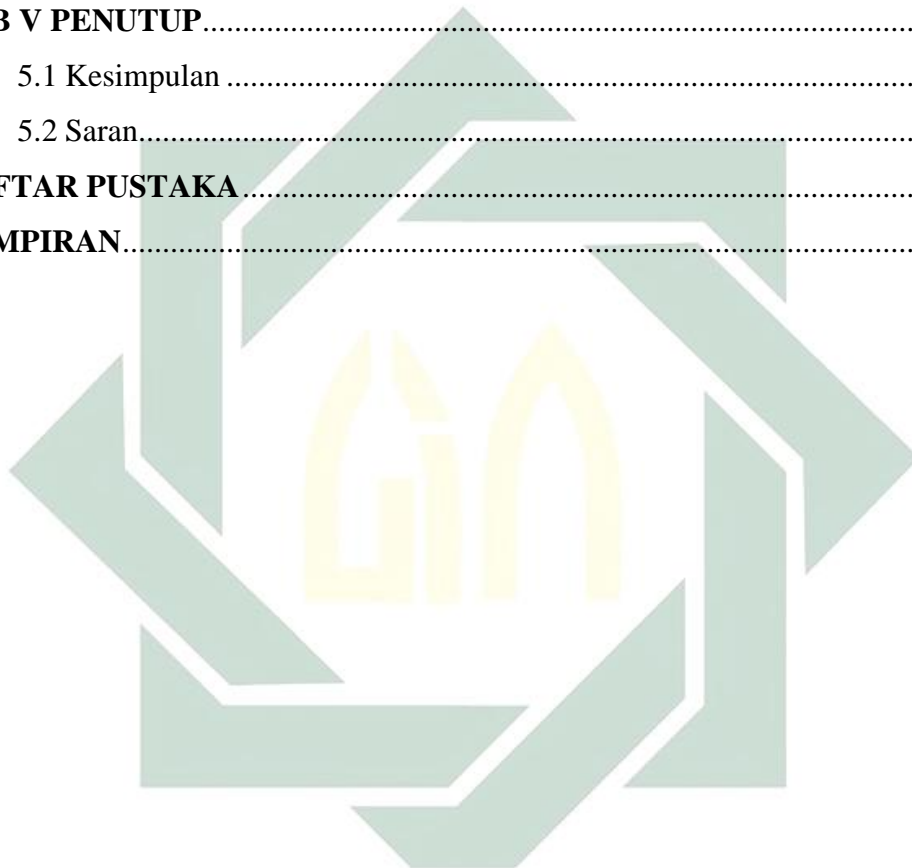
Demikian pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 9 Agustus 2020

Penulis

(Ayudya Fitri Arifa)

3.5 Prosedur Penelitian	49
3.6 Analisis Data	60
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	62
4.1 Isolasi Khamir dari Sarang Lebah Madu <i>Apis mellifera</i>	62
4.2 Optimasi Isolasi DNA Khamir	65
4.3 Optimasi Protokol PCR untuk Amplifikasi DNA Khamir	72
4.4 Optimasi Isolasi dan Amplifikasi DNA dalam Prespektif Islam	82
BAB V PENUTUP.....	86
5.1 Kesimpulan	86
5.2 Saran.....	86
DAFTAR PUSTAKA.....	87
LAMPIRAN.....	93



lingkungan ekstrem dengan konsentrasi gula, garam, dan pH yang tinggi (Prihartini and Ilmi, 2018). Khamir juga dapat ditemukan di dalam sarang lebah madu (Thacker, 2012).

Keberadaan khamir pada sarang lebah madu memberikan peranan yang penting bagi kehidupan lebah beserta koloninya, dari peranan ini menimbulkan adanya simbiosis mutualisme antara lebah madu dan khamir. Lebah memiliki peranan sebagai vektor bagi khamir dari habitat satu ke habitat lainnya, sedangkan khamir berperan dalam proses pematangan madu bunga (*nectar*) menjadi madu pada sisir madu (*honeycomb*). Khamir berperan dalam proses konversi serbuk sari (*pollen*) menjadi *bee bread* yang berguna sebagai makanan lebah (Maulana, 2011), atau yang biasa disebut fermentasi. Proses fermentasi yang dilakukan khamir bersifat enzimatik dengan mengubah gula yang terkandung dalam nektar dan *pollen* menjadi alkohol. Alkohol akan mengalami reaksi dengan oksigen sehingga membentuk asam bebas seperti asam asetat dan asam oksalat yang berpengaruh terhadap tingkat aroma, keasaman, dan rasa pada madu (Savitri *et al.*, 2017).

Madu termasuk ke dalam cairan yang bersifat kental menyerupai sirup dan memiliki warna dari kuning muda, coklat, hingga coklat kemerahan (Sebayang *et al.*, 2017). Ketersediaan bunga dari tanaman yang menjadi sumber nektar merupakan penyebab keberagaman jenis madu. Indonesia sendiri, mempunyai beragam jenis madu yang dibedakan berdasarkan pada jenis tanamannya, yaitu madu multiflora dan monoflora. Keberagaman jenis madu menyebabkan adanya keragaman pada khamir yang membantu dalam proses pembuatan madu. Hal itu dikarenakan disetiap nektar bunga memiliki

Lebah juga dikaruniai oleh Allah kemampuan dalam memproduksi madu yang merupakan obat untuk menyembuhkan penyakit. Madu juga sering dikenal sebagai “*The food of god*”, bahkan Allah telah memberikan kedudukan istimewa kepada lebah dengan dibuktikan adanya Surat An-Nahl yang artinya lebah dan semua isi dalam surat tersebut menerangkan tentang kehidupan dan segala sesuatu yang dapat dikaji dan dipelajari dari lebah.

Salah satunya, yaitu kemampuan lebah dalam memproduksi madu dengan bantuan khamir. Peran dan keberadaan khamir pada produksi madu yang berada di dalam sarang lebah masih belum banyak yang mengkaji termasuk keberadaannya pada sarang lebah madu *Apis mellifera*. Hal ini dapat dilakukan melalui identifikasi. Identifikasi, eksplorasi, bahkan isolasi merupakan beberapa metode untuk mempelajari segala sesuatu tentang khamir. Metode ini dapat digunakan untuk mengetahui keanekaragaman dan kelimpahan khamir di alam. Pada tahun 1951, Wickerman merupakan orang pertama yang memelopori penelitian mengenai identifikasi khamir, sehingga memberikan pengaruh pada perkembangan pengetahuan tentang taksonomi khamir. Perkembangan ini ditandai dengan adanya sekitar 100 genus dan 700 spesies khamir yang berhasil teridentifikasi (Kanti and H.J.D., 2011). Bahkan, pada tahun 2011 terdapat sekitar 1500 spesies khamir berhasil teridentifikasi hingga ke taksonominya (Candra, 2015).

Namun, peningkatan perkembangan mengenai identifikasi khamir masih belum mewakili seluruh spesies khamir karena pada kenyataannya, khamir diperkirakan berjumlah sekitar 150.000 spesies, sehingga masih tersisa 99% spesies yang belum teridentifikasi dan sangat perlu dilakukan

eksplorasi terutama pada negara yang memiliki kelimpahan keanekaragaman mikroorganisme seperti Indonesia (Candra, 2015). Diantara 89 genus khamir yang telah teridentifikasi dan terdaftar dalam monograf, sebanyak 37 genus berhasil ditemukan di alam Indonesia. Hal ini mengindikasikan bahwa masih banyak spesies khamir yang belum teridentifikasi di alam Indonesia dan dari sini telah membuktikan bahwa Indonesia memiliki potensi sebagai tempat eksplorasi dan identifikasi khamir yang menjanjikan (Lase, 2016).

Identifikasi khamir merupakan suatu proses yang digunakan untuk menemukan dan membandingkan isolat khamir yang belum teridentifikasi dengan taksa yang telah teridentifikasi sehingga dapat memberikan identitas pada spesies baru. Identifikasi khamir memiliki banyak manfaat seperti mengetahui adanya biodiversitas spesies khamir di alam, menganalisa hubungan kekerabatan, dan mengetahui peranan khamir di berbagai sektor seperti pada bidang pangan sebagai *starter* produk fermentasi makanan dan minuman dan pada bidang energi sebagai *bioefuel* dan bioetanol (Sumerta and Atit, 2017). Identifikasi khamir biasanya dapat dilakukan melalui dua jenis metode yaitu secara konvensional dan molekular (Maulana, 2011).

Identifikasi secara konvensional berpatokan pada karakter biokimia, fenotip, fisiologi, dan morfologi (Diana and Titi, 2016). Parameter yang digunakan pada identifikasi konvensional tidak menyediakan banyak variasi sehingga dapat menimbulkan kesulitan, jika ingin melakukan identifikasi hingga tingkat spesies, sedangkan identifikasi secara molekular berpatokan pada data *sequence* gen, sehingga memiliki beberapa keuntungan yang dapat

mengatasi kelemahan pada identifikasi secara konvensional, seperti lebih akurasi dan tidak membutuhkan waktu yang lama (Maulana, 2011).

Adapun kelompok gen yang biasanya digunakan dalam identifikasi molekular adalah gen pada ribosomal DNA (rDNA). Gen ini dapat ditemukan di semua makhluk hidup, mudah dalam proses *sequensing*, dapat dilakukan amplifikasi dengan primer universal, dan termasuk dalam *multiple copy* yaitu sekitar 100 hingga 200 *copy* dalam *genome*. Gen rDNA memiliki satu unit daerah yang terdapat pada makhluk hidup eukariotik yang terdiri dari daerah *coding* dan *non coding*. Daerah *coding* mencakup atas gen *Small Sub Unit* (SSU); 5,8S; gen *Large Sub Unit* (LSU); dan 5S, sedangkan daerah *non coding* mencakup pada *Intergenic Spacer* (IGS) dan *Internal Transcribed Spacer* (ITS) (Anggraini *et al.*, 2019).

Daerah ITS memiliki keragaman *sequence* yang tinggi jika dibandingkan dengan daerah *coding*. Menurut Ekasari *et al.* (2012), yang menyatakan bahwa sekuen daerah ITS mempunyai derajat variasi yang tinggi sehingga sangat sesuai jika digunakan dalam analisis sistematika melalui molekular hingga ke tingkat spesies. Sekuen ITS juga mempunyai karakteristik yang unggul dengan ukuran ± 700 bp, melalui karakteristik ini menjadikan sekuen ITS mudah dalam proses isolasi, amplifikasi, hingga analisisnya. Sekuen ITS juga mengacu pada *spacer* yang termasuk ke dalam target sekuen gen, sehingga sesuai jika digunakan dalam identifikasi khamir secara molekular (Anggraini *et al.*, 2019).

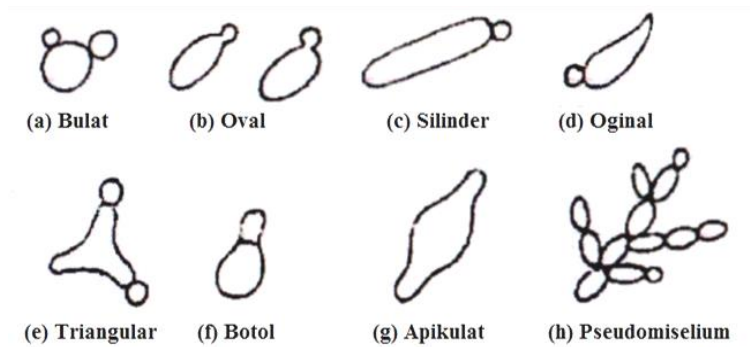
Variasi teknik dalam identifikasi khamir secara molekular sangat beragam tergantung pada cara pelaksanaan untuk mendapatkan data yang

diinginkan, biasanya akan disesuaikan dengan tingkat kemudahan metode, sarana prasarana, keberadaan sumber daya manusia, dan ketersediaan aspek finansial. Aspek finansial sering menjadi faktor penentu dalam identifikasi molekular, karena sangat berhubungan dengan penggunaan beberapa bahan kimia seperti kit isolasi dan amplifikasi DNA yang memiliki harga relatif mahal dengan pengadaan bahan yang terkadang memerlukan jangka waktu lama, sehingga diperlukan adanya terobosan penelitian yang dapat mengatasi permasalahan tersebut (Syafaruddin & Tri, 2011).

