

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KHAMIR
YANG BERASOSIASI DENGAN BUNGA APEL (*Malus sylvestris* Mill)
DAN POTENSINYA DALAM FERMENTASI KARBOHIDRAT**

SKRIPSI

Oleh:

ACHMAD RIFKY ALFIAN

NIM. 14620086



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG**

2018

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KHAMIR
YANG BERASOSIASI DENGAN BUNGA APEL (*Malus sylvestris* Mill)
DAN POTENSINYA DALAM FERMENTASI KARBOHIDRAT**

SKRIPSI

**Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri
Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**Oleh:
ACHMAD RIFKY ALFIAN
NIM. 14620086**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG**

2018

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KHAMIR
YANG BERASOSIASI DENGAN BUNGA APEL (*Malus sylvestris* Mill)
DAN POTENSINYA DALAM FERMENTASI KARBOHIDRAT**

SKRIPSI

Oleh:
ACHMAD RIFKY ALFIAN
NIM. 14620086

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal 28 Desember 2018

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

Romaidi, M.Si, D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019

M. Mukhlis Fahuiddin, M.S.I
NIPT. 201402011409

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi

Romaidi, M.Si, D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KHAMIR
YANG BERASOSIASI DENGAN BUNGA APEL (*Malus sylvestris* Mill)
DAN POTENSINYA DALAM FERMENTASI KARBOHIDRAT**

SKRIPSI

Oleh:
ACHMAD RIFKY ALFIAN
NIM. 14620086

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Tanggal 4 Januari 2019

Penguji Utama	<u>Dr. Ulfah Utami, M.Si</u> NIP. 19650509 199903 2 002	
Ketua Penguji	<u>Prilya Dewi Fitriasari, M.Sc</u> NIDT. 19900428 20160801 2 062	
Sekretaris Penguji	<u>Romaidi, M.Si, D.Sc</u> NIP. 19810201 200901 1 019	
Anggota Penguji	<u>M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I</u> NIPT. 201402011409	

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi

Romaidi, M.Si, D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Achmad Rifky Alfian

NIM : 14620086

Jurusan : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Menyatakan bahwa “**Skripsi** “ yang saya buat untuk memenuhi persyaratan kelulusan pada Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang, dengan judul :

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KHAMIR YANG BERASOSIASI DENGAN BUNGA APEL (*Malus sylvestris* Mill) DAN POTENSINYA DALAM FERMENTASI KARBOHIDRAT

Adalah hasil karya sendiri, dan bukan duplikasi dari karya orang lain.

Selanjutnya apabila di kemudian ada “**klaim**”, bukan menjadi tanggung jawab dari Dosen Pembimbing dan atau pihak Fakultas Sains dan Teknologi, tetapi menjadi tanggung jawab diri saya sendiri.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya dan tanpa paksaan dari siapapun.

Malang,
Yang membuat pernyataan,

Achmad Rifky Alfian
NIM: 14620086

HALAMAN PERSEMBAHAN

Karya ini kupersembahkan kepada :

Ayahanda dan Ibunda tercinta : Bpk Muhammad Yusuf dan Ibu Siti Zulaikhah

Adik tercinta: Rizal Khoirul Umam dan Amirun Najib Al-Zam-Zami

Guru : KH. Muhammad Hasib, KH. M. Baidlowi Muslich, Ustadz H. Syamsul

Huda,

Ustadz Nurul Yaqien

Serta Para Sahabat dan Keluarga Besar PP. Anwarul Huda Karangbesuki Malang

MOTTO

إِنَّ اللَّهَ لَا يُغَيِّرُ مَا بِقَوْمٍ حَتَّىٰ يُغَيِّرُوا مَا بِأَنْفُسِهِمْ ۗ وَإِذَا أَرَادَ اللَّهُ بِقَوْمٍ سُوءًا
فَلَا مَرَدَّ لَهُ ۗ وَمَا لَهُم مِّن دُونِهِ مِن وَالٍ

Sesungguhnya Allah tidak merubah keadaan sesuatu kaum sehingga mereka merubah keadaan yang ada pada diri mereka sendiri. Dan apabila Allah menghendaki keburukan terhadap sesuatu kaum, maka tak ada yang dapat menolaknya; dan sekali-kali tak ada pelindung bagi mereka selain Dia

(Q.S. ar-Ra'd: 11)

KATA PENGANTAR

Assalamu 'alaikum Wr. Wb.

Puji syukur ke hadirat Ilahi Rabbi, karena dengan limpahan rahmat, dan hidayah-Nya Penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini dengan judul ” **Isolasi dan identifikasi khamir yang berasosiasi dengan bunga apel (*Malus sylvestris* Mill) dan potensinya dalam fermentasi karbohidrat**”. Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW yang kita nantikan syafa'atnya *fi yaumil qiyamah*.

Penulis menyadari bahwa banyak pihak yang telah membantu dan berpartisipasi dalam menyelesaikan penulisan skripsi ini. Untuk itu iringan doa dan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya Penulis sampaikan, kepada:

1. Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag selaku rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Bapak Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Bapak Romaidi, M.Si.,D.Sc selaku ketua jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Bapak Romaidi, M.Si.,D.Sc dan Bapak M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I selaku dosen pembimbing yang telah banyak meluangkan waktu dan sumbangan pemikiran guna memberi bimbingan, petunjuk, dan pengarahan kepada Penulis dalam menyusun skripsi ini.
5. Segenap dosen jurusan Biologi yang telah meluangkan waktu dan memberikan banyak ilmu dan informasi terkait skripsi ini.
6. Teman angkatan Biologi Telomer 2014 yang menemani di waktu suka dan duka selama menempuh pendidikan di kampus ini.
7. Teman Kamar D3 Pondok Pesantren Anwarul Huda yang selalu memberikan semangat dalam penyelesaian skripsi ini.
8. Ayah bundaku serta keluarga tercinta yang dengan sepenuh hati memberikan motivasi dan ketulusan do'a yang selalu terpanjatkankan sehingga penulisan skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.

9. Seseorang yang juga memberikan semangat dan do'a untuk kelancaran skripsi ini.
10. Berbagai pihak yang tidak dapat Penulis sebutkan satu persatu, yang telah memberikan bantuan yang sangat bermanfaat dalam penyusunan skripsi ini. Semoga Allah SWT memberikan balasan yang setimpal. Amiin

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih jauh dari sempurna, untuk itu Penulis harapan kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak. Akhirnya, Penulis berharap penulisan skripsi ini dapat memberikan manfa'at bagi para pembaca.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Malang, 28
Desember 2018

Achmad Rifky Alfian

DAFTAR ISI

Halaman Judul Dalam	i
Halaman Pengajuan	ii
Halaman Persetujuan	iii
Halaman Pengesahan	iv
Halaman Pernyataan	v
Halaman Persembahan	vi
Halaman Motto	vii
Kata Pengantar	viii
Daftar Isi	x
Daftar Tabel	xiii
Daftar Gambar	xiv
Daftar Lampiran	xv
Abstrak	xvi
BAB I : PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	6
1.3. Tujuan Penelitian	6
1.4. Manfaat Penelitian	7
1.5. Batasan Masalah.....	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Integrasi Sains dan Islam	9
2.1.1 Khamir dalam Perspektif Islam	9
2.1.2 DNA dalam Islam	11
2.2 Deskripsi Khamir.....	12
2.3 Taksonomi Khamir	14
2.4 Diversitas dan Ekologi Khamir	16
2.5 Identifikasi Khamir	17
2.5.1 Identifikasi Konvensional	18

2.5.2 Identifikasi Molekular.....	19
2.6 Fermentasi Karbohidrat	20
2.7 Analisis Daerah <i>Internal Transcribed Spacer (ITS)</i>	
rDNA Khamir	23
2.8 Tinjauan tentang Apel (<i>Malus sylvestris</i> Mill)	
dan Klasifikasinya	25
2.9 Penelitian Isolasi Khamir dari Tumbuhan Apel (<i>Malus sylvestris</i> Mill).....	27

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian.....	29
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	29
3.3 Alat dan Bahan	29
3.3.1 Alat Penelitian.....	29
3.3.2 Bahan Penelitian	30
3.4 Prosedur Penelitian	30
3.4.1 Pembuatan Media.....	30
3.4.1.1 <i>Yeast Malt Extract Agar (YMEA)</i>	30
3.4.1.2 <i>Yeast Extract-Malt Broth (YMB)</i>	31
3.4.2 Prosedur Isolasi Khamir.....	31
3.4.3 Pengamatan Morfologi Makroskopik Khamir	32
3.4.4 Pengamatan Morfologi Mikroskopik Khamir.....	32
3.4.5 Identifikasi Secara Biokimia.....	32
3.4.5.1 Uji Kemampuan Isolat Khamir dari Bunga Apel Dalam Fermentasi Karbohidrat	32
3.4.5.2 Uji Pertumbuhan pada Media <i>Glucose Peptone Yeast Extract Agar (GPY agar) Konsentrasi Gula 50%</i>	33
3.4.6 Teknik Molekular.....	33
3.4.6.1 Isolasi DNA Genom dari Isolat Khamir	33
3.4.6.2 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	34
3.4.6.3 Elektrofesis Gel Agarosa.....	34
3.4.6.4 Pengukuran Kuantitas DNA	35
3.4.6.5 Sekuensing	35

3.5 Analisis Data.....	36
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Karakteristik Morfologi Khamir Hasil Isolasi dari bunga apel (<i>Malus sylvestris</i> Mill).....	38
4.1.1 Jenis Khamir yang Ditemukan pada Bunga Apel (<i>Malus sylvestris</i> Mill) Berdasarkan Karakter Makroskopis	39
4.1.2 Jenis Khamir yang Ditemukan pada BungaApel (<i>Malus sylvestris</i> Mill) Berdasarkan Karakter Mikroskopis	41
4.2 Kemampuan Isolat Khamir yang Ditemukan di Bunga Apel dalam Fermentasi Karbohidrat.....	45
4.3 Identifikasi secara Molekular Jenis Isolat Khamir dengan Kemampuan Fermentasi Karbohidrat Terbaik	48
4.3.1 Identifikasi Khamir Hasil PCR-Koloni	48
4.3.2 Analisis Hasil Sekuensing dan Kekerabatan Spesies	50
4.4 Dialog Hasil Penelitian tentang Khamir dalam Perspektif Islam.....	54
BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	59
5.2 Saran.....	59
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN	69

Daftar Tabel

Tabel 2.1 Daftar Genus Khamir yang Menunjukkan Hubungan Taksonomi pada Kelas Utama Fungi	15
Tabel 4.1 Karakteristik morfologi makroskopis koloni khamir.....	40
Tabel 4.2 Karakteristik morfologi mikroskopik sel khamir.....	44
Tabel 4.3 Kemampuan delapan isolat khamir dalam memfermentasi glukosa, fruktosa dan galaktosa	45
Tabel 4.4 Indikator adanya produksi asam pada media fermentasi masing-masing isolat khamir	46
Tabel 4.5 Pengamatan uji pertumbuhan pada media <i>Glucose Peptone Yeast Extract Agar</i> (GPY Agar) konsentrasi gula 50%.....	48
Tabel 4.6 Hasil analisis homologi isolat khamir pada bunga apel menggunakan BLAST (<i>Basic Local Allignment Search Tools</i>).....	50

Daftar Gambar

Gambar 2.1 Produk fermentasi piruvat yang diproses oleh mikroorganisme yang berbeda.....	21
Gambar 2.2 Fermentasi karbohidrat dari mikrroorganisme dengan pewarna indikator <i>fuchsin</i>	22
Gambar 2.3 Struktur Kimia D-Glukosa, D-Galaktosa dan D-Fruktosa	22
Gambar 2.4 Struktur daerah ribosomal DNA	24
Gambar 2.5 Pohon Apel (<i>Malus sylvestris</i> Mill)	25
Gambar 2.6 Struktur bunga apel (<i>Malus sylvestris</i> Mill).....	26
Gambar 3.1 Diagram alir penelitian.....	37
Gambar 4.1 Isolat Hasil Isolasi Khamir dari Bunga Apel	38
Gambar 4.2 Morfologi makroskopik.....	40
Gambar 4.3 Reproduksi aseksual.....	42
Gambar 4.4 Reproduksi seksual.....	42
Gambar 4.5 Morfologi sel.....	43
Gambar 4.6 Hasil amplifikasi daerah ITS.....	49
Gambar 4.8 Pohon filogenetik isolat AMR-1, AMR-4, AAR-7, AAR-8 dari bunga apel manalagi dan ana dengan spesies lain.....	52

Daftar Lampiran

Lampiran 1 gambar sel khamir hasil isolasi bunga apel	69
Lampiran 2 pengamatan makroskopis koloni khamir hasil isolasi bunga apel...	71
Lampiran 3 pengamatan mikroskopis sel khamir hasil isolasi bunga apel.....	72
Lampiran 4 hasil fermentasi karbohidrat dari isolat khamir	74
Lampiran 5 pengamatan fermentasi karbohidrat dari isolat khamir (hari ke-7) .	77
Lampiran 6 pengamatan uji pertumbuhan isolat khamir pada Media <i>glucose</i> <i>peptone yeast extract agar</i> (gpy agar) konsentrasi gula 50%.....	79
Lampiran 7 hasil sekuensing isolat khamir dari bunga apel (<i>Malus sylvestris</i> Mill).....	81
Lampiran 8 sekuen DNA ITS isolat dan spesies pembanding dari genbank	83
Lampiran 9 elektroforegram hasil sekuensing	84
Lampiran 10 hasil BLAST sekuen <i>Clavispora lusitaniae</i> strain 37C dengan NCBI	91
Lampiran 11 hasil BLAST sekuen <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain LYY dengan NCBI	92
Lampiran 12 hasil BLAST sekuen <i>Pichia kudriavzevii</i> strain YS156 dengan NCBI	93
Lampiran 13 hasil BLAST sekuen <i>Pichia kudriavzevii</i> strain YS156 dengan NCBI	94
Lampiran 14 hasil penyejajaran sekuen ITS sampel dan spesies pembanding lain	95

