OPTIMASI AMPLIFIKASI PCR PADA ISOLAT KHAMIR DARI PENCERNAAN LEBAH MADU (*Apis mellifera)* MENGGUNAKAN DAERAH *INTERNAL TRANSCRIBED SPACER* (ITS)

SKRIPSI

UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

Disusun oleh :

AZIMAH VIKASSA'ADAH
H71216052

PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL
SURABAYA
2021

LEMBAR PERSETUJUAN PEMBIMBING

Skripsi oleh

NAMA : AZIMAH VIKASSA'ADAH

NIM : H71216052

JUDUL : OPTIMASI AMPLIFIKASI PCR PADA ISOLAT KHAMIR DARI PENCERNAAN LEBAH MADU (*Apis mellifera)* MENGGUNAKAN DAERAH *INTERNAL TRANSCRIBED SPACER* (ITS)

Telah diperiksa dan disetujui untuk diujikan.

Surabaya, 05 Januari 2021

Dosen Pembimbing I	Dosen Pembimbing II
(Nirmala Fitria Firdhausi, M.Si.)	(Saiful Bahri, M.Si.)
NIP.198506252011012010	NIP.198804202018011002

LEMBAR PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI

Skripsi Azimah Vikassa'adah ini telah dipertahankan
di depan tim penguji skripsi
di Surabaya, 08 Januari 2021

Mengesahkan,
Dewan Penguji

Dosen Penguji I

(Nirmala Fitria Firdhausi, M.Si.)
NIP.198506252011012010

Dosen Penguji II

(Saiful Bahri, M.Si.)
NIP.198804202018011002

Dosen Penguji III

(Esti Tyastirin, M. KM.)
NIP.198706242014032001

Dosen Penguji IV

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

Mengetahui,
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Sunan Ampel Surabaya

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

PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama	: Azimah Vikassa'adah
NIM	: H71216052
Program Studi	: Biologi
Angkatan	: 2016

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul **"OPTIMASI AMPLIFIKASI PCR PADA ISOLAT KHAMIR DARI PENCERNAAN LEBAH MADU (*Apis mellifera)* MENGGUNAKAN DAERAH *INTERNAL TRANSCRIBED SPACER* (ITS)"**. Apabila suatu saat nanti terbukti saya melakukan tindakan plagiat, maka saya bersedia menerima saksi yang telah ditetapkan.

Demikian pernyataan keaslian ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 27 Januari 2021

Yang menyatakan,

(Azimah Vikassa'adah)

NIM.H71216052

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 : Azimah Vikassa'adah
NIM : H71216052
Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi / Biologi
E-mail address : vikaaviks1903@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 ☐ Desertasi ☐ Lain-lain (……)
yang berjudul :
OPTIMASI AMPLIFIKASI PCR PADA ISOLAT KHAMIR DARI PENCERNAAN LEBAH MADU (*Apis mellifera*) MENGGUNAKAN DAERAH *INTERNAL TRANSCRIBED SPACER* (ITS)

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, 27 Januari 2021
Penulis

(Azimah Vikassa'adah)

ABSTRAK

OPTIMASI AMPLIFIKASI PCR PADA ISOLAT KHAMIR DARI PENCERNAAN LEBAH MADU *Apis mellifera* MENGGUNAKAN DAERAH *INTERNAL TRANSCRIBED SPACER* (ITS)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan salah satu teknik identifikasi secara molekuler, PCR biasa digunakan untuk mengidentifikasi sampai tingkat spesies. Identifikasi sampai tingkat spesies perlu dilakukan pada khamir dalam saluran pencernaan lebah madu *Apis mellifera* karena data identifikasi khamir pada sistem pencernaan lebah yang belum teridentifikasi secara maksimal. Guna mendapatkan hasil terbaik yang didapat dari proses identifikasi khamir diperlukan optimasi secara berkala terutama pada proses amplifikasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan kondisi optimum pada proses amplifikasi DNA khamir. Sebanyak 7 sampel isolat khamir berasal dari saluran pencernaan lebah madu *Apis mellifera*, amplifikasi dilakukan dengan 4 protokol dari Kanti *el al.* (2018), Ediningsari (2008), Anggraini *et al.* (2019) dan Maulana (2011). Protokol dari Ediningsari (2008) mampu mengamplifikasi seluruh isolat yang ada, sedangkan protokol dari Maulana (2011) mampu menghasilkan pita yang tebal dan terang namun hanya berhasil mengamplifikasi isolat 2, 3, dan 4 dengan ukuran pita DNA 573 bp, 499 bp, dan 466 bp.

Kata kunci : Amplifikasi, Khamir, Optimasi, 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

OPTIMAZATION OF DNA AMPLIFICATION OF YEAST FROM THE DIGESTIVE TRACTS *Apis mellifera* USING *INTERNAL TRANSCRIBED SPACER* (ITS) DOMAIN

Polymerase Chain Reaction (PCR) is one of technique in molecular analysis, it can be used to identify a species. Identification to the species level needs to be carried out on yeast in the digestive tract of *Apis mellifera* honeybees because the yeast identification data in the digestive sytem of bees have not been identified optimally. In order to get the best results obtained from the yeast identification process, periodic optimization is needed, especially in the amplification process. The purpose of this study was to obtain the optimum conditions for the amplification of yeast DNA. A total of 7 samples of yeast isolats came from the digestive tract of Apis mellifera honeybees, amplification was carried out using 4 protocols from Kanti el al. (2018), Ediningsari (2008), Anggraini et al. (2019) and Maulana (2011). The protocol from Ediningsari (2008) was able to amplify all existing isolats, while the protocol from Maulana (2011) was able to produce thick and bright bands but only succeeded in amplifying isolats 2, 3, and 4 with DNA band sizes of 573 bp, 499 bp, and 466 bp.

Keywords : Amplification, Yeast, Optimization, 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

DAFTAR ISI

Halaman Sampul i
Lembar Persetujuan Pembimbing ii
Lembar Pengesahan Tim Penguji Skripsi iii
Pernyataan Keaslian iv
Motto v
Halaman Persembahan vi
Abstrak vii
Abstrack viii
Kata Pengantar ix
Daftar Isi xi
Daftar Tabel xii
Daftar Gambar xiii
Daftar Lampiran xiv
BAB I PENDAHULUAN 1
1.1. Latar Belakang 1
1.2. Rumusan Masalah 5
1.3. Tujuan Penelitian 5
1.4. Manfaat Penelitian 5
1.5. Batasan Penelitian 6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA 8
2.1. Khamir 8
2.2. Lebah Madu 12
2.3. Daerah Gen Ribosomal DNA (rDNA) 21
2.4. Identifikasi Khamir dengan Metode Molekuler 23
BAB III METODE PENELITIAN 30
3.1. Rancangan Penelitian 30
3.2. Tempat dan Waktu Penelitian 30
3.3. Alat dan Bahan Penelitian 31
3.4. Prosedur Penelitian 32
3.5. Analisis Data 38
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN 38
4.1. Pengambilan Sampel 39
4.2. Karakteristik Morfologi Isolat Khamir 39
4.3. Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA 43
4.4. Optimasi Kondisi PCR pada Amplifikasi Daerah ITS rDNA 45
BAB V PENUTUP 55
5.1. Kesimpulan 55
5.2. Saran 55
DAFTAR PUSTAKA 56
LAMPIRAN 60

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 3.1 Jadwal Pelaksanaan Penelitian 30
Tabel 3.2 *Cocktail* PCR 36
Tabel 3.3 Optimasi Suhu PCR 36
Tabel 4.1 Karakteristik Isolat Khamir berdasarkan pengamatan makroskopis... 40
Tabel 4.2 Karakteristik Isolat Khamir berdasarkan pengamatan mikroskopis ... 40
Tabel 4.3 Kemurnian dan Konsentrasi Isolat ITS rDNA Khamir..... 44
Tabel 4.4 Perbandingan panjang pita DNA 53

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 Struktur sel khamir 9
Gambar 2.2 Bentuk Sel Khamir 10
Gambar 2.3 Tiga Kasta Lebah Madu Coklat (*Apis mellifera*) 14
Gambar 2.4 Anatomi Lebah 16
Gambar 2.5 Morfologi Lebah 17
Gambar 2.6 Proboscis pada *Apis mellifera* 19
Gambar 2.7 Daerah rDNA 21
Gambar 2.8 Daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) 23
Gambar 2.9 Proses PCR 24
Gambar 4.1 Isolat 1 41
Gambar 4.2 Isolat 2 41
Gambar 4.3 Isolat 3 41
Gambar 4.4 Isolat 4 42
Gambar 4.5 Isolat 5 42
Gambar 4.6 Isolat 6 42
Gambar 4.7 Isolat 7 42
Gambar 4.8 Visualisasi DNA khamir protokol Kanti *et al*. (2018) 46
Gambar 4.9 Visualisai DNA khamir protokol Ediningsari (2008) 47
Gambar 4.10 Visualisasi DNA khamir protokol Anggraini *et al.* (2019) 48
Gambar 4.11 Visualisasi DNA khamir protokol Maulana (2011) 49

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 LAMPIRAN

Lampiran 1. Lebah madu *Apis mellifera* 60
Lampiran 2. Nilai kualitas dan kuantitas genom DNA isolat khamir hasil biodrop 60
Lampiran 3. Kegiatan Penelitian 61
Lampiran 4. Certificate of analysis Gotaq® Green Master Mix 63
Lampiran 5. User guide Generuler 1 kb plus DNA Ladder 64
Lampiran 6. Hasil perhitungan laju elfo produk amplifikasi DNA 66

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

Indonesia merupakan negara megabiodiversitas, dengan keanekaragaman hayati yang sangat banyak. Salah satunya adalah keanekaragaman khamir, khamir merupakan mikroorganisme eukariotik yang tergolong dalam kingdom fungi dan tergolong kedalam 2 filum, yaitu Ascomycota dan Basidiomycota. Spesies khamir yang telah teridentifikasi, sekitar 42% dapat ditemukan di Indonesia dengan jumlah 37 genera (Kurtzman & Fell, 2006). Dari seluruh 89 genera keanekaragaman khamir, diperkirakan masih 1% saja yang sudah teridentifikasi (Kurtzman & Fell, 2006). Khamir memiliki jangkauan ekologi yang luas dan ekstrem (Kanti, 2006). Khamir berasosiasi dengan komponen biotik lainnya seperti hewan, tumbuhan, dan serangga. Oleh sebab itu, komponen-komponen tersebut juga bisa menjadi salah satu sumber untuk isolat khamir.

Khamir pada umumnya digunakan dalam proses fermentasi pangan, seperti bir, roti, anggur, sake. Namun, saat ini penggunaan khamir dalam bidang pangan sudah makin meluas diantaranya menjadi penghasil aroma, vitamin, asam-asam organik, dan enzim. Khamir digunakan dalam bidang pertanian sebagai biokonversi untuk produk pertanian dan residunya sebagai bahan bakar terbarukan. Khamir juga dapat digunakan sebagai agen bioremediasi hidrokarbon, juga sebagai indikator pencemaran air. Khamir juga dimanfaatkan dalam bidang farmasi sebagai penghasil hormon, antigen, antibiotik, senyawa *biotherapeutic*, dan vaksin (Deak, 2006). Khamir yang ada

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 pencernaan lebah biasanya berfungsi dalam fermentasi serbuk sari menjadi *bee bread* dan membantu pematangan nectar menjadi *honeycomb*, pada umumnya khamir di pencernaan lebah dapat menghasilkan asam amino dan vitamin essensial yang membantu lebah. Pemaparan sains mengenai khamir pada pencernaan lebah yang membantu pembuatan madu juga di sebutkan dalam Al-Qur'an surat An-Nahl ayat 69 :

ثُمَّ كُلِيْ مِنْ كُلِّ الثَّمَرٰتِ فَاسْلُكِيْ سُبُلَ رَبِّكِ ذُلُلًاۗ يَخْرُجُ مِنْۢ بُطُوْنِهَا شَرَابٌ مُّخْتَلِفٌ اَلْوَانُهٗۖ فِيْهِ شِفَاۤءٌ لِّلنَّاسِۗ اِنَّ فِيْ ذٰلِكَ لَاٰيَةً لِّقَوْمٍ يَّتَفَكَّرُوْن

Artinya : kemudian makanlah dari tiap-tiap (macam) buah-buahan dan tempuhlah 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. Sesungguhnya pada demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran tuhan) bagi orang-orang yang memikirkan.

Berdasarkan terjemah dari ayat diatas disebutkan kata "perut lebah" yang merupakan asal tempat keluar minuman (madu) dengan warna yang bermacam-macam, perut lebah disini mengindikasikan bahwa madu dihasilkan dari pencernaan lebah yang dibantu dengan proses fermentasi oleh khamir. Proses fermentasi merupakan proses pengubahan gula menjadi asam organik oleh aktivitas dengan substrat yang cocok (Savitri, 2017).

Keberadaan khamir dalam pencernaan lebah merupakan bentuk asosiasi antara khamir dan lebah madu yang dalam hal ini dilakukan oleh lebah madu pekerja, keberadan jenis khamir dalam pencernaan lebah madu pekerja sendiri ditentukan oleh keadan lingkungan serta perbedaaan tipe bunga dan kelimpahannya. Khamir berperan dalam proses fermentasi serbuk sari menjadi

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

bee bread dan proses pematangan madu bunga (*nectar*) menjadi madu. Asosiasi yang terjadi antara khamir dan lebah madu pekerja bersifat mutualistic karena berhubungan dengan tugas lebah madu pekerja sebagai pencari *nectar* bunga dan juga dalam pembuatan madu di dalam sarang.

Kemampuan khamir dalam proses fermentasi pembuatan madu bisa menjadi salah satu bibit pengembangan bioteknologi, untuk mengetahui jenis khamir apa saja yang membantu proses pembuatan madu dalam pencernaan lebah diperlukan proses identifikasi. Proses identifikasi khamir sangat bermanfaat untuk menambah database spesies khamir, identifikasi khamir dapat dilakukan secara konvsional dan molekuler. Identifikasi merupakan proses menemukan spesies dari suatu isolat dengan membandingkannya menggunakan data yang sudah ada. Identifikasi khamir secara konvensional memanfaatkan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis, lalu beberapa macam tes secara biokimia (Diana dan Titi, 2016). Karakteristik yang digunakan untuk identifikasi secara konvensional kurang memberikan variasi sehingga cukup sering terjadi kesulitan ketika mengidentifikasi sebuah spesies, maka mulai dikembangkanlah identifikasi spesies dengan metode molekuler yang memanfaatkan *sequence* dari gen tertentu yang bersifat *conserve* namun memiliki variasi yang cukup tinggi sehingga memiliki nilai akurasi yang lebih tinggi (Maulana, 2011).

Salah satu jenis gen yang *conserve* adalah gen ITS yang merupakan salah satu daerah *non-coding* pada rDNA (ribosomal DNA). Gen yang terdapat pada rDNA bersifat *multiple copy* atau memiliki kopian yang cukup banyak, gen rDNA meliputi dari daerah unit besar atau LSU (*Large Sub Unit*) dan SSU

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

(*Small Sub Unit*). Pada rDNA terdapat daerah *coding* yaitu gen 26S, 18S, dan 5,8S yang masing-masing gennya dipisahkan oleh daerah ITS, sehingga daerah ITS memiliki 2 bagian yaitu ITS 1 dan ITS 2, masing masing memisahkan anatar ketiga gen *coding* pada rDNA (Anggraeni *et al*, 2019). Pemilihan daerah rDNA ITS sebagai marka molekuler untuk khamir dikarenakan daerah ini merupakan salah satu daerah yang *conserved* atau tidak banyak mengalami perubahan susunan nukleotida atau dengan kata lain lagu mutasinya rendah sehingga variasi pada penempelan primernya juga tidak terlalu banyak (Case *et al*, 2007).