Terobosan ini berupa modifikasi metode yang sudah ada, ditinjau dari penggunaan bahan kimia, pengaturan suhu inkubasi saat isolasi DNA, pemilihan pasangan primer yang tepat, dan pengaturan suhu *annealing*, sehingga ditemukan metode yang paling optimal untuk identifikasi khamir secara molekular (Joko *et al.*, 2011). Metode yang optimal dapat dilihat berdasarkan keberhasilan isolasi DNA dan amplifikasi ITS rDNA yang dapat membantu dalam tahap lanjutan yaitu *sequencing* DNA, sehingga mempermudah dalam identifikasi maupun rekonstruksi filogenetik khamir yang berhasil diisolasi (Nugroho *et al.*, 2013).

Berdasarkan penjelasan tersebut, diketahui bahwa penelitian mengenai optimasi isolasi DNA dan protokol PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk identifikasi khamir dari sarang lebah madu *Apis mellifera* merupakan langkah awal yang akan digunakan sebagai referensi dan bahan acuan untuk penelitian selanjutnya yang diharapkan dapat memberikan manfaat secara teoritis maupun praktis. Oleh karena itu, pentingnya penelitian ini dilakukan

- d. Variasi metode isolasi DNA yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan dua referensi yaitu metode pertama berasal dari protokol Wizard® Genomic DNA Purification Kit TM050 yang telah dimodifikasi pada enzim yang digunakan (Proteinase K), sedangkan metode kedua berasal dari Kanti *et al.*, (2018) dalam buku panduan pengelolaan koleksi mikroorganisme InaCC LIPI.
- e. Teknik yang digunakan sebagai identifikasi secara molekular adalah teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) konvensional.
- f. *Component cocktail* dan Kit PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan pada Promega GoTaq® Green Master Mix 9PIM712.
- g. Variasi protokol PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan tiga referensi yaitu protokol PCR dari Kanti *et al.*, (2018), Ediningsari (2008), dan Maulana (2011) yang memiliki perbedaan pada suhu *annealing* dan siklusnya.
- h. Parameter yang digunakan dalam optimasi isolasi DNA dan protokol PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yaitu, nilai konsentrasi dan kemurnian isolasi DNA khamir serta visualisasi hasil amplifikasi DNA khamir menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang telah melalui tahap elektroforesis dan dilanjutkan dengan pembacaan pada instrumen *gel documentation*.
- i. Primer yang digunakan dalam identifikasi secara molekular yaitu, primer *forward* ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) dan primer *reverse* ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC).



Gambar 2.1 Beberapa Bentuk Khamir
Sumber: Rini, 2017.

2.1.1 Sistem Taksa (Taksonomi)

Taksonomi termasuk ke dalam ilmu yang memiliki cakupan mengenai klasifikasi dan identifikasi. Jika dilihat berdasarkan taksonominya, khamir termasuk ke dalam Kingdom Eumycota (Fungi) yang terdiri atas dua Filum yaitu Ascomycota dan Basidiomycota. Khamir yang termasuk ke dalam Filum Ascomycota memiliki kemampuan dalam menghasilkan askospora atau spora seksual yang strukturnya menyerupai kantung. Khamir ini juga memiliki tipe dinding sel bilayer atau dua lapis dan dapat berkembangbiak secara aseksual dengan cara membentuk tunas dengan tipe holoblastik (Rini, 2017).

Jika dilihat berdasarkan analisis sekuen pada daerah gen rRNA, Filum Ascomycota terdiri dari tiga Kelas yakni, Hemiascomycetes, Euascomycetes, dan Archiascomycetes. Kelas Hemiascomycetes terdiri dari satu Ordo yaitu Saccharomycetales yang mempunyai sebelas Famili. Kelas Euascomycetes terdiri dari dua anggota Genus *Endomyces* dan *Oosporidium*. Kelas Archiascomycetes terdiri dari enam Ordo yaitu Taphrinales, Schizosaccharomycetales,

Protomycetales, Pneumocystidales, Neoelectales, dan khamir anamorfik yang merupakan anggota dari Genus *Saitoella* (Kurtzman *et al.*, 2011).

Kelas Hemiascomycetes memiliki ciri-ciri sebagai berikut, mempunyai askokarp yaitu askus yang tidak dihalangi oleh badan buah, mempunyai dua lapis dinding sel atau yang biasa disebut sebagai tipe bilayer, dan dapat berkembangbiak secara aseksual melalui proses pembentukan arthrokonidia atau tunas dengan tipe holoblastik. Askokarp yang dimiliki oleh Kelas Hemiascomycetes terbagi menjadi beberapa jenis yang dibedakan berdasarkan bentuknya yakni, *hat-shaped*, *hemispheroidal*, *spheroidal*, *globose*, *ovoidal*, dan *lenticular* (Maulana, 2011).

Kelas Euscomycetes memiliki askokarp atau askus yang dihalangi oleh badan buah. Khamir Euscomycetes merupakan satu-satunya khamir yang askokarpnya dihalangi oleh badan buah. Selain itu, khamir yang termasuk ke dalam Kelas ini merupakan kelompok *yeast-like fungi*. Kelas Archiascomycetes memiliki ciri-ciri, antara lain mempunyai askokarp yang tidak dihalangi oleh badan buah, mempunyai dua lapis pada dinding selnya yang akrab disebut sebagai khamir pemilik dinding sel tipe bilayer yang dapat berkembangbiak secara aseksual melalui pembentukan tunas dengan pembelahan sel atau yang bisa disebut sebagai tipe enteroblastik. Khamir ini juga memiliki tipe askokarp yang beragam seperti *ellipsoidal*, *spheroidal*, dan *reniform* (Kurtzman, 2011).

Khamir yang termasuk ke dalam Filum Basidiomycota memiliki kemampuan dalam membentuk spora seksual basidiospora yang bentuknya menyerupai gada atau yang akrab disebut basidium. Filum ini memiliki tipe dinding sel yakni tipe multilayer atau banyak lapis dan dapat berkembangbiak secara aseksual melalui pembentukan tunas dengan tipe enteroblastik atau tipe pembentukan tunas melalui pembelahan sel. Khamir jenis ini juga memiliki kemampuan dalam membentuk teliospora. Teliospora merupakan spora seksual yang hanya dimiliki kelompok khamir pada Filum Basidiomycota dengan struktur dinding yang tebal. Teliospora ini juga menjadi tempat kariogami yang membentuk basidiospora khususnya pada Kelas Ustilaginales dan Uredinales (Coelho *et al.*, 2017).

Jika dilihat berdasarkan analisis filogenetik molekular pada sekuen daerah D1/D2 gen LSU rRNA, Filum Basidiomycota terdiri dari tiga Kelas yakni, Ustilaginomycetes, Urediniomycetes dan Hymenomycetes. Kelas Urediniomycetes terdiri dari empat Ordo yakni Sporidiobolous, Microbotryum, Erythrobasidium, dan Agaricostilbum. Kelas Ustilaginomycetes terdiri dari tiga Ordo yakni Ustilaginomycetidae, Malsseziales, dan Exobasidiomycetidae. Kelas Hymenomycetes terdiri dari empat Ordo yakni Cystofilobasidiales, Filobasidiales, Trichosporonales, dan Tremellales (Kurtzman, 2011).

Kelas Ustilaginomycetes memiliki ciri-ciri sebagai berikut, mempunyai komponen gula pada dinding selnya. Adapun golongan gula yang mendominasi adalah mannosa, galaktosa, dan glukosa. Kelas

Urediniomycetes memiliki ciri-ciri diantaranya, mempunyai peranan sebagai parasit hingga saprofit, memiliki persebaran ekologi yang luas, memiliki keberagaman tipe morfologi, dan beberapa contoh dari Kelas ini memiliki keunikan basidiospora sesil yang ada pada basidiumnya, yaitu pada Genus *Filobasidium* (Coelho *et al.*, 2017).

Jika dilihat berdasarkan sudah dan belum diketahuinya jenis reproduksi secara seksual, maka khamir dapat dibedakan menjadi dua tipe yakni khamir teleomorfik dan khamir anamorfik. Masing-masing Filum memiliki dua jenis tipe ini yang bisa disebut sebagai khamir Ascomycota teleomorfik, khamir Ascomycota anamorfik, khamir Basidiomycota teleomorfik, dan khamir Basidiomycota anamorfik (Rini, 2017).

Khamir yang memiliki tipe teleomorfik merupakan khamir yang sudah diketahui jenis reproduksi seksualnya, sedangkan khamir yang memiliki tipe anamorfik merupakan khamir yang belum diketahui jenis reproduksi seksualnya. 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. *Apiculate* atau *lemon shape yeast* merupakan khamir yang memiliki kemampuan dalam mengacaukan proses fermentasi wine, menimbulkan adanya *off-flavor*, mampu membentuk asam volatil tinggi dan alkohol. *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 (Maulana, 2011).

Food dan *feed yeast* merupakan tipe khamir yang sering dimanfaatkan sebagai bahan pangan dan bahan pakan ternak, biasanya khamir ini digunakan 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. *Osmofilic yeast* merupakan tipe khamir yang resisten terhadap lingkungan dengan kandungan gula dan garam yang tinggi (Sumerta and Atit Kanti, 2017).

Khamir dengan tipe ini mampu hidup pada lingkungan yang memiliki *aw* (*activity water* = aktivitas air) sebesar 0,62 hingga 0,65 bahkan ada yang mampu tumbuh pada *aw* 0,78, dan hampir semua khamir yang resisten terhadap kondisi lingkungan dengan kandungan konsentrasi garam tinggi termasuk ke dalam khamir tipe *film yeast* (Maulana, 2011).

2.1.2 Ekologi dan Habitat Alami

Khamir termasuk ke dalam kelompok mikroorganisme dengan penyebaran ekologi yang cukup luas. Keberadaan khamir di alam sangat melimpah meliputi perairan/akuatik (laut), atmosfer (udara), dan daratan/terrestrial (tanah) (Ashliha and Nur, 2014). Khamir banyak ditemukan pada komponen biotik seperti daun, buah, nektar bunga, dan saluran pencernaan beberapa hewan khususnya pada kelompok

serangga (*insecta*). Bahkan, beberapa khamir dapat bertahan hidup pada lingkungan ekstrem dengan kandungan konsentrasi gula, garam, dan pH yang tinggi serta lingkungan yang memiliki temperatur, ketersediaan oksigen, dan air yang rendah. Selain itu, khamir juga memiliki tempat berasosiasi lainnya seperti pada berbagai jenis minuman dan makanan berfermentasi. Salah satu produk fermentasi yang sering menjadi tempat habitat khamir adalah madu. Khamir juga dapat ditemukan di dalam sarang lebah madu (Prihartini and Ilmi, 2018).

2.1.3 Hubungan dengan Sarang Lebah

Hubungan yang terjalin antara lebah dan khamir bersifat saling menguntungkan atau yang biasa disebut sebagai simbiosis mutualisme. Lebah berperan sebagai vektor bagi khamir dari habitat satu ke habitat lainnya, sedangkan khamir berperan dalam proses pematangan madu bunga (*nectar*) menjadi madu pada sisir madu (*honeycomb*). Khamir berperan dalam proses konversi serbuk sari (*pollen*) menjadi *bee bread* yang berguna sebagai makanan lebah (Maulana, 2011), atau yang biasa disebut fermentasi.

Proses fermentasi yang dilakukan khamir bersifat enzimatik dengan mengubah gula yang terkandung dalam nektar dan *pollen* menjadi alkohol. Alkohol akan mengalami reaksi dengan oksigen sehingga membentuk asam bebas seperti asam asetat dan asam oksalat yang berpengaruh terhadap tingkat aroma, keasaman, dan rasa pada madu (Savitri *et al.*, 2017). Hal ini sesuai dengan firman Allah di dalam Al-Qur'an Surat An-Nahl ayat 13 yang berbunyi:

Indonesia merupakan negara yang memiliki biodiversitas lebah madu terbesar di dunia. Adapun jenis lebah madu yang dapat ditemukan di Indonesia seperti *Apis nigrocincta*, *Apis koschevnikovi*, *Apis dorsata*, *Apis cerana*, *Apis andreniformis*, dan *Apis mellifera* yang berasal dari Eropa dan telah di introduksi dari Australia, serta berhasil ditenakkan sejak tahun 1995 di Irian Jaya, sehingga menambah koleksi jenis lebah madu di Indonesia (Jasmi, 2013). Berdasarkan enam jenis lebah madu tersebut, terdapat beberapa yang sering dibudidayakan dan ada yang jarang dibudidayakan. Budidaya atau ternak lebah madu biasanya disesuaikan dengan hasil produksi madu dan tingkat kesulitan dalam proses pembudidayaannya. Lebah madu yang sering dibudidayakan adalah *Apis cerana* dan *Apis mellifera* (Situmorang and Aam, 2014).