ABSTRAK

Alfian, Achmad Rifky. 2018. Isolasi dan identifikasi khamir yang berasosiasi dengan bunga apel (*Malus sylvestris* Mill) dan potensinya dalam fermentasi karbohidrat. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing Biologi: Romaidi, M.Si.,D.Sc. Pembimbing Agama: M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I

Khamir merupakan mikrofungi uniselular yang termasuk eukariotik. Khamir tersebar di berbagai lingkungan, yaitu lingkungan terestrial, perairan hingga udara bebas. Komunitas khamir juga ditemukan yang berasosiasi dengan tumbuhan, hewan dan insekta. Saat ini ilmuwan telah berhasil mengklasifikasikan khamir sekitar 1500 spesies pada 100 genus yang ada di bumi (Satyanarayana, 2009). Penelitian ini mengungkapkan keberadaan dan keanekaragaman khamir yang berasosiasi dengan bunga apel (*Malus sylvestris* Mill). Tujuan penelitian untuk mengetahui jenis khamir yang ditemukan pada bunga apel (*Malus sylvestris* Mill); mengetahui identitas khamir berdasarkan karakter morfologi, biokimia dan molekular; dan mengetahui hubungan kekerabatan spesies khamir yang ditemukan pada bunga apel (*Malus sylvestris* Mill) berdasarkan *Internal Transcribed Spacer* (ITS) rDNA dengan menggunakan database NCBI.

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi dan deskriptif kualitatif. Sampel penelitian adalah khamir hasil isolasi dari bunga apel di Kebun Apel Dusun Junggo, Desa Tulungrejo, Batu. Lokasi pengambilan sampel bunga dilakukan secara *simple random sampling*, dimana pengambilan sampel dilakukan secara acak untuk memberikan kesempatan yang sama bagi setiap anggota populasi untuk menjadi sampel penelitian. Sampel dibawa ke Laboratorium untuk dilakukan isolasi, purifikasi dan identifikasi secara morfologi koloni dan sel, identifikasi biokimia (mengukur kemampuan fermentasi karbohidat) dan identifikasi molekular. Identifikasi Molekular menggunakan metode *Colony-PCR*, PCR dilakukan dengan mengambil langsung dari kultur koloni khamir dengan menggunakan primer fungi ITS1 *forward*. Hasil amplifikasi DNA disekuensing dengan ABI PRISM 3730xl Genetic Analyzer, Bioneer, Korea.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis khamir yang ditemukan pada bunga apel (*Malus sylvestris* Mill) berdasarkan karakter morfologi termasuk ke dalam kelompok ascomycetes dengan isolat yang diperoleh sebanyak 8 isolat, meliputi AAR-3, AAR-4, AAR-7, AAR-8, AMR-1, AMR-4, AMR-5, AMR-6. Semua isolat mempunyai kemampuan dalam fermentasi karbohidrat. Identifikasi secara molekular jenis isolat khamir dengan kemampuan fermentasi karbohidrat terbaik, yaitu isolat khamir AAR-7 memiliki kemiripan dengan *Clavispora lusitaniae* strain 37C (97%), isolat khamir AAR-8 memiliki kemiripan dengan *Saccharomyces cerevisiae* strain LYY (99%), isolat khamir AMR-1 memiliki kemiripan dengan *Pichia kudriavzevii* strain YS156 (100%) dan isolat khamir AMR-4 memiliki kemiripan dengan *Pichia kudriavzevii* strain YS156 (99%).

Kata Kunci: Isolasi khamir, identifikasi khamir, bunga apel (*Malus sylvestris* Mill)



ABSTRACT

Alfian, Achmad Rifky. 2018. Isolation and identification of yeasts in Association with apples (*Malus sylvestris* Mill) and potential in carbohydrate fermentation. Thesis. Department of Biology of the Faculty of Science and technology in the Islamic State University Maulana Malik Ibrahim Malang. Biology Supervisor: Romaidi, M. Si., D.Sc. Religious Supervisor: M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I.

Yeasts are unicellular mikrofungi is a eukaryotic included. Yeasts are scattered in various environments, i.e. terrestrial, aquatic environment to free air. The community of yeasts are also found in association with plants, animals and insects. This time scientists have managed to classify yeasts around 1500 species in genus 100 on Earth (Satyanarayana, 2009). This study revealed the existence and diversity of yeasts in association with apples (*Malus sylvestris* Mill). The purpose of the study to find out the types of yeasts found in the flowers of Apple (*Malus sylvestris* Mill); knowing the identification of the yeasts based on morphological characters, molecular and biochemistry; and knowing the kinship of species yeast found on flower apples (*Malus sylvestris* Mill) based on Internal Transcribed Spacer (ITS) rDNA using NCBI database.

This research is descriptive and exploratory qualitative research. Sample research is the result of yeast isolation from flower apples in the apple orchards of the village Junggo, village Tulungrejo, Batu. Location of sampling of flowers done in simple random sampling, where sampling was done randomly to provide equal opportunities for every Member of the population to become a research sample. The sample is brought to the lab to do the isolation, purification and identification in morphology and cell colonies, identification of biochemical (fermentation ability measure carbohydrate) and molecular identification. Molecular identification method using Colony-PCR, PCR is performed by taking directly from the culture of yeast colonies by using primary fungi ITS1 forward. Disekuensing DNA amplification results with ABI PRISM 3730xl Genetic Analyzer, Bioneer, Korea.

The results showed that the types of yeasts found in the flowers of Apple (*Malus sylvestris* Mill) based on morphological characters are included in a group of ascomycetes with isolates obtained as many as 8 isolates, including AAR-3,-4, AAR AAR AAR-7,-8, AMR-1, 4-AMR, AMR, AMR-5-6. All isolates had the ability in the fermentation of carbohydrates. Identifying the molecular type of yeast isolates with the best fermentation ability, the AAR-7 yeast isolates were similar to *Clavispora lusitaniae* strain 37C (97%), AAR-8 yeast isolates were similar to *Saccharomyces cerevisiae* LYY strain (99%), AMR yeast isolates - 1 has similarities with the strains of *Pichia kudriavzevii* YS156 (100%) and AMR-4 yeast isolates have similarities to the strain *Pichia kudriavzevii* YS156 (99%).

Key words: isolation of yeasts, yeast identification, flower apples (*Malus sylvestris* Mill)

مستخلص

ألفيان، أحمد رفقي. 2018. عزل وتحديد مخمر الموجودة في زهرة التفاح (*Malus sylvestris* Mill) وإمكانيتها في تخمير الكربوهيدرات. البحث الجامعي. قسم علم الحياة كلية العلوم والتكنولوجيا جامعة مة لانا مالك إبراهيم مالانج. المشرف في علم الحياة: روماييدي الماجستير. المشرف في الأمر الديني: م مخلص فخر الدين الماجستير.

مخمر هو *mikrofungi uniselular* الذي يشمل *eukariotik*. انتشر مخمر في نبات مختلفة، وهي الأرضية والمياه من خلال الهواء الحر. كما وجد أن مجتمع مخمر يرتبط بالنباتات والحيوانات والحشرات. تمكن علماء حاليا من تصنيف مخمر حوالي 1500 نوع من 100 يكشف جنس في الأرض (ساتيانارايا 2009). هذا البحث عن وجود وتنوع مخمر المرتبطة بزهرة التفاح (*Malus sylvestris* Mill). كان الغرض من الدراسة هو تحديد نوع مخمر الموجودة في زهرة التفاح (*Malus sylvestris* Mill): معرفة تحديد مخمر على أساس الأحرف المورفولوجية والبيوكيميائية والجزئية: ومعرفة العلاقة بين الأنواع القرابية الموجودة في زهرة التفاح (*Malus sylvestris* Mill) على أساس *Internal Transcribed Spacer (ITS) rDNA* باستخدام قاعدة بيانات *NCBI database*. هذا البحث هو الاستكشاف النوعي والدراسة الوصفية. وكانت عينات من هذا البحث هي مخمر المعزولة من زهرة التفاح في بستان التفاح جونجو، قرية تولونجوجو، باتو. تتم عملية أخذ العينات عن طريق أخذ عينات عشوائية بسيطة، حيث يتم أخذ عينات عشوائية لتوفير فرصة متساوية لكل فرد من السكان ليكون عينة من الدراسة. تم أخذ العينات إلى المختبر من أجل عزل وتنقية وتحديد مورفولوجيا القولون والخلية، وتحديد الهوية الكيميائية الحيوية (قياس قدرة تخمر الكربوهيدرات) وتحديد الجزئية باستخدام طريقة *Colony-PCR* تم تنفيذ PCR عن طريق أخذ مباشرة من ثقافة مستعمرة مخمر باستخدام الفطور الأولية *ITS1 forward* إلى الأمام. تم تسلسل نتائج تضخيم الحمض النووي مع *ABI PRISM 3730x1* محلل وراثي، بايونير، كوريا.

أظهرت النتائج أن نوع مخمر الموجودة في زهرة التفاح (*Malus sylvestris* Mill) مبنية على الطابع المورفولوجي المتضمن في مجموعة *ascomycetes* مع العزلات التي تم الحصول عليها بواسطة 8 عزلات.، تتكون من *AAR-3* و *AAR-4* و *AAR-7* و *AAR-8* و *AMR-1* و *AMR-4* و *AMR* عزلات. 5 و *AMR-6* جميع العزلات لديها القدرة على تخمير الكربوهيدرات على 3 أنواع من BLAST *NCBI*، وهي سلالة *Clavispora lusitaniae* من 37 ج (97%) عزلات *AAR-7*، سلالة *Saccharomyces cerevisiae* strain LYY (99%) من عزلات *AAR-8*، *Pichia kudriavzevii*

Pichia kudriavzevii strain YS156 و AMR-1 الناجمة عن سلاسة strain YS156 (100%)
(99%) من عزلات AMR-4.

كلمات مفتاحية: عزل مخمر، تحديد مخمر، زهرة التفاح (*Malus sylvestris* Mill)



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia sebagai negara yang terletak di garis khatulistiwa memiliki tingkat biodiversitas yang tinggi. Sebanyak 10% dari spesies tumbuhan berbunga, 12% dari mamalia dunia, 16% dari reptil dunia dan 17% dari total spesies burung hidup secara alami di Indonesia (CBD, 2016). Hal ini karena Indonesia memiliki iklim tropis yang diapit oleh dua benua, yaitu Asia dan Australia. Selain itu juga Indonesia diapit dua samudra yaitu samudra Hindia dan Pasifik, sehingga sebagian besar makhluk hidup dapat sintas dan menghasilkan keturunan. Kondisi inilah yang menyebabkan munculnya pelbagai organisme, mulai dari organisme tingkat rendah hingga tingkat tinggi yang tersebar di alam. Penciptaan pelbagai makhluk hidup sejalan dengan firman Allah swt dalam Al-Qur'an surat al-Baqarah ayat 29:

هُوَ الَّذِي خَلَقَ لَكُمْ مَا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا ثُمَّ أَسْتَوَىٰ إِلَى السَّمَاءِ فَسَوَّاهُنَّ سَبْعَ سَمَاوَاتٍ وَهُوَ بِكُلِّ شَيْءٍ عَلِيمٌ ﴿٢٩﴾

”Dialah Allah, yang menjadikan segala yang ada di bumi untuk kamu dan Dia berkehendak (menciptakan) langit, lalu dijadikan-Nya tujuh langit. Dan Dia Maha Mengetahui segala sesuatu.”

Kata *istawa* dalam ayat di atas mengandung makna “berkehendak” dan “mendatangi”, karena menggunakan kata sambung “ilaa”. Ilmu Allah meliputi seluruh apa yang diciptakannya. Sebagaimana firman-Nya, “Apakah Allah yang menciptakan itu tidak mengetahui (apa yang kamu tampilkan dan sembunyikan)” (Katsir, 2004). Untuk menyempurnakan ciptaan-Nya, Allah swt. menciptakan langit berlapis tujuh setelah menciptakan bumi dengan segala manfaatnya.

Pelbagai jenis makhluk hidup yang beraneka ragam di langit maupun di bumi dapat hidup saling berdampingan, menjaga keberlangsungan ekosistem, satu diantaranya adalah khamir.

Khamir merupakan mikrofungi uniselular yang tersebar luas di lingkungan. Persebaran khamir di lingkungan lebih terbatas daripada bakteri, tetapi khamir telah berhasil diisolasi dari pelbagai lingkungan, yaitu lingkungan terestrial, perairan hingga udara bebas. Komunitas khamir juga ditemukan berasosiasi dengan tumbuhan dan hewan. Saat ini ilmuwan telah berhasil mengklasifikasikan khamir sekitar 1500 spesies pada 100 genus yang ada di bumi (Satyanarayana dan Kunze, 2009).