Metode identifikasi secara molekuler memiliki berbagai macam teknik, hal ini disesuaikan dengan bagaimana untuk mendapatkan data yang diinginkan dengan sarana prasarana yang telah tersedia, sahingga beberapa sumber untuk modifikasi sebuah metode pun dibutuhkan dengan penyesuaian sampel yang akan diuji, dalam penelitiannya Astriani, Ratnayani, dan Yowani (2014) menyebutkan salah satu tahap yang mengalami beberapa modifikasi adalah optimasi pada proses PCR dapat dilakukan dengan menaikturunkan suhu *annealing*, pengoptimasian suhu pada proses ini disebabkan tahap ini merupakan tahap dimana primer akan menempel pada DNA *template*, jika suhu *annealing* terlalu tinggi yang akan terjadi adalah penempelan *primer* yang tidak terlalu sempurna, begitupun jika terlalu rendah akan menyebabkan *primer* tidak menempel pada daerah yang spesifik, sehingga basa nitrogen yang teramplifikasi bukanlah gen target. Pertiwi, Mahardika, dan Watiniasih (2015) dalam hasil penelitiannya juga menunjukkan bahwa optimasi setiap sampel bersifat mandiri atau tidak ditentukan oleh persamaan spesiesnya, hal ini

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

menjelaskan bahwa keadaan sampel itu sendiri juga sangat menentukan optimasi suhu *annealing*. Suhu *annealing* yang sesuai dengan gen target daerah ITS ada pada kisaran 44°C s/d 49°C hal ini disebutkan dalam hasil penelitian dari Nugroho, Rambe, Dewi, Fitri, Sepryani, Restihadi, dan Haryani (2013), suhu ini didasarkan dan dipengaruhi oleh daerah ITS bagian mana yang di amplifikasi juga pasangan primer yang akan digunakan.

Beberapa penelitian terdahulu membuktikan, bahwa optimasi suhu pada tahap PCR sangat penting untuk menghasilkan amplifikasi DNA yang akurat dan banyak sehingga memudahkan dalam proses identifikasi pada sebuah sampel yang menggunakan metode molekuler. Hasil dari optimasi yang optimal dapat membantu dalam proses selanjutnya seperti didapatkannya pita hasil elektroforesis yang jelas dan juga hasil sequencing yang tidak menumpuk. Pada penelitian ini dimungkinkan untuk menambah pengetahuan mengenai optimasi dalam proses amplifikasi PCR dalam proses identifikasi spesies khamir dari pencernaan lebah madu *Apis mellifera* secara molekuler.

1.2. Rumusan Masalah

Bagaimana perbandingan optimasi amplifikasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk identifikasi isolat khamir dari pencernaan lebah madu *Apis mellifera* menggunakan daerah ITS (*Internal Transcribed Spacer*)?

1.3. Tujuan Penelitian

Mengetahui perbandingan optimasi amplifikasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk identifikasi isolat khamir dari pencernaan lebah madu *Apis mellifera* menggunakan daerah ITS (*Internal Transcribed Spacer*).

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

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian dalam penelitian ini adalah :

1. Peneliti : Menambah pengalaman peneliti dalam metode optimasi suhu pada protokol PCR untuk identifikasi khamir dari sistem pencernaan lebah madu *Apis mellifera* dengan menggunakan gen ITS.
2. Masyarakat : Memberikan informasi terbaru mengenai optimasi suhu pada protokol PCR untuk isolat khamir dari saluran pencernaan lebah madu *Apis mellifera*.
3. Instansi : Penelitian ini dapat menjadi tambahan literatur dan daftar pustaka.
4. Pendidikan dan pengetahuan : Menjadi salah satu referensi mengenai optimasi pada protokol PCR untuk sampel khamir pada sistem pencernaan *Apis mellifera*.

1.5. Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. Spesies lebah yang digunakan adalah *Apis mellifera*.
2. Khamir yang diisolasi dan diidentifikasi sebatas pada saluran pencernaan lebah madu *Apis mellifera*.
3. Lokasi pengambilan lebah madu *Apis mellifera* dari peternakan lebah madu Kembang Joyo Sriwijaya, Malang.
4. Primer yang digunakan yaitu, primer ITS4 (5’TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’) sebagai primer *reverse* dan ITS5 (5’GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3’) sebagai primer *forward*.

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. Variasi protokol PCR menganut pada beberapa literatur yaitu buku panduan pengelolaan mikroorganisme InaCC LIPI oleh Kanti *et al* (2018), Maulana (2011), Ediningsari (2008), dan Anggraini *et al.* (2019).
6. *Cocktail* dan kit PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang digunakan dalam penelitian ini adalah promega GoTaq® Green Master Mix 9PIM712.
7. Teknik PCR yang digunakan adalah teknik PCR konvernsional.

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 II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Khamir

a. Ciri Umum dan Taksonomi

Khamir termasuk ke dalam organisme uniseluler dan eukariotik, secara kingdom termasuk kedalam kingdom fungi. Spesies dari khamir biasa ditemukan pada filum Ascomycota dan Basidiomycota. Ascomycota sendiri merupakan filum yang didalamnya beranggotakan fungi yang memiliki askospora, sebagian besar bereproduksi dengan cara aseksual, dikariofase terjadi secara gametangia, spermatisasi, dan somatogami, namun hasil dari dikariofasenya berukuran kecil serta berumur pendek, reproduksi secara seksualnya dengan membentuk askospora yang bersifat endogen yang terbentuk dalam askus, dengan hasil spora 4 atau 8. Basidiomycota merupakan filum dengan karakteristik memiliki hifa septat, sebagian besar bereproduksi secara seksual, dikariofase dengan cara spermatisasi dan somatogami, hasil dari dikariofasenya berumur panjang dan memiliki ukuran yang besar, juga berperan dalam terbentuknya baik miselia sekunder maupun tersier, reproduksi secara seksual dari filum ini dilakukan dengan pembentukan basidiospora yang bersifat eksogen yang terbentuk dalam basidia, dengan hasil jumlahnya dari 1 sampai 8 spora (Maulana, 2011).

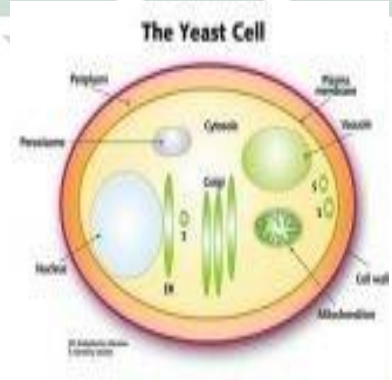
Khamir tersebar dalam kedua filum tersebut dengan sifat teleomorfik dan anamorfik. Individu khamir bisa diidentifikasi baik saat fase reproduksi

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

seksual maupun aseksualnya. Pengertian dari teleomorfik dan anamorfik adalah pada fase apa sebuah individu khamir teridentifikasi atau ditemukan. Teleomorfik berarti untuk khamir yang ditemukan saat fase reproduksi seksual sedangkan anamorfik saat mengalami fase reproduksi aseksual (Maulana, 2011).

Khamir memiliki orgenel sel seperti sel eukaryotic pada umumnya yaitu apparatus golgi, reticulum indoplasma, nucleus, vakuola, mitokondria, sitoskeleton (Montes *et al*., 2016). Pada beberpa khamir memiliki sifat dimorphic yang dikenal juga dengan sebutan *yeast-like fungi* yaitu memiliki 2 fase dalam siklusnya, fase hifa dan fase uniseluler (Maulana, 2011).

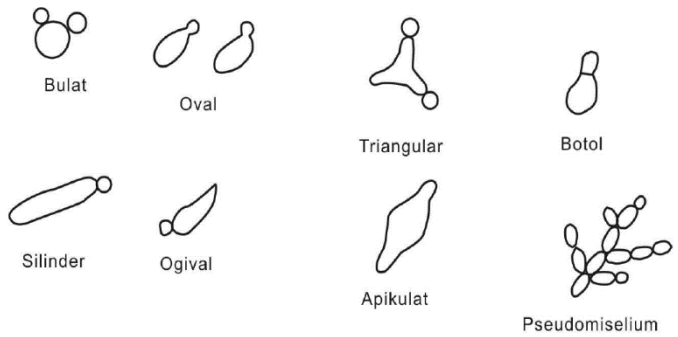
Pada umumnya ukuran sel khamir lebih besar dari pada sel bakteri, tetapi pada ukuran sel khamir terkecil tidak lebih besar daripada ukuran sel bakteri terbesar. Bentuk dan ukuran dari sel khamir juga beragam, ada yang berbentuk bulat telur, memanjang, dan bola. Bentuk dari spesies khamir juga dipengaruhi oleh umur dan lingkungan, meski ada bentuk khas dari masing-masing spesiesnya (Pelczar and Chan, 2013).



Gambar 2.1. Struktur sel khamir
(Sumber : Pratiwi, 2008)

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 memiliki sel vegetatif uniseluler dengan membentuk miselium sejati maupun palsu dengan sebutan pseudomiselium. Koloni khamir terlihat seperti mentega yang mengkilat. Bentuk sel khamir memiliki banyak macam dan khamir merupakan organisme non motil karena tidak memiliki alat gerak baik yang berbentuk flagella maupun flagellum (Pelczar and Chan, 2013).



Gambar 2.2 bentuk sel khamir
(Sumber : Cano dan Colom, 1986)

b. Filum Ascomycota

Filum Ascomycota merupakan salah satu filum dari kingdom fungi yang anggotanya berupa khamir dengan beberapa kelas, khamir sendiri merupakan salah satu macam bentukan dari kingdom fungi. Berikut merupakan kelas dari filum Ascomycota yang anggotanya terdapat khamir:

1) Kelas Hemiascomysetes

Khamir dalam kelas ini memiliki ciri-ciri askus yang tidak ditutupi oleh askokarp (tubuh buah), dinding selnya terdiri dari 2 lapis, dan pembentukan tunas secara holoblastik (arthrokonidia) sebagai reproduksi secara aseksualnya (Sjamsuridzal, 2006).

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) Kelas Eucomycetes

Ciri dari khamir anggota kelas ini adalah tubuh buah (askokarp), khamir dalam kelas ini biasanya berupa *yeast-like fungi* (Sjamsuridzal, 2006).

3) Kelas Archiascomycetes

Khamir dari kelas ini bisa dilihat dari ciri-cirinya yang memiliki askus yang tidak ditutupi oleh tubuh buah (askokarp), dinding selnya ada 2 lapis, dan reproduksi aseksualnya dengan pembentukan tunas dengan pembelahan sel (*fussion*) atau enteroblastik (Sjamsuridzal, 2006). Kelas ini merupakan kelas tertua dengan anggotanya sekitar 150 spesies pada 10 genus (Webster and Weber, 2007).

c. Filum Basidiomycota

Beberapa kelas dari filum basidiomycota yang anggotanya terdapat khamir adalah sebagai berikut :

1) Kelas Uredinimycetes

Anggota khamir dari kelas ini merupakan yang paling beragam baik secara morfologi maupun ekologi, juga bersifat parasite dan saprofit (Sjamsuridzal, 2006).

2) Kelas Hymenomycetes

Kelas ini memiliki ciri-ciri septa yang *dolipore* dan kandungan gula dalam dinding selnya berupa glukosa, xylose, dan mannose (Sjamsuridzal, 2006).

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) Kelas Ustilaginomycetes

Dinding sel dari kelas ini kandungan gulanya didominasi oleh galaktosa, mannose, dan glukosa (Sjamsuridzal, 2006).

d. Habitat Khamir

Khamir merupakan makhluk hidup yang tersebar dari wilayah aquatic, daratan, dan udara (Starmer dan Lachance, 2011). Khamir juga ditemukan pada nectar bunga, buah, dan dedaunan. Khamir juga terdapat pada pencernaan hewan terutama serangga, beberapa ada yang patogen terhadap manusia maupun hewan berdarah panas (Charlile *et al*., 2001). Beberapa jenis khamir ditemukan di daerah dengan lingkungan ekstrim, yaitu daerah dengan kandungan gula atau garam yang tinggi, ketersediaan oksigen yang rendah, dan temperature yang rendah (Walker,2009). Khamir juga dapat ditemukan pada makanan, salah satunya madu (Thacker, 2012).

2.2. Lebah Madu (*Apis mellifera*)

a. Ciri Umum dan Taksonomi

Apis mellifera merupakan jenis lebah madu yang terkenal luas persebarannya, dari mulai daerah Eropa yaitu Spanyol, Yugoslavia, dan Yunani. Lebah madu *Apis mellifera* dapat menghasilkan madu sebanyak 25-30 kg perkoloninya. Lebah madu jenis ini memiliki nama lokal lebah madu coklat (Koeniger, 2007).

Lebah madu memiliki 3 bagian utama tubuh, yaitu kepala, thorax dan abdomen. Kepalanya memiliki mata majemuk dan antenna, dua pasang sayap dan 3 pasang kaki menempel pada toraks. Pada lebah madu hanya lebah betina saja yang memiliki sengat yang berasal dari ovipositor yang

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

dimodifikasi (Mortensen *et al*.,2013). *Apis mellifera* memiliki 3 pasang segment dari bagian belakang abdomennya yang berwarna kuning, lebah ratunya memiliki warna merah kuning kecoklatan, sedangkan pada lebah pejantannya berwarna lebih muda. *Apis mellifera* memiliki sayap dengan panjang pada kisaran 0.8 - 0.95 cm, belainya pada kisaran 0.55 – 0.71 cm, abdomen ke 6-nya tanpa 'tomentum'. *A. mellifera* merupakan jenis lebah yang sering membersihkan sarangnya, sehingga sarang lebah ini sering terlihat bersih (Lamerkabel, 2011).

Menurut Singh (1960), berikut adalah klasifikasi lebah madu coklat.

Kingdom : Animalia

Filum : Arthropoda

Kelas : Hexapoda

Ordo : Hymenoptera

Famili : Apidae

Genus : *Apis*

Spesies : *Apis mellifera*

b. Koloni

Lebah merupakan jenis hewan yang hidup secara berkoloni, juga termasuk kedalam hewan yang polimorfisme atau dalam 1 spesies memiliki

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

lebih dari satu jenis bentuk. Satu sarang lebah biasanya diisi oleh 1 koloni dengan 3 macam lebah dengan perannya masing-masing (Gambar 2.1).

Gambar 2.3 Tiga Kasta Lebah Madu Coklat (*Apis mellifera*)
(Sumber : The Editors of Encyclopedia Britannia, 2012)

1) Lebah Ratu

Lebah ratu merupakan lebah dengan ukuran paling besar dalam koloninya dengan perbandingan 2,8 kali bobot lebah pekerja, juga hanya berjumlah 1 dalam setiap koloni. Lebah ratu bertugas untuk bertelur dan mengembangbiakkan lebah yang baru, lebah ratu mampu bertelur pada kisaran 1000 – 3000 telur perharinya. Masa produksi lebah ratu berakhir pada usia 2 tahun, namun masa bertelurnya pada usia 3-5 tahun (Lamerkabel, 2011).