Apis mellifera memiliki sebaran yang luas, bahkan hampir di seluruh benua, seperti Eropa, Australia, Amerika, Afrika, dan Asia. Kemampuan adaptasi tinggi yang dimiliki lebah ini sangat berhubungan dengan revolusi yang terjadi sehingga, menyebabkan lebah ini memiliki 24 subspecies, dan pada tahun 1988, Rutter melakukan pembagian kelompok terhadap 24 subspecies ini berdasarkan analisis multivariat yang dilihat dari morfometrik pada bagian tubuh lebah sehingga didapatkan empat kelompok yang disesuaikan dengan garis keturunan yakni kelompok 1 adalah kelompok A, Afrika; kelompok 2 adalah kelompok M, Eropa Utara dan Barat; kelompok 3 adalah kelompok C, Eropa Selatan; dan kelompok 4 adalah kelompok O, Timur Tengah (Hidayat, 2011).

Lebah madu *Apis mellifera* termasuk ke dalam jenis lebah madu yang digemari oleh para peternak lebah diberbagai negara, seperti Prancis, Spanyol, Yugoslavia, Yunani, dan termasuk di Indonesia. Adapun jenis lebah yang dibudidayakan yaitu *Apis mellifera* (lebah madu hitam atau lebah coklat Eropa), *Apis mellifera carnica* (lebah kelabu Carniola), dan *Apis mellifera lingustica* (lebah kuning Italia). Lebah ini dipilih dalam kegiatan ternak karena sifat yang dimilikinya, seperti tingkat adaptasi yang tinggi, tahan dengan perubahan iklim, tidak terlalu agresif, dan dapat memproduksi madu dengan hasil yang tidak sedikit yaitu sekitar 30 hingga 60 kg/tahun untuk setiap koloninya (Hamzah, 2011).

Apis mellifera sebenarnya bukan lebah madu asli Indonesia, melainkan lebah madu asli Eropa. Pada tahun 1972, lebah ini mulai populer di Indonesia, dan saat itu, memang terdapat ajakan kerjasama antara *Australian Freedom For Hunger Campaign Commite* (AFFHC) dengan Apiari Pramuka yang termasuk ke dalam salah satu peternakan lebah madu terbesar yang ada di Indonesia, dari kerjasama ini membawakan hasil berupa bantuan 25 kotak sarang lebah *Apis mellifera* dengan beberapa subspecies seperti *Apis mellifera caucasia*, *Apis mellifera lingustica*, dan *Apis mellifera mellifera*. Ketiga subspecies ini sangat digandrungi para peternak, sehingga menyebabkan banyak peternakan lebah madu besar di Indonesia mulai melakukan budidaya spesies lebah ini (Pusat Perlebahan Apiari Pramuka, 2010).

Pada tahun 1974 hingga 1985, banyak peternakan lebah madu yang melakukan kegiatan impor ratu lebah *Apis mellifera* dari

dan keunikan yang dimiliki setiap taksu pada koloni lebah madu: (Situmorang and Aam, 2014).

a. Lebah Ratu (*Queen*)

Lebah yang berada pada kasta ini merupakan lebah betina dan memiliki peran penting sebagai induk dari seluruh lebah yang berada dalam satu koloni tersebut. Tugas ratu lebah sebagai induk membuktikan adanya kemampuan dalam memproduksi telur hingga 1500 butir/hari. Lebah ini juga memiliki tugas dalam hal memimpin, memelihara keharmonisan lebah, dan memiliki tanggung jawab dalam keberlangsungan hidup koloni. Jumlah lebah ratu hanya ada satu ekor dalam setiap koloni.

Lebah ratu memiliki beberapa keunikan yaitu fisiologis tubuh yang berwarna merah tua atau merah kehitaman; memiliki tubuh dua kali lebih panjang dan besar dibandingkan kasta lain, khususnya kasta lebah pekerja; memiliki bagian tubuh yang berfungsi sebagai tempat untuk menyimpan telur-telur di dalam sarang yang disebut sebagai ovipositor; lebah ratu memiliki alat reproduksi yang fertil sehingga dapat dibuahi oleh lebah jantan; memiliki berat tubuh pada tahapan imago sekitar 178 hingga 292 mg; memiliki periode masa hidup sekitar empat tahun; memiliki sengat dan memiliki kemampuan dalam menyengat secara berulang tanpa harus mati; dan segala kebutuhannya mulai dari makanan, minuman, hingga kebersihan tubuh dilakukan oleh lebah pekerja.

b. Lebah Jantan (*Drone*)

Lebah yang berada pada kasta ini merupakan lebah jantan yang memiliki peran penting dalam melakukan proses kawin dengan calon lebah ratu atau lebah ratu perawan (*virgin queen*); memiliki tugas pokok sebagai lebah yang menjaga sarang dari musuh atau predator dan berperan dalam membersihkan sarang; memiliki berat tubuh pada tahapan imago sekitar 196 hingga 225 mg; lebah jantan memiliki periode waktu hidup selama tiga bulan; memiliki sayap dan mata yang lebih besar jika dibandingkan dengan lebah madu pekerja; memiliki warna tubuh yang lebih gelap dan agak kehitaman; memiliki suara dengungan yang keras; tidak memiliki sengat (*apitoxin*) pada ekornya; memiliki bentuk ekor yang tumpul; memiliki panjang tubuh berkisar 1,3 cm; dan segala kebutuhannya dicukupi oleh lebah pekerja.

c. Lebah Pekerja (*Worker Bees*)

Lebah yang berada pada kasta ini merupakan lebah betina yang memiliki jumlah lebih banyak dibandingkan dua taksa diatas, bahkan jumlahnya dapat mencapai ribuan hingga puluhan ribu hanya dalam satu sarang. Lebah pekerja memiliki distribusi tugas sendiri yang dibedakan berdasarkan umur pada setiap lebah pekerja. Berikut ini distribusi tugas pada lebah pekerja yang akan ditunjukkan dalam bentuk tabel yakni pada (Tabel 2.1) dibawah ini.

memiliki empat tahapan dalam siklus hidupnya, yakni telur, larva, (ulat), pupa (kepompong), dan imago (lebah dewasa). Lebah madu *Apis mellifera* memiliki kemampuan dalam memproduksi telur sekitar 1800 hingga 2000 butir/hari (Mohammad and Dwi, 2013).

Lebah ratu akan memproduksi dua jenis telur yaitu telur yang tidak dibuahi dan telur yang dibuahi. Telur yang tidak dibuahi akan tumbuh dan berkembang menjadi lebah pejantan, sedangkan telur yang dibuahi akan tumbuh dan berkembang menjadi lebah ratu dan lebah pekerja. Semua telur akan diletakkan pada dasar tabung sel terkecuali telur yang akan menjadi calon lebah ratu akan diletakkan secara tegak lurus ke arah bawah dengan posisi menggantung. Tabung sel yang digunakan sebagai tempat telur calon lebah ratu juga memiliki ukuran yang lebih besar dan agak memanjang ke bawah (Rangel *et al.*, 2016).

Berikut ini penjelasan tiap tahapan dalam siklus hidup lebah madu, yakni **(a)**, pada tahapan telur, lebah ratu akan memasukkan dan meletakkan sel telur di dasar dari tiap-tiap tabung sel yang ada pada sarang lebah. Telur ini akan menetas dan berubah menjadi larva yang nantinya tumbuh besar dan menyerupai bentuk ulat. Larva ini memiliki fisiologis tubuh diantaranya, tubuh yang berwarna putih, memiliki mulut, tapi tidak memiliki antena, mata, sayap, bahkan kaki (Tim Karya Tani Mandiri, 2010).

(b), pada tahapan larva, lebah pekerja yang bertugas sebagai pengasuh larva akan merawatnya dengan memberikan makanan berupa *pollen*, nektar, dan madu. Pada tahapan ini, larva akan mengalami masa

aktif yang ditandai dengan meningkatnya konsumsi makanan. Pada tahapan ini pula, larva diberi makanan berupa *royal jelly* selama 2 hingga 3 hari pertama. Namun, pengecualian untuk larva yang menjadi calon lebah ratu. Larva ini akan mendapatkan *royal jelly* lebih banyak yaitu sekitar 2,5 hingga 3,5 hari (Tim Karya Tani Mandiri, 2010).

Larva akan berkembang seiring bertambahnya hari dan akan berubah menjadi pupa dengan bentuk yang terbungkus atau yang sering disebut sebagai kepompong. Pada tahapan ini calon lebah madu akan mengalami puasa sehingga tidak akan ada asupan makanan yang didapatkannya. **(c)**, pupa akan berdiam diri pada tabung sel yang berada di sarang lebah. **(d)**, ketika calon lebah madu mengalami tahapan pupa, lebah pekerja akan menutup pintu atau penutup pada tabung sel dengan rapat (Tim Karya Tani Mandiri, 2010).

(e), berakhirnya tahapan pupa akan ditandai dengan perubahan kondisi yang di alami tubuh pupa, kondisi ini berlangsung cepat dengan adanya tanda-tanda berupa kemunculan sayap, mata, dan kaki. Selain itu, terjadi perubahan warna pada lapisan kutikula yang berubah menjadi semakin gelap. Ketika tanda ini telah muncul maka metamorfosis telah selesai dilalui, dan akan menuju ke tahapan terakhir yaitu **(f)**, imago atau lebah dewasa akan muncul dan keluar dari tabung sel dengan bentuk yang lebih sempurna. Imago ini akan menembus lapisan tipis yang biasa disebut sebagai *bee waxes* atau lilin lebah (Tim Karya Tani Mandiri, 2010). Tahapan-tahapan ini dapat dilihat pada (Gambar 2.4) dibawah ini.

menyiapkan segala sesuatu yang berhubungan dengan kegiatan bertelurnya lebah ratu, jadi ketika lebah ratu kembali ke sarang maka, ia akan langsung bertelur pada sarang yang telah disisapkan (Kuszevska *et al.*, 2018).

2.2.3 Kemampuan Membuat Sarang

Sarang lebah merupakan tempat yang digunakan lebah untuk meletakkan dan menyimpan nektar, madu, telur, larva, dan pupa lebah yang dibangun dengan beberapa campuran bahan seperti malam atau lilin lebah (*bee waxes*) dan bahan perekat (*propolis*) yang semuanya didapat dari tumbuhan berbunga. Kasta lebah madu yang bertugas dalam membangun sarang adalah lebah pekerja yang berumur 12 hingga 17 hari, lebah ini akan mengonsumsi madu sekitar 240 ml untuk memproduksi 30 ml *bee waxes* sehingga, tak heran jika memiliki stamina dan kelenjar malam yang bagus jika dibandingkan dengan lebah pekerja lainnya (Rangel *et al.*, 2016).

Proses pembuatan sarang lebah diawali dari pencarian tempat yang cocok untuk pembangunan sarang lebah. Tempat yang akan dijadikan konstruksi sarang lebah harus memiliki ruang yang luas dan berada didekat sumber nektar dan *pollen* dari tumbuhan berbunga. Selanjutnya, lebah pekerja akan mengeluarkan lilin yang bertekstur lunak dari kelenjar dibagian bawah perutnya. Lilin ini akan diuleni dan dicampur dengan sekresi glandular yang berasal dari lebah pekerja (Situmorang and Aam, 2014).

2.3.1 Identifikasi Konvensional

Identifikasi secara konvensional (non molekular) berpatokan pada karakter biokimia, fenotip, fisiologi, dan morfologi. Karakter fenotip terdiri dari karakter morfologi secara makroskopik dan mikroskopik khamir, karakter dalam setiap fase reproduksi yaitu aseksual dan seksual, serta karakter biokimia dan fisiologinya. Adapun karakter morfologi secara mikroskopik yang diperhatikan adalah bentuk sel, tipe reproduksi aseksual yakni tipe *budding*, *fission*, balistokonidia, blastokonidia, sterigmatokonidia, serta tipe hifa, sedangkan karakter morfologi secara makroskopik yang diperhatikan adalah permukaan, profil, tepi, tekstur, dan warna koloni pada khamir (Maulana, 2011).

Karakter biokimia dan fisiologi didasarkan pada beberapa kemampuan yang dimiliki khamir yaitu mengasimilasi unsur nitrogen dan karbon, memfermentasi gula tertentu, serta mempertahankan proses metabolismenya dalam lingkungan ekstrem seperti lingkungan yang tidak mengandung vitamin tertentu, lingkungan dengan kandungan gula, garam, dan pH tinggi, dan lingkungan dengan temperatur sekitar 37 °C. Adapun beberapa pengujian yang berhubungan dengan kemampuannya tersebut adalah uji pertumbuhan pada media dengan konsentrasi gula 50% dan uji kemampuan fermentasi karbohidrat (Suryaningsih *et al.*, 2018).