Khamir memainkan peranan penting dalam siklus unsur di alam yaitu pada rantai makanan, karbon, nitrogen dan sulfur. Selain itu juga, khamir dimanfaatkan oleh manusia dalam bidang manipulasi atau rekayasa genetika meliputi hibridisasi, mutasi, sitoduksi, fusi speroplas, transfer kromosom tunggal dan transformasi menggunakan teknologi rekombinan. Pemanfaatan khamir dalam bidang bioteknologi semakin banyak diaplikasikan dipelbagai sektor penting meliputi makanan, minuman, kimia, farmasi, industri enzim, agrikultur (misalnya *Saccharomyces cerevisiae* yang memiliki potensi pada stimulasi pertahanan tumbuhan sereal terhadap fungi patogen dan khamir seperti *Debaryomyces hansenii* digunakan sebagai biokontrol penyakit buah fungi) dan pada lingkungan (misalnya khamir dapat menyerap logam berat dan detoksifikasi polutan kimia) (Satyanarayana dan Kunze, 2009).

Umumnya khamir bersifat heterotropik dengan kebutuhan nutrisi sederhana dan hidup sebagai anaerob fakultatif. Sifatnya yang anaerob fakultatif menjadikan

khamir dapat bertahan hidup pada lingkungan dengan ataupun tanpa oksigen. Oleh karena itu, khamir dapat terdistribusi secara luas pada habitat alaminya seperti pada bunga dan buah, sereal, dan debris tumbuhan pada permukaan tanah (Han *et al.* 2015). Beberapa spesies khamir telah berhasil diisolasi dari lingkungan terspesialisasi atau lingkungan ekstrim seperti pada potensial air yang rendah (misalnya konsentrasi gula atau garam yang tinggi), suhu rendah (misalnya khamir diisolasi dari Antartika), dan ketersediaan oksigen rendah (misalnya pada sistem pencernaan hewan) (Satyanarayana dan Kunze, 2009).

Keberhasilan isolasi khamir dari lingkungan selanjutnya dimanfaatkan sebagai starter untuk membuat pelbagai jenis makanan dan minuman fermentasi beralkohol (Steensels *et al.* 2014) seperti bir, *wine*, dan sake. Peran khamir dalam proses fermentasi makanan dan minuman yaitu untuk mendegradasi substrat membentuk struktur, tekstur dan aroma yang dapat menambah nilai gizi (Aidoo *et al.* 2006; Bourdichon *et al.* 2012; Buenrostro-Figueroa *et al.* 2012; Carrau *et al.* 2015; Jespersen, 2003). Genus khamir fungsional yang berkaitan dengan fermentasi makanan dan minuman meliputi *Brettanomyces* (Dekkera), *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Galactomyces*, *Geotrichum*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Hyphopichia*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Saccharomycopsis*, *Schizosaccharomyces*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Yarrowia* dan *Zygosaccharomyces*. Makanan dan minuman fermentasi pada umumnya, terutama diproses oleh khamir, atau kombinasi dengan bakteri maupun *mould*, yaitu bir dan ale, produk roti, cachaca, keju, kenkey, kimci, produk susu (kefir, yoghurt, susu

fermentasi), cocoa, kopi, daging fermentasi dan sosis, fermentasi minyak zaitun dan ketimun, kecap, *tea fungus*, *silage* dan probiotik (Turker, 2014).

Saat ini analisis identifikasi suatu spesies yang digunakan banyak mengarah pada metode genetika molekular. Metode identifikasi baru ini berdasarkan urutan asam nukleat telah diaplikasikan pada identifikasi khamir. Perbandingan dari ribosomal RNA (rRNA) dan *template* ribosomal DNA (rDNA) telah digunakan secara ekstensif pada akhir-akhir ini (de Llanos *et al.* 2004). Identifikasi secara molekular memiliki keuntungan dibandingkan identifikasi secara konvensional, yaitu mampu untuk mendeteksi perubahan *single* nukleotida dan mengidentifikasi keanekaragaman yang luas dari penggambaran strain genetik untuk mengetahui perbedaan antar spesies (Kurtzman dan Fell, 1998).

Identifikasi khamir dapat ditentukan berdasarkan data sekuens dari daerah *Internal Transcribed Spacer (ITS)* dari DNA ribosomal. Analisis kompleks sekuens gen rDNA daerah *Internal Transcribed Spacer (ITS)* sekarang ini dipertimbangkan sebagai metode “*gold-standard*” untuk identifikasi spesies khamir (Schoch *et al.* 2012; Wang *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2014; Merseguel *et al.* 2015). Seperti halnya eukariota lainnya, khamir memiliki daerah *ITS* yang berlokasi antara gen 18S dan 28S rRNA. Daerah *ITS* dibagi menjadi dua daerah, yaitu daerah *ITS1* yang memisahkan gen 18S dan 5.8S rRNA, dan daerah *ITS2* yang terletak antara gen 5.8S dan 28S rRNA. *ITS* merupakan kronometer yang khas untuk menentukan hubungan kedekatan genotip suatu spesies, karena *ITS* memiliki tingkat divergenitas yang tinggi dibandingkan dengan gen 18S rRNA (James *et al.* 1996). Informasi yang masih sedikit terkait filogeni khamir pada kronometer dibandingkan dengan bakteri, sehingga dengan analisis sekuensing

subunit rRNA maupun subunit rDNA akan berkontribusi secara signifikan pada sistematika khamir (James *et al.* 1996).

Penelitian isolasi dan identifikasi keberadaan khamir yang berasosiasi dengan bunga pada tanaman tertentu masih jarang dilakukan di Indonesia. Hingga saat ini, identifikasi khamir yang pernah dilakukan adalah pada isolat tanah, sedimen, daun, buah, serasah dan bunga (Sumerta dan Kanti, 2016) akan tetapi tidak disebutkan secara spesifik tumbuhan yang digunakan dan pada saluran pencernaan lebah *Apis cerana* (Basukriadi *et al.* 2010). Penelitian ini mencoba untuk menguji keberadaan khamir yang berasosiasi dengan bunga apel (*Malus sylvestris* Mill) yang masuk ke dalam genus *Malus* anggota famili Rosaceae atau rose dari Kota Batu. Studi akhir-akhir ini mempunyai pertimbangan interaksi tumbuhan yang saling berkaitan dengan polinator dan beberapa kelompok meliputi herbivora (Herrera, 2000), jamur mikorhiza (Gange dan Smith, 2005; Gehring dan Bennet, 2009), ataupun khamir nektar (Canto *et al.*, 2007, 2008; Herrera *et al.* 2008, 2009). Khamir telah diketahui lebih lanjut pada abad ini yang sebagian besar berada pada nektar bunga (Boutroux, 1884; Nadson dan Krassilnikov, 1927).

Identifikasi khamir yang berasosiasi dengan bunga pohon apel (*Malus sylvestris* Mill) masih belum dilakukan di Indonesia. Penelitian isolasi dan identifikasi khamir yang pernah dilakukan pada apel yaitu pada ampas apel hasil fermentasi (Castillo *et al.* 2016), khamir yang telah ditemukan sebanyak 6 spesies yaitu *Aureobasidium pullulans*, *Barnettozyma californica*, *Candida boidinii*, *Debaryomyces hansenii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Saccharomyces cerevisiae*, dan pada buah apel yang telah ditemukan sebanyak 12 spesies yaitu

Aureobasidium pullulans, *Cryptococcus sp.*, *Galactomyces candidus*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia kluyveri*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia membranifaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycopsis crataegensis*, *Wickerhamomyces anomalus* (Vadkertiová *et al.* 2012). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang isolasi dan identifikasi khamir yang berasosiasi pada bunga pohon apel (*Malus sylvestris* Mill). Sehingga diketahui keragaman khamir pada bunga pohon apel (*Malus sylvestris* Mill) yang akan menjadi dasar untuk menggali potensi ekologi dan untuk perkembangan bioteknologi terutama dalam bidang fermentasi makanan dan minuman.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dikaji dalam penelitian ini adalah:

1. Jenis khamir apa yang ditemukan pada bunga apel (*Malus sylvestris* Mill) berdasarkan karakter morfologi?
2. Isolat mana saja yang mempunyai kemampuan dalam fermentasi karbohidrat dan tumbuh pada media agar konsentrasi 50%?
3. Bagaimana identitas secara molekular jenis isolat khamir dengan kemampuan fermentasi karbohidrat terbaik?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui jenis khamir yang ditemukan pada bunga apel (*Malus sylvestris* Mill) berdasarkan karakter morfologi.

2. Mengetahui isolat mana saja yang mempunyai kemampuan dalam fermentasi karbohidrat dan tumbuh pada media agar konsentrasi 50%.
3. Mengetahui identitas secara molekular jenis isolat khamir dengan kemampuan fermentasi karbohidrat terbaik.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah

1. Penelitian ini dapat memberikan informasi spesies yang ditemukan pada bunga apel (*Malus sylvestris* Mill).
2. Penelitian ini diharapkan dapat diaplikasikan dalam bidang mikrobiologi terutama dalam bidang pangan.
3. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kekerabatan spesies khamir yang telah ditemukan.
4. Penelitian ini dapat memberikan informasi endosimbiosis khamir pada bunga apel (*Malus sylvestris* Mill).

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bunga pohon apel yang digunakan adalah apel (*Malus sylvestris* Mill) varietas ana dan manalagi.
2. Media isolasi khamir yaitu *Yeast Media* (YM).
3. Khamir diremajakan pada media *Yeast Media Extract Agar* (YMEA).
4. Metode identifikasi dengan karakterisasi morfologi secara makroskopis koloni khamir (bentuk koloni, warna, elevasi, permukaan dan tepian koloni) dan

mikroskopis sel khamir (bentuk sel, ukuran sel, reproduksi vegetatif, ada tidaknya pseudohifa dan hifa sejati, reproduksi seksual)

5. Pengamatan mikroskopis sel khamir menggunakan pewarna *methylene blue*.
6. Jenis karbohidrat yang digunakan untuk menguji kemampuan isolat khamir dalam fermentasi karbohidrat meliputi glukosa, fruktosa, dan galaktosa
7. Penanda molekular yang digunakan adalah Internal Transcribe Spacer (*ITS*) 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') sebagai *forward primer*.
8. Analisis pohon filogenetik dilakukan dengan menggunakan program MEGA 5.05 metode statistik Neighbor-Joining (NJ). Penentuan uji filogeni dengan *bootstrap* 1000 dengan model substitusi Kimura 2-parameter model.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Integrasi Sains dan Islam

2.1.1 Khamir dalam Perspektif Islam

Khamir merupakan kelompok dari cendawan/ fungi yang berukuran mikro.

Khamir termasuk organisme heterotrofik yang mana mereka memerlukan senyawa organik untuk nutrisinya. Jenis organisme ini berkembang dengan spora dan habitat khamir tersebar di lingkungan, baik hidup pada benda hidup maupun benda mati. Allah swt. tidak membiarkannya tanpa makanan. Yang Maha Kuasa menganugerahinya alat-alat khusus sehingga dia dapat hidup sesuai dengan waktu dan kadar yang ditetapkan Allah (Shihab, 2015). Hal ini sejalan dengan firman Allah dalam Surah Hud ayat 6:

﴿وَمَا مِنْ دَابَّةٍ فِي الْأَرْضِ إِلَّا عَلَى اللَّهِ رِزْقُهَا وَيَعْلَمُ مُسْتَقَرَّهَا وَمُسْتَوْدَعَهَا كُلٌّ فِي كِتَابٍ مُبِينٍ ۖ﴾

“Dan tidak ada suatu binatang melata pun di bumi melainkan Allah-lah yang memberi rezekinya, dan Dia mengetahui tempat berdiam binatang itu dan tempat penyimpanannya. Semuanya tertulis dalam Kitab yang nyata (Lauh mahfuzh)” (QS. Hud: 6).

Pengetahuan Allah swt. yang menyeluruh sampai pada sesuatu yang terkecil itu menunjukkan bahwa kekuasaan dan nikmat-Nya mencakup semua makhluk *sebab* pengetahuan-Nya bergandengan dengan kekuasaan-Nya. Kata *dabbah* biasa digunakan untuk binatang selain manusia, tetapi makna dasarnya dapat juga mencakup manusia. Memahaminya untuk ayat ini dalam arti lebih umum lebih tepat. Pemilihan kata ini mengandakan bahwa rezeki yang dijamin Allah swt. itu menuntut setiap *dabbah* untuk memfungsikan dirinya sebagaimana namanya, yakni bergerak dan merangkak, yakni tidak tinggal diam menanti rezeki tetapi agar mereka harus bergerak guna memperoleh rezeki yang disediakan Allah swt. itu (Shihab, 2017). Ayat ini mengantarkan manusia untuk berfikir terutama terkait

pelbagai makhluk yang diciptakan di bumi. Sebagaimana terbaca pada surah An-Nahl ayat 13:

وَمَا ذَرَأَ لَكُمْ فِي الْأَرْضِ مُخْتَلِفًا أَلْوَنًا إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَذَّكَّرُونَ ۝ ١٣

“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” (QS. An-Nahl: 13).

Ibnu Katsir (2004) dalam tafsirnya menjelaskan tentang surat an-Nahl ayat 13 bahwa ketika Allah telah mengingatkan tanda-tanda yang ada di langit, Dia mengingatkan atas apa yang Dia ciptakan di bumi. Allah menciptakan benda-benda yang menakjubkan dan pelbagai makhluk hidup, diantaranya binatang-binatang, tumbuh-tumbuhan dengan pelbagai macam warna dan bentuk dengan peran dan manfaat yang berbeda-beda. Atas anugerah dan nikmat Allah, manusia patut bersyukur dari pelajaran yang bisa diambil.