2) Lebah Pejantan

Lebah pejantan merupakan lebah yang bertugas untuk mengawini sang ratu, sehingga lebah ini tidak memiliki sengat dan juga hanya berdiam di sarang, jumlahnya juga tidak terlalu banyak pada kisaran 100 – 250 ekor. Ukuran dari lebih jantan berada di tengah-tengah antara lebah ratu dan lebah pekerja yaitu lebih kecil dari lebah ratu namun lebih besar dari lebah pekerja. Umur dari lebah jantan hanya 3 bulan atau pada kisaran 75 – 90

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 dan akan mati jika sudah mengawini sang ratu. Perkawinan antara lebah jantan dan ratu berlangsung di alam terbuka dengan pemilihan terlebih dahulu dengan lebah pejantan terbaik (Lamerkabel, 2011).

3) Lebah Pekerja

Lebah pekerja merupakan jenis lebah yang berukuran paling kecil dalam koloninya, namun berjumlah paling banyak yaitu dengan kisaran 20.000 – 90.000 individu. Lebah pekerja bertugas mengumpulkan nektar, tepungsari, dan air dari berbagai bunga, juga mencari vitamin dan karbohidrat, lebah pekerja memiliki *home sense* yang merupakan alat pembau sehingga tidak akan tersesat untuk kembali ke sarang. Lebah pekerja juga bertugas untuk merawat ratu, pejantan dan larva lebah, selain itu lebah pekerja juga bertugas dalam membangun sel sarang, dan menjaga kebersihanya juga memperbaiki sarang ketika ada kerusakan. Lebah pekerja juga bertugas dalam menyimpan madu dalam sel sarang (Lamerkabel, 2011).

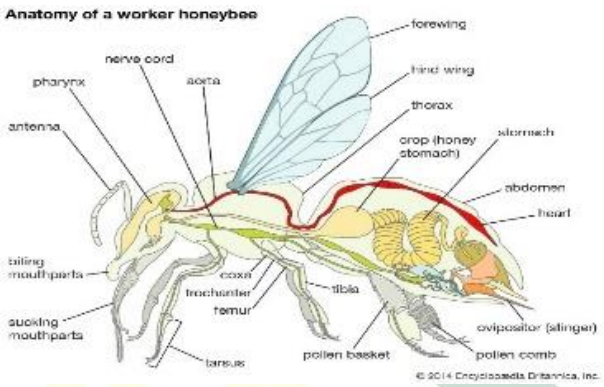
Lebah pekerja dilengkapi dengan sengat berduri yang bentuknya menyerupai bentuk kait dengan dilengkapi kantong racun, lebah pekerja akan mati jika sudah sekali menyengat. Umur dari lebah pekerja sendiri tidak bisa terukur secara pasti, namun berada pada kisaran 4-6 minggu jika dihitung dari telur dewasa, atau 8-10 minggu sejak telur menetas sampai jadi larva, atau juga 35-42 hari karena tugasnya yang keluar sarang

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

penyebab kematian lebah pekerja tidak hanya mati secara alami, namun juga bisa disebabkan oleh dimangsa predator, dan juga saling membunuh dengan lebah lain (Lamerkabel, 2011).

c. Struktur Tubuh Lebah madu

1) Struktur tubuh dalam lebah madu



Gambar 2.4 Anatomi Lebah
(Sumber : The Editors of Encyclopedia Britannia, 2014)

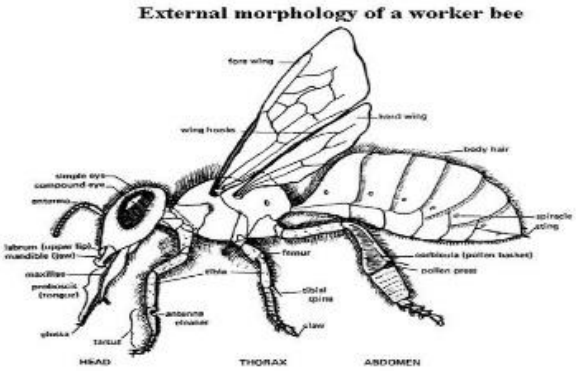
Anatomi lebah meliputi sistem peredaran darah, sistem pencernaan, sistem pembuangan, sistem syaraf, sistem reproduksi, sistem pernafasan, sistem otot (Gambar 2.4). Sistem peredaran darah lebah terdiri dari jantung yang berada di bagian dorsal bawah kulit, rongga tubuh, dan darah. Sistem pencernaan berada tepat dibawah jantung, sistem pencernaan lebah terdiri dari usus yang melintang dari mulut sampai anus, kelenjar ludah lebah terletak di daerah ventral sebelah mulut. Usus dari lebah dibagi menjadi stomodeum (foregut), mesenteron, (mindgut), dan protodeum (hindgut) (Sa'diyah, 2015).

Sistem pembuangan lebah tersusun dari pembuluh-pembuluh buntu yang seperti benang halus dan terhubung ke

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

bagian usus posterior bernama *benang malphigi*. Sistem syaraf dari lebah berada di bagian ventral atas kulit yang terdiri dari otak dan tali syaraf yang terentang mulai dari otak sampai belakang di atas kulit, dimana tali ini terdiri atas simpul syaraf sepasang pada setiap ruasnya. Sistem reproduksi lebah sesuai dengan jenis kelaminnya, sel jantan untuk yang jantan sedangkan yang betina berupa sel betina. Sistem pernafasan lebah terdiri dari trakea, air sac (kantung udara), trakheole, dan spirakel. Sistem otot lebah terdiri kulit bagian dalam yang tidak polos dengan tonjolan disetiap ruasnya, tonjolan ini merupakan tumpuan otot (Sa'diyah, 2015).

2) Struktur tubuh luar lebah madu



Gambar 2.5 Morfologi lebah
(Sumber : Sammatara and Alphones, 1978)

Secara garis besar, lebah memiliki 3 bagian tubuh utama yaitu kepala, dada, dan perut (Gambar 2.5). Pada bagian kepala lebah ada sepasang mata majemuk yang berfungsi untuk indra penglihatan. Mata lebah bisa membedakan warna biru, kuning, hijau muda, dan ultraviolet. Tipe mulut lebah adalah penggigit-penghisap, penggigit yang berfungsi sekaligus sebagai gigi,

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

merakit sarang, alat pertahanan diri, dan penghisap dengan glossa pada bagian tengahnya untuk menghisap nectar atau cairan makanan lainnya serta memberi makanan untuk larva. Lebah juga memiliki antenna sebagai indra peraba dan perasa, antenna berfungsi untuk berkomunikasi, khususnya ketika ada lebah lain yang sudah mendapatkan pakan (Suputa and Arminudin, 2007).

Bagian dada lebah merupakan tempat melekatnya organ penggerak berupa sayap dan kaki. Pada lebah terdapat 2 pasang sayap yang mana sayap depan lebih lebar daripada yang belakang. Gerak sayap lebah dikontrol oleh otot dada, dengan jarak terbang yang jauh. Saat membantu penyebaran polen, lebah menggunakan rambut-rambut pada kakinya untuk mengumpulkan polen dan memasukkannya kedalam mulut. Pada bagian perut lebah terdapat sengat sebagai alat pertahanan diri yang merupakan perubahan dari alat peletak telur. Sengat lebah hanya dimiliki oleh lebah pekerja (Suputa and Arminudin, 2007).

d. Proses Pembuatan Madu

Proses pengolahan madu yang dihasilkan oleh lebah madu diawali dengan pengambilan dan pencarian nectar-nektar bunga oleh lebah madu pekerja dengan proboscis, lalu dimasukkan tersimpan *honey suck*. Ketika *honey suck* penuh, lebah pekerja mengakhiri pencariannya. Sesampainya di sarang, lebah pekerja yang bertugas mencari nectar memindahkan nectar yang didapat dari pencarian dipindahkan dengan menggunakan proboscis ke lebah pekerja yang bertugas didalam sarang. Nectar akan masuk kedalam

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

perut lebah madu bagian abdomen untuk diserap airnya oleh sel-sel dinding perut dan dibuang keluar melewati pipa *malphigi* dan poros usus.

Gambar 2.6 Proboscis pada *Apis mellifera*
(Sumber : Hale, 2019)

Nectar memiliki kandungan air yang banyak, yaitu pada kisaran 70-80%, sedangkan kandungan air pada madu sendiri ada pada kisaran 20%. Proses terbentuknya nektar menjadi madu, tidak luput dari aktivitas mikroorganisme dan lebah madu, setiap madu dari berbagai koloni yang berbeda memiliki cita rasa yang berbeda apalagi jika dari lebah madu berbeda spesies karena dari sumber nectar bunga yang berbeda. Proses pembuatan madu dibantu oleh mikroorganisme terutama khamir, yang membantu proses fermentasi.

Khamir yang biasa ditemukan pada pencernaan lebah merupakan khamir yang tahan terhadap kadar gula tinggi, khamir yang terdapat pada pencernaan lebah juga merupakan khamir yang bias mendegradasi gula menjadi alcohol. Khamir yang diperoleh lebah madu dari nectar biasanya merupakan khamir jenis asam amino dan vitamin b, asam amino untuk menutrisi lebah madu sendiri, sedangkan vitamin b untuk membantu

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

perkembangan kelenjar hipofaringeal yang berfungi untuk menyekresi *royal jelly* yang merupakan makanan bagi larva dan ratu lebah madu.

e. Persebaran Habitat

Apis mellifera merupakan lebah madu dengan persebaran terluas karena kemampuan adapatasi yang bagus, diketahui lebah madu *Apis mellifera* tersebar di seluruh benua kecuali antartika karena ketidak sediaan tanaman sebagai sumber pakan. Koloni lebah madu *Apis mellifera* yang berada di negara sub-tropis juga tidak berproduksi pada musim dingin, sehingga hasil madu yang di dapat lebih banyak pada lebah madu *Apis mellifera* yang berada di daerah tropis (Gojmerac, 1983). Menurut Sammataro dan Avitabile (1998) lebah madu *Apis mellifera* berasal dari benua Afrika, Eropa, dan Asia barat, lalu dibawa manusia menyebar ke daerah lain seperti benua Amerika, sebagian benua Asia, dan benua Australia. Lebah madu *Apis mellifera* mulai masuk ke Indonesia pada tahun 1972 melalui Apiari Pramuka yang mendapatkan bantuan sebanyak 25 kotak (stup) lebah madu *Apis mellifera* dari Autralia (Hidayat, 2011).

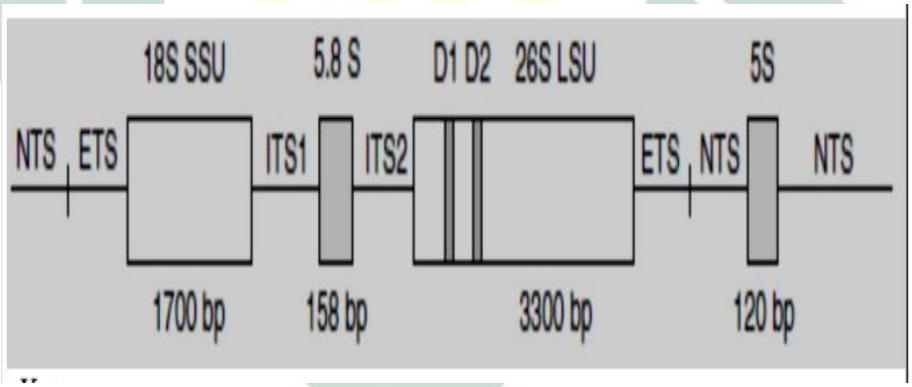
Habitat asli Lebah madu *Apis mellifera* adalah tempat dengan banyak tanaman berbunga seperti padang rumput, hutan terbuka, dan taman. Namun, lebah madu *Apis mellifera* juga bisa bertahan hidup di daerah gurun dan lahan basah jika tesedia cukup air, makanan, dan tempat berlindung. Habitat asli lebah madu *Apis mellifera* juga membutuhkan lubang, biasanya sarang *Apis mellifera* berada di dalam lubang pohon (Milne dan Milne, 2000). Pada lebah madu *Apis mellifera* yang berada di peternakan sarangnya terbuat dari kayu yang berbentuk kotak (stup) dengan letaknya dekat dengan

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

sumber pakannya baik hutan maupun perkebunan, supaya produktivitas madu tinggi.

2.3. Daerah Gen Ribosomal DNA (rDNA)

Perbandingan *sequence* pada daerah gen penyandi ribosomal DNA (rDNA) dapat menjadi salah satu karakter yang digunakan dalam identifikasi khamir secara molekuler. Daerah ini tersusun meliputi SSU (*small sub unit*) atau 18S, ITS (*internal transcribed spacer*), 5,8S, LSU (*large sub unit*) atau 28S, IGS (*intergenic spacer*). Keseluruhan daerah ini berulang sebanyak 100-200 kopi dalam genom organisme. Daerah LSU, 5S, 5,8S, dan SSU termasuk daerah *coding*, sedangkan sisanya merupakan daerah *non coding* (Maulana, 2011).



Gambar 2.7 Daerah rDNA
(Sumber : Maulana, 2011)

Keterangan :

NTS : *Non-transcribed Spacer*

ETS : *External Transcribed Spacer*

ITS : *Internal Transcribed Spacer*

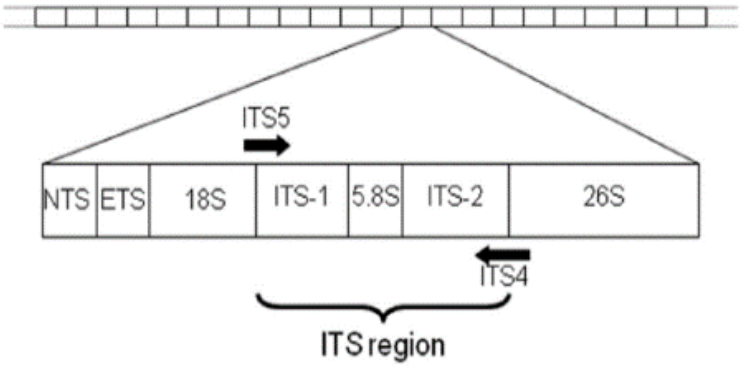
SSU : *Small Sub-unit*

LSU : *Large Sub-unit*

D : Domain

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

Gen yang biasa digunakan untuk identifikasi khamir sampai dengan tingkat spesies biasa menggunakan daerah ITS dan D1/D2 gen LSU. Daerah ITS merupakan daerah *noncoding* yang mengapit gen 5,8S, daerah ini terdiri dari ITS1 dan ITS2, memiliki kisaran panjang pada 300-900 pb, daerah ITS memiliki laju mutasi yang rendah namun variasinya sangat beragam, dikarenakan daerah ITS efektif untuk digunakan dalam identifikasi khamir, sebagai contoh pada penelitian Tavanti (2005) melaporkan terdapat 2 spesies baru yaitu *Candida orthopsilosis* dan *Candida metapsilosis* dikarenakan sequensnya pada daerah ITS ternyata terbedakan dari spesies *Candida parapsilosis*, yang sebelumnya kedua spesies ini termasuk kedalam *Candida parapsilosis* kelompok I dan II karena sequence D1/D2 LSUnya identik. Daerah gen D1/D2 gen LSU juga biasa digunakan untuk indentifikasi pada khamir, dengan kisaran panjang pada 600 pb per ujung 5´, namun laju mutasinya lebih tinggi daerah ITS sehingga ada beberapa spesies dari khamir memiliki sequens yang identic pada daerah ini, contohnya pada spesies *Candida fukuyamaensis* dan *Candida guilliermondi* (Maulana, 2011).