Umumnya, identifikasi konvensional (non molekular) khamir yang berhasil diisolasi akan mengikuti dan mengacu pada beberapa referensi sebagai acuan pengamatan yakni pada karakter biokimia,

karakter fisiologi, karakter reproduksi seksual dan aseksual berdasarkan Barnett and R. J. (1990) dan Kurtzman and W. F. (1998). Pada morfologi sel berdasarkan Hawksworth *et al.* (1995) (Sumerta and Atit Kanti, 2017). Namun, parameter yang digunakan pada identifikasi konvensional ini tidak menyediakan cukup banyak variasi sehingga akan menimbulkan kesulitan jika ingin melakukan identifikasi khamir hingga tingkat spesies. Selain itu, metode ini juga memiliki kekurangan seperti membutuhkan kinerja dan jam kerja yang cukup intensif hingga tenaga kerja yang telah berpengalaman dibidang ini. Selain itu, terdapat kesulitan dalam membedakan spesies satu dengan spesies lainnya, dan membutuhkan waktu yang lama (Diana and Titi, 2016).

2.3.2 Identifikasi Molekular

Identifikasi secara molekular merupakan identifikasi yang dilakukan berdasarkan pada data *sequence* gen, sehingga memiliki beberapa keuntungan yang dapat mengatasi kelemahan pada identifikasi secara konvensional, seperti memiliki tingkat keakuratan yang lebih baik dibandingkan identifikasi konvensional (non molekular) dan tidak membutuhkan waktu yang lama (Maulana, 2011). Jenis gen yang sering digunakan dalam identifikasi khamir dan menjadi karakter molekular adalah genom nuklear. Genom nuklear (inti) yang berperan merupakan gen pada ribosomal DNA (rDNA) atau bisa disebut sebagai (rRNA) (Dewi, 2012).

Gen ini merupakan gen atau daerah yang mengkode komponen RNA ribosom (rRNA utama). Pada organisme eukariotik memiliki

deretan rDNA yang terletak pada inti sel (nukleus) dan mitokondria (Mulyatni *et al.*, 2011). Namun, rDNA yang terletak di mitokondria pada kelompok fungi memiliki perkembangan sangat lambat sehingga sulit jika digunakan dalam identifikasi hingga tingkat spesies (Fajarningsih, 2016). rDNA terdiri atas sub unit kecil maupun besar yang dipisahkan oleh suatu pengatur jarak atau pembatas (*spacer*) yakni ETS (*External Transcribed Spacer*) dan IGS (*Intergenic Spacer*) yang lebih dikenal dengan sebutan NTS (*Nontranscribed Spacer*). Pada rDNA organisme yang termasuk ke dalam Kingdom Fungi seperti khamir, memiliki daerah atau gen konservatif yakni rRNA 18S; 5,8S; dan 28S yang masing-masing gen tersebut terdapat pada lingkup daerah ITS (*Internal Transcribed Spacer*) (Mulyatni *et al.*, 2011).

a. Daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS)

Daerah ITS adalah daerah sekuen DNA yang tidak menyandikan protein fungsional dan berlokasi pada daerah RNA ribosomal (rRNA). Daerah ini dapat digunakan sebagai penanda genetika yang memiliki varian sekuen yang cukup tinggi hingga tingkat spesies (Purnamasari *et al.*, 2012). Daerah ITS rRNA merupakan suatu urutan RNA dari proses transkripsi yang terletak diantara prekursor ribosomal dan hilang pada proses *splicing* atau selama proses pematangan rRNA (*mature rRNA*) (Mulyatni *et al.*, 2011).

rDNA mempunyai tingkat variasi jenis nukleotida yang tinggi jika dibandingkan dengan daerah lain dari rDNA yakni SSU (25S &

primer yang digunakan. Pemilihan primer yang tepat dan spesifik menjadi kunci sukses identifikasi khamir. Primer yang digunakan harus cukup universal untuk mencangkup seluruh tingkatan taksa dan disaat bersamaan juga harus menghasilkan amplikon dengan variasi yang tinggi sehingga dapat membedakan spesies yang saling berkaitan. Oleh sebab itu, pemilihan primer menjadi salah satu bagian terpenting (Beeck *et al.*, 2014).

b. Pemilihan Primer

Primer mempunyai peranan utama yang harus diperhatikan dalam proses amplifikasi DNA dengan menggunakan teknik PCR (Beeck *et al.*, 2014). Adapun parameter-parameter yang harus diperhatikan dalam pemilihan primer adalah sebagai berikut, primer terdiri dari satu pasang yaitu *primer forward* dan *primer reverse*. Pasangan ini terdiri atas dua oligonukleotida yang memiliki kandungan 18-28 nukleotida dan memiliki 45-60% *GC Content*; *sequence primer* yang pendek; ujung 3' primer menjadi komponen penting dalam menentukan sensitivitas dan spesifisitas PCR, ujung ini juga tidak boleh memiliki 3 bahkan lebih basa G (Guanin) atau C (*Cytosin* atau Sitosin) (Larasati, 2018).

Pasangan primer juga memiliki *temperature melting* (T_m) sekitar 52-58 °C dan tidak ≥ 65 °C; tidak memiliki urutan basa yang diulang. Pengulangan sebanyak empat kali masih ditoleransi; dan memiliki selisih *temperature melting* (T_m) antar pasangan primer tidak ≥ 5 °C (Maitriani *et al.*, 2016). Konsentrasi primer yang baik

c. Isolasi DNA

Identifikasi molekular memiliki tahapan awal yang dikenal dengan sebutan isolasi DNA. Tahapan ini mempunyai prinsip dasar yaitu memisahkan dan mengekstraksi jaringan sehingga didapatkan DNA murni yang sudah terpisah dari komponen sel dan jaringan lainnya. Tahapan utama dalam isolasi DNA yakni menghancurkan dinding sel khamir. Proses ini dapat dilakukan menggunakan dua jenis metode, diantaranya metode secara mekanik dan secara lisis. Pemilihan metode dapat berpengaruh pada kuantitas dan kualitas produk hasil isolasi DNA. Metode mekanik memerlukan beberapa alat seperti mortar (*grinding*) dan sonikasi, sedangkan metode lisis memerlukan peranan beberapa macam bahan kimia atau reagen sehingga, saat ini terdapat terobosan baru yaitu isolasi DNA dengan bantuan Kit (Wahyuningsih, 2019).

Hasil terbaik dari isolasi DNA ditandai dengan nilai konsentrasi yang berada pada rentang 10-100 $\mu\text{g/ml}$ dan nilai kemurnian yang menunjukkan pada rentang 1,8-2,0. Hal ini sangat berhubungan dengan ada tidaknya kehadiran kontaminan seperti protein, RNA, lipid, dan debris sel lainnya. Oleh sebab itu, diperlukan adanya perhatian terhadap proses isolasi DNA yaitu melalui *trial* atau optimasi metode isolasi DNA (Maulana, 2011).

Cara untuk mengetahui nilai konsentrasi dan kemurnian dari hasil isolasi DNA yaitu dengan menggunakan sebuah instrumen yang dinamakan spektrofotometer. DNA murni akan menyerap sinar

UV pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan kontaminan akan menyerap sinar UV pada panjang gelombang 280 nm. Sehingga untuk menghitung nilai kemurnian DNA dengan cara membagi nilai pada absorbansi 260 nm dengan nilai pada absorbansi 280 nm ($\frac{A_{260}}{A_{280}}$) (Susilowati, 2019).

d. Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA pada identifikasi khamir secara molekular biasanya menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). PCR merupakan teknik amplifikasi DNA secara *in vitro* dengan melibatkan beberapa tahap yang terjadi secara berulang (siklus). Pada setiap siklus inilah terjadi penggandaan jumlah DNA. PCR memiliki prinsip dasar yakni mengamplifikasi fragmen DNA murni dan spesifik dengan bantuan enzim DNA *Taq-polymerase* dan dua macam fragmen oligonukleotida sintesis yaitu sepasang primer yang telah dipilih dan diketahui *sequence gennya* (Susilowati, 2019).

Proses PCR memiliki beberapa tahapan yaitu, *pre-denaturation* DNA *template*, *denaturation* DNA *template*, penempelan primer (*annealing*), pemanjangan primer (*extension* atau *elongasi*), dan pemantapan (*post extension* atau *post-elongasi*). Namun, secara garis besar, satu siklus dalam teknik PCR terdiri dari tiga tahapan yakni *denaturation*, *annealing*, dan *extension*. Setiap tahapan ini memiliki suhu optimal yang berbeda-beda. Oleh sebab itu, perlu dilakukan adanya *trial* atau optimasi kondisi dalam reaksi PCR sehingga didapatkan hasil terbaik dari amplifikasi DNA yang

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

Adapun alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

3.3.1 Alat Penelitian

Beberapa alat yang digunakan terdiri dari autoklaf [Hirayama HICLAVE HG-50], *cooler box* [Lion Star], DNA *documentation/transiluminator* [Enduro™ GDS], *electric stove* [Maspion S-301], *electrophoresis* [Mupid-exu], *hot plate magnetic stirrer* [Thermo Scientific], *ice gel, laboratory freezer* [Thermo Scientific], *laminar flow cabinet* [ESCO], *microcentrifuge* [Thermo Scientific Heraus Fresco 21], *micropipet* (P10, P200, P1000) [Biopette Plus], mikroskop [Nikon], mesin PCR [Multigene Optimax], *power supply* [Hofer PS300-B], *refrigerator* [Thermo Scientific], *spektrophotometer DNA quantitative analysis* [BioDrop], *spin down*, *timbangan analitik* [Thermo Scientific], dan *vortex mixer* [Thermo scientific].

Peralatan habis pakai yang digunakan terdiri dari cawan petri (*petri dish disposable*) [One Med], kapas steril [One Med], karet pentil, kertas saring, korek api, mask [Sensi Mask], label nama, *microcentrifuge tubes* (1.5 ml) [Biologix], *micropipet, mini tubes PCR, pipet tips* (10, 200 dan 1000 μ l) [Biologix], pemantik api, *pipet tips* (0.5-10 μ l) [Axygen], plastik tahan panas [Wayang], *plastic wrap* dan aluminium foil [Total Wrap], sarung tangan latex [Safeglove], spidol *permanent*, dan tisu. Peralatan *glassware* yang digunakan terdiri dari

atm, dipindahkan ke dalam beberapa cawan petri *disposable* steril sebanyak 20 ml, dilapisi cawan petri *disposable* dengan *plastic wrap*, dan dibiarkan pada suhu ruangan hingga medium memadat.

b. Medium PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Pembuatan medium PDA dilakukan dengan mengikuti petunjuk yang tertera pada kemasan. Hal pertama yang dilakukan dalam pembuatan medium PDA adalah membuat media stok dengan volume 1000 ml di dalam labu erlenmeyer. Adapun pembuatan medium stoknya adalah sebagai berikut, bubuk PDA sebanyak 39 gr dilarutkan dalam aquades hingga volume akhir mencapai 1000 ml, dipanaskan sambil diaduk hingga mendidih dan homogen.

Selanjutnya ditambahkan antibiotik *chloramphenicol* sebanyak 500 mg/l ke dalam medium pada saat suhu 40-50 °C, dihomogenkan dengan cara digoyang perlahan hingga komponen larut, disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan tekanan 2 atm pada suhu 121 °C, dipindahkan ke dalam beberapa cawan petri steril sebanyak 20 ml, dilapisi cawan petri dengan *plastic wrap*, dan dibiarkan pada suhu ruangan hingga medium memadat.

c. Medium PDB (*Potato Dextrose Broth*)

Pembuatan medium PDB dilakukan dengan mengikuti petunjuk yang tertera pada kemasan. Hal pertama yang dilakukan dalam pembuatan medium PDB adalah membuat media stok dengan volume 100 ml di dalam labu erlenmeyer. Adapun pembuatan

medium stoknya adalah sebagai berikut, bubuk PDA sebanyak 2,4 gr dilarutkan dalam aquades hingga volume akhir mencapai 100 ml, dipanaskan sambil diaduk hingga mendidih dan homogen.