Kata “berlain-lainan macamnya” dalam ayat ini menyatakan bahwa Allah telah menciptakan makhluk hidup di bumi ini dengan pelbagai bentuk dan ukuran, baik mikroskopis maupun makroskopis. Khamir merupakan makhluk mikroskopis yang Allah ciptakan. Karena itu, kajian tentang khamir perlu dilakukan dan selanjutnya dapat dimanfaatkan oleh manusia.

Pemanfaatan khamir terutama dalam bioteknologi telah berkembang luas. Penggunaan khamir dalam proses fermentasi meliputi, *sake*, kecap, *wine* dan beberapa makanan fermentasi. Bidang biokatalisis diantaranya biotransformasi dan *pharmaceutical*. Bidang penelitian dasar biologi, meliputi biologi molekular dan selular, genomik, genom fungsional, dan mekanisme sistem biologi. Hingga bidang biofuel, biokontrol, penelitian biomedik, dan bioteknologi lingkungan

semuanya memanfaatkan peran khamir (Walker, 1998). Pemanfaatan khamir bertujuan untuk mempermudah manusia dalam memproses ataupun mendaur ulang bahan kimia maupun biologi hingga cemaran yang ada di lingkungan. Sehingga dapat meminimalkan potensi negative dan menambah nilai guna serta manfaat bagi manusia.

2.1.2 DNA dalam Islam

Sifat yang menyandi suatu organisme dan bersifat menurun pada keturunannya telah disinggung pada sabda Nabi Muhammad saw. sebagai berikut:

عن أبي هريرة قال جاء رجل من بني فزارة إلى النبي ﷺ فقال إن امرأتي ولدت غلاما أسود. فقال النبي ﷺ هل لك من إبل؟ قال نعم. قال فما ألوانها؟ قال حمر قال هل فيها من أورك؟ قال إن فيها لورقا. قال فأنى أتاه ذلك؟ قال عسى أن يكون نزع عرق قال وهذا عسى أن يكون نزع عرق

“Seorang dari suku Fazarah mendatangi Nabi saw. dan berkata: “Istriku melahirkan seorang anak yang berkulit hitam.” Maka Nabi saw. bertanya: “Apakah engkau memiliki unta?” Dia berkata: “Ya”. Rasul bertanya: ”Apakah warnya-warnanya?” Dia menjawab: ”Coklat”. Nabi bertanya lagi: “Apakah tidak ada yang keabu-abuan? Sungguh di antaranya ada yang keabu-abuan” jawabnya. “Dari mana asalnya” tanya Nabi lagi. Dia menjawab: ”Boleh jadi ‘irq (faktor keturunan).” Nabi saw. bersabda: “Anak itu boleh jadi juga (berkulit hitam) karena faktor keturunan” (HR. Bukhari melalui Abu Hurairah).

Kata al-‘irq dari segi bahasa berarti asal sesuatu. Sabda Nabi ini dalam kamus al-Munjid dijelaskan dengan menyatakan sifat-sifat orang tua menurun kepada anak. Dahulu orang memahami kata tersebut pada hadits ini dalam arti gen dan bahwa yang beliau maksud dengan pesan ini adalah bahwa sifat-sifat orang tua

dapat diwariskan kepada anak-anaknya (Shihab, 2015). Molekul DNA membawa informasi hereditas dari sel. Pengkode materi genetik organisme dalam molekul DNA dikenal dengan gen. Gen adalah unit hereditas suatu organisme hidup (Fatchiyah dkk. 2011). Gen menyediakan instruksi untuk membuat protein spesifik. Akan tetapi, gen tidak membangun protein secara langsung. Jembatan antara DNA dan sintesis protein adalah asam nukleat RNA (Campbell dan Reece, 2008).

Fakta-fakta di atas jika direnungkan secara saksama, pasti mengantar manusia mengakui bahwa dibalik penciptaan dan pengorganisasiannya, pasti ada “tangan” Yang Maha Kuasa lagi Maha Mengetahui. Sebagai manusia yang lemah, tidaklah layak bersikap sombong. Semua yang kita nikmati berupa sehat tidak lain merupakan anugerah Allah swt. yang tidak ternilai harganya. Setiap waktu hingga setiap detiknya, di tubuh manusia berjalan mekanisme regulasi metabolisme yang tidak ada tumpang tindih dan berjalan dengan sistematis.

Hal ini juga kaitannya dengan kehidupan sosial manusia. Seseorang yang memiliki kekayaan yang melimpah, jabatan yang tinggi, pengaruh yang luas harus sadar dan bertanya apakah ia layak menyombongkan dirinya? Pasti seseorang akan sadar bahwa kehidupan sosial yang mapan tidak lepas dari peran dan sumbangsih orang lain. Manusia tidak bisa hidup tanpa bantuan orang lain. Maka dari itu, manusia selayaknya bersyukur apa yang telah didapatkan dan berusaha juga melakukan hubungan dengan sesama yang harmonis.

2.2 Deskripsi Khamir

Khamir dideskripsikan sebagai fungi uniselular. Khamir direpresentasikan sebagai sel dengan reproduksi secara pertunasan (*budding*) atau dengan

pembelahan sel (*fission*). Selama pertunasan, dinding sel dari sel induk mendonorkan dan mengeluarkan bentukan tunas, setelah itu membebaskan sel anakan menjadi individu baru. Beberapa khamir memperlihatkan formasi hifa atau pseudohifa, yang terbuat dari rantai penjuluran tunas (Choudhary dan Johri, 2009). Pembentukan tunas (*budding*) ditandai dengan terjadinya penonjolan atau tunas pada permukaan dinding sel induk. Sementara itu, inti sel induk membelah secara mitosis (Sasmitamihardja dan Siregar, 1990).

Pada umumnya, sel khamir lebih besar dari pada kebanyakan bakteri, tetapi khamir yang paling kecil tidak sebesar bakteri yang terbesar. Khamir sangat beragam ukurannya, berkisar antara 1 sampai 5 μm lebarnya dan panjangnya dari 5 sampai 30 μm atau lebih. Biasanya berbentuk telur, tetapi beberapa ada yang memanjang atau berbentuk bola. Setiap spesies mempunyai bentuk yang khas, namun sekalipun dalam biakan murni terdapat variasi yang luas dalam hal ukuran dan bentuk sel-sel individu, tergantung pada umur dan lingkungannya. Khamir tidak dilengkapi flagellum atau organ-organ penggerak lainnya (Pelczar dan Chan, 2013).

Beberapa fungi termasuk dimorfik (memiliki dua siklus hidup) dan menunjukkan sebuah siklus khamir yang mengalami perubahan pada pertumbuhan miselia dibawah kondisi kultur. Khamir termasuk fungi dengan reproduksi seksual (khamir basidiomycetous dan khamir ascomycetous) dan juga reproduksi aseksual. Basidiomycetous khamir dapat dibedakan dari ascomycetous khamir berdasarkan tes urease. Basidiomycetes dikelompokkan menjadi tiga subkelas, meliputi: Hymenomycetes (bentukan jamur basidiomycetes), Urediniomycetes (*rusts*), dan Ustilaginomycetes (*smuts*). Beberapa anggota

basidiomycetous tumbuh pada kultur dengan sel tunas (Choudhary dan Johri, 2009).

2.3 Taksonomi Khamir

Khamir merupakan organisme eukariota uniselular yang secara taksonomi termasuk dalam kingdom Eumycota. Spesies-spesies khamir dapat ditemukan dalam filum Ascomycota maupun Basidiomycota (Dufour *et al.* 2003). Khamir yang tersebar dalam filum Ascomycota dan Basidiomycota terdiri atas khamir teleomorfik dan anamorfik (Querol dan Fleet, 2006). Satu individu khamir dapat ditemukan berada pada fase reproduksi seksual maupun pada fase reproduksi aseksual (Alexopoulos *et al.* 1996). Khamir yang ditemukan berada pada fase reproduksi seksualnya disebut khamir teleomorfik sedangkan khamir yang berada pada fase reproduksi aseksualnya disebut khamir anamorfik. Pemberian nama genus dalam taksonomi khamir berdasarkan pada fase reproduksi yang ditemukan, yaitu teleomorfik atau anamorfik (Yarrow, 1998). Contoh khamir anamorfik adalah *Candida*, yang apabila ditemukan fase seksualnya diberi nama teleomorfik *Pichia* atau *Metschnikowia* (Boekhout *et al.* 1998; Kurtzman dan Fell, 1998).

Khamir basidiomycetous telah dibagi ke dalam garis keturunan yang berbeda berdasarkan analisis daerah yang berbeda dari rDNA, empat klaster utama berdasarkan 26S rDNA (Sporidiales, Tremellales, Filobasidiales dan terdapat hubungan dengan taksa Ustilaginales (Fell *et al.* 1995); dan tiga garis keturunan utama berdasarkan 18S rDNA atau daerah D1/D2 dari subunit rDNA (Ustilaginomycetes, Hymenomycetes dan Urediniomycetes) (Fell *et al.* 2000). Sedangkan menurut Prescott (1975) bahwa khamir dikelompokkan ke dalam 3

kelas utama fungi, yaitu ascomycetes, basidiomycetes dan deuteromycetes seperti yang disajikan pada tabel 2.1 dibawah ini.

Tabel 2.1 Daftar Genus Khamir yang Menunjukkan Hubungan Taksonomi pada Kelas Utama Fungi (Prescott, 1975).

Kelas Fungi	Genus Khamir
Ascomycetes	<i>Citeromyces, Hanseniaspora, Debaryomyces, Endomycopsis, Dekkera, Hansenula, Lipomyces, Kluyveromyces, Lodderomyces, Nadsonia, Metschnikowia, Nematospora, Pichia, Pachysolen, Saccharomyces, Saccharomycodes, Schizosaccharomyces, Wickerhamia, Schwanniomyces, Wingea, Saccharomycopsis.</i>
Basidiomycetes	<i>Bullera, Rhodosporidium, Sporobolomyces, Leucosporidium, Sporidiobolus.</i>
Deuteromycetes (fungi imperfecti)	<i>Schizoblastosporion, Brettanomyces, Torulopsis, Candida, Kloeckera, Pityrosporum, Rhodotorula, Oosporidium, Sterigmatomyces, Trichosporon, Trigonopsis, Cryptococcus.</i>

Kelas ascomycetes untuk anggota family Saccharomycetaceae kebanyakan hidup sebagai saprofit pada substrat yang mengandung gula, misalnya buah-buahan yang membusuk atau buah-buahan yang masak, madu atau cairan gula yang dihasilkan tumbuhan, juga ditemukan pada tanah yang banyak mengandung humus dan pada air susu. Beberapa spesies hidup parasit pada tumbuhan dan hewan. Struktur talus vegetatif tidak tersusun dari hifa, tapi merupakan sel tunggal yang berangkai membentuk pseudomiselium (miselium palsu). Bentuk sel bersifat polimorfik yaitu banyak bentuk (berubah-ubah bentuk) tergantung keadaan medium tempat tumbuhnya (Sulisetijono, 2015).

Basidiomycota dibedakan menjadi tiga kelas, yaitu Holobasidiomycetes, Phragmobasidiomycetes dan Teliomycetes. Hal ini berbeda pada pengklasifikasian Prescott (1975) bahwa adanya kelas Basidiomycetes (tabel 2.1). Divisi basidiomycota dibagi menjadi dua kelas berdasarkan basidiumnya, yaitu

Homobasidiomycetes (Holobasidiomycetes), basidium terdiri dari satu sel; dan kelas Heterobasidiomycetes (Phragmobasidiomycetes), basidium bersekat yang terbagi menjadi empat sel (Sulisetijono, 2015).

Deuteromycetes adalah fungi yang umum terdapat di lingkungan. Banyak yang menyebabkan penyakit pada tanaman, menyebabkan pembusukan makanan dan banyak yang dapat melakukan biodegradasi. Sebagian besar dari sekitar 8000 spesies kelas ini adalah pathogen pada tanaman bernilai ekonomi, misalnya spesies dari genus *Septoria* menyerang tanaman seledri, azalea, gladiola dan gandum (Roosheroe, 2006). Tubuh dari jamur imperfekti ini berbentuk hifa septat (dinding pemisah). Reproduksi aseksualnya membentuk konidia dan reproduksi seksual belum diketahui (Sulisetijono, 2015).

2.4 Diversitas dan Ekologi Khamir

Sifat uniselular dari khamir membuat mereka lebih cocok pada substrat cair atau basah. Oleh karena itu, khamir tumbuh secara khas pada lingkungan basah karena adanya suplai berlimpah larutan nutrisi seperti glukosa dan asam amino. Basidiomycetous khamir terdistribusi secara luas pada varietas substrat meliputi kulit dan kayu angiospermae, susunan bunga ditangkai yang sudah mati dan jamur (Mc Laughlin *et al.* 2004).