Gambar 2.8 Daerah Internal Transcribed Spacer (ITS)
(Sumber : Hidayat, dkk, 2015)

Internal Transcribed Spacer (ITS) merupakan bagian dari criston rDNA dengan urutan 18S, ITS1, 8S, ITS2, dan 26S yang terdapat 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

beberapa ratus salinan pada sebagian besar eukariot. ITS1 dan ITS2 merupakan struktur yang tidak setara, meski terkadang panjangnya konvergen pada pola subtitusi, ITS1 berevolusi dari spacer intergenik dan ITS2 dari segmen ekspansi di subunit besar rDNA (Won & Renner, 2005). Daerah ITS bertempat di antara gen konserv yaitu gen pengkode 18S dan 28S rRNA. ITS memiliki 2 wilayah yaitu ITS1 dan ITS2 yang terpisah oleh gen konserv 5.8S rRNA. Variasi daerah ITS yang sangat beragam pada suatu spesies dari pada daerah dan gen lainnya menjadi alasan mendasar dijadikannya daerah ini sebagai penanda molekuler (Nagla *et al*., 2019).

2.4. Identifikasi Khamir dengan Metode Molekuler

Identifikasi merupakan mencari indentitas sebuah isolat dari segi spesiesnya dengan membandingkannya dari data yang sudah ada. Manfaat utama dari identifikasi adalah mengetahui keanekaragaman spesies yang ada di alam. Identifikasi juga membantu untuk mengetahui kekerabatan antar spesies, membantu dalam proses diagnosis medis, serta kontaminan khamir dalam industry makanan maupun minuman (Maulana, 2011).

Dalam identifikasi khamir sendiri dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu konvensional dan molekuler, indentifikasi dengan cara konvensional biasa dilakukan dengan pengamatan pada morfologinya baik secara makroskopik dan mikroskopik. Secara makroskopiknya meliputi warna, profil, tepi koloni, *sediment*, *pellicle*, *ring*, dan *islets*. Pada pengamatan secara mikroskopiknya meliputi bentuk sel, ukuran sel, tipe tunas, misellium palsu atau asli, dan reproduksinya secara seksual atau aseksual. Namun pada identifikasi secara morfologi sendiri tidak bisa mendeteksi sampai tingkat spesies. Identifikasi

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 konvensional juga meliputi uji biokimia dan fisiologi, namun karena keterbatasan pandang sering terjadi kesalahan identifikasi pada khamir dengan kekerabatan yang sangat dekat (Maulana, 2011).

Cara identifikasi yang kedua dan mulai sering digunakan dan dikembangkan yaitu dengan cara molekuler, identifikasi khamir dengan teknik molekuler sudah mulai dicetuskan konsepnya sejak tahun 1978 oleh Price dkk, ini menyatakan bahwa 2 isolat masih termasuk kedalam 1 spesies yang sama jika presentasenya 80-100% dari DNA *relatedness* berdasarkan pada hibridisasi DNA genom. Cara molekuler sendiri terbukti akurat dapat mengidentifikasi sampai tingkat spesies. Identifikasi secara molekuler yang berdasarkan pada DNA yang merupakan stempel pasti pada makhluk hidup yang berbeda pada tiap individunya sehingga menjadikan identifikasi dengan cara molekuler spesifik dan akurat (Maulana, 2011).

a. Isolasi DNA

Langkah awal dari identifikasi dengan teknik molekuler adalah isolasi DNA. Prinsip dari isolasi DNA adalah mendapatkan DNA murni tanpa kontaminasi baik protein maupun karbohidrat. Tahap yang sangat menentukan keberhasilan dalam isolasi DNA pada khamir adalah hancurnya dinding sel pada khamir, proses ini dapat dilakukan dengan cara lisis maupun mekanis. Keberhasilan isolasi DNA sangat terpengaruh oleh metode yang digunakan (Zein dan Prawiradilaga, 2013).

Metode mekanis yang biasa digunakan untuk isolasi DNA adalah sonikasi, *grinding* dengan menggunakan mortar, dan *boiling.* Isolasi DNA dengan metode ini jika digunakan untuk isolasi DNA khamir biasanya

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

menghasilkan kualitas dan kuantitas yang kurang baik, karena biasanya dinding sel kurang terhancurkan dengan baik. Metode lisis merupakan metode yang biasanya memanfaatkan bahan-bahan kimia dan beberapa enzim. Bahan kimia yang biasa digunakan dalam isolasi DNA secara lisis adalah nitrogen cair dan SDS (*sodium dodecylsufate*), sedangkan untuk enzimnya adalah enzim zymolase dan llitikase. Isolasi DNA juga dapat dilakukan dengan kit komersial yang merupakan penggabungan dari isolasi DNA secara mekanik dan lisis. Salah satunya adalah Wizard® Genimic DNA Purification kit (Zein dan Prawiradilaga, 2013).

b. Pengukuran Kualitas dan Kuantitas DNA

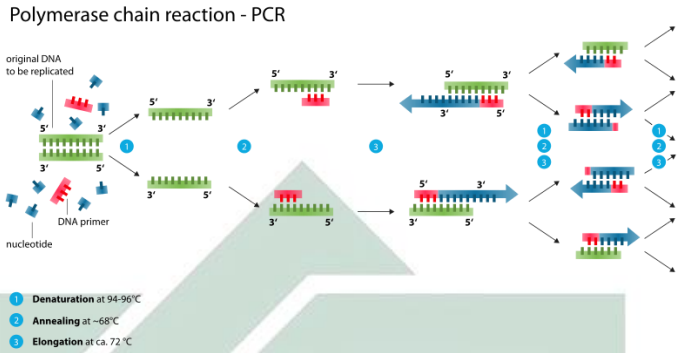
Pengukuran kualitas dan kuantitas DNA biasa dilakukan dengan spektrofotometer. Prinsip kerja dari spektrofotometri adalah dengan menentukan konsentrasi molekul dari sebuah sampel dengan menghitung perbandingan dari jumlah sinar UV yang diteruskan sampel pada gelombang tertentu dan yang diabsorbsi. Sampel yang memiliki kandungan RNA dan DNA memiliki panjang gelombang 260 nm, sedangkan sampel dengan kandungan protein ada pada panjang gelombang 280 nm. Kuantitas DNA pada suatu sampel ditentukan oleh nilai absorbansi pada panjang gelombang tersebut. Nilai absorbansi 1 dikirakan mengandung DNA sebanyak 50 µg/ml (Zein dan Prawiradilaga, 2013).

Kemurnian DNA atau juga bisa disebut kualitas DNA sebuah sampel dapat diketahui dengan pengukuran dari perbandingan nilai absorbansi DNA dan protein. Kulitas DNA yang baik memiliki nilai perbandingan absorbansi DNA dan protein pada kisaran 1,8-2,0. Kisaran tersebut

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

menunjukkan bahwa kandungan DNA lebih banyak dari protein (Zein dan Prawiradilaga, 2013).

c. Amplifikasi DNA dengan metode PCR (*Polumerase Chain Reaaction*)



Gambar 2.9 Proses PCR
(Sumber : Genome Research Limited, 2019)

PCR merupakan metode dengan prinsip dasar amplifikasi terhadap fragmen DNA spesifik dengan memanfaatkan enzim DNA polymerase dan 2 macam fragmen oligonukleotida yang telah ditentukan urutannya atau biasa disebut primer. Metode ini memiliki 3 tahap utama dalam 1 siklusnya, yaitu *denaturation*, *annealing*, dan *extension*. Tiap dari 3 tahap tersebut memiliki *range* suhu yang berbeda-beda, sehingga alat yang digunakan untuk metode PCR dinamakan *thermal cycle*. Beragamnya suhu dari setiap tahapan metode PCR memerlukan optimasi untuk mendapatkan hasil amplifikasi yang maksimal (Zein dan Prawiradilaga, 2013).

- Denaturasi

  Denaturasi merupakan tahap pemisahan rantai ganda *double helix* pada DNA menjadi *single helix*, tahapan ini dilakukan dengan merusak ikatan hydrogen yang menghubungkan basa nitrogen yang komplemen. Denaturasi pada umumnya dilakukan dengan suhu 95°C

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

sampai pada 97.5°C dengan kisaran waktu 30-60 detik. Penggunaan tepatnya suhu proses denaturasi tergantung pada seperti apa gen target yang akan di amplifikasi, semakin kaya sekuen gen target dengan basa nitrogen G-C (*Guanine-Cytosin*) maka akan semakin tinggi suhunya (Yusuf, 2010).

Pertimbangan suhu dan lama waktu proses denaturasi juga memerlukan pertimbangan dengan waktu paruh dari enzim *Taq polymerase*, karena jika waktu dan suhu pada proses ini tidak membertimbangkan hal tersebut rantai DNA yang sudah menjadi *single helix* akan kembali menjadi *double helix* (Yusuf, 2010).

- *Annealing*

Annealing merupakan proses penempelan primer pada gen target, sehingga DNA *template* yang telah menjadi *single helix* akan kembali menjadi *double helix*. Penempelan primer pada proses ini dipengaruhi oleh tingkat pemisahan primer dari kompleks primer atau saat pengenceran primer serta kemampuan DNA polimerasi pada pemanjangan primer sehingga DNA *template* yang terbentuk akan menjadi stabil (Yusuf, 2010).

Kisaran waktu pada proses *annealing* biasanya ada pada rentang waktu 30-45 detik pada suhu 36°C - 72°C. Penentuan suhu dari proses ini dilakukan dengan menghitung *Melting Teemperature* (Tm) yang didasarkan pada jumlah basa nitrogen dan panjang primer (Yusuf, 2010).

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

- Ekstensi

Ekstensi adalah proses terakhir pada tahap PCR, yang merupakan proses pemanjangan rantai DNA salinan. Proses ini terjadi setelah primer menempel pada DNA *template* pada proses annealing akan terjadi pengikatan deosinukleotida pada ujung 3'-OH primer dengan bantuan DNA *polymerase* yang dibantu oleh dNTPs.

Suhu pada proses ini terjadi pada suhu yang cukup tinggi yaitu pada kisaran 72°C, lama waktu yang dibuthkan pada proses ini ditentukan oleh kondisi pH, *buffer* yang digunakan, serta DNA target (Zein dan Prawiradilaga, 2013). Hal ini menyebabkan di lakukannya penambahan waktu sekitar 5-10 menit pada akhir ekstensi untuk memastikan DNA yang diamplifikasi strukturnya telah kembali menjadi *double helix* (Zein dan Prawiradilaga, 2013).

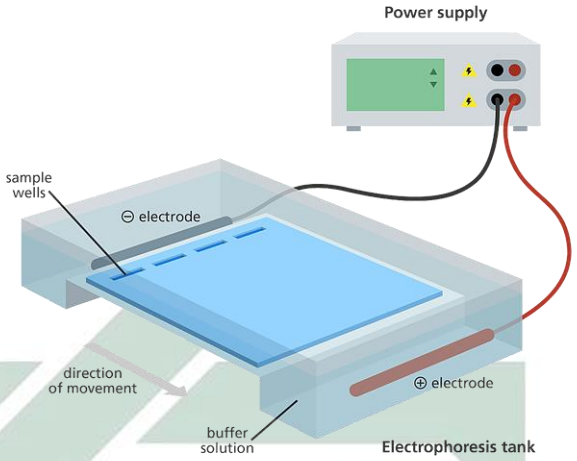
d. Visualisasi Hasil Amplifikasi

Visualisasi hasil amplifikasi adalah untuk mengetahui panjang untai DNA yang telah teramplifikasi pada proses PCR, untuk panjang untai DNA hasil amplifikasi pada khamir biasanya ada pada kisaran 300 – 900 bp. Kisaran ini baik divisualisasikan dengan menggunakan gel agarose pada konsentrasi 2%, yang mampu memvisualisasikan untai DNA pada kisaran 100 bp – 3 kb (Zein dan Prawiradilaga, 2013).

Prinsip dari proses elektroforesis adalah DNA yang bermuatan negatif akan bermigrasi ke arah elektroda positif. Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam proses elektroforesis selain gel agarose adalah buffer

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

TAE, sampel DNA teramplifikasi, *loading dye*, dan DNA *ladder* atau *marker* sebagai pengukur panjang bp (Zein dan Prawiradilaga, 2013).



Gambar 2.10 Elektroforesis
(Sumber : Genome Research Limited, 2019)

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 kedalam penelitian eksperimental dengan pendekatan deskriptif kualitatif, dimana sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan khamir yang berasal dari pencernaan lebah madu (*Apis mellifera*).

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Genetika, Laboratorium Terintegrasi Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi-UINSA, yaitu pada kisaran bulan November 2019 – Maret 2020 dan Oktober 2020 – Januari 2021. Berikut merupakan jadwal kegiatan penelitian :

Tabel 3.1 Jadwal Pelaksanaan Penelitian

No	Kegiatan	Tahun (2019)			Tahun (2020)					Tahun (2021)
		Nov	Des	Jan	Feb	Mar	Okt	Nov	Des	Jan
1.	Penyusunan proposal skripsi									
2.	Proses koleksi sampel									
3.	Pembuatan media isolasi									
4.	Proses inokulasi									
5.	Proses inkubasi									
6.	Ekstraksi DNA									
7.	Pengukuran kadar DNA									
8.	Amplifikasi PCR									
9.	Proses elektroforesis									
10.	Visualisasi hasil elektroforesis									
11.	Amalisis Data									
12.	Penyusunan draft dan sidang skripsi									

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

3.3. Alat dan Bahan Penelitian

Alat – alat yang digunakan yaitu *sterile polyethylene bags*, gelas ukur, *beaker glass*, Erlenmeyer, kompor listrik Maspion S-301, petri disk, jarum ose, micropipette Biopette plus Labinet, timbangan analitik, 0.5-10 µl pipet tips axygen, 200µ pipet tips dan 1000µ pipet tips biologix, *Laminar Air Flow* ESCO, batang pengaduk, Microtube biologix, spatula, vortex mixer thermo scientific, hot plate magnetic stirrer thermo scientific, autoclave hurayama HICLAVE HG-50, oven thermo scientific, microsentrifuge thermo scientific heraus fresco 21, spectrophotometer DNA quantitative analysis biodrop, microscope Nikon ECLIPSE E100, incubator thermo scientific, DNA documentation transiluminator endure ™ GDS labinet, waterbath clifon, PCR multigene optimax, Bunsen, electrophoresis horizontal thermo scientific owl easycast B1, power supply hoefer PS300-B, masker sensi mask, sarung tangan safe glove, alumunium foil total wrap, pematik api, corong kaca, plastic wrap total wrap, kapas sterile onemed, refrigerator thermo scientific, plastic tahan panas, tabung eppendorf, karet pentil, batang sumpit, laboratory freezer thermo scientific.