Selanjutnya ditambahkan antibiotik *chloramphenicol* sebanyak 50 mg/l ke dalam medium pada saat suhu 40-50 °C, dihomogenkan dengan cara digoyang perlahan hingga komponen larut, disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan tekanan 2 atm pada suhu 121 °C, dipindahkan ke dalam beberapa tabung reaksi steril sebanyak 10 ml, ditutup dengan kapas dan aluminium foil, dilapisi tabung reaksi dengan *plastic wrap*, dan dibiarkan pada suhu ruangan.

3.5.2 Sterilisasi Alat, Bahan, dan Medium

Proses sterilisasi perlu dilakukan karena bertujuan untuk mencegah kontaminasi pada alat, bahan, medium pertumbuhan, dan terutama sampel. Proses sterilisasi dilakukan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Alat dan bahan yang disterilisasi harus bersifat *glassware* dan tidak dapat meleleh ketika terkena suhu panas.

3.5.3 Pengoleksian Isolat Khamir

Sampel dikoleksi dari sarang lebah madu *Apis mellifera* dan dilakukan penyimpanan sementara di dalam *cooler box* yang berisi *ice gel*. Sarang lebah yang telah didapatkan selanjutnya disimpan ditempat sejuk dan kering pada suhu 15-25 °C atau pada suhu kamar/ruangan

terkendali (*controlled room temperature*) yang memiliki sirkulasi udara lancar dan juga terhindar dari cahaya matahari.

Proses pengkoleksian dilanjutkan dengan pembuatan suspensi sarang lebah. Suspensi ini diperoleh dari sarang lebah madu sebanyak 1 gr yang telah dilarutkan dengan aquades steril sebanyak 90 ml, dan divortex hingga homogen. Kemudian, suspensi ini dituang sebanyak 1 ml (1000 μ l) ke dalam medium YMA steril, diratakan ke seluruh permukaan medium YMA steril dengan batang L (*spreader*), dilapisi cawan petri *disposable* dengan *plastic wrap*, dan diinkubasi selama 48-72 jam pada suhu ruangan. Proses ini dilakukan untuk mendapatkan isolat khamir dari suspensi sarang lebah madu *Apis mellifera*.

3.5.4 Pengamatan Morfologi Khamir secara Mikroskopis

Pengamatan morfologi khamir secara mikroskopis dilakukan pada *working culture* khamir saat berusia 72 jam. Adapun parameter yang diamati adalah ukuran sel meliputi panjang dan lebar sel vegetatif; bentuk sel vegetatif; dan tipe pertunasan (*budding*). Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop binokuler dari perbesaran 40 hingga 1000x, selanjutnya dilakukan pengukuran panjang dan lebar sel dengan bantuan *software Image J*.

3.5.5 Pemurnian dan Pembuatan *Working Culture* Khamir

Pemurnian isolat khamir dilakukan secara berurutan dengan pembuatan *working culture* khamir. Hal pertama yang dilakukan dalam pemurnian isolat khamir yaitu memastikan bahwa isolat yang telah

dikoleksi adalah isolat khamir yang sebenarnya. Isolat ini merupakan isolat yang telah diamati dibawah mikroskop. Selanjutnya, jika telah didapatkan isolat khamir. Kemudian dapat dilanjutkan dengan inokulasi khamir ke medium YMA steril yang baru dengan cara mengambil ± 3 ose dan membuat goresan empat arah kuadran. Selanjutnya, diinkubasi selama 48-72 jam pada suhu ruangan hingga didapatkan koloni murni dan tunggal. Pemurnian ini dilakukan min. dua kali dalam 48-72 jam.

Setelah didapatkan isolat khamir murni, maka dilanjutkan dengan pembuatan *working culture* khamir. Hal pertama yang dilakukan dalam pembuatan *working culture* adalah menyiapkan dan memastikan biakan khamir dengan koloni tunggal representatif yang berusia 48-72 jam. Jika telah didapatkan koloni tersebut, kemudian dipindahkan dalam media PDA dengan cara membuat goresan empat arah kuadran, dan diinkubasi selama 3-7 hari pada suhu ruangan. Hal serupa juga dilakukan pada media PDB dengan cara dipindahkan koloni tersebut dengan jarum ose, digoyang jarum ose secara perlahan hingga koloni tercampur dengan media, dan diinkubasi selama 20 jam. Koloni yang telah tumbuh pada medium PDA dan PDB dapat digunakan sebagai *working culture*.

3.5.6 Optimasi Isolasi DNA Khamir

Isolasi DNA merupakan suatu prosedur penting dalam analisis di bidang molekular seperti identifikasi spesies khamir. Isolasi ini dilakukan pada kultur khamir murni dan tunggal yang minimal berusia 20 jam-1 minggu. Pada penelitian ini terdapat dua variasi metode yang

digunakan untuk optimasi isolasi DNA, yaitu variasi metode pertama berasal dari protokol Wizard® Genomic DNA Purification Kit TM050 yang telah dimodifikasi pada enzim yang digunakan (Proteinase K) sebagai variasi metode pertama, sedangkan variasi metode kedua berasal dari Kanti *et al.*, (2018) dalam buku panduan pengelolaan koleksi mikroorganisme InaCC LIPI. Berikut ini akan dijelaskan tahapan-tahapan dalam setiap metode isolasi DNA tersebut:

a. Variasi Metode Pertama

Langkah awal dalam metode ini yaitu persiapan ragi lisat sebelum menuju ke langkah selanjutnya yaitu pengendapan protein dan rehidrasi DNA. Berikut ini merupakan tahapan-tahapannya yaitu kultur khamir murni pada media PDB yang telah berusia 20 jam diambil sebanyak 1 ml (1000 µl), dimasukkan ke dalam *microcentrifuge tube* ukuran 1.5 ml, *dicentrifuge* selama 2 menit pada kecepatan 13.000-16.000 x g, sehingga akan terbentuk dua lapisan dimana lapisan atas adalah supernatan dan lapisan bawah adalah *pellet*.

Selanjutnya dibuang supernatannya, ditambahkan EDTA 50 mM sebanyak 293 µl, ditambahkan enzim yang telah dimodifikasi yaitu enzim Proteinase K sebanyak 7,5 µl, dilakukan proses *pipeting* secara perlahan sebanyak 4 kali hingga komponen tercampur, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30-60 menit, didinginkan pada suhu kamar, *dicentrifuge* selama 2 menit pada kecepatan 13.000-16.000 x g, dibuang supernatannya, ditambahkan *Nuclei Lysis*

Solution (NLS) sebanyak 300 μ l ke *pellet*, dan dilakukan proses *pipetting* secara perlahan hingga komponen tercampur.

Langkah selanjutnya adalah pengendapan protein dan rehidrasi DNA. Berikut ini merupakan tahapan langkah selanjutnya yaitu ditambahkan *Protein Precipitation Solution* (PPS) sebanyak 100 μ l, divortex selama 20 detik, dibiarkan dan didinginkan pada suhu dingin dengan es batu selama 5 menit, *dicentrifuge* selama 3 menit pada kecepatan 13.000-16.000 x g, dipindahkan supernatan ke dalam *microcentrifuge tube* ukuran 1.5 ml, ditambahkan isopropanol sebanyak 300 μ l, dilakukan proses pencampuran dengan cara diinversi hingga benar-benar terbentuk untaian DNA yang menyerupai benang.

Selanjutnya *dicentrifuge* selama 2 menit pada kecepatan 13.000-16.000 x g, dibuang supernatan dengan micropipet secara hati-hati dan perlahan, ditiriskan *pellet* pada tisu, ditambahkan etanol 70% sebanyak 300 μ l, dan dikocok dengan sangat perlahan untuk membilas *pellet*, *dicentrifuge* selama 2 menit pada kecepatan 13.000-16.000 x g, dibuang supernatannya, dan ditiriskan *pellet* pada tisu selama 10-15 menit. Kemudian ditambahkan DNA *rehydration solution* sebanyak 50 μ l, ditambahkan RNase solution sebanyak 1,5 μ l, divortex selama 1 detik, disentrifuge selama 5 detik, diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37 °C, diinkubasi selama 1 jam pada suhu 65 °C atau pada suhu 4 °C selama semalam (*overnight*), dan dapat disimpan pada suhu 2-8 °C.

b. Variasi Metode Kedua

Langkah awal dalam metode ini yaitu persiapan kultur khamir murni berusia 7 hari. Kultur khamir murni pada media PDA yang telah siap kemudian diambil secukupnya dengan jarum ose steril ± 3 ose, dimasukkan ke dalam *microcentrifuge tube* ukuran 1,5ml, ditambahkan *Nuclease-Free Water* (NFW) sebanyak 50 μ l, dihomogenkan dengan vortex hingga larut, dipanaskan pada suhu 98 °C selama 10 menit, dan dihomogenkan lagi dengan *spin down* hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan atas sebagai DNA *template* dan lapisan bawah sebagai *pellet*.

3.5.7 Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian Produk Isolasi DNA

Pengukuran nilai konsentrasi dan kemurnian produk isolasi DNA dilakukan dengan bantuan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 dan 280 nm ($\text{\AA}260/\text{\AA}280$). Adapun langkah pertama yang dilakukan yaitu menginisiasi spektrofotometer dengan ddH₂O. Akuabides (ddH₂O) sebanyak 1,5-3 μ l akan digunakan sebagai blanko. Pemberian ini dilakukan sebelum dan setelah proses pengukuran produk isolasi DNA, selanjutnya tempat peneteskan harus dibersihkan terlebih dahulu dengan tisu. Kemudian produk isolasi DNA sebanyak 1,5-3 μ l diteteskan pada tempat peneteskan dan diukur. Pengukuran ini secara otomatis diolah oleh software yang terdapat pada spektrofotometer. Pengukuran dengan spektrofotometer dilakukan pada seluruh produk hasil isolasi DNA

3.5.8 Pengenceran Pasangan Primer

Pengenceran pasangan primer menjadi konsentrasi 100 μmol dan penambahan *buffer* TE disesuaikan dengan keterangan yang tertera pada *datasheet* masing-masing primer. Penambahan ini dilakukan dengan mengalikan 10 pada *nmole*. Primer dengan konsentrasi 100 μmol digunakan sebagai persediaan stok, sedangkan untuk persediaan *working* maka, harus dilakukan pengenceran lagi dengan menggunakan ddH₂O. Konsentrasi primer untuk persediaan *working* pada penelitian ini mengacu dengan penelitian Maulana (2011) yaitu menggunakan primer dengan konsentrasi 10 μmol . Adapun cara untuk membuat persediaan *working* yaitu sebagai berikut, primer dengan konsentrasi 100 μmol sebanyak 10 μl ditambahkan dengan ddH₂O sebanyak 90 μl , kemudian divortex hingga homogen dan disimpan pada suhu -20 °C.

3.5.9 Optimasi Protokol PCR untuk Amplifikasi DNA Khamir

Amplifikasi DNA khamir dilakukan dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang biasa disebut dengan *running* PCR dengan menggunakan pasangan primer ITS5 dan ITS4. Amplifikasi DNA khamir diawali dengan proses sterilisasi *laminar flow cabinet* sebagai tempat untuk melakukan *mixture component cocktail* PCR dengan menggunakan alkohol 70%. Proses sterilisasi dilakukan dibawah sinar UV selama 15-30 menit untuk mencegah adanya kontaminasi yang dapat mempengaruhi hasil amplifikasi. *Component cocktail* PCR yang digunakan pada penelitian ini mengacu pada protokol Promega GoTaq® Green Master Mix 9PIM712 dengan total

3.5.10 Pembuatan Gel Agarose

Pembuatan gel agarose dilakukan sebelum melakukan tahapan elektroforesis. Adapun pembuatan gel agarose yang mengacu pada penelitian Sambrook and Russel (2001) adalah sebagai berikut, gel agarose sebanyak 2 gr ditambahkan dengan *buffer* TBE 1X sebanyak 100 ml, dipanaskan dan diaduk hingga mendidih dan homogen, didiamkan hingga hangat-hangat kuku, ditambahkan Diamond™ *nucleic acid dye-Ethidium Bromide* (Et-Br) sebagai pewarna sebanyak 10 µl dan dihomogenkan dengan batang pengaduk.

Selanjutnya dituangkan ke dalam cetakan (*tray*) yang telah dipasang sisir (*comb*), dan dibiarkan pada suhu ruangan hingga memadat. Jika telah memadat angkat sisir (*comb*) dari gel agarose secara perlahan-lahan, maka terlihat jejak sisir pada gel agarose yang akan menjadi sumuran tempat untuk meletakkan *ladder* dan produk hasil amplifikasi DNA.