Khamir dikarakteristikan dengan persebaran yang luas pada habitat alaminya. Umumnya pada daun tumbuhan dan bunga. Khamir ditemukan pada perairan dan daratan yang berbeda, dan juga pada habitat yang terisolasi. Mereka juga ditemukan berasosiasi dengan tubuh hewan sebagai komensalisme pada alat pencernaan (Lachance dan Starmer, 1998). Tipe nutrisi tanah menentukan khamir mikrobunga meskipun beberapa bentuk khamir tinggal permanen di tanah,

misalnya spesies *Cryptococcus*, *Rhodotorula* dan spesies *Sporobolomyces* (Spencer dan Spencer, 1997 ; Lachance dan Starmer, 1998).

Distribusi spesies khamir pada pelbagai mata air memberikan jenis yang bervariasi dari beberapa sel per ml pada air bersih hingga lebih dari jutaan sel per ml pada anak sungai. Pada air tercemar jumlah khamir mengalami peningkatan proporsi dengan tingkat polusi yang terjadi (Lachance dan Starmer, 1998). Beberapa, seperti khamir merah telah digunakan sebagai indek pencemaran. Spesies perairan dari basidiomycetous yang umum ditemukan meliputi spesies *Cryptococcus*, *Rhodotorula* dan *Sporobolomyces* (Hagler, 1987).

Habitat khamir seringkali melimpah pada karbon organik sederhana, terkadang sangat tinggi pada embunan, asam atau adakalanya alkalin. Diversitas pada tipe habitat ini menunjukkan bahwa khamir mampu tumbuh secara luas. Karakteristik ini memungkinkan untuk memprediksi distribusi mereka; bagaimanapun, spesies baru khamir diisolasi dari habitat yang berbeda dengan seleksi alam yang terjadi di lingkungan. Pengamatan kesamaan dan perbedaan khamir yang ditemukan di lingkungan memerankan peran penting pada perkembangan evolusi (Spencer dan Spencer, 1997).

2.5 Identifikasi Khamir

Identifikasi adalah membandingkan isolat yang belum diketahui dengan taksa yang sudah ada untuk menetapkan identitasnya (Barnett *et al.* 1983). Beberapa manfaat identifikasi khamir antara lain adalah mengetahui keanekaragaman spesies di alam (Lachance dan Starmer 1998), mempelajari hubungan kekerabatan, membantu diagnosis medis, mengetahui khamir yang terlibat dalam

industri makanan dan minuman serta mendeteksi kontaminan (Kurtzman, 1990; Barnett *et al.* 1983; Ciardo *et al.* 2006).

2.5.1 Identifikasi Konvensional

Spesies fungi sebagian besar (termasuk khamir) dideskripsikan secara konvensional berdasarkan morfologi. Salah satu karakter morfologi adalah penampakan makroskopik koloni (Kurtzman *et al.* 2003). Penampakan makroskopik dapat diamati dari morfologi koloni, meliputi bentuk, tekstur, warna, permukaan, dan elevasi (Suryaningsih *et al.* 2018). Sedangkan, karakter mikroskopik yang meliputi bentuk sel, tipe pertunasan, ukuran sel, keberadaan miselium palsu atau sejati, dan tipe reproduksi seksual atau aseksual (Yarrow, 1998).

Sifat fisiologis terutama berfungsi untuk menggambarkan dan mengidentifikasi spesies khamir dan, pada tingkat yang sangat kecil, genus. Tes yang paling banyak digunakan untuk tujuan identifikasi rutin adalah fermentasi dan pertumbuhan pada sumber karbon, pertumbuhan pada sumber nitrogen, kebutuhan akan vitamin, pertumbuhan pada pelbagai suhu dan media dengan kandungan gula atau natrium klorida yang tinggi, hidrolisis urea, dan resistensi terhadap antibiotik. Tidak ada metode standar tunggal untuk banyak tes ini. Hasil tes tersebut sering bergantung pada teknik yang digunakan, oleh karena itu prosedur mana yang dipilih, seharusnya dipatuhi dengan cermat dan pertumbuhan kultur muda yang cepat digunakan sebagai inokulum (Kurtzman dan Fell, 1998). Identifikasi konvensional berdasarkan morfologi, biokimia maupun fisiologi memerlukan waktu pengerjaan yang lama dan dapat menimbulkan kesalahan identifikasi terutama pada spesies yang berkerabat dekat (Geiser, 2004). Seiring

dengan adanya kemajuan ilmu pengetahuan, untuk mengidentifikasi khamir dengan mudah, efisien, dan akurat maka dikembangkan metode identifikasi secara molekular (Fell *et al.* 2000).

2.5.2 Identifikasi Molekular

Karakterisasi sekuens DNA yang merupakan strain spesifik memungkinkan studi tentang distribusi biotip pada komunitas khamir. Pendekatan ini telah digunakan untuk mempelajari populasi khamir alami, dan juga perhatian besar dalam kontrol implantasi dan kontaminasi strain khamir komersial pada fermentasi industri. Strategi paling sederhana adalah produksi strain-spesifik elektroforegram dengan restriksi endonuklease DNA genom utuh. Ini telah digunakan oleh Lachance *et al.* (1990) untuk mempelajari penyebaran khamir kaktofilik, *Clavispora opuntiae*. Hal itu dan banyak spesies lainnya, pengulangan berurutan DNA ribosomal hadir pada tiap akses elektroforesis agarose yang sederhana dari proses restriksi menghasilkan pola pita rDNA yang jelas terhadap sekuens lainnya. Pola ini dapat digunakan sebagai penanda atau pengubahan menjadi peta kluster gen. Sebagian besar variasi disebabkan oleh jarak polimorfisme (Lachance dan Starmer, 1998).

Identifikasi berdasarkan karakter molekular dapat digunakan untuk mengidentifikasi khamir hingga tingkat spesies (Van der Vossen *et al.* 2003). Metode identifikasi khamir secara molekular yang umum digunakan dan terbukti akurat untuk mengidentifikasi hingga tingkat spesies adalah metode sekuensing DNA (Kurtzman dan Fell, 2006). Fell *et al.* (2000) melaporkan penggunaan analisis sekuens DNA untuk identifikasi khamir-khamir anggota Basidiomycota hingga tingkat spesies.

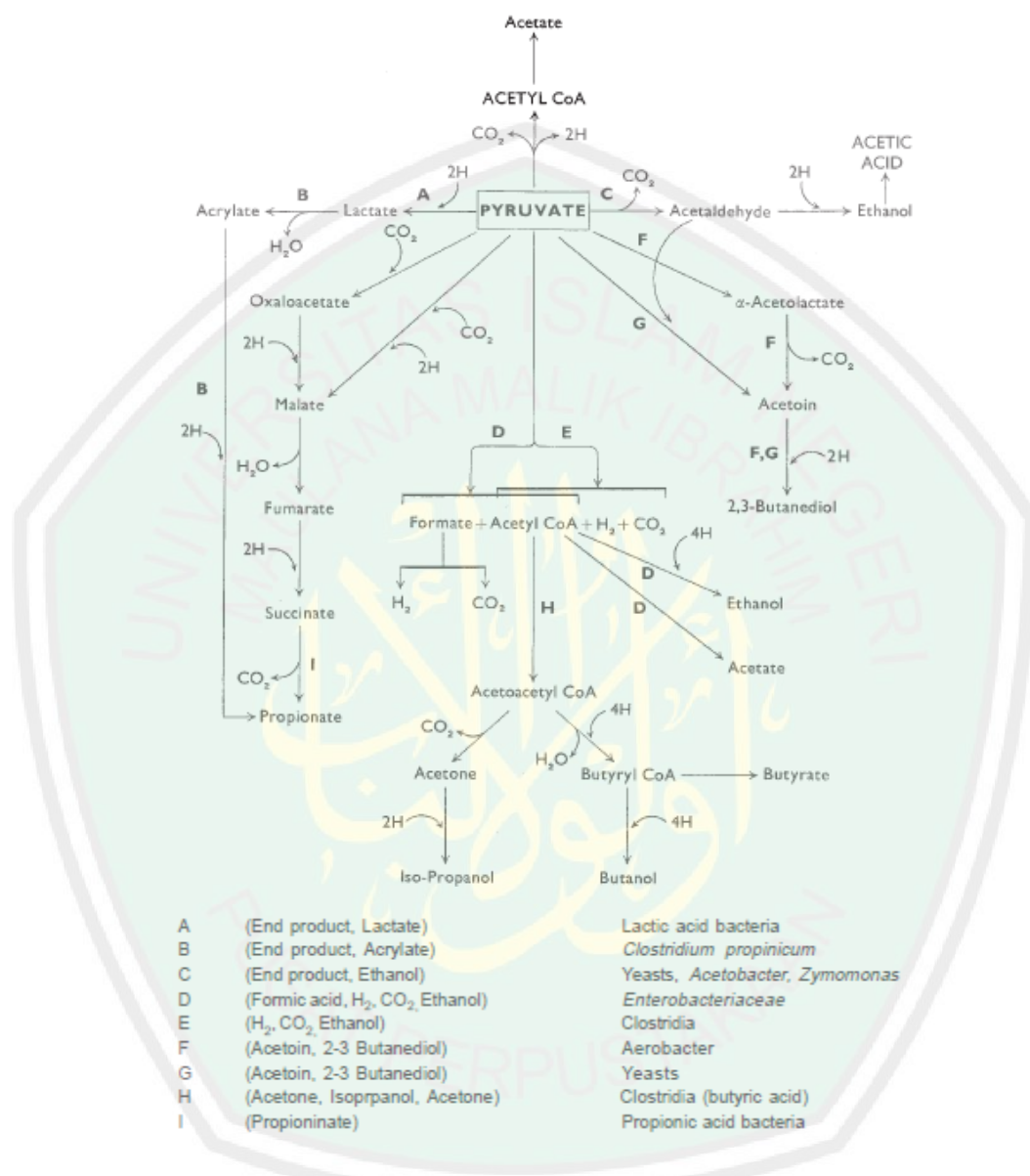
2.6 Fermentasi Karbohidrat

Fermentasi adalah proses penghasil energy utama dari pelbagai mikroorganismenya. Mikroorganismenya seperti itu disebut anaerob, karena mereka mampu hidup dan memecah senyawa organik tanpa oksigen. Beberapa dari organismenya tersebut akan mati jika didedahkan dengan oksigen. Dalam hal ini mereka disebut anaerob fakultatif. Contoh terbaik organismenya yang melakukan fermentasi adalah khamir atau ragi. Ragi termasuk anaerob fakultatif, yaitu mereka dapat hidup dengan atau tanpa oksigen (Sasmitamihardja dan Siregar, 1990).

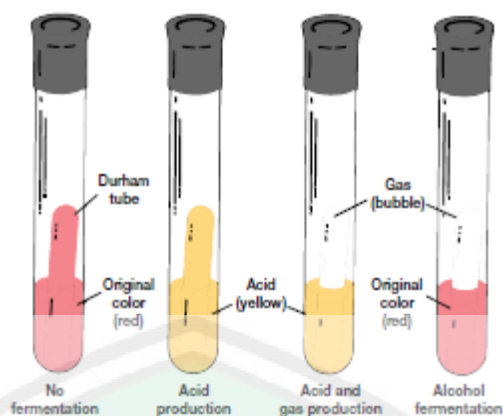
Meskipun hanya etanol dan CO_2 yang disebutkan sebagai hasil tambahan fermentasi, tetapi masih terdapat hasil-hasil lain yang dibentuk melalui proses fermentasi. Misalnya, asam laktat adalah hasil tambahan fermentasi glukosa oleh bakteri asam laktat. Proses ini dikenal sebagai penyebab menjadi asamnya susu. Pada fermentasi asam laktat, yang dibentuk dari piruvat adalah asam laktat. Enzim yang mengkatalisis reaksi itu adalah asam laktat dehidrogenase (Sasmitamihardja dan Siregar, 1990). Produk fermentasi piruvat yang diproses oleh mikroorganismenya yang berbeda dapat dilihat pada gambar 2.1.

Fermentasi karbohidrat oleh khamir menghasilkan produk berupa gas, etanol dan asam asetat (gambar 2.1). Gas-gas yang dihasilkan selama proses fermentasi dapat dideteksi dengan menggunakan sebuah tabung kecil-terbalik disebut tabung Durham (dinamai Herbert Edward Durham, ilmuwan bakteriologi dari Inggris, 1866 – 1945), dalam media kultur cair. Setelah menambahkan sejumlah substrat, tabung Durham dimasukkan ke dalam masing-masing tabung kultur. Selama proses sterilisasi (*autoclaving*), udara keluar dari tabung Durham sehingga

menjadi penuh dengan media. Jika dihasilkan gas dalam proses fermentasi, media cair yang berada di dalam tabung Durham akan keluar, dan gas dalam bentuk gelembung akan terperangkap dalam tabung Durham (gambar 2.2).

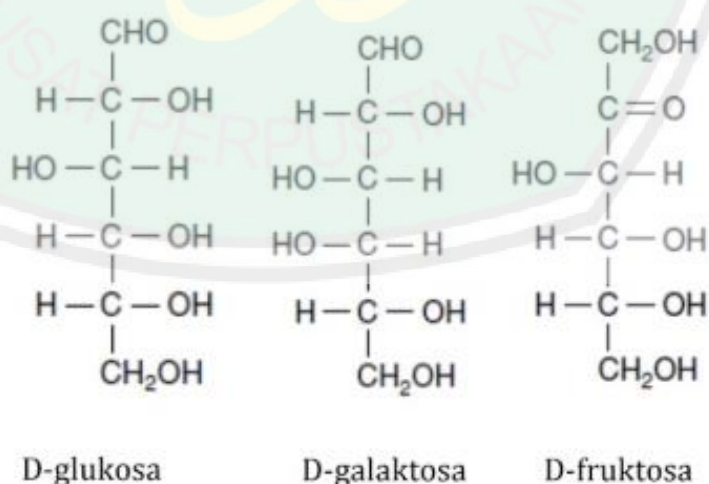


Gambar 2.1 Produk fermentasi piruvat yang diproses oleh mikroorganisme yang berbeda (Okafor, 2007).