Bahan-bahan yang dibutuhkan adalah isolat khamir dari pencernaan lebah madu *Apis mellifera*, medium pemeliharaan khamir sebagai stock culture yaitu PDA, medium pertumbuhan, pemurnian, seta pengamatan makroskopis menggunakan YMA, YMB, dan yeast extract agar + glucose (YESA 50%), alcohol 70%, aquabides (ddH_2O), aquades, ErOH 70% dan 100%, glukosa atau sukrosa 50%, gliserol 10%, antibiotic chloramphenicol 500 mg (ritemed), malt extract merck, PDA merck, reagen chelex, pepton, PBS (Phosphate Buffer

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

Saline), sodium asetat 3M (pH 5,5), saponin 0,5%, trehalose 5%, yeast extract merck, spirtus, dan promega yang terdiri dari buffer TAE (Tris-Acete EDTA), DNA ladder 100 bp, Etidium Bromida (Et-Br), DNA marker 1kb, loading dye, PureTA Ready-To-Go (RTG) 6 PCR beads, nuclease-free water, bahan kimia dari sigma berupa proteinase, primer *reverse* ITS 5 (5´-TCCTCCTGCTTATTGATATGC-3´), dan primer *forward* ITS 4 (5´-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAAGG-3´).

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Pengoleksian Lebah Madu

Lebah yang akan digunakan adalah lebah pekerja, diambil 15 individu lebah pekerja, dimasukkan kedalam *sterile polyethylene bags*.

3.4.2. Identifikasi lebah

Identifikasi dilakukan oleh Peternak Lebah Madu di Peternakan Lebah Kembang Joyo Sriwijaya, Malang dengan referensi buku The Bees of The World (Michener, 2000).

3.4.3. Sterilisasi Alat, Bahan, dan Medium

Sterilisasi yang dilakukan pada proses ini bertujuan untuk menghidari kontaminasi terutama pada sampel yang akan sangat memengaruhi hasil akhir dari sampel. Sterilisasi dilakukan pada alat, bahan, dan medium pertumbuhan. Prosedur sterilisasi dilakukan dengan menggunakan autoclave hurayama HICLAVE HG-50, yang dilakukan pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Syarat dari alat dan bahan yang perlu dilakukan sterilisasi adalah alat

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 bahan yang bersifat *glass ware* dan tidak meleleh ketika terkena panas.

3.4.4. Pembuatan Media

Media yang diperlukan dalam penelitian ini adalah PDA (*Potato Dextrose Agar*) sebagai dan YMA (*Yeast Extract-Malt Extract Agar*) sebagai dengan prosedur pembuatannya sebagai berikut :

a. Media PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Pembuatan media ini dilakukan dengan menimbang 39 gram bubuk media PDA yang dilarutkan dalam 1000 ml aquades. Setelahnya, ditambahkan 500 mgL^{-1} *antibiotic chloramphenicol*, lalu diaduk agar homogen sampai mendidih. Lalu, media yang mendidih di masukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 5 ml sebanyak tabung reaksi yang akan digunakan, selanjutnya media disterilkan dengan autoklaf selama 30 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm.

b. Media YMA (*Yeast Extract-Malt Extract Agar*)

Pembuatan media YMA dilakukan dengan melarutkan 3 gr ekstrak khamir, 3 gr ekstrak malt, 5 gr pepton, 10 gr glukosa, dan 20 gr agar kedalam aquades dengan volume akhir 1000 ml. Pelarutan dilakukan diatas kompor eletrik dengan cara pengadukan sampai mendidih, lalu media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit dengan tekanan 1 atm, lalu ditunggu suhu media turun sampai pada kisaran 40-50°C, ketika sudah turun maka ditambahkan 500 mgL^{-1} antibiotik tetrasiklin, setelah

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

dihomogenkan media dituangkan pada cawan petri dengan masing-masing cawan sebanyak 20 ml dan dibiarkan sampai membeku.

3.4.5. Isolasi khamir dari pencernaan lebah madu *Apis mellifera*

Isolasi isolat khamir dilakukan dengan membedah perut lebah *Apis mellifera* terlebih dahulu menggunakan *forcep* dibawah mikroskop stereo. Usus lebah madu *Apis mellifera* dimasukkan kedalam tabung ependorf yang telah berisi air MiliQ sebanyak 200 µL, lalu dihancurkan dengan menggunakan *grinder*. Suspensi khamir yang telah mengalami penggerusan (*grinder*) kemudian akan digoreskan pada medium YMA. Goresan ini dibuat dengan empat arah kuadran. Selanjutnya diinkubasi dalam suhu ruang selama 48 jam hingga didapatkan koloni tunggal yang dapat mewakili satu macam koloni (*representative*). Jika telah didapatkan koloni tinggal representative, kemudian dipindahkan dalam media PDA dan diinkubasi pada suhu ruangan selama 48 jam.

3.4.6. Pengamatan Khamir secara Makroskopis dan Mikroskopis

Pengamatan khamir secara makroskopis dapat dilakukan pada khamir yang sudah tumbuh pada media YMA yang berumur 72 jam atau 3 hari. Pengamatan dilakukan pada suhu ruang atau pada kisaran 20-25°C dengan parameter pengamatannya yaitu permukaan koloni, warna, dan tekstur. Pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan beberapa parameter yaitu bentuk dan ukuran sel, tipe pertunasan, ada tidaknya miselium sejati atau palsu dan spora seksual khamir baik askospora maupun basidiospora.

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

3.4.7. Ekstraksi DNA Khamir

Metode yang digunakan dalam isolasi DNA untuk isolat khamir adalah metode *boiling*. Isolasi DNA bisa mulai dilakukan dari saat isolat khamir berumur 48 jam sampai 1 minggu, dengan langkah – langkah sebagai berikut :

1) Diambil kultur biakan khamir dari cawan petri dengan jarum ose atau tusuk gigi atau tip micropipette yang steril sebanyak 3 olesan.
2) Disuspensikan ke dalam tabung eppendorf yang sebelumnya sudah diisi dengan 100 µl NFW.
3) Dispindown selama 10 detik diulang per 5 detik sampai terpisah antara pellet dan supernatan.
4) Diambil supernatant yang akan digunakan sebagai DNA template pada amplifikasi DNA.
5) Dipindahkan kedalam tabung eppendorf yang steril dan bersih.

3.4.8. Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Proses pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA dilakukan dengan bantuan alat spektrofotometer *BioDrop*, pengukuran ini diawali dengan menginisiasi spektrofotometer dengan ddH_2O sebagai blanko, lalu juga panjang gelombang yang diperlukan untuk pengukuran ini adalah 260 nm dan 280 nm. Setelah pemberian blanko maupun sampel hasil amplifikasi tempat penetesan perlu dibersihkan dengan tisu. Sampel amplifikasi DNA yang diteteskan yaitu sebanyak 1,5 µl, pengukuran ini diolah

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

otomatis oleh software yang ada didalam spektrofotometer. Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA dilakukan pada semua sampel.

3.4.9. Amplifikasi DNA Khamir

Tahap amplifikasi DNA khamir dilakukan dengan variasi protokol InaCC LIPI oleh Kanti *et al* (2018), Maulana (2011), Ediningsari (2008), dan Anggraini *et al.* (2019) dengan *cocktail* PCR sebagai berikut :

Tabel 3.2 *Cocktail* PCR

Bahan	Volume (µl)
DNA Template	5
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

Sumber : Protokol Promega GoTaq© Green Master Mix

Dengan pengaturan suhu PCR sebagai berikut :

Tabel 3.3 Optimasi Suhu PCR

Protokol	Proses	Suhu (°C)	Waktu	Siklus
Kanti *et al*. (2018)	Pre-denaturasi	95	1’ 30”	35×
	Denaturasi	95	30’	
	Annealing	55	30”	
	Elogasi	72	1’	
	Post-elongasi	72	15’	
Ediningsari (2008)	Pre-denaturasi	94	2’	40×
	Denaturasi	94	15”	
	Annealing	56	30”	
	Elogasi	68	1’	
	Post-elongasi	68	10’40”	
Anggraini (2019)	Pre-denaturasi	94	1’	35×
	Denaturasi	94	15”	
	Annealing	55	15”	
	Elogasi	72	10”	
	Post-elongasi	72	5’	
Maulana (2011)	Pre-denaturasi	95	2’	40×
	Denaturasi	95	15”	
	Annealing	55	30”	
	Elogasi	68	10’40”	
	Post-elongasi	68	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

4. Elektroforesis Gel Agarose

Tahap elektroforesis membutuhkan bahan yang dinamakan dengan gel agarose, oleh karena itu sebelum dilakukan elektroforesis terlebih dahulu dilakukan pembuatan gel agarose dengan konsentrasi 1% yaitu 1 gr agarose yang lalu ditambahkan aquades sampai mencapai volume 100 ml, lalu dipanaskan sambil dihomogenkan, setelah mendidih dan homogen produk gel agrose dimasukkan kedalam cetakan (*tray*) yang telah dipasangi sisir (*comb*), dan dibiarkan dalam suhu ruangan hinggal agarose memadat. Setelah agarose memadat, agarose diletakkan kedalam alat elektroforesis, lalu ditambahkan *buffer* TBE.

Selanjutnya, sampel hasil amplifikasi DNA sebanyak 3 µl ditambahkan dengan 1 µl *loading dye* sebelum dimasukkan ke dalam sumuran (*well*) agarose 2%, lalu juga dimasukkan DNA *ladder* dan *marker*nya, kemudian dialirkan arus listrik sebesar 50 V dan *running* selama 60-75 menit.

3.5. Analisis Data

Analisis data yang dilakukan dalam penelitian ini secara deskriptif, dipaparkan dalam bentuk tabel dan gambar. Data yang akan disajikan yaitu data hasil optimasi protokol PCR (*Polimerase Chain Reaction*) yang termasuk ke dalam data kualitatif yang diperoleh dengan visualisasi menggunakan elektroforesis dan pembacaan oleh instrument *gel documentation*, sehingga menghasilkan data berupa gambar *band* DNA. Pembacaan panjang band DNA akan dibandingkan dengan *marker* berupa DNA *ladder* 1kb.

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

Identifikasi pada spesies khamir dapat dilakukan dengan menggunakan metode molekuler yaitu dengan memanfaatkan sekuen DNA dari daerah ribosomal atau rDNA pada bagian ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Daerah ITS tedapat 2 bagian yaitu daerah ITS1 dan daerah ITS2 yang masing-masing memisahkan daerah *coding* 18S dan 5,8S, lalu gen 5,8S dan 26S. Pada proses identifikasi perlu dilakukan optimasi terlebih dahulu agar mendapatkan DNA *template* yang cukup sehingga memudahkan proses identifikasi spesies dan analisis filogenetik. Pada penelitian ini didapatkan 7 isolat khamir, dengan kode sampel 1, 2, 3, 4, 5, 6, dan 7. Jenis dan banyaknya isolat khamir yang ditemukan bergantung pada kondisi lingkungan peternakan lebah serta jenis dan macam bunganya. Lingkungan peternakan tempat pengambilan sampel untuk penelitian ini merupakan lingkungan yang asri, memiliki beberapa jenis tanaman berbunga namun jenis dan keragaman bunganya masih sedikit untuk bisa membuat lebah madu *Apis mellifera* memproduksi madu secara maksimal, sehingga diberi nutrisi tambahan 2 hari sekali.

Proses penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu karakteristik khamir yang terisolasi dari pencernaan lebah *Apis mellifera*, ekstraksi DNA isolat khamir, amplifikasi DNA menggunakan PCR, visualisasi pita gen *geldoc* dengan bantuan perangkat UV *transiluminator*. Data yang

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

diperoleh dari masing-masing tahapan ditampilkan dalam beberapa uraian berikut :

4.1. Pengambilan Sampel

Sampel lebah madu (*Apis mellifera*) diambil dari peternakan lebah di peternakan lebah Kembang Joyo Sriwijaya, Malang. Pengambilan sampel dilakukan dengan memasukkan individu lebah kedalam *sterile polyethylene bags* sebelum dibawa ke laboratorium Genetika UIN Sunan Ampel Surabaya.

4.2. Karakteristik Morfologi Isolat Khamir

Sampel lebah dari peternakan lebah Kembang Joyo Sriwijaya, Malang langsung di bawa menuju laboratorium Genetika UIN Sunan Ampel Surabaya untuk langsung diisolasi, pengambilan sistem pencernaan lebah madu di lakukan dengan bantuan pinset dan cawan petri. Media YMA merupakan media selektif untuk pertumbuhan yeast, setelah diinkubasi selama 3 hari, dilakukan peremajaan pada koloni yeast yang sudah tumbuh menggunakan media PDA, lalu kembali diinkubasi selama 3 hari, setelah itu didapatkan beberapa isolat khamir.

Isolasi mikroba merupakan proses pemisahan mikroba dari habitat aslinya ke media buatan yang sesuai, dan proses inokulasi merupakan proses pemindahan kultur mikroba pada media yang baru untuk pertumbuhan. Kedua proses ini dilakukan untuk mendapatkan mikroba yang murni dari kontaminasi mikroba lain. Media YMA merupakan media

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 digunakan dalam proses isolasi, media YMA ialah media yang bersifat selektif untuk khamir saja.

Karakteristik hasil pengamatan makroskopis dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel 4.1 karakteristik isolat khamir berdasarkan pengamatan makroskopis.

Kode isolat	Bentuk	Ukuran	Warna	Tekstur	Margin	Elevasi
1	Bulat	Medium	Putih kekuningan	Licin	Rata	Timbul
2	Bulat	Large	Putih kecoklatan	Licin	Berlekuk	Datar
3	Bulat	Medium	Putih krem	Licin	Berlekuk	Timbul
4	Bulat	Medium	Putih kecoklatan	Licin	Berlekuk	Timbul
5	Bulat	Medium	Putih kecoklatan	Licin	Rata	Timbul
6	Bulat	Medium	Putih kecoklatan	Licin	Rata	Timbul
7	Bulat	Medium	Putih krem	Licin	Rata	Timbul

Sumber : Dokumen Pribadi, 2020

Karakteristik hasil pengamatan makroskopis dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel 4.2 karakteristik isolat khamir berdasarkan pengamatan mikroskopis.