3.5.11 Elektroforesis

Gel agarose yang telah memadat dipindahkan ke dalam mesin elektroforesis, ditambahkan *buffer* TBE 1X hingga agarose terendam (usahakan jangan ada gelembung udara yang muncul). Selanjutnya *ladder* 1kb sebanyak 2 µl ditambahkan dengan *loading dye* sebanyak 1 µl dan diresuspensi dengan mikropipet hingga homogen, dimasukkan ke dalam sumuran. Kemudian produk hasil amplifikasi DNA sebanyak 3 µl ditambahkan dengan *loading dye* sebanyak 1 µl dan diresuspensi dengan mikropipet hingga homogen, dimasukkan ke dalam sumuran.

Jika dilihat berdasarkan (Tabel 4.1) dan (Gambar 4.1) diatas menunjukkan adanya isolat khamir yang memiliki ciri sel dengan bentuk bulat untuk IKS-1, bentuk bulat-oval-silinder untuk IKS-2, bentuk pseudomiselium untuk IKS-3, dan bentuk oval-silinder untuk IKS-4. Hal ini sesuai dengan pernyataan Walker (2009) yaitu khamir memiliki bentuk sel yang segitiga melengkung, oval, lonjong, botol, apikulat, atau menyerupai bentuk lemon, bulat, dan menyerupai batang.

Selain itu, dari keempat isolat khamir yang berhasil diisolasi memiliki tipe (*budding*) pertunasan yang sama yaitu multilateral. Hal ini sesuai dengan pernyataan Kurtzman *et al.* (2011) yaitu khamir berkembangbiak secara aseksual dengan tunas (*budding*). Tipe pertunasan multilateral merupakan tunas yang dapat tumbuh disekitar ujung sel yang biasanya menjadi ciri-ciri dari beberapa Genus khamir seperti Genus *Candida*, Genus *Saccharomyces*, Genus *Pichia*, Genus *Hansenula*, Genus *Debaryomyces*, dan Genus *Torulaspota* (Sulastri, 2019).

Isolat-isolat khamir yang berhasil diisolasi pada penelitian ini memiliki ukuran yang bervariasi dengan panjang antara 2,6-12,2 μm dan lebar antara 1,4-5,3 μm . Hal ini sesuai dengan pernyataan Walker (2009) yaitu sel khamir memiliki ukuran yang sangat bervariasi. Ukuran ini tergantung pada pertumbuhan dan jenis spesiesnya. Beberapa khamir mempunyai panjang antara 2-3 μm atau 20-50 μm dan lebar antara 1-10 μm .

Selain itu, pada penelitian ini tidak ditemukan ciri-ciri seperti adanya filamen yang disebut hifa sehingga isolat yang berhasil diisolasi bukanlah kapang melainkan khamir, ciri-ciri lainnya juga tidak ditemukan flagel

sehingga isolat yang berhasil diisolasi bukanlah bakteri melainkan khamir. Hal ini sesuai dengan pernyataan Walker (2009) yaitu khamir merupakan mikroorganisme yang tidak dapat membentuk filamen dan tidak dapat bergerak karena tidak memiliki flagel.

4.2 Optimasi Isolasi DNA Khamir

Prinsip dasar dari isolasi DNA khamir yaitu serangkaian proses yang dilakukan untuk memisahkan dan mengekstraksi jaringan sehingga didapatkan DNA khamir murni dan terbebas dari komponen-komponen sel lainnya. Produk isolasi DNA khamir menjadi salah satu faktor penting dalam keberhasilan amplifikasi DNA khamir. Oleh sebab itu, metode isolasi DNA khamir harus dilakukan dengan baik, tepat, dan optimal. Beberapa metode isolasi DNA telah dikembangkan untuk mendapatkan hasil terbaik melalui optimasi dan validasi metode isolasi DNA sehingga dapat mengefisienkan waktu, biaya, dan bahan yang digunakan (Maknunah, 2017).

Metode isolasi DNA yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan dua referensi yaitu metode pertama berasal dari protokol Wizard® Genomic DNA Purification Kit TM050 yang telah dimodifikasi dengan penggunaan enzim proteinase K, sedangkan metode kedua berasal dari Kanti *et al.*, (2018) dalam buku panduan pengelolaan koleksi mikroorganisme InaCC LIPI yang termasuk ke dalam metode *boiling* (pemanasan atau pendidihan). Modifikasi yang diterapkan pada metode pertama terletak pada penggunaan enzim proteinase K sebagai pengganti enzim litikase. Enzim ini merupakan enzim proteolitik yang berperan dalam menghilangkan protein. Protein termasuk ke

dalam salah satu inhibitor dalam proses amplifikasi DNA dan menjadi kontaminan dalam proses isolasi DNA (Nugroho *et al.*, 2016).

Penggantian dan modifikasi penggunaan enzim pada metode pertama dikarenakan adanya beberapa faktor seperti pengadaan bahan yang terkadang memerlukan jangka waktu lama dan bahan yang memiliki harga relatif mahal, sehingga dimodifikasi dengan enzim proteinase K. Pemilihan metode pertama sebagai variasi untuk optimasi metode isolasi DNA dikarenakan telah cukup sering digunakan dalam riset mengenai identifikasi mikroba termasuk khamir seperti pada penelitian Agustini (2019) yang mengacu pada protokol Wizard® Genomic DNA Purification namun tanpa penambahan enzim litikase untuk ekstraksi DNA genom khamir yang berhasil diisolasi dari proses pembuatan minuman beralkohol dan khamir yang terkonfirmasi terdiri dari *Candida glabrata*, *C. nivariensis*, *Torulaspota delbruekii*, *T. pretoriensis*, *Pichia manschurica*, dan *Schizosaccharomyces pombe*. Penggunaan enzim proteinase K pada isolasi DNA khamir juga pernah dilakukan oleh Julistiono *et al.* (1999) untuk riset mengenai analisis variasi genetik *Saccharomyces cerevisiae* yang tahan etanol.

Metode kedua yaitu metode *boiling* yang merupakan salah satu metode untuk mengekstraksi DNA dari sel khamir. Metode ini dilakukan dengan cara mendidihkan sel khamir di dalam air pada suhu tinggi selama beberapa menit (Nur'utami, 2011). Alasan pemilihan metode kedua sebagai variasi untuk optimasi metode isolasi DNA dikarenakan penggunaan bahan yang sedikit yaitu hanya NFW dengan harga bahan yang relatif lebih murah. Selain itu, metode ini juga digunakan langsung pada riset Kanti *et al.* (2018), bahkan

diisolasi yaitu IKS-3. Hal itu disebabkan karena IKS-3 merupakan isolat khamir dengan pertumbuhan yang cukup cepat, sehingga dapat dijadikan percobaan awal untuk isolasi DNA dengan metode pertama.

Penggunaan metode ini diharapkan mampu menghasilkan produk isolasi DNA dengan nilai konsentrasi dan kemurnian yang baik. Namun, pada kenyataannya, produk isolasi DNA yang dihasilkan dari metode pertama memiliki nilai konsentrasi dan kemurnian berturut turut sebesar $-3,097 \mu\text{l}$ dan $0,504$. Nilai ini sangat kecil dan jauh dari nilai yang baik untuk diteruskan ke tahap amplifikasi DNA, sedangkan produk isolasi DNA yang dihasilkan dari metode kedua memiliki nilai konsentrasi dan kemurnian DNA yang cukup baik dan dapat diteruskan ke tahap amplifikasi DNA.

Menurut Nur'utami (2011), yang menyatakan bahwa nilai konsentrasi DNA yang baik untuk amplifikasi DNA yaitu 10 hingga $100 \mu\text{g/ml}$, sedangkan nilai kemurnian yang baik untuk amplifikasi DNA yaitu pada rentang nilai $1,8-2,0$. Jika nilai yang didapatkan kurang dari nilai diatas maka menunjukkan adanya preparasi DNA yang terkontaminasi fenol, polisakarida, atau protein lainnya, sedangkan nilai rasio yang lebih dari nilai diatas, maka menunjukkan adanya kontaminasi RNA. Perhitungan nilai konsentrasi dan kemurnian DNA dilakukan dengan bantuan instrumen spektrofotometer pada panjang gelombang 260 dan 280 nm ($\text{\AA}260/\text{\AA}280$). Pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm memiliki hasil pendeteksian yang berbeda yaitu pada $\lambda 260 \text{ nm}$ akan terdeteksi material DNA murni dan pada $\lambda 280 \text{ nm}$ akan terdeteksi kontaminan protein (Patramurti *et al.*, 2014).

Adanya kontaminan pada produk isolasi DNA dengan metode pertama disebabkan oleh beberapa faktor seperti rendahnya kandungan DNA isolat khamir yang digunakan untuk isolasi DNA. Hal ini berhubungan dengan usia pada fase pertumbuhan khamir yang berusia masih terlalu muda yaitu 20 jam, sedangkan pada metode kedua menggunakan isolat khamir yang berusia 3 hingga 7 hari, dimana isolat khamir dengan usia 3 hari merupakan khamir yang dapat tumbuh cepat (*fast grower*), sedangkan isolat khamir dengan usia 7 hari merupakan khamir yang pertumbuhannya lambat (*slow grower*) (Maknunah, 2017).

Menurut Maulana (2011) yang menjelaskan bahwa isolasi DNA khamir sebaiknya dilakukan pada saat pertumbuhan khamir diperkirakan mencapai akhir dari fase log. Fase log merupakan fase pertumbuhan populasi mikroba yang berada pada puncak pertumbuhan (eksponensial), sehingga berpengaruh terhadap kandungan DNA mikroba, dimana kandungan tertinggi terdapat pada fase log dan sebanding dengan jumlah pertumbuhan sel mikroba.

Tidak hanya itu, suhu yang digunakan untuk menginkubasi enzim proteinase K juga dapat menjadi faktor dalam mempengaruhi keberhasilan isolasi DNA. Suhu sebesar 37 °C yang digunakan pada metode pertama dinilai tidak optimal karena sesungguhnya suhu optimal untuk menginkubasi dan meningkatkan aktivitas enzim proteinase K adalah 55-60 °C selama 1 jam, dimana semakin lama waktu inkubasi, maka daya *recovery* DNA semakin baik (Sunarno *et al.*, 2014), sedangkan suhu inkubasi yang digunakan pada metode kedua dinilai cukup sesuai untuk mengisolasi DNA sehingga menghasilkan nilai kemurnian pada isolat khamir dengan kode IKS-

1 dan IKS-4 yang berada direntang 1,8 hingga 2,0 dan nilai konsentrasi yang cukup tinggi pada seluruh isolat khamir.

Pemanasan dengan suhu inkubasi sebesar 98 °C selama 10 menit yang digunakan pada metode kedua dinilai dapat mempercepat lisis nya dinding sel khamir, sehingga DNA dapat diekstraksi dengan mudah dan dapat mendenaturasi protein-protein inhibitor. Namun, kekurangan proses pendidihan pada metode kedua ini tidak dapat mendenaturasi DNA plasmid melainkan hanya dapat mendenaturasi DNA kromosomal. Tidak hanya itu, pada metode *boiling*, pemanasan dilakukan pada suhu tinggi selama beberapa menit. Hal ini akan memberikan pengaruh dalam meningkatkan permeabilitas dinding sel khamir yang berakibat pada masuknya cairan dan materi lain disekitar sel dan keluarnya materi-materi dari dalam sel (Maknunah, 2017).

Suhu tinggi juga bermanfaat untuk menginaktivasi enzim, terutama DNase yang dapat merusak DNA. Suhu yang digunakan dan lamanya waktu dalam proses pemanasan tergantung pada jenis sampel yang digunakan. Pemanasan dengan suhu yang terlalu tinggi dan waktu yang terlalu lama dikhawatirkan akan merusak DNA *template* dan akan memperlama proses isolasi. Isolasi DNA menggunakan metode *boiling* sangat mudah dilakukan dan hanya membutuhkan waktu beberapa menit, tapi kualitas DNA yang dihasilkan relatif lebih rendah jika dibandingkan dengan metode lain (Nugorho *et al.*, 2016).

Pada metode kedua juga memiliki kualitas DNA yang relatif rendah. Hal ini dibuktikan dengan adanya isolat khamir yaitu pada IKS-2 dan IKS-3 yang memiliki nilai rasio absorbansi lebih dan kurang dari rentang 1,8-2,0 yaitu

berturut-turut sebesar 2,118 dan 1,759. Berdasarkan nilai kemurnian tersebut dapat diartikan bahwa DNA yang didapatkan belum murni yang artinya selain DNA, masih terdapat kontaminan yang terkandung di dalam isolat tersebut seperti protein dan polisakarida. Nilai kemurnian yang tidak begitu baik dapat disebabkan karena proses pengeluaran DNA tidak sempurna, sehingga masih dimungkinkan adanya DNA yang masih terperangkap di dalam sel. Selain itu, terdapat eliminasi partikel lain yang tidak sempurna, sehingga berpotensi menjadi inhibitor yang dapat mempengaruhi proses amplifikasi DNA (Sunarno *et al.*, 2014).