Gambar 2.2 Fermentasi karbohidrat dari mikrorganisme dengan pewarna indikator *fuchsin* (Harley dan Prescott, 2002).

Jenis karbohidrat yang digunakan pada penelitian ini dari golongan monosakarida, meliputi glukosa, fruktosa dan galaktosa. Glukosa, fruktosa dan galaktosa termasuk kelompok heksosa, yaitu monosakarida yang memiliki 6 atom C. Berdasarkan gugus karbonilnya, glukosa dan galaktosa termasuk golongan aldosa. Aldosa mempunyai gugus karbonil terminal O=CH yang disebut gugus aldehid. Sedangkan fruktosa termasuk golongan ketosa. Ketosa mempunyai gugus karbonil C=O ditengah-tengah yang berikatan dengan atom karbon lainnya, yang disebut gugus keton (Firani, 2017).



Gambar 2.3 Struktur Kimia D-Glukosa, D-Galaktosa dan D-Fruktosa

2.7 Analisis Daerah *Internal Transcribed Spacer (ITS)* rDNA Khamir

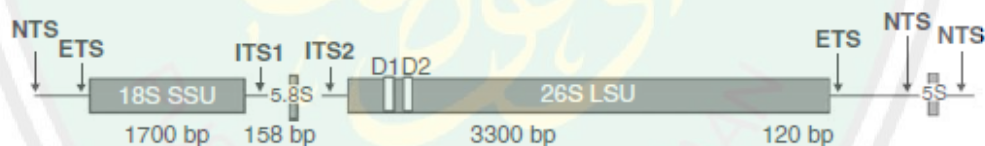
Daerah yang digunakan untuk identifikasi khamir hingga tingkat spesies adalah daerah *ITS* dan D1/D2 gen LSU (Kurtzman dan Fell, 1998). Daerah D1/D2 adalah daerah sepanjang 600 nukleotida dari ujung 5' gen LSU rDNA (James dan Stratford, 2003). Menurut Daniel dan Meyer (2003), analisis sekuen daerah D1/D2 gen LSU rDNA dapat digunakan untuk mengidentifikasi khamir hingga tingkat spesies karena umumnya pada spesies khamir yang berbeda, sekuen daerah tersebut bervariasi. Namun demikian, sekuen D1/D2 LSU yang identik ditemukan pada beberapa spesies yang berkerabat dekat sehingga analisis daerah D1/D2 LSU tidak dapat digunakan untuk membedakan spesies-spesies tersebut (Fell *et al.* 2000). Sebagai contoh adalah *C. fukuyamaensis* dan *C. guilliermondii* yang memiliki sekuen daerah D1/D2 LSU yang identik (Bai *et al.* 2000).

Ribosomal DNA adalah suatu daerah dalam nuklear DNA yang mengkode ribosom. Ribosom merupakan organel sel yang berperan dalam sintesis protein dan terdiri dari subunit kecil (18S) dan subunit besar (28S). Daerah non-coding (*ITS1* dan *ITS2*) dan gen 5,8S rDNA merupakan urutan nukleotida rDNA (Articus, 2004). Struktur dari daerah ribosomal DNA dapat dilihat pada gambar 2.4.

Daerah *ITS* terdiri atas *ITS1* dan *ITS2* yang dipisahkan oleh gen 5,8S. Daerah tersebut pada khamir umumnya berukuran 300-900 pb (Fujita *et al.* 2001). Variasi sekuen yang lebih tinggi dari daerah D1/D2 LSU dimiliki oleh daerah *ITS* karena daerah tersebut merupakan daerah *non-coding* yang memiliki laju mutasi lebih tinggi dari daerah *coding* (SSU dan LSU) (James *et al.* 1996). Oleh karena itu, analisis sekuen daerah *ITS* dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies-

spesies yang berkerabat dekat (Ciardo *et al.* 2006; Esteve-Zarzoso *et al.* 1999). Sebagai contoh, Tavanti *et al.* (2005) melaporkan dua spesies baru yaitu *C. orthopsilosis* dan *C. metapsilosis* yang dibedakan dari *C. parapsilosis* berdasarkan analisis sekuen daerah *ITS*. Kedua spesies tersebut sebelumnya diidentifikasi sebagai *C. parapsilosis* kelompok I dan II karena memiliki sekuen D1/D2 LSU yang identik dengan *C. parapsilosis*.

Konsep spesies khamir berdasarkan sekuen DNA dilaporkan oleh Price *et al.* (1978). Strain-strain khamir merupakan satu anggota spesies yang sama apabila memiliki persentase kekerabatan DNA berdasarkan hibridisasi DNA genom sebesar 80% ke atas (Price *et al.* 1978). Persentase kekerabatan memberikan perkiraan dari kesamaan genom keseluruhan antara dua organisme, akan tetapi teknik ini tidak mendeteksi perbedaan ploidi gen tunggal atau multipel, meskipun aneuploidi terkadang dapat dideteksi (Vaughan-Martin dan Kurtzman, 1985).



Gambar 2.4 Struktur daerah ribosomal DNA (Fernández-Espinar *et al.* 2002).

Sugita *et al.* (1999) melaporkan bahwa isolat-isolat khamir yang memiliki persentase DNA relatedness sebesar 80--100%, ternyata memiliki homologi sekuen daerah *ITS* yang tinggi (99-100%). Oleh karena itu, analisis sekuen *ITS* dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies khamir. Menurut Sugita *et al.* (1999), dua isolat khamir merupakan satu spesies yang sama apabila memiliki persentasi atau tingkat homologi sekuen daerah *ITS* sebesar 99--100%. Sekuen

daerah *ITS* khamir dapat diakses dengan mudah pada database DNA internasional. Sebagai contoh adalah *yeast genome project* (YGP), *national center for biotechnology information* (NCBI), dan *DNA data bank of Japan* (DDBJ) (Boundy-Mills, 2006).

2.8 Tinjauan tentang Apel (*Malus sylvestris* Mill) dan Klasifikasinya

Sejarah mencatat, bahwa tidak ada seorang yang mengetahui dengan tepat kapan orang mulai mengonsumsi buah apel. Penemuan fosil di sebuah danau di Swiss sering dijadikan patokan bahwa sejak berabad-abad yang lalu apel sudah dikenal. Namun, para arkeolog memperkirakan manusia sudah mengonsumsi apel sejak 6500 tahun sebelum masehi. Penyebaran tanaman ini dilakukan oleh tentara-tentara Romawi ketika mengadakan invasi dan penjelajahan ke pelbagai penjuru dunia (Yulianti dkk. 2015).



Gambar 2.5 Pohon Apel (*Malus sylvestris* Mill) (Dokumen pribadi, 2018).

Pohon apel (*Malus sylvestris* Mill) merupakan jenis pohon yang kecil, berdaun gugur. Tingginya 3-12 meter, dengan tajuk yang lebar dan beranting (Gambar 2.2). Daun-daunnya berbentuk lonjong dengan panjang 5-12 cm dan lebar 3-6 cm. Pada bunga, terdapat lima kelopak, dengan diameter 2,5 hingga 3,5 cm. Berbunga putih dengan kombinasi merah jambu yang berangsur pudar (Gambar 2.6). Buahnya masak pada musim gugur, dan umumnya berdiameter 5-9 cm. Inti buah apel memiliki lima ginosisium yang tersusun seperti bintang lima mata, masing-masing berisi satu hingga tiga biji (Nurchayati, 2014).

Klasifikasi tanaman apel (*Malus sylvestris* Mill) sebagai berikut (Kik *et al.* 2013):

Kingdom: Plantae

Filum: Tracheophyta

Kelas: Magnoliopsida

Ordo: Rosales

Famili: Rosaceae

Genus: *Malus*

Spesies: *Malus sylvestris* Mill



Gambar 2.6 Struktur bunga apel (*Malus sylvestris* Mill) (Sheffield *et al.* 2005)

Apel (*Malus sylvestris* Mill) dikenal dan dijumpai di beberapa negara di dunia. Lebih dari 25 varietas apel terdapat di Amerika. Jumlah ini belum ditambahkan dengan jenis apel yang berasal dari Asia. Bahkan, sebuah catatan Departemen Pertanian Amerika melaporkan, varietas apel yang tumbuh di seluruh dunia ada ± 7000 jenis, baik dari hasil persilangan maupun jenis yang tumbuh liar di hutan. Namun, dari sekian banyak varietas hanya beberapa yang menguasai pasaran lokal. Di antara jenis apel familiar di Kota Malang adalah apel ana, apel manalagi, dan *rome beauty* (Yulianti dkk. 2015).

2.9 Penelitian Isolasi Khamir dari Tumbuhan Apel (*Malus sylvestris* Mill)

Penelitian sebelumnya secara *in vitro* menunjukkan bahwa penambahan ampas apel terfermentasi pada proses fermentasi ruminal jerami menambah viabilitas jumlah khamir dan konsentrasi asam laktat pada medium ruminal selama 24 jam (Castillo *et al.* 2015). Penelitian yang dilakukan Castillo *et al.* (2016), telah berhasil mengisolasi 16 strain baru khamir dan diidentifikasi menggunakan fermentasi ruminal *in vitro* dari ampas apel terfermentasi yang dikombinasikan dengan jerami. 16 strain khamir tersebut meliputi *C. norvegensis*, *I. orientalis*, *C. albicans*, *I. occidentalis*, *I. scutulata*, *I. terricola*, *C. xestobii*, *P. membranefaciens*, *C. rugopelliculosa*, *C. carpophila*, *C. fermentati*, *C. dubliniensis*, *C. viswanathii*, *P. nakasei* dan *S. cerevisiae*. Strain *C. norvegensis* menunjukkan level produksi gas tertinggi pada pengujian *in vitro* dengan jerami dan gandum. Sehingga strain ini berperan meningkatkan pencernaan ruminal daripada strain lainnya.

Teixidó *et al.* (1999) menguji komunitas khamir dari tahapan perkembangan apel “*golden delicious*” yang berbeda (tunas hingga buah) dan ditemukan

kelompok khamir yang berwarna putih meliputi *Debaryomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* spp, dan *Cryptococcus*, sebagai yang dominan, sedangkan khamir yang berwarna merah pada genus *Rhodotorula* dan *Sporobolomyces* sebagai yang resesif atau rendah. Sementara itu, penelitian yang dilakukan *Vadkertiováet al.* (2012) telah berhasil mengisolasi pelbagai spesies khamir yang berbeda dari bunga dan buah apel. Spesies yang berhasil diisolasi dari sampel bunga apel meliputi *Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida boidinii*, *Barnettozyma californica*, dan *Aureobasidium pullulans*. Sedangkan spesies yang berhasil diisolasi dari sampel buah apel meliputi *Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus* sp., *Galactomyces candidus*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia membranifaciens*, *Saccharomycopsis crataegensis*, dan *Wickerhamomyces anomalus*.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi dan deskriptif kualitatif. Sampel penelitian adalah khamir hasil isolasi dari bunga apel di Kebun Apel Dusun Junggo, Desa Tulungrejo, Batu. Lokasi pengambilan sampel bunga dilakukan secara *simple random sampling*, dimana pengambilan sampel dilakukan secara acak untuk memberikan kesempatan yang sama bagi setiap anggota populasi untuk menjadi sampel penelitian.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari-November 2018. Pengambilan sampel bunga apel (*Malus sylvestris* Mill) dilakukan di Kebun Apel Dusun Junggo, Desa Tulungrejo, Batu. Identifikasi morfologi khamir dilakukan di laboratorium Mikrobiologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Isolasi DNA, uji kualitatif dan kuantitatif DNA dan PCR dilakukan di laboratorium Biologi Molekular Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Proses *sequencing* dilakukan oleh Bioneer, Korea.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, mikropipet, erlenmeyer, autoklaf, beaker glass, gelas ukur, *hot plate and stirer*, bunsen, inkubator, *Laminar Air Flow* (LAF), timbangan analitik, *microcentrifuge tube*, *vortex*, *centrifuge*, *blue tip*, *yellow tip*, tabung durham, tusuk gigi, tisu, plastik wrap, aluminium foil, mikroskop, lemari es, *Polymerase Chain Reaction* (PCR),

ice box, PCR *tube*, sendok, ose segitiga, perangkat elektroforesis, mikroskop cahaya Nikon Eclipse E200, mikroskop computer binokuler Nikon SMZ-1500, objek dan *deck glass*, UV transluminator, komputer.

3.3.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga apel (*Malus sylvestris* Mill) varietas manalagi dan anna. Media yang digunakan, *Yeast Media* (YM), *Sodium DL-Lactate*, *Yeast Malt Extract Agar* (YMEA), aquades, pewarna *Ethidium Bromide* (EtBr), NaCl, phenol, kloroform, ddH₂O, jenis monosakarida (glukosa, fruktosa dan galaktosa), pepton, asam *fuchsin*, NaOH, *meat extract*, pewarna *methylene blue*, etanol absolut, TE (Tris-EDTA) *buffer* pH 8, isopropanol, SDS, EDTA, PCR *buffer*, *Taq* DNA polymerase, primer *forward* ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3').