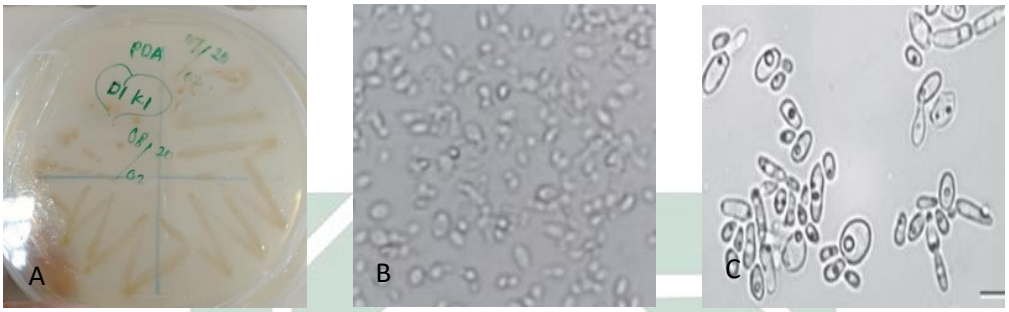
Kode Isolat	Bentuk Sel	Pola Pertunasan	Susunan Sel
1	Bulat	Multirateral	Tunggal dan berpasangan
2	Silinder	Multirateral	Tunggal dan berpasangan
3	Silinder	Multirateral	Tunggal dan berpasangan
4	Silinder	Multirateral	Tunggal dan berpasangan
5	Bulat, oval	Multirateral	Tunggal dan berpasangan
6	Bulat	Multirateral	Tunggal dan berpasangan
7	Oval	Multirateral	Tunggal dan berpasangan

Sumber : Dokumen Pribadi, 2020

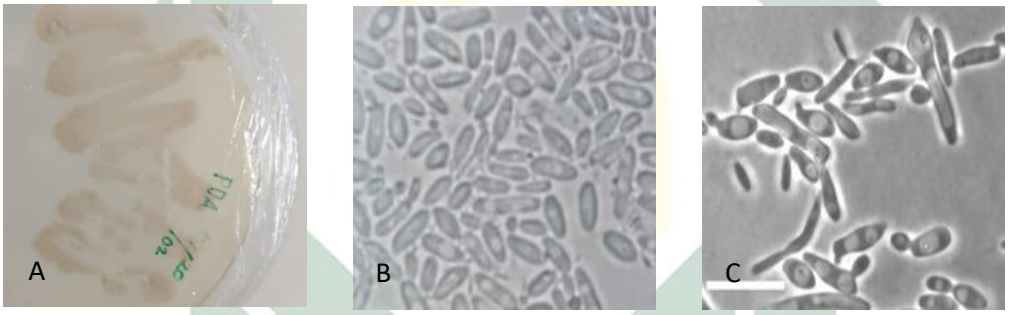
Hasil data pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis di dapatkan bahwa terdapat 7 isolat yang berbeda. Isolat tersebut diperoleh dari hasil pengamatan mikroskopis dan makroskopis. Pengamatan yang dilakukan dengan media PDA meliputi warna, bentuk, ukuran, tekstur,

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

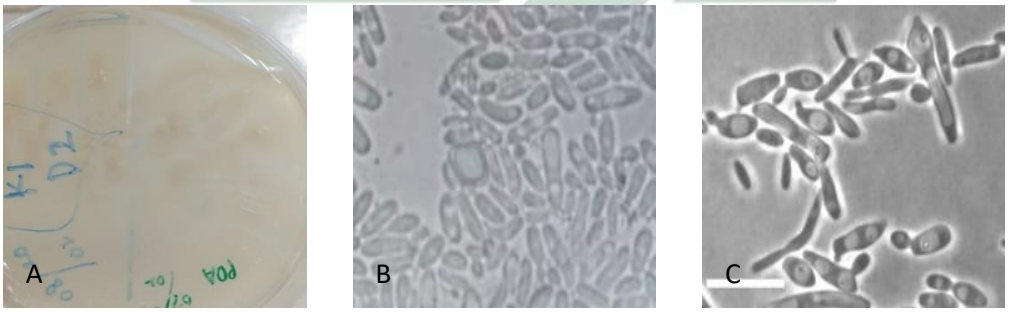
margin, dan elevasi sedangkan pengamatan secara mikroskopis bertujuan untuk mengetahui morfologi sel dari khamir melalui pola pertunasan, hifa atau pseudohifa dan bentuknya. Gambar hasil pengamatan mikroskopis dan makroskopis sampel khamir dapat di lihat pada gambar dibawah ini.



Gambar 4.1 Isolat 1 (A : makroskopis, B : pengamatan mikroskopis, C : gambar literatur *Candida anglica* NRRL Y-27079, sumber : Kurztman, 2011)



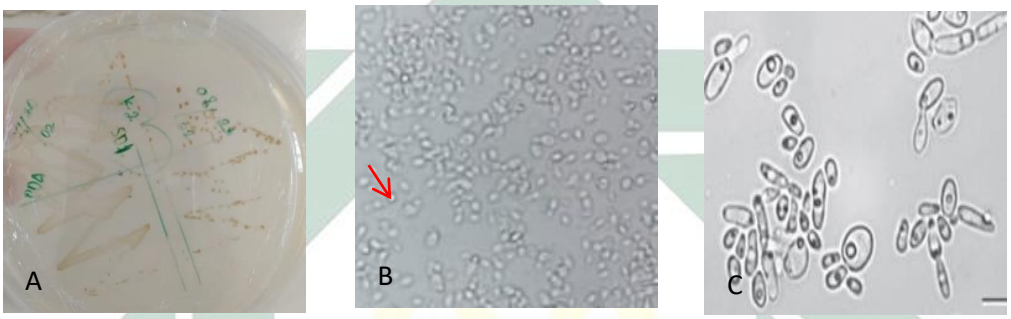
Gambar 4.2 Isolat 2 (A : makroskopis, B : pengamatan mikroskopis, C : gambar literatur *Candida atmosphaerica* CBS 4547, sumber : Kurztman, 2011)



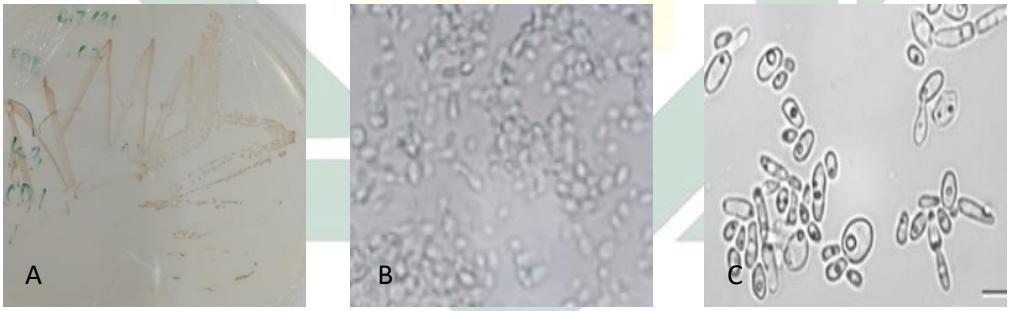
Gambar 4.3 Isolat 3 (A : makroskopis, B : pengamatan mikroskopis, C : gambar literatur *Candida atmosphaerica* CBS 4547, sumber : Kurztman, 2011)

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

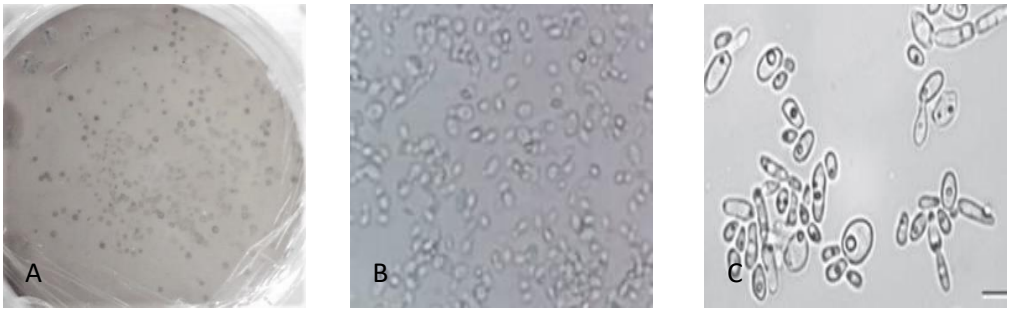
Gambar 4.4 Isolat 4 (A : makroskopis, B : pengamatan mikroskopis (sel berbentuk silinder ditunjuk oleh panah merah), C : gambar literatur *Candida atmosphaerica* CBS 4547, sumber : Kurztman, 2011)



Gambar 4.5 Isolat 5 (A : makroskopis, B : pengamatan mikroskopis (sel berbentuk bulat ditunjuk oleh panah merah), C : gambar literatur *Candida anglica* NRRL Y-27079, sumber : Kurztman, 2011)



Gambar 4.6 Isolat 6 (A : makroskopis, B : pengamatan mikroskopis, C : gambar literatur *Candida anglica* NRRL Y-27079, sumber : Kurztman, 2011)



Gambar 4.7 Isolat 7 (A : makroskopis, B : pengamatan mikroskopis, C : gambar literatur *Candida anglica* NRRL Y-27079, sumber : Kurztman, 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

Dengan karakterisitik dan hasil dari pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis pada isolat khamir, isolat khamir yang diisiloasi dimungkinkan dari genus *Candida*, namun untuk mengetahui secara pasti dibutuhkan penelusuran lebih lanjut. *Candida* merupakan genus khamir dengan ciri-ciri selnya yang berbentuk bulat, silindroidal, atau memanjang. Genus *Candida* merupakan jenis jamur kecil, bulat, dan berkembang biak secara holoblastik pemula. Genus *Candida* termasuk ke dalam khamir teleomorfik, pembelahan tunasnya multilateral, beberapa ada yang membentuk pseudohifa beberapa ada yang tidak, khamir dengan genus *Candida* merupakan jenis khamir oportunis (Kurtzman, 2011).

4.3. Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Proses awal dalam analisis khamir menggunakan metode melekuler dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah ekstraksi DNA, dalam proses ini dilakukan dengan menggunakan protokol dari InaCC LIPI. Protokol dari LIPI selain tahapnya yang sederhana juga minim biaya sekaligus waktu. Ekstraksi DNA sendiri bertujuan untuk mendapatkan isolat DNA yang murni dari sebuah sampel, sehingga proses ini berperan penting untuk mengetahui keberhasilan proses berikutnya, proses ekstraksi DNA dilakukan secara aseptis untuk menghindari kontaminasi sekaligus menjaga kemurnian DNA sampel.

Proses ekstraksi DNA pada umumnya memiliki prinsip dasar pengrusakan dinding sel, pemisahan DNA, dan pemurnian DNA. Perbedaan jenis dan tebal dinding sel pada makhluk hidup menyebabkan

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

perbedaan cara untuk mengekstraksi DNA tergantung dari jenis sampelnya, untuk sampel khamir kali ini seperti yang sudah tertera pada paragraf sebelumnya menggunakan protokol dari InaCC LIPI dimana pemecahan dinding selnya dilakukan dengan cara inkubasi selama 10 menit dengan suhu 98 °C.

Proses isolasi DNA membutuhkan validasi untuk mengetahui seberapa banyak DNA *template* yang didapatkan, hal ini dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer. Pada penelitian ini alat spektrofotometer adalah *spectrophotometer* DNA *quantitative analysis* BioDrop. Konsetrasi dan kemurnian DNA dilihat pada tabel A260/A280, jika nilainya ada pada kisaran 1,8-2,0 maka DNA *template* yang didapatkan murni, sedangkan apabila dibawah 1,8 DNA *template* yang didapatkan masih terlalu sedikit yang bisa memungkinkan bahwa hasil amplifikasi kurang maksimal dan apabila konsentrasi DNA *template* diatas 2,0 maka DNA *template* terkontaminasi oleh protein dan fenol. Nilai konsentrasi DNA template yang baik ada pada kisaran 10 – 100 µl.

Berikut merupakan tabel hasil spektrofotometer sampel :

Tabel 4.3 kemurnian dan konsentrasi isolat ITS rDNA khamir.

No	**Kode Isolat**	**Hasil Spektrofotometer**		**Keterangan**
		Konsentrasi (µl)	Kemurnian (A260/A280)	
1.	1	45.94	1.5	Kurang murni
2.	2	8.50	2.1	Kurang murni
3.	3	23.64	2.3	Kurang murni
4.	4	16.42	2.5	Kurang murni
5.	5	13.99	1.5	Kurang murni
6.	6	4.30	1.5	Kurang murni
7.	7	8.507	1.8	Murni

Sumber : 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

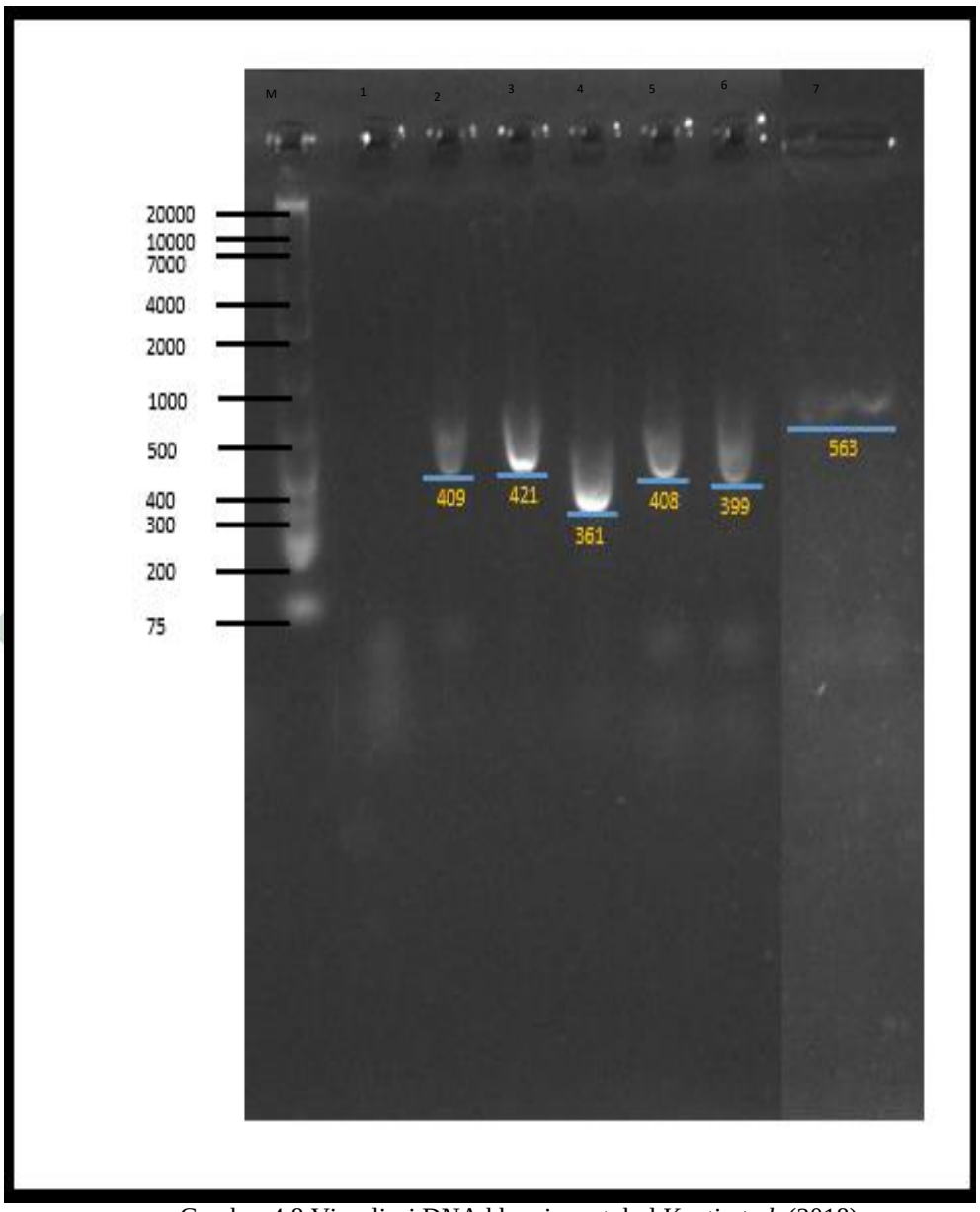
4.4. Optimasi kondisi PCR pada Amplifikasi daerah ITS rDNA

Proses amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*), yang merupakan teknik amplifikasi DNA yang dilakukan secara in vitro dengan beberapa tahapan. Pada masing-masing tahapan ada beberapa siklus. Protokol yang digunakan dalam penelitian ini adalah protokol Go Taq® Green Master Mix [Promega]. Primer yang digunakan adalah sepasang primer universal untuk target daerah ITS rDNA pada khamir yaitu ITS4 (*reverse*) dan ITS5 (*forward*) (Maulana, 2011). Penggunaan daerah ITS sebagai gen yang diamplifikasi dikarenakan daerah ini merupakan gen konserv, panjang yang relative pendek yaitu pada kisaran ±700 bp namun salinannya ada banyak (Ekasari, 2012). Optimasi amplifikasi ITS rDNA pada penelitian ini menggunakan 4 protokol, optimasi perlu dilakukan untu mendapatkan produk PCR yang baik dan optimal sehingga bisa melanjutkan analisis berikutnya. Hasil amplifikasi yang baik dipengaruhi oleh DNA template yang cukup, primer yang tepat serta suhu annealing yng optimal (Nugroho *el al*., 2013).