Faktor selanjutnya yang dapat mempengaruhi keberhasilan isolasi DNA yaitu ketebalan dinding sel yang dimiliki khamir. Khamir memiliki ketebalan dinding sel yang berbeda-beda, dimana khamir dari Filum Ascomycota memiliki dinding sel yang terdiri atas dua lapis (bilayer), sedangkan khamir dari Filum Basidiomycota memiliki dinding sel terdiri atas banyak lapis (multilayer), sehingga berdasarkan ketebalan dinding sel yang dimiliki khamir, diperlukan adanya reagen lain untuk melisiskan dinding sel. Hal ini berlaku pada metode pertama yang kemungkinan memerlukan reagen lain, sedangkan pada metode kedua menggunakan *Nuclease Free Water* (NFW) sebagai pelarut. Hal ini dinilai cukup sesuai untuk mengekstraksi DNA karena NFW mampu membantu menghindari degradasi DNA oleh nuclease dan dapat melarutkan konsentrasi pereaksi ke konsentrasi akhir yang tepat.

Sementara itu, ketidak berhasilan metode pertama dalam mengisolasi DNA khamir juga dapat disebabkan karena pengaruh modifikasi metode kit komersial yang dilakukan pada metode pertama. Faktor lainnya yang dapat

mempengaruhi keberhasilan isolasi DNA adalah kepadatan sel pada suspensi. Oleh karena itu, produk isolasi DNA dengan metode pertama yaitu modifikasi metode dari protokol Wizard® Genomic DNA Purification Kit TM050 tidak diteruskan ke proses amplifikasi DNA karena melihat nilai konsentrasi dan kemurnian yang dihasilkan tidak sesuai, sedangkan produk isolasi DNA dengan metode kedua yaitu metode yang berasal dari Kanti *et al.*, (2018) dalam buku panduan pengelolaan koleksi mikroorganisme InaCC LIPI akan diteruskan ke proses amplifikasi DNA karena melihat nilai konsentrasi dan kemurnian yang dihasilkan cukup sesuai. Meskipun terdapat isolat khamir yang nilai rasio nya kurang serta lebih dari rentang 1,8-2,0.

4.3 Optimasi Protokol PCR untuk Amplifikasi DNA Khamir

Amplifikasi DNA pada identifikasi khamir secara molekular dapat dilakukan dengan menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). PCR merupakan teknik amplifikasi DNA secara *in vitro* dengan melibatkan beberapa tahap yang terjadi secara berulang (siklus). PCR memiliki prinsip dasar yakni mengamplifikasi fragmen DNA murni dan spesifik dengan bantuan enzim DNA *Taq-polymerase* dan dua macam fragmen oligonukleotida sintesis yaitu sepasang primer yang telah dipilih dan diketahui *sequence gennya* (Susilowati, 2019).

Proses PCR memiliki beberapa tahapan yaitu, *pre-denaturation*, *denaturation*, penempelan primer (*annealing*), pemanjangan primer (*extension* atau *elongasi*), dan pemantapan (*post extension* atau *post-elongasi*). Setiap tahapan ini memiliki suhu optimal yang berbeda-beda dan tergantung pada jenis sampel yang akan diamplifikasi, sehingga perlu

dilakukan adanya *trial* atau optimasi kondisi dalam reaksi PCR sehingga didapatkan hasil amplifikasi DNA yang terbaik (Yusuf, 2010). Optimasi protokol PCR dilakukan untuk memastikan parameter-parameter penting dalam teknik PCR dan dapat mengefisiensikan waktu dan bahan sehingga proses identifikasi dapat dilakukan dengan cepat dan tepat (Roux, 2009).

Protokol PCR yang digunakan untuk amplifikasi DNA khamir pada penelitian ini berdasarkan tiga referensi yaitu potokol PCR dari Kanti *et al.*, (2018), Ediningsari (2008), dan Maulana (2011). Pemilihan ketiga protokol PCR pada penelitian ini dikarenakan pada masing-masing referensi menggunakan protokol PCR untuk mengamplifikasi DNA khamir seperti pada penelitian Kanti *et al.* (2018) yang menggunakan protokol PCR tersebut untuk identifikasi isolat khamir secara molekular bedasarkan 26srDNA, pada penelitian Ediningsari (2008) yang menggunakan protokol PCR tersebut untuk identifikasi khamir dari perairan mangrove dan laut cagar alam pulau rambut berdasarkan daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS), dan pada penelitian Maulana (2011) yang menggunakan protokol PCR tersebut untuk identifikasi isolat-isolat khamir dari saluran pencernaan lebah *Apis cerana* berdasarkan data *sequence* daerah ITS rDNA..

Masing-masing protokol PCR ini memiliki perbedaan pada suhu, waktu, dan jumlah siklus, sehingga memberikan pengaruh yang berbeda pada hasil visualisasi serta panjang pita (*band*) DNA disemua isolat khamir yang dapat dilihat pada gambar beserta penjelasannya dibawah ini.

Hasil visualisasi produk amplifikasi DNA khamir dengan protokol PCR dari Kanti *et al.*, (2018) yang ditampilkan pada (Gambar 4.5) dibawah ini

Kanti *et al.*, (2018) hanya 35 siklus dan ini menjadi jumlah siklus yang paling sedikit jika dibandingkan dengan jumlah siklus pada dua protokol PCR lainnya yaitu 40 siklus.

Hal tersebut juga didukung oleh pernyataan Amalia (2013) yang menjelaskan bahwa pada amplifikasi DNA khamir dengan jumlah siklus 35, reaksi amplifikasi belum terjadi secara optimal dan sempurna. Jika dibandingkan dengan dua hasil protokol PCR lainnya yaitu Ediningsari (2008) dan Maulana (2011) yang menggunakan 40 siklus tidak menunjukkan adanya fragmen DNA yang gagal bermigrasi. Adanya fragmen DNA yang gagal bermigrasi terlihat pada sumuran isolat khamir IKS-3 dan IKS-4 dari protokol PCR Kanti *et al.*, (2018).

Selain itu, pada hasil visualisasi produk amplifikasi DNA dengan protokol Ediningsari (2008) juga menunjukkan adanya dua isolat khamir yang tidak teramplifikasi dengan baik dan sempurna. Hal itu dapat disebabkan karena suhu *denaturation* yang digunakan tidak optimal. Protokol PCR Ediningsari (2008) menggunakan suhu *denaturation* sebesar 94 °C selama 15 detik. Menurut Deekshit *et al.*, (2013) yang menyatakan bahwa tahapan *denaturation* pada proses amplifikasi menyebabkan adanya pemisahan struktur untai ganda menjadi untai tunggal DNA, sehingga diperlukan suhu yang optimal yaitu 95 °C selama 30 detik. Waktu yang tidak optimal akan menyebabkan proses renaturasi atau proses kembalinya bentuk struktur untai ganda DNA dari keadaan terdenaturasi yang terjadi secara cepat, sedangkan waktu yang terlalu lama akan memberikan pengaruh

terhadap kerja enzim DNA *Taq-polymerase*, sehingga dapat berpengaruh pada keberhasilan proses PCR (Joko *et al.*, 2011)..

Tidak hanya itu, tahapan *pre-denaturation* juga memiliki peranan dalam keberhasilan proses PCR. Tahap ini berperan dalam memastikan jumlah dari molekul DNA *template* yang akan dilipatgandakan sehingga semua dapat terdenaturasi. Suhu yang digunakan pada tahap ini akan disamakan dengan tahapan *denaturation* hanya saja waktu yang diperlukan lebih lama jika dibandingkan dengan tahapan *denaturation* yaitu selama 2-5 menit (Muladno, 2010).

Tahapan *annealing* menjadi faktor krusial selanjutnya yang berperan dalam proses penempelan primer sehingga menjadi kunci utama pada amplifikasi DNA. Oleh karena itu, tahapan ini harus disesuaikan dengan sifat dari primer yang digunakan. Suhu *annealing* yang diaplikasikan merupakan suhu dengan selisih sebesar 5 °C dibawah *temperature melting* (T_m) yang dimiliki primer (Cindy, 2017). Pada penelitian ini menggunakan primer ITS5 dan ITS4 sebagai pasangan primer yang masing-masing dari primer tersebut memiliki *temperature melting* (T_m) sebesar 58 °C dan 63 °C, sehingga jika dihubungkan dengan *temperature melting* (T_m) yang dimiliki primer, maka suhu *annealing* yang seharusnya digunakan adalah sekitar 53 °C dan 58 °C.

Jika dilihat berdasarkan suhu *annealing* pada beberapa protokol PCR yang digunakan dalam penelitian ini, menunjukkan bahwa suhu *annealing* yang telah memenuhi yaitu pada protokol PCR Maulana (2011) yaitu 58 °C, sehingga pada hasil visualisasinya semua isolat khamir berhasil teramplifikasi dengan baik dan sempurna dengan menunjukkan adanya pendaran fragmen

DNA yang tebal dan utuh, sedangkan pada hasil visualisasi dengan dua protokol lainnya terdapat isolat khamir yang tidak menunjukkan adanya DNA yang teramplifikasi dengan baik dan sempurna, bahkan terdapat satu isolat khamir yang menunjukkan adanya pendaran fragmen DNA yang tidak utuh yaitu yang terjadi pada IKS-2 dari protokol PCR Ediningsari (2008).

Suhu *annealing* yang tidak optimal dan tidak sesuai akan menyebabkan terjadinya *mispriming* yaitu penempelan primer di tempat yang salah atau tempat yang bukan menjadi target amplifikasi (Hikmatyar *et al.*, 2015). Kemungkinan ketidakberhasilan proses amplifikasi DNA beberapa isolat khamir pada protokol PCR Kanti *et al.*, (2018) dan Ediningsari (2008) juga disebabkan adanya tahapan *pre-denaturation*, *denaturation*, dan *annealing* yang tidak berjalan optimal.

Selain itu, adanya *component cocktail* PCR yang buruk juga menjadi faktor yang dapat mengurangi keberhasilan pada tahap *annealing*, dimana target primer yang spesifik juga dipengaruhi oleh aktivitas enzim, $MgCl_2$, ketersediaan komponen *deoxyribonucleoside triphosphates* (dNTPs), dan nilai konsentrasi hingga nilai kemurnian DNA *template*. DNA *template* merupakan untai DNA sekaligus hasil produk isolasi DNA yang dijadikan sebagai cetakan untuk melipatgandakan jumlah untai DNA target (Rakhmana *et al.*, 2015).

Jika dihubungkan dengan nilai konsentrasi dan nilai kemurnian hasil isolasi DNA khamir yang didapatkan dari metode kedua dari isolasi DNA menunjukkan bahwa terdapat tiga isolat khamir yang sering tidak muncul atau tidak teramplifikasi dengan baik dan sempurna pada protokol PCR Kanti

et al. (2018) dan Ediningsari (2008), yaitu IKS-1, IKS-3, dan IKS-4. Sementara itu, pada kenyataannya, ketiga isolat khamir ini memiliki nilai konsentrasi yang cukup tinggi yaitu 20,06; 21,55; dan 10,32 $\mu\text{g/ml}$ dan jika dilihat pada nilai kemurniannya juga menghasilkan nilai kemurnian direntang 1,8-2,0 yaitu 2,034; 1,759; dan 1,870. Ketidakberhasilan ketiga isolat khamir pada tahap amplifikasi DNA bisa disebabkan oleh beberapa faktor, seperti terdapat kontaminan molekul lain yang tidak diharapkan sehingga mempengaruhi kualitas DNA.