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan Media

3.4.1.1 *Yeast Malt Extract Agar* (YMEA)

Media YMEA dibuat mengikuti James *et al* (1996). Sebanyak 3 gr ekstrak khamir, 3 gr ekstrak malt, 5 gr pepton, 10 gr glukosa; pH 5.5 pada suhu 24°C dan 20 gr agar dilarutkan ke dalam akuades hingga volume akhir mencapai 1.000 ml. Larutan tersebut dipanaskan sambil diaduk hingga homogen dan mendidih. Media yang telah homogen dan mendidih lalu disterilisasi di dalam autoklaf bersuhu 121° C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Media YMEA yang sudah steril ditambah antibiotik *sodium DL-Lactate* sebanyak 120 µl pada saat suhu media mencapai 40-50° C. Media yang berisi *sodium DL-Lactate* digoyang perlahan hingga *sodium DL-Lactate* larut. Media

tersebut kemudian dituang ke beberapa cawan petri steril sebanyak 20 ml per petri dan dibiarkan hingga memadat.

3.4.1.2 Yeast Extract-Malt Broth (YMB)

Pembuatan media YMB berdasarkan (Yarrow, 1998). Sebanyak 3 g ekstrak khamir, 5 g pepton, 3 g ekstrak malt dan 10 g glukosa dilarutkan ke dalam akuades hingga volume akhir mencapai 1.000 ml. Campuran tersebut dipanaskan sambil diaduk hingga homogen dan mendidih. Media YMB yang telah homogen dan mendidih dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml. Tabung reaksi yang berisi media disterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121° C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Setelah sterilisasi, media YMB ditambah antibiotic *sodium DL-Lactate* sebanyak 120 µl.

3.4.2 Prosedur Isolasi Khamir

Untuk skrinning dan isolasi khamir, beberapa sampel bunga apel didapatkan dari Kebun Apel Dusun Junggo, Desa Tulungrejo, Batu yang digunakan sebagai inokulum pada media isolasi. Sampel bunga apel (*Malus sylvestris* Mill) ditimbang sebanyak ±8 gr dan diinkubasi pada media cair YM 50 ml. Untuk mencegah pertumbuhan bakteri, ditambahkan *Sodium DL-Lactate* 120µl per 1L media cair YM. Inkubasi bunga apel dilakukan pada suhu ruang (±25⁰C) selama 3 hari.

Isolat selanjutnya diambil dengan mikropipet steril sebanyak 20µl dan ditumbuhkan pada media agar YME dan diinkubasi pada suhu 25⁰C hingga tumbuh koloni khamir (2-3 hari). Kemudian dilakukan purifikasi dengan pengulangan *streak* koloni pada media agar YME (Watanabe *et al.* 2016).

Pemilihan koloni berdasarkan koloni yang terpisah (Kanti, 2004) untuk selanjutnya diidentifikasi morfologi, biokimia hingga molekular.

3.4.3 Pengamatan Morfologi Makroskopik Khamir

Pengamatan morfologi makroskopik dilakukan pada koloni khamir berdasarkan Yarrow (1998) dengan ciri-ciri yang diamati yaitu bentuk, warna, tekstur, tepian dan permukaan koloni (elevasi). Pengamatan dilakukan pada biakan berumur 48 jam atau lebih yang ditumbuhkan dalam media YMEA pada suhu ruang (20-25°C). Pengamatan morfologi koloni khamir dengan menggunakan mikroskop komputer binokuler Nikon SMZ-1500.

3.4.4 Pengamatan Morfologi Mikroskopik Khamir

Pengamatan morfologi secara mikroskopik dilakukan pada sel khamir berdasarkan Yarrow (1998). Ciri-ciri yang diamati secara mikroskopis sel khamir meliputi bentuk sel, reproduksi vegetatif, ukuran sel ada dan tidaknya pseudohifa dan hifa sejati, serta reproduksi seksual. Pengamatan morfologi sel khamir dilakukan dengan menggunakan pewarnaan *methylene blue* diteteskan di atas *object glass* dan diamati di bawah mikroskop cahaya Nikon Eclipse E200.

3.4.5 Identifikasi Secara Biokimia

3.4.5.1 Uji Kemampuan Isolat Khamir dari Bunga Apel dalam Fermentasi Karbohidrat (Harley dan Prescott, 2002)

a) Preparasi larutan karbohidrat

Tambahkan karbohidrat sebanyak 10 gr ke dalam aquades hingga volume 100 mL. Gula yang digunakan adalah glukosa, fruktosa dan galaktosa. Aduk hingga homogen.

b) Preparasi media

Tambahkan semua bahan, yaitu 10 gr pepton, 5 gr NaCl, 3 gr *meat extract*, 10 mL *Andrade's indicator* (asam fuchsin 0,1 gr dan NaOH (1 N) per 100 mL) pada aquades hingga volume 1 L. Aduk hingga homogen. Selanjutnya dipanaskan hingga mendidih. Media sebanyak 10 mL dituang pada tiap tabung reaksi beserta tabung Durham. Sterilisasi selama 15 menit. Kemudian dinginkan hingga suhu 25⁰C. Tambahkan 0,5 mL larutan karbohidrat steril pada tiap tabung.

Uji dilakukan selama 7 hari dengan 3 kali ulangan pada setiap sampel isolat khamir. Uji fermentasi akan menunjukkan hasil positif apabila terdapat gelembung pada tabung Durham dan indikator untuk mengetahui adanya produksi asam ditandai dengan perubahan warna dari kemerahan menjadi kekuningan pada media fermentasi. Uji dilakukan dengan melakukan tiga ulangan.

3.4.5.2 Uji Pertumbuhan pada Media *Glucose Peptone Yeast Extract Agar* (GPY agar) Konsentrasi Gula 50%

Satu ose isolat diinokulasikan pada media *Glucose Yeast Peptone* dengan kadar gula 50% dan diamati pertumbuhannya selama 24–48 jam pada suhu ruang. Uji dilakukan dengan melakukan 2 ulangan (duplo) (Kurtzman dan Fell, 2006).

3.4.6 Teknik Molekular

3.4.6.1 Isolasi DNA Genom dari Isolat Khamir

Isolasi DNA genom mengikuti metode Hamby *et al.* (2012) dengan beberapa modifikasi. Sebanyak 1 µL koloni khamir yang berumur 2 x 24 jam dihomogenisasi pada PCR tube yang berisi 50 µL NFW (*nuclease free water*) dan 20 µL reagen SNET (0,3% SDS; 400 mM NaCl; 5 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl). Ekstraksi dilakukan dengan metode pemanasan pada suhu 98⁰ C selama 10 menit

pada waterbath. Setelah dipanaskan, campuran PCR tube dihomogenasi dan bagian supernatan diambil untuk *template* saat PCR.

3.4.6.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Amplifikasi daerah *ITS* rDNA dilakukan dengan pembuatan PCR mix dengan volume 25 μL , yang terdiri dari DNA *template* sebanyak 1 μL , primer *forward* dan primer *reverse* masing-masing 0,5 μL dengan konsentrasi 10 pmol; 10,5 μL NFW dan 12,5 μL *GoTaq Green Master Mix* (Promega). Primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah *ITS1* (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') sebagai *forward primer*. Proses PCR diawali dengan predenaturasi pada suhu 95° C selama 2 menit, kemudian dilanjutkan dengan 40 siklus yang meliputi denaturasi pada 95° C selama 15 detik; annealing pada suhu 58° C selama 30 detik; dan ekstensi pada suhu 68° C selama 1 menit. Proses ekstensi akhir berlangsung pada suhu 68° C selama 10 menit 40 detik. Produk PCR kemudian disimpan di dalam lemari es pada suhu 5-10° C.

3.4.6.3 Elektroforesis Gel Agarosa

Pembuatan gel agarosa berdasarkan Sambrook dan Russel (2001). Produk PCR sebanyak 5 μl ditambahkan dengan 1 μl *loading dye* lalu dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 2%. Gel agarosa dalam keadaan terendam buffer TAE 1x (*Tris Acetate EDTA*) pH 8,3. Arus listrik 100 V selanjutnya dialirkan menuju katoda selama 25 menit. Gel kemudian direndam dalam larutan EtBr 1% (b/v) selama 20 menit. Gel kemudian dimasukkan ke dalam transluminator pada alat *gel documentation* (gel doc). Sinar UV dari gel documentation akan memendarkan senyawa EtBr yang menyisip pada DNA produk PCR dan memperlihatkan pola

pita berukuran tertentu. Produk PCR dapat diketahui ukuran fragmennya dengan cara dibandingkan dengan pita DNA *ladder* 100 bp atau 1 kb.

3.4.6.4 Pengukuran Kuantitas DNA

Pengukuran kuantitas dan kualitas produk PCR yang telah dimurnikan dilakukan menggunakan spektrofotometer *Thermo Scientific Nanodrop 1000*. Pengukuran konsentrasi DNA menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260/280 nm. Spektrofotometri diawali dengan menginisiasi alat spektrofotometer menggunakan air *milliQ* yang diteteskan pada tempat yang disediakan. Selanjutnya air *milliQ* diteteskan kembali dan digunakan sebagai blanko. Tempat peneteskan tersebut dikeringkan menggunakan kertas tisu *KimWipe* setiap selesai pengukuran.

Sampel PCR sebanyak 1,5 μ l diteteskan pada tempat peneteskan selanjutnya diukur. Pengukuran konsentrasi DNA dilakukan secara otomatis menggunakan software dari spektrofotometer *Thermo Scientific Nanodrop 1000* dan hasilnya ditampilkan pada monitor. Pengukuran kemurnian produk PCR dilakukan juga secara otomatis dan merupakan perbandingan antara konsentrasi DNA dan protein. Penyerapan iradiasi sinar UV secara maksimal oleh DNA dicapai pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan penyerapan maksimal oleh protein dicapai pada panjang gelombang 280 nm (Muladno, 2002).

3.4.6.5 Sekuensing

Sampel hasil PCR yang telah didenaturasi lalu dipindahkan sebanyak 13 μ l ke dalam tabung *sequencing* berukuran 0,5 ml. Tabung kemudian ditutup dengan septa dan diberi label. Tabung tersebut lalu dimuat pada *sample tray* dalam ABI

310 *Automated DNA Sequencer*. Mesin sekuen tersebut lalu dioperasikan berdasarkan petunjuk dalam buku manual ABI 310 *Automated DNA Sequencer*.

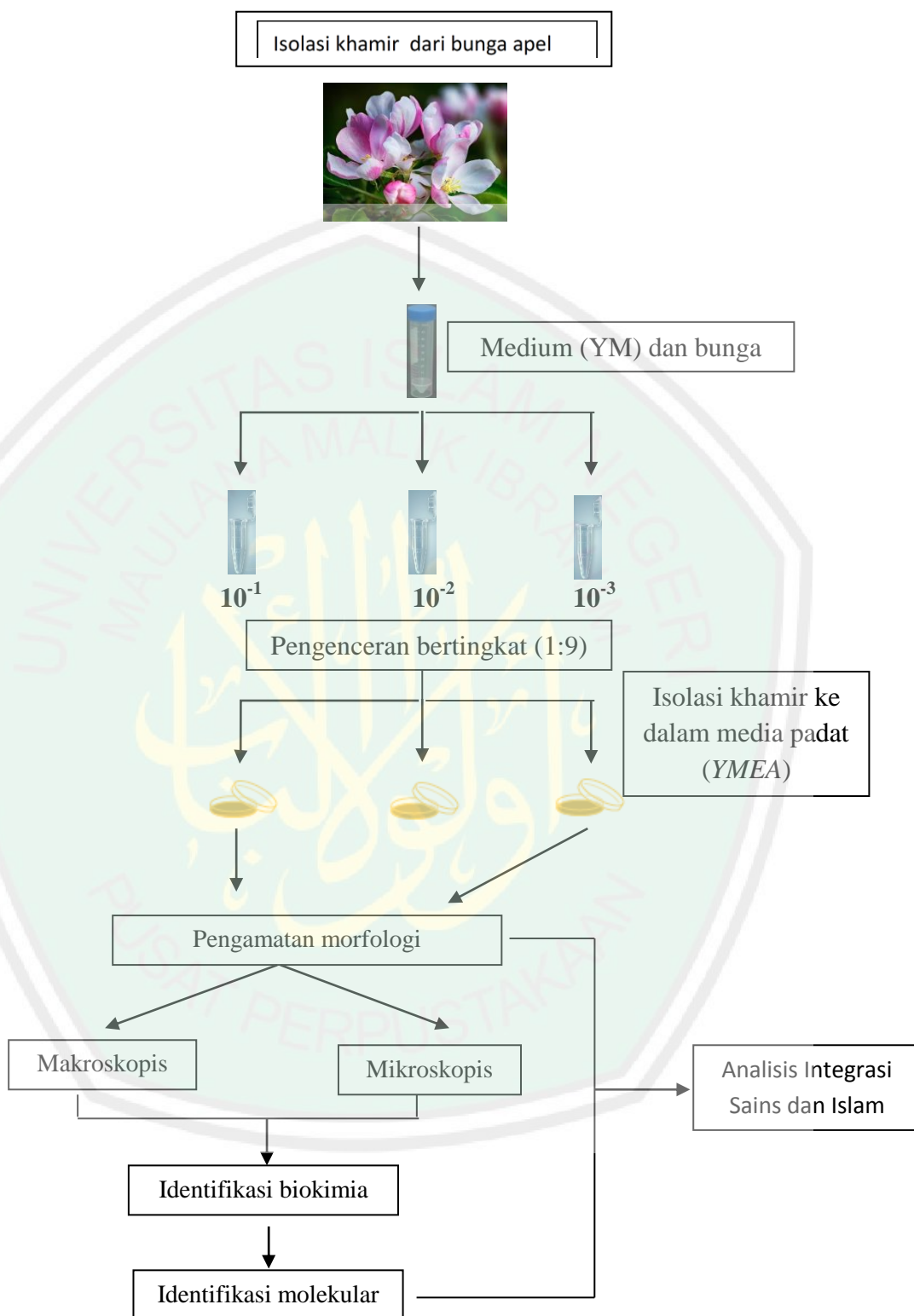
3.5 Analisis Data

Data hasil sekuensing *ITS* dibaca dengan Sekuen Scanner 1.0. Kecocokan *ITS* dengan Query yang diperoleh dari Gene Bank diketahui dengan program BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) (Haddad *et al.* 2014). Perubahan basa nukleotida yang terjadi dilihat dengan program Finch TV. Multiple alignment antara sekuen *ITS* dibuat dengan program MEGA 5.05.