Analisis kualitatif pada hasil isolat DNA khamir dilakukan melalui hasil visualisasi elektroforesis dan pembacaan menggunakan perangkat *gel documentation*. Gel elektroforesis adalah teknik pemisahan molekul asam nukleat (DNA / RNA) atau protein dari ukuran molekulnya, proses ini dipicu dengan muatan listrik dengan factor-faktor yang memengaruhi yaitu komposisi gel, kuat medan listrik, densitas muatan, dan ukuran partikel (Zein & Prawiradilaga, 2013). Hasil elektroforesis berupa *band*

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 dibaca dengan menggunakan instrument *gel documentatiton*, visualiasinya ditunujukkan dengan muncunya pita tunggal DNA yang ditunjukkan oleh gambar di bawah ini :

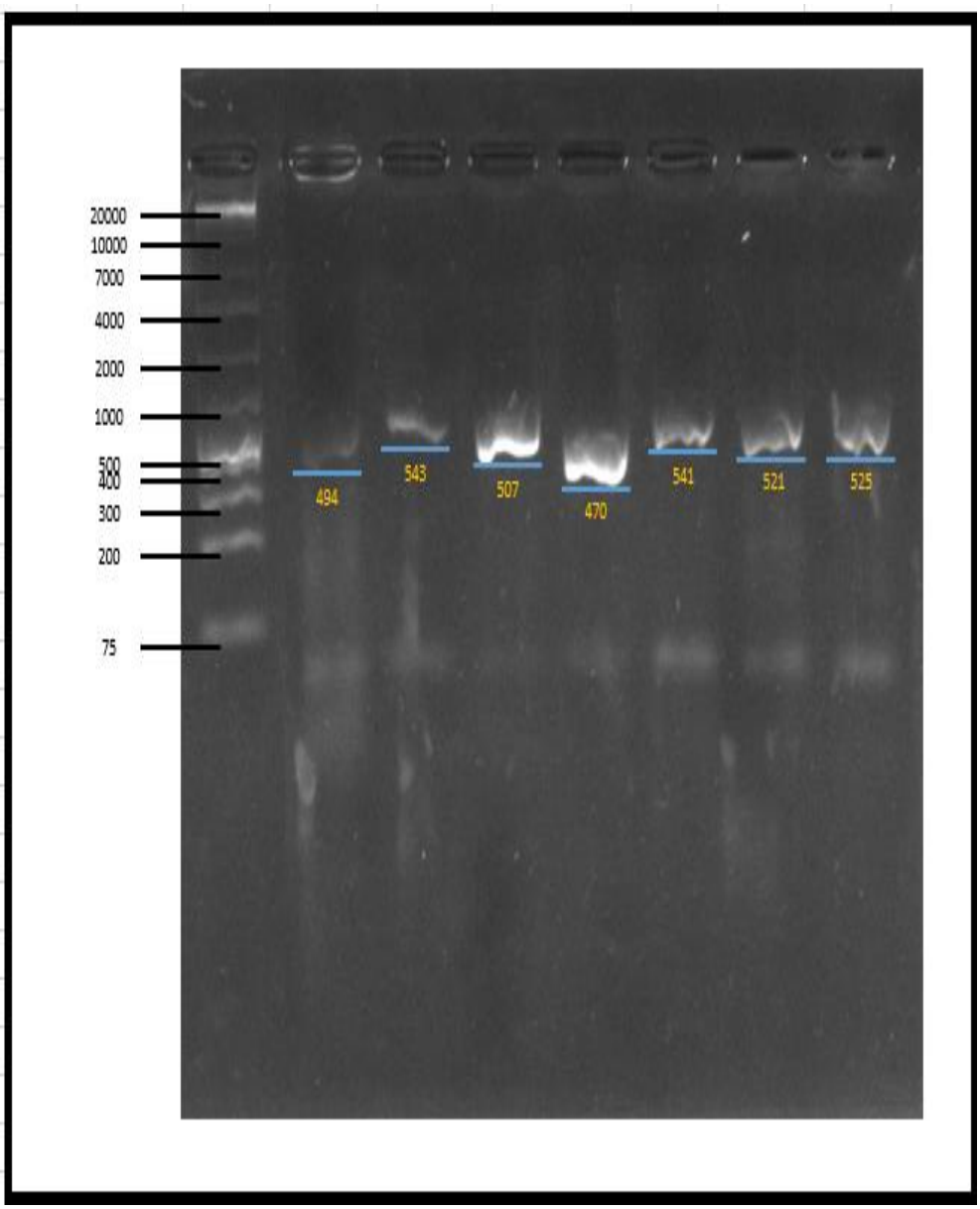


Gambar 4.8 Visualiasi DNA khamir protokol Kanti *et al*. (2018).

Hasil visualisasi amplifikasi PCR protokol Kanti *et al.* (2018) yang ditampilkan pada (Gambar 4.8) menunjukkan bahwa pada isolat 1 tidak memunculkan pita DNA, isolat 2 pada kisaran 409 bp, isolat 3 ada pada kisaran

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

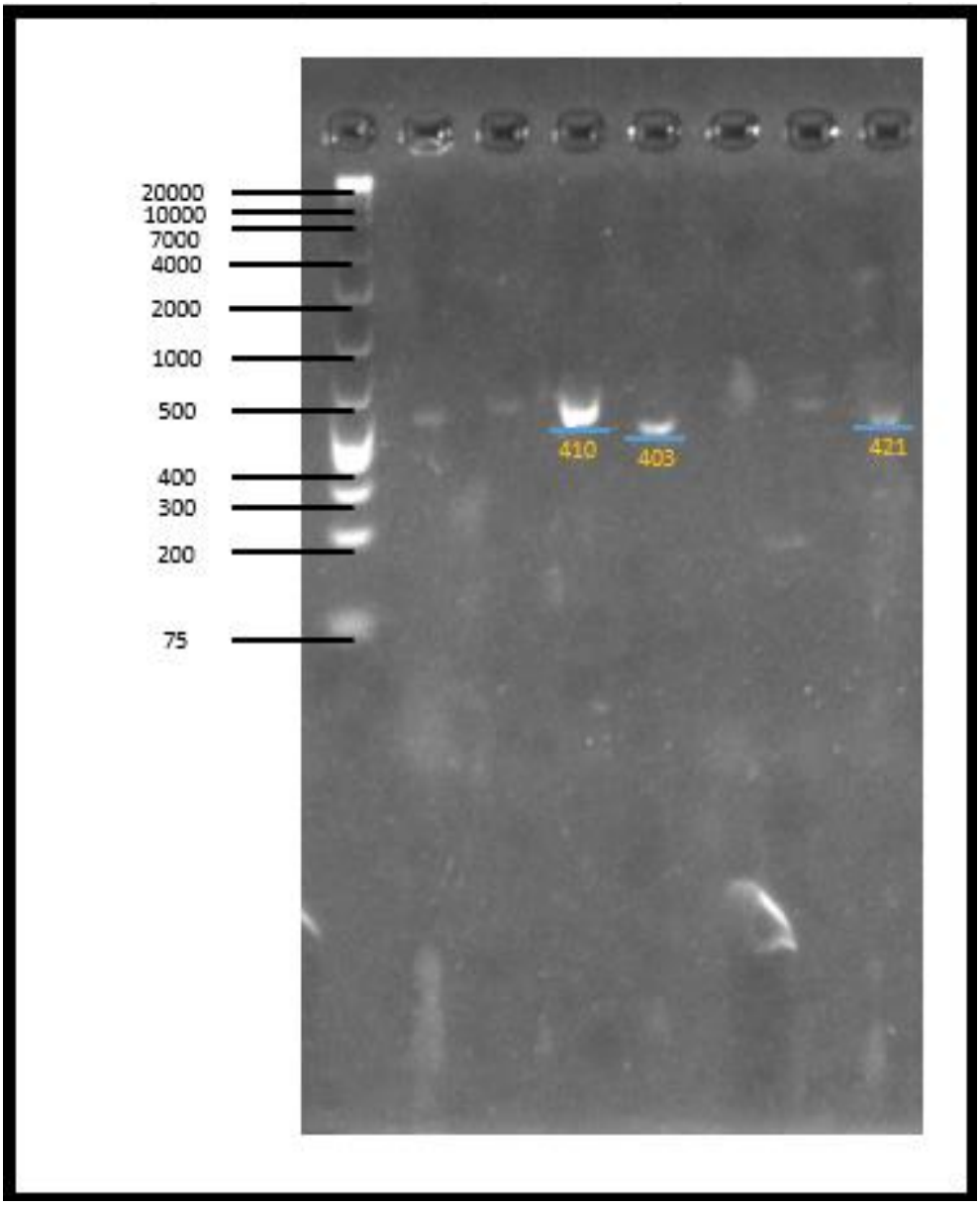
421 bp, isolat 4 ada pada kisaran 361 bp, isolat 5 ada pada kisaran 408 bp, isolat 6 ada pada kisaran 399 bp, isolat 7 ada pada kisaran 563 bp.



Gambar 4.9 Visualiasi DNA khamir protokol Ediningsari (2008).

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

Hasil visualisasi amplifikasi PCR protokol Ediningsari (2008) yang ditampilkan pada (Gambar 4.9) menunjukkan bahwa pada isolat 1 ada pada kisaran 494 bp, isolat 2 ada pada kisaran 543 bp, isolat 3 ada pada kisaran 507 bp, isolat 4 ada pada kisaran 470 bp, isolat 5 ada pada kisaran 541 bp, isolat 6 ada pada kisaran 521 bp, isolat 7 ada pada kisaran 525 bp.

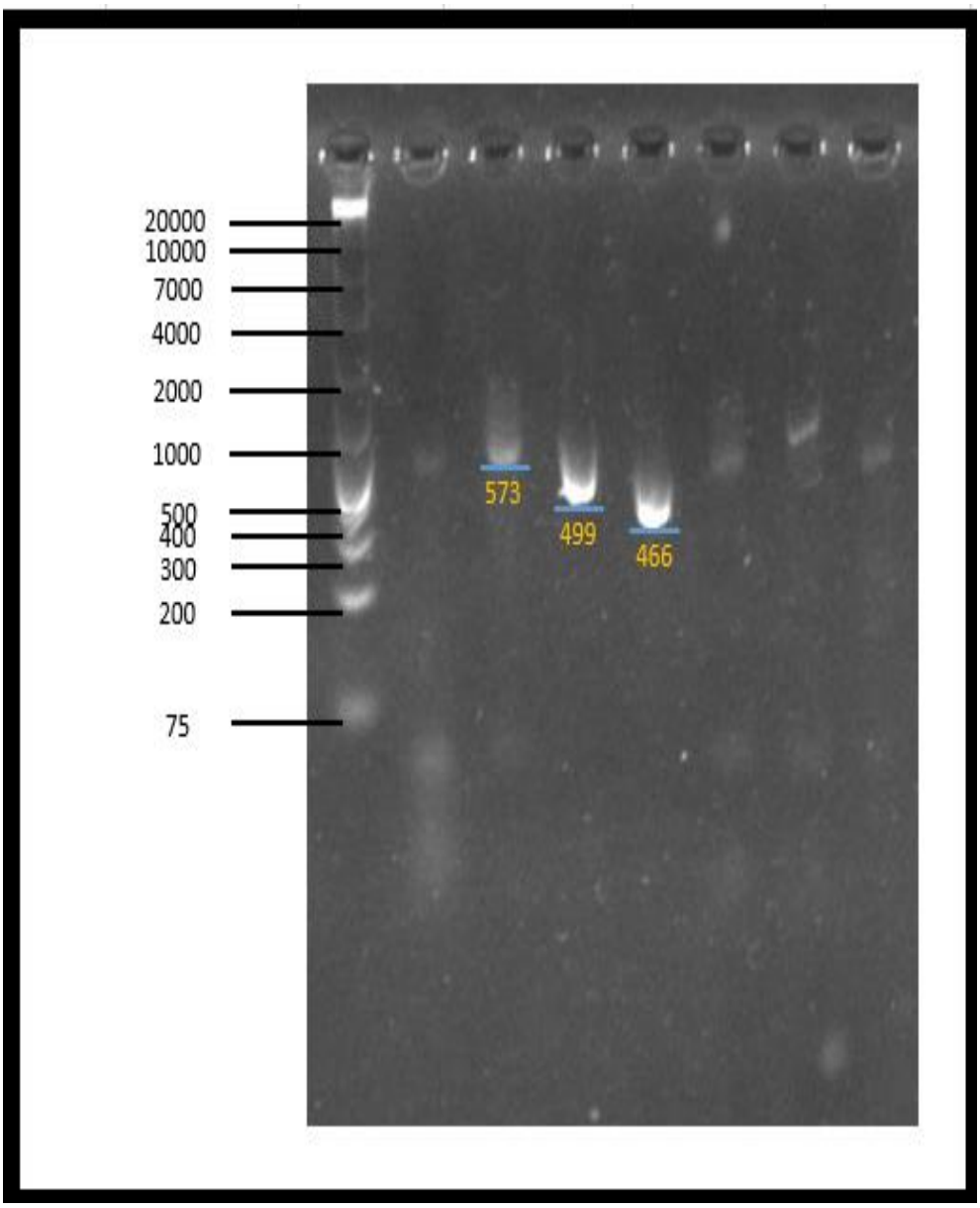


Gambar 4.10 Visualiasi DNA khamir protokol Anggraini *et al*. (2019).

Hasil visualisasi amplifikasi PCR protokol Anggraini *et al*. (2019) yang ditampilkan pada (Gambar 4.10) menunjukkan bahwa pada isolat 1 tidak

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

muncul pita DNA , isolat 2 tidak muncul pita DNA, isolat 3 ada pada kisaran 410 bp, isolat 4 ada pada kisaran 403 bp, isolat 5 tidak muncul pita DNA, isolat 6 tidak muncul pita DNA, isolat 7 ada pada kisaran 421 bp.



Gambar 4.11 Visualiasi DNA khamir protokol Maulana (2011).

Hasil visualisasi amplifikasi PCR protokol Maulana (2011) yang ditampilkan pada (Gambar 4.11) menunjukkan bahwa pada isolat 1 tidak muncul pita DNA , isolat 2 ada pada kisaran 573 bp, isolat 3 ada pada kisaran

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

499 bp, isolat 4 ada pada kisaran 466 bp, isolat 5 tidak muncul pita DNA, isolat 6 tidak muncul pita DNA, isolat 7 tidak muncul pita DNA.