DNA dengan kualitas baik merupakan DNA yang murni dengan ditunjukkan adanya pendaran fragmen DNA pada gel elektroforesis. DNA yang belum murni kemungkinan masih memiliki kandungan protein, polisakarida, RNA, hingga kontaminan lain. Jika kontaminan ini hadir dalam jumlah yang signifikan, maka dapat mempengaruhi penempelan primer pada DNA *template* saat proses amplifikasi (Afshan *et al.*, 2017). Selain itu, jumlah DNA *template* yang digunakan juga dapat menjadi faktor dalam keberhasilan amplifikasi DNA. DNA dengan kualitas baik merupakan DNA yang murni dengan ditunjukkan adanya pendaran fragmen DNA pada gel elektroforesis. DNA yang memiliki konsentrasi dan kemurnian tidak sempurna kemungkinan masih mengandung

Rahman *et al.*, (2013) menyatakan bahwa DNA *template* sebanyak 1 μl sudah dapat menghasilkan produk amplifikasi terbaik yang ditandai dengan diperolehnya pita DNA yang tebal, utuh, dan tidak *smear*. DNA *template* yang terlalu sedikit akan menyebabkan DNA target tidak dapat teramplifikasi dengan baik karena primer sama sekali tidak menempel pada DNA target,

- Itsantibiotic Resistance Genes from Seafood. *Journal of Microbiological Methods*. 93: 233-238.
- Dewi, C. L. H. 2012. Analisis Biomolekuler Gen *Internal Transcribed Spacer* (ITS) dalam Studi Filogenetik *Zingiber loerzingii* Valetton (ZINGIBERACEAE). *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Diana, Lady and Titi Lasmini. 2016. Isolasi dan Identifikasi Khamir Selulolitik dari Tanah Rizosfer Anggrek Puser Bumi (*Pecteilis susannae* L.) di Hutan Wonosadi Gunung Kidul DIY. *BIOGENESIS*. 4(1): 21–28.
- Ediningsari, A. R. 2008. Identifikasi Khamir dari Perairan Mangrove dan laut Cagar Alam Pulau Rambut Berdasarkan Daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS). *Skripsi*. Universitas Indonesia, Depok.
- Ekasari, T. W. D., Retnoningsih A., and Widiyanti T. 2012. Analisis Keanekaragaman Kultivar Pisang Menggunakan Penanda PCR-RFLP pada *Internal Transcribed Spacer* (ITS) DNA Ribosom. *J. MIPA*. 35: 21–30.
- Fajarningsih, N. D. 2016. Internal Transcribed Spacer (ITS) as DNA Barcoding to Identify Fungal Species: a Review. *Squallen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*. 11(2): 37–44.
- Gupta, Rakesh Kumar., Patrice Kasangaki., Moes Chemurot., and Devinder Sharma. 2014. *Beekeeping for Poverty Alleviation and Livelihood Security, Chapter: 4*. Netherlands: Springer.
- Hamka. 1979. *Tafsir Al-Azhar*. Surabaya: Yayasan Latimojong.
- Hamzah, D. 2011. Produksi Lebah Madu (*Apis cerana*) yang Dipelihara pada Sarang Tradisional dan Moderen di Desa Kuapan Kecamatan Tambang Kabupaten Kampar. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau, Pekanbaru.
- Hanifah, Imam Abu. 2019. Optimasi Jenis dan Konsentrasi Kation Divalen pada Proses Amplifikasi Sikuen 16S rDNA Bakteri *Bacillus cereus*. *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Hawksworth, D. L. *et al.* 1995. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edn*. Wallingford, UK: CAB International.
- Hidayat, M. R. 2011. Penelusuran Asal Wilayah Lebah Madu *A. mellifera* di Indonesia Menggunakan Daerah Intergenik *cox1/cox2* DNA Mitokondria. *Jurnal BIOPROPAL INDUSTRI*. 2(1): 27–37.
- Hikmatyar, M. F., Royani J. I., and Dasumiati. 2015. Isolasi dan Amplifikasi DNA Keladi Tikus (*Thyponium flagelliform*) untuk Identifikasi Keragaman Genetik. *J. Bioteknol Bios Indon*. 2(2): 42-48.
- Irinyi, L. *et al.* 2015. International Society of Human and Animal Mycology

- (ISHAM)-ITS Reference DNA Barcoding Database-The Quality Controlled Standard Tool for Routine Identification of Human and Animal Pathogenic Fungi. *Medical Micology*. 53(4): 313–337.
- Jasmi. 2013. Hamuli Lebah Madu *Apis* (Hymenoptera: Apidae) pada Beberapa Ketinggian di Sumatera Barat. *Jurnal Saintek*. 5(1): 71–77.
- Joko, Tri., Nanda Kusumandari., and Sedyo Hartono. 2011. Optimasi Metode PCR untuk Deteksi *Pectobacterium carotovorum*, Penyebab Penyakit Busuk Lunak Anggrek. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*. 17(2): 54-59.
- Julistriono, H., Titin Y., and Sukanto H. 1999. Analisis Variasi Genetik *Saccharomyces cerevisiae* di Tahan Etanol dengan RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). *Berita Biologi*. 4(5): 229-232.
- Jumiyati., Siti Harnina Bintari., and Ibnu Mubarak. 2012. Isolasi dan Identifikasi Khamir secara Morfologi di Tanah Kebun Wisata Pendidikan Universitas Negeri Semarang. *Biosaintifika*. 4(1): 28–35.
- Kanti, A. and H.J.D. Latupapua. 2001. Identifikasi Keragaman Khamir yang Diisolasi dari Tanah Kebun Biologi Wamena Kabupaten Jayawijaya, Propinsi Papua. *J. Biol. Indon*. 3(2): 150–160.
- Kurtzman, C. P. and W. F. Jack. 1998. *The Yeast a Taxonomic Study*. New York: Elsevier.
- Kurtzman, C. P. and Fell J. W. 2006. *Yeast Systematics and Phylogeny-Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology*. Berlin: Springer-Verlag.
- Kurtzman, C. P. 2011. Recognition of Yeast from Gene Sequence Comparisons. *The Open Applied Informatics Journal*. 5: 20–29.
- Kurtzman, C. P. et al. 2011. *Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeast*. USA: Elsevier B.V.
- Kusmana, C. 2015. Makalah Utama: Keanekaragaman Hayati (Biodiversitas) sebagai Elemen Kunci Ekosistem Kota Hijau. *PROS SEM NAS MASY BIODIV INDON*. 1(8): 1747–1755.
- Kuszevska, K., Agnieszka Waclawska., and Michal Woyciechowski. 2018. Reproductive of Rebel Workers in Honeybee (*Apis mellifera*) Colonies. *Apidologie*. 49(162): 162–171.
- Larasati, D. U. R. 2018. *Limit of Detection (LOD) Fragmen DNA Pengkode Gen Sitokrom B (cyt b) Babi (Sus scrofa)*. *Skripsi*. UIN Sunan Ampel Surabaya, Surabaya.
- Lase, E. R. K. 2016. Isolasi Khamir dari Nira, Tuak, dan Laru Asal Pulau Nias dan Uji Kemampuannya dalam Memproduksi Bioetanol dari Limbah. *Skripsi*.

- Patramurti, C., Sugiyanto N. A., and Martono S. 2014. Polymorphism of Cytochrome P450 2A6 (CYP2A6*1 and CYP2A6*4) Among Javanese Indonesian Smoker and Non Smoker. *Indonesian Journal of Pharmacy*. 26(1): 11-19.
- Prasetyo, B. A., Sri Minarti., and Nur Cholis. 2014. Perbandingan Mutu Madu Lebah *Apis mellifera* berdasarkan Kandungan Gula Pereduksi dan Non Pereduksi di Kawasan Karet (*Hevea brasilliensis*) dan Rambutan (*Nephelium lappaceum*). 1–7.
- Prihartini, M. and Ilmi M. 2018. Karakterisasi dan Klasifikasi Numerik Khamir Madu Hutan dari Sulawesi Tengah. *Jurnal Mikologi Indonesia*. 2(2): 112–127.
- Purnamasari, M. I., C. Prihatna., A. W. Gunawan., and A. Suwanto. 2012. Isolasi dan Identifikasi secara Molekuler *Ganoderma* spp. yang Berasosiasi dengan Penyakit Busuk Pangkal Batang di Kelapa Sawit. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. 8(1).
- Pusat Perlebahan Apiari Pramuka. 2010. *Lebah Madu: Cara Beternak dan Pemanfaatannya*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Rahman, M.T., Uddin M. S., Sultana R., Mone A., and Setu. 2013. Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*. 4(1): 30-36.
- Rakhmana, Senjavi., Saryono., and Titania T. Nugroho. 2015. Ekstraksi DNA dan Amplifikasi ITS rDNA Isolat Fungi Endofit LBKURCC67 Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*). *JOM FMIPA*. 2(1): 145-151.
- Rangel, J. *et al.* 2016. Honey Bee (*Apis mellifera*) Queen Reproductive Potential Affects Queen Mandibular Gland Pheromone Composition and Worker Retinue Response. *PLOS ONE*. 1–16.
- Rini, A. W. E. 2017. Isolasi dan Identifikasi Khamir Toleran Alkohol dari Molasses. *Skripsi*. Universitas Jember, Jember.
- Roux, K. H., 2009. Optimization and Troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harbor Protocols*. 4(4): 1-6.
- Sani, R. A. and Nusroh N. I. 2015. *Sains Berbasis Al-Qur'an*. Jakarta: Bumi Aksara.
- Savitri, N. P. T., E. D. Hastuti., and S. W. A. Suedy. 2017. Kualitas Madu Lokal dari Beberapa Wilayah di Kabupaten Temanggung. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*. 2(1).
- Sebayang, T., Salmiah., and Sri Fajar Ayu. 2017. Budidaya Ternak Lebah di Desa Sumberejo Kecamatan Merbau Kabupaten Deli Serdang. *ABDIMAS TALENTA*. 2(2): 168–178.

- Shihab, M. Q. 2001. *Tafsir Al-Misbah*. Jakarta: Lentera Hati.
- Singh, S. 1962. *Beekeeping in India*. Indiana Council of Aricultural Research. New Delhi: S. N. Guha Ray At Sree Saraswaty Press Limited.
- Situmorang, R. O. P. and Aam Hasanudin. 2014. *Panduan Manual Budidaya Lebah Madu*. Aek Nauli: Balai Penelitian Kehutanan Aek Nauli.
- Sulastri, Winda. 2019. Jumlah Cemaran dan Identifikasi Khamir pada Jajanan Jubede yang Dijual di Pasar Kapedi Kecamatan Bluto Kabupaten Sumenep sebagai Sumber Belajar Biologi. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Malang, Malang.
- Sumerta, I. N. and Atit Kanti. 2017. Keragaman Jenis khamir Penghasil Etanol yang Diisolasi dari Makanan Fermentasi di Kepulauan Riau. *Jurnal Biologi Indonesia*. 13(1): 61–69.
- Sunarno, Fauzal M., Nyoman F., Amarila M., Anis K., and Amin S. 2014. Metode Cepat Ekstraksi DNA *Corynebacterium diphtheriae* untuk Pemeriksaan PCR *Bul. Penelit. Kesehat.* 42(2): 85-92.
- Suryaningsih, V., Ferniah., R. S., and Endang Kusdiyantini. 2018. Karakteristik Morfologi, Biokimia, dan Molekuler Isolat Khamir IK-2 Hasil Isolasi dari Jus Buah Sirsak (*Annona muricata* L.). *Jurnal Biologi*. 7(1): 18–25.
- Susilowati, T. 2019. Deteksi Kontaminan DNA Babi pada Sampel Penggilingan Daging di Pasar Surya Kota Surabaya Menggunakan *Real-Time Polymerase Chain Reaction*. *Skripsi*. UIN Sunan Ampel Surabaya, Surabaya.
- Syafaruddin and Tri Joko Santoso. 2011. Optimasi Teknik Isolasi dan Purifikasi DNA yang Efisien dan Efektif pada Kemiri Sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco) Airy Shaw). *Jurnal Littri*. 17(1): 11-17.
- Thacker, E. 2012. *The Honey Book*. Ohio: James Direct.
- Tim Karya Tani Mandiri. 2010. *Pedoman Budidaya Beternak Lebah Madu*. Bandung: Nuansa Aulia.
- Wahyuningsih, A. 2019. Keragaman Genetik Pisang (*Musa* spp.) Berdasarkan Karakter Fenotip dan Molekuler Menggunakan Penanda *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) di Kabupaten Lumajang. *Skripsi*. UIN Sunan Ampel Surabaya, Surabaya.
- Walker, G. M. 2009. *Yeasts In: Schaechter M-Desk Encyclopedia of Microbiology*. 2nd ed. London: Elsevier.
- Yusuf, Z. K. 2010. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. *Saintek*. 5(6): 1–6.
- Yuwono, T. 2016. Eksplorasi dan Pemanfaatan Biodiversitas Mikrobia Indonesia untuk Pengembangan Bioteknologi. *Seminar Nasional Biodiversitas VI*. 3–10