Berdasarkan hasil visualisasi dari empat protokol PCR dapat dilihat bahwa ada perbedaan pada ketebalan panjang pita DNA yang di hasilkan, hal ini disebabkan oleh beberapa factor salah satunya yaitu konsetrasi dan kemurnian DNA *template* yang di tampilkan pada (Tabel 4.3). Hal yang juga berpegaruh pada produk PCR adalah jumlah siklus untuk setiap protokol, suhu serta durasi dari setiap tahapan yang berbeda-beda, komponen yang digunakan dalam pembuatan *cocktail* PCR pun berpengaruh seperti buffer dan pasangan primer yang digunakan.

Berbagai protokol yang digunakan pada penelitian ini menunjukkan bahwa protokol dari Ediningsari (2008) merupakan protokol yang dapat mengamplifikasi seluruh isolat di karenakan adanya pita DNA di setiap isolat, lalu ada protokol dari Kanti *et al* (2018) yang dapat mengamplifikasi 6 isolat yang ditandai dengan adanya 6 pita DNA dari 7 isolat dengan isolat 1 yang tidak berhasil diamplifikasi oleh protokol ini, dan protokol dari Anggraini (2019) yang dapat mengamplifikasi 3 isolat yaitu isolat 3, 4, dan 7, sama halnya dengan protokol Anggraini (2019) protokol Maulana (2011) dapat mengamplifikasi 3 isolat dari 7 isolat yaitu isolat 2, 3, dan 4. Isolat yang teramplifikasi dari seluruh protokol adalah isolat 3 dan 4, meskipun seluruh protokol dapat mengamplifikasi kedua isolat ini terdapat sedikit perbedaan pada hasilnya yaitu pada protokol Ediningsari (2008) dan Maulana (2011) dapat dilihat bahwa pita DNA yang dihasilkan lebih terang dan tebal, serta panjang bp pita DNA yang dihasilkan juga paling panjang diantara 2 protokol

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

lainnya, kedua protokol ini menggunakan jumah siklus yang sama yaitu 40 siklus.

Protokol Ediningsari (2008) merupakan protokol yang bisa mengamplifikasi seluruh isolat, namun beberapa pita DNA yang dihasilkan ada yang smear, smear merupakan pola bayangan dibawah pita DNA, hal ini disebabkan oleh DNA yang tidak utuh sehingga fragmen dengan ukuran yang berbeda sehingga tertahan sesuai dengan keadaan gel pada ukurannya selain itu juga bisa disebabkan oleh kontaminasi dari RNA (Sauer, 1998). Protokol Maulana (2011) merupakan protokol yang menghasilkan pita DNA yang tidak smear, namun tidak semua isolat teramplikasi.

Penyebab tidak berhasilnya suatu proses amplifikasi ada beberapa factor, yang pertama yaitu pada proses denaturasi, menurut Deekshit *et al*. (2013) suhu optimal untuk proses ini adalah 95°C selama 30 detik, keoptimalan dalam proses ini memengaruhi dalam pemisahan untai ganda DNA, karena jika suhu kurang optimal maka untai ganda yang sudah terpisah akan kembali atau disebut dengan proses renaturasi, namun waktu yang terlalu lama akan memengaruhi kerja enzim DNA *Taq-polymerase*.

Tahap *annealing* juga menjadi tahap yang penting dalam berhasilnya amplifikasi pada isolat, karena pada tahap ini terjadi penempelan primer. Suhu *annealing* yang digunakan untuk proses PCR adalah dengan jarak suhu 5°C dibawah *Temperatur melting* (Tm), pada penelitian ini sepasang primer yang digunakan adalah primer ITS4 dan ITS5 dengan masing-masing *Temperature melting* (Tm) pada suhu 58°C dan 63°C, sehingga suhu optimal pada proses *annealing* yang bisa digunakan ada pada kisaran 53°C - 58°C. Pada 4 protokol

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 digunakan dapat dilihat bahwa suhu *annealing* yang digunakan ada pada kisaran suhu annealing yang pas pada kisaran suhu *annealing* untuk primer ITS4 dan ITS5, namun meski begitu perbedaan strain juga dapat menjadi salah satu faktor pembeda suhu annealing optimal dari masing - masing isolat (Nugroho, 2011).

Proses *annealing* juga dipengaruhi oleh komponen *cocktail* PCR terutama pada kemurnian DNA *template*. Kemurnian DNA *template* yang tidak sempurna disebabkan oleh masih adanya polisakarida atau kontaminan lain dapat memengaruhi proses penempelan primer (Pharmawati, 2009). DNA template sendiri merupakan produk dari proses isolasi DNA yang dijadikan pola dasar untuk mengamplifikasi DNA target (Rakhmana *et al*., 2015).

Komposisi DNA template pada cocktail DNA sebanyak 1 µl sudah dapat menghasilkan pita DNA yang tebal dan tidak smear (Rahman *et al*., 2013). Jika jumlah DNA template terlalu sedikit dapat menyebabkan primer tidak menempel sama seklai sehingga tidak terjadi proses amplifikasi, sedangkan jika terlalu banyak akan menyebabkan penempelan primer pada daerah yang kurang spesifik. Penyesuain jumlah DNA *template* ditentukan oleh jumlah dari primer *reverse* dan *forward* yang akan digunakan.

Pada keseluruhan isolat khamir yang menggunakan protokol Kanti *et al*. (2018), Ediningsari (2008), Anggraini *et al*. (2019), dan Maulana (2011) memili kisaran panjang fragmen DNA pada 361-573 bp. Hal ini dapat dilihat pada tabel 4.4.

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 4.4 perbandingan panjang pita DNA.

Protokol	Panjang pita DNA (bp)						
	1	2	3	4	5	6	7
Kanti *et al.*(2018)	-	409	421	361	408	399	563
Ediningsari (2008)	494	543	507	470	541	521	525
Anggraini et al. (2019)	-	-	410	403	-	-	421
Maulana (2011)	-	573	499	466	-	-	-

Adanya variasi dari fragmen yang teramplifikasi dikarenakan variasi dari panjang daerah ITS masing-masing rDNA (Pharmawati, 2009). Perbedaan tersebut juga bisa disebabkan oleh polimorfisme pada sampel atau ada beberapa spesies yang berbeda pada satu sampel. Kisaran panjang pada daerah ITS rDNA sendiri ada pada kisaran 300-900 bp (Korabecna *et al*., 2003).

Optimasi amplifikasi DNA dengan teknik PCR pada 4 protokol ini menunjukkan bahwa protokol yang memiliki tingkat keberhasilan untuk amplifikasi pada daerah ITS rDNA khamir adalah protokol dari Kanti *et al*., (2018) dan Ediningsari (2008).

Optimasi yang dilakukan pada proses amplifikasi PCR merupakan salah satu tahapan dalam identifikasi khamir dengan metode molekuler, identifikasi juga merupakan salah satu cara untuk mengetahui keragaman khamir. Keragaman yang sangat banyak ini juga merupakan salah satu tanda kebesaran Allah SWT seperti pada salah satu firman-Nya dalam surat An Nahl ayat 13 :

وَمَا ذَرَأَ لَكُمْ فِي الْأَرْضِ مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ ۗ إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَآيَةً لِقَوْمٍ يَذَّكَّرُونَ

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

Artinya : dan Dia (menundukkan pula) apa yang Dia ciptakan untuk kamu di bumi ini dengan berlain-lainan macamnya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang mengambil pelajaran.

Jika dilihat pada makna ayat tersebut ada kata “berlain-lain” yang merupakan salah satu tanda kebesaran Allah SWT, kata ini bisa di kaitkan dengan banyaknya macam spesies khamir, dan kata “pelajaran” dapat di maknai bahwa dari banyaknya spesies khamir dapat diambil pelajaran salah satunya adalah dengan cara mengidentifikasinya untuk lebih medalami manfaat-manfaat dari berbagai jenis 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

BAB V

PENUTUP

5.1 Simpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan bahwa Protokol amplifikasi PCR dari Ediningsari (2008) merupakan protokol yang bisa mengamplifikasi seluruh isolat khamir dan Protokol amplifikasi PCR dari Maulana (2011) merupakan protokol yang menghasilkan pita DNA tunggal, terang, dan tebal. Hasil panjang pita DNA dari seluruh protokol yang digunakan ada pada kisaran 361-573 bp.

5.2 Saran

1. Perlunya peningkatan metode pada proses isolasi DNA supaya mendapatkan kualitas DNA *template* yang lebih baik.
2. Kembali membandingkan hasil optimasi protokol PCR yang ada pada penelitian ini dengan protokol lain.
3. Perlunya analisis lanjutan berupa analisis *sequencing* dan BLAST untuk memastikan urutan *sequence* DNA sehingga mengetahui spesies dari isolat 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

DAFTAR PUSTAKA

Anggaraini, Ika., Rejeki Siti Ferniah., dan Endang Kusdiyantini. 2019. Isolasi Khamir Fermentatif dari Batang Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.) dan Hasil Identifikasinya Berdasarkan Sekuens *Internal Transcribed Spacer*. *Berkala Bioteknologi.* 2(2): 12-22.

Cano, R.J. dan Colom, J.S. 1986. Microbiology. St. Paul, MN: West Publishing Company.

Case, R.J., Y.Boucher, I. Dahlloff, C. Holmstrom, W.F. Doolittle, and S. Kjelleberg. 2007. Use of 16S rRNA and *rpoB* Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 : 278-288.

Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW. 2001 –*The fungi,2nd edition*. Academic Press. California, pp. 70–76

Deak, T. 2006. *Environmental Factors Influencing Yeast*. Berlin: Springer-Verlag.

Deekshit, V. K., Ballamoole K.K., Praveen R., Anusha R., and Indrani K., 2013. Simultaneous Detection of *Salmonella* Pathogenicity Island 2 and Itsantibiotic Resistance Genes from Seafood. *Journal of Microbiological Methods*. 93: 233-238.

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

Exotic Bee ID. 2021. http://idtools.org/id/bees/exotic/factsheet.php?name=16736 (diakses pada 20.30 WIB 08 Januari 2021).

Fatchiyah, E. L. A., Widyarti, S. and Rahayu, S. (2011) *Biologi Molekuler : Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Erlangga.

Gojmerac WL., 1983. *Bees, Beekeeping, Honey and Pollination. Connecticu*t: AVI Publishing.

Hidayat, M.R. 2011. Penelusuran Asal Wilayah Lebah Madu *A. Mellifera* Di Indonesia Menggunakan Daerah Intergenik Cox1/Cox2 DNna Mitokondria. *Jurnal BIOPROPAL INDUSTRI*. Vol. : 02 (01).

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

Hidayat, T., Priyandoko, D., Wardiny, P.T., Islami, D.K. 2015. Molekuler Phygenetic Screening of *Withania somnifera* Relative From Indonesia Based on Internal Transcried Spacer Region. *Hayati Journal of Biosciences*. 1-4.

Hale, Brian. 2019. https://fineartamerica.com/featured/honeybee-proboscis-brian-hale.html (diakses pada 19.13 WIB 19 Desember 2019).

https://www.sanger.ac.uk/about/who-we-are/sanger-institute/genome-research-limited (diakses pada 19.00 WIB 19 Desember 2019).

Kanti. 2006. Marga Candida, khamir tanah pelarut posfat yang diisolasi dari tanah Kebun Biologi Wamena Papua. Biodiversitas. 7(2): 105-108.

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

Koeniger, N. and G. Koeniger. 2007. Mating flight duration of Apis mellifera queens : As short as possible, as long as necessary. *Apidologie* 38 : 606-611.

Kurtzman CP and Piskur J. 2006. Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts. Berlin: Springer-verlag.

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

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

Korabecna, M., Liska V., amd K. Fajrlik. 2003. The variability in the fungal

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

Maulana, I. 2011. *Identifikasi Isolat-Isolat Khamir dari Saluran Pencernaan Apis cerana (Fabricus, 1793) di Apiari Berdasarkan Data Sequence Daerah ITS rDNA*. doi: Jakarta: Universitas Indonesia.

Michener, C. D. 2000. *The Bees of the World, Journal of Chemical Information and Modeling*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

Milne, M., L. Milne. 2000. *National Audubon Society: Field Guide To Insects and Spiders*. New York, Canada: Alfred A. Knopf, Inc..

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

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

ResearchGate.

Mortensen, A.N., Schmehl, D.R., and J. Ellis. 2013. European Honey Bee *Apis mellifera* Linneus and subspecies (Insecta : Hymenoptera : Apidae). IFAS Extension. University of Florida.

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 fr identification of yeast speceis isolatd from cancer patients at the isotope and radiation center, khartoum, Sudan : A cross-sectional, case-control study. *ResearchGate*

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*. UI-PRESS.

Pharmawati, M. 2009. Optimalisasi ekstraksi DNA dan PCRRAPD pada *Grevillea* spp. (*Proteaceae*). Jurnal Biologi. 8 (1): 12-16.

Pratiwi, Sylvia T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta. Erlangga.

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.

Sa'diyah, S. K. 2015. *Perancangan pusat budidaya dan konservasi lebahmadu di Kota Batu: Tema biomimicry architecture*. Available at: http://etheses.uin-malang.ac.id/2430/.

Sammatara, D. and Alphones, A. 1978. *The Beekeepers: Handbook.* Dexter, Michigan: Peach Mountain Press Itd.

Sammataro, D., A. Avitabile. 1998. *The Beekeeper's Handbook, 3rd edition*. Ithaca, New York, USA: Comstock Publishing Associates.

Singh, S. 1960. *Beekeping in India*. New Delhi: Indian Council of Agricultural Research.

Sjamsuridzal, W. 2006. *Sistematika Fungi*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.

Suputa and Arminudin, A. 2007. *Beternak Lebah*. Yogyakarta: Citra Aji Paratama.

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

Starmer WT, Lachance MA. 2011. –*Yeast Ecology*. In:Kurtzman CP, FellJW, BoekhoutT–*The yeasts, ataxonomic study, 5th Edition*. Elsevier B. V. London, p. 65.

Sauer, P., M. Muller, dan J. Kang. 1998. Quantition DNA. Qiagen News. Vol. 2 : 23-26

Tavanti, A., A.D. Davidson, N.AR. Gow, M.C.J. Maiden & F.C. Odds. 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida paraptilosis* group II and III. Journal of Clinical Microbiology 43(1) : 284-292.

Thacker E. 2012 –*The honey book.* James Direct, Inc. Ohio.

The Editors of Encyclopedia Britannia. 2012. *Honeybee*. Available at: https://www.britannica.com/animal/bumblebee.

The Editors of Encyclopedia Britannia. 2014. *Honeybee*. Available at: https://www.britannica.com/animal/bumblebee.

Voelkerdlng KV, Dames S dan Durtschi J. 2009. Next generation sequensing: from basix research to diagnostic. Clinical Chemistry. 55(4): 641-658.

Walker GM. 2009 –*Yeasts.In: Schaechter M –Desk encyclopedia of microbiology,2nd ed.* Elsevier/Academic Press. London, ppl. 1174–1187.

Webster J & Weber RWS. 2007. *Introduction to Fungi. Third Edition*. New York: Cambridge University Press.

Won, H., Renner, S.S., 2005. *The internal transcribbed spacer of nuclear ribosomal DNA in gymnosperm Gnetum*. Molekuler Phylogenetics and Evolution.

Yusuf, Z. K. 2010. *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Saintek*. 5(6): 1–6.

Zein, M. S. A. and Prawiradilaga, D. M. 2013. *DNA Barcode*. Cetakan ke. Jakarta: Kharisma Putra Utama.

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