Pembuatan atau rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan program MEGA 5.05. Menurut Saitou dan Nei (1987), *Neighbor joining* (NJ) akan menghasilkan pohon filogenetik yang menerapkan prinsip minimum evolusi serta cukup efisien dalam memilih topologi (pohon filogenetik) yang benar. Selain itu, NJ juga dapat diaplikasikan pada hampir semua jenis data jarak evolusioner. Evaluasi pohon filogenetik dilakukan dengan menggunakan analisis bootstrap sebanyak 1000 ulangan.

Data hasil pengamatan juga dianalisis menggunakan analisis nalar dan spiritual Islam. Analisis ini berusaha untuk mengintegrasikan penelitian yang dilakukan dengan sumber utama umat Islam yaitu Al-Qur'an dan Hadits sebagai dasar berfikir dalam menemukan gagasan penelitian. Sehingga tanda kebesarannya yang terserak di alam semesta ini dapat terungkap dan peran manusia untuk mengelola alam ini sebagai khalifah di bumi dan tanggung jawab sebagai ilmuwan Islam.

Adapun secara diagramatis, penelitian ini dirancang sebagaimana Gambar 3.1 berikut:

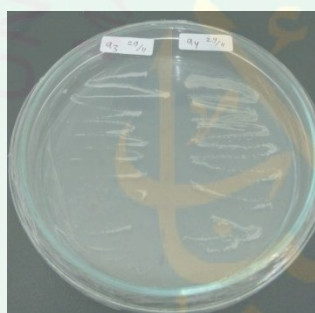


Gambar 3.1 Diagram alir penelitian

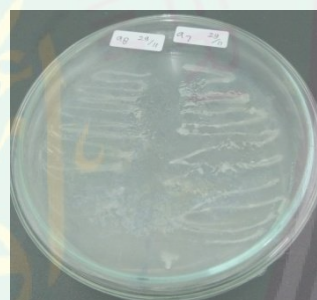
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.5 Karakteristik Morfologi Khamir Hasil Isolasi dari bunga apel (*Malus sylvestris* Mill)

Isolasi khamir dilakukan untuk mencari dan menemukan kandidat khamir terutama pada bunga apel (*Malus sylvestris* Mill). Bunga apel yang dieksplorasi dari varietas apel ana dan manalagi. Pada penelitian ini pemilihan isolat berdasarkan koloni yang terpisah (Kanti, 2004), sehingga ditemukan 8 isolat hasil purifikasi yang masing-masing dari bunga apel manalagi 4 isolat dan dari bunga apel ana 4 isolat. Isolat khamir yang diperoleh dari isolasi bunga apel disajikan pada gambar 4.1.



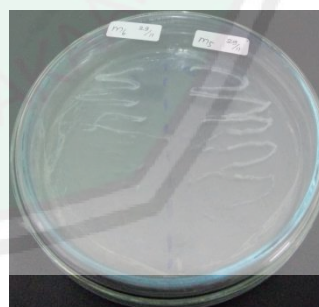
Isolat AAR-3 dan AAR-4



Isolat AAR-8 dan AAR-7



Isolat AMR-4 dan AMR-1



Isolat AMR-6 dan AMR-5

Gambar 4.1 Isolasi Hasil Isolasi Khamir dari Bunga Apel

Isolat khamir pada gambar 4.1 untuk bunga apel ana diberi notasi AAR, meliputi isolat AAR-3, AAR-4, AAR-7 dan AAR-8. Untuk isolat khamir bunga

apel manalagi diberi notasi AMR, meliputi isolat AMR-1, AMR-4, AMR-5, AMR-6. Isolasi khamir dilakukan dengan mengkultivasi sampel bunga yang didapatkan dari Kebun Apel Dusun Junggo, Desa Tulungrejo, Batu pada media cair khamir (*YM broth*). Sampel kultivasi diinkubasi pada suhu ruang hingga terdapat gelembung sebagai indikator telah terjadi aktivitas fermentasi khamir. Selanjutnya sebanyak 20 μ L masing-masing isolat diinokulasikan pada media padat *Yeast Malt Extract Agar* (YMEA). Kemudian isolat yang diperoleh diinkubasi pada suhu 25⁰C. Yarrow (1998) menyatakan bahwa kultur biasanya diinkubasi pada suhu 20-25⁰C karena kebanyakan khamir termasuk mesofilik.

4.5.1 Jenis Khamir yang Ditemukan pada Bunga Apel (*Malus sylvestris* Mill) Berdasarkan Karakter Makroskopis

Khamir yang diperoleh sebanyak 8 isolat berdasarkan koloni yang terpisah (Kanti, 2004) dari inokulasi kultivasi bunga apel pada media padat yaitu *Yeast Malt Extract Agar* (YMEA). Pemurnian selanjutnya dilakukan dengan mengambil koloni dan diinokulasikan kembali pada media yang sama. Sehingga karakteristik morfologi makroskopis koloni dapat dilihat pada tabel 4.1. Karakteristik pengamatan morfologi makroskopis koloni meliputi tekstur, warna, permukaan, elevasi, tepi (Kurtzman dan Fell, 1998) dan bentuk (Suryaningsih, 2018).

Berdasarkan tabel 4.1 dapat dilihat bahwa hampir semua isolat memiliki beberapa ciri morfologi koloni yang sama, yaitu bentuk sirkular, memiliki tekstur mukoid, warna krem, permukaan kilau, elevasi timbul dan tepi rata seperti yang disajikan pada gambar 4.2. Beberapa isolat memiliki perbedaan morfologi yaitu isolat AMR-5 dan AMR-4. Isolat AMR-5 memiliki permukaan kusam, sedangkan

isolat AMR-4 memiliki tekstur butyrous, warna krem keputihan dan permukaan kusam.

Tabel 4.1 Karakteristik morfologi makroskopis koloni khamir

Kode Isolat	Morfologi koloni					
	Bentuk	Tekstur	Warna	Permukaan	Elevasi	Tepi
AMR-1	Sirkular	Mucoid	Krem	Kusam	Rata	Rata
AMR-5	Sirkular	Mucoid	Krem	Kusam	Timbul	Rata
AMR-4	Sirkular	Butyrous	Krem keputihan	Kusam	Timbul	Rata
AMR-6	Sirkular	Mucoid	Krem	Kilau	Timbul	Rata
AAR-7	Sirkular	Mucoid	Krem	Kilau	Timbul	Rata
AAR-3	Sirkular	Mucoid	Krem	Kilau	Timbul	Rata
AAR-8	Sirkular	Mucoid	Krem	Kilau	Timbul	Rata
AAR-4	Sirkular	Mucoid	Krem	Kilau	Timbul	Rata

Keterangan:

AMR: Isolat bunga apel manalagi

AAR: Isolat bunga apel ana

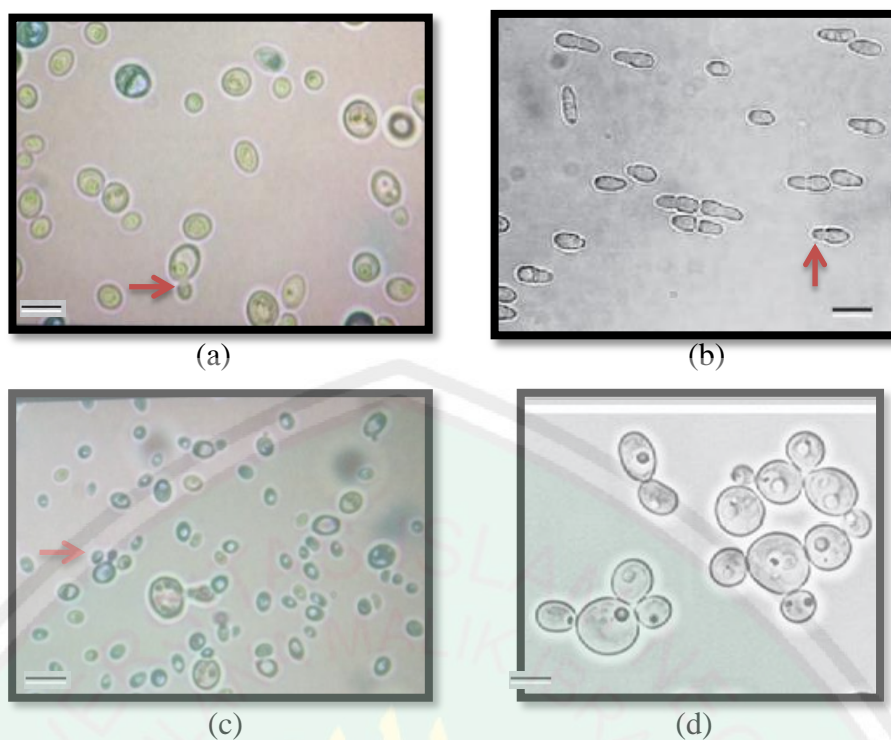


Gambar 4.2 Morfologi makroskopik. (a) Koloni khamir isolat AAR-3 dengan bentuk sirkular (ditunjukkan tanda panah), dibandingkan dengan (b) Koloni khamir YJM311 dengan bentuk sirkular (Granek dan Magwene, 2010).

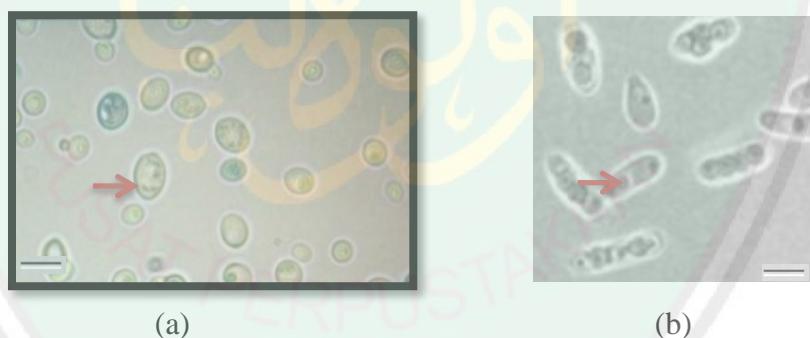
4.5.2 Jenis Khamir yang Ditemukan pada Bunga Apel (*Malus sylvestris* Mill) Berdasarkan Karakter Mikroskopis

Pengamatan mikroskopis khamir dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 100x10. Karakteristik morfologi mikroskopik yang diamati meliputi bentuk sel, reproduksi vegetatif, ukuran sel, ada tidaknya pseudohifa dan hifa sejati serta reproduksi seksual. Untuk pengamatan viabilitas sel khamir dilakukan pewarnaan. Pewarnaan yang digunakan pada penelitian ini adalah *methylene blue*. Viabilitas sel khamir dapat diketahui dari rasio warna yang nampak (mati pada keadaan pemberian *methylene blue*) hingga sel yang tidak berwarna (hidup pada keadaan pemberian *methylene blue*) (Slaughter, 2003).

Karakteristik morfologi mikroskopik sel khamir dapat dilihat pada tabel 4.2. Isolat dari bunga apel manalagi (AMR) dapat dideskripsikan sebagai berikut: AMR-1 memiliki bentuk sel subglobose (bulat), reproduksi vegetatifnya dengan pertunasan satu kutub (monopolar) (gambar 4.3a), memiliki ukuran pada salah satu sel 6,08-5,51 μ m dan tidak memiliki pseudohifa maupun hifa sejati. Isolat AMR-4 memiliki bentuk sel subglobose, reproduksi vegetatif dengan pembelahan (*fission*), memiliki ukuran pada salah satu sel 5,83-4,20 μ m dan tidak memiliki pseudohifa maupun hifa sejati. Isolat AMR-5 memiliki bentuk elipsoid (oval), reproduksi vegetatif dengan pertunasan satu kutub (monopolar), memiliki ukuran pada salah satu sel 5,64-5,00 μ m dan tidak memiliki pseudohifa maupun hifa sejati. Isolat AMR-6 memiliki bentuk sel elipsoid, reproduksi vegetatifnya dengan pertunasan satu kutub (monopolar), memiliki ukuran pada salah satu sel 5,14-3,25 μ m dan tidak memiliki pseudohifa maupun hifa sejati. Semua isolat dari bunga apel manalagi memiliki reproduksi seksual yang sama yaitu dengan askospora (Gambar 4.4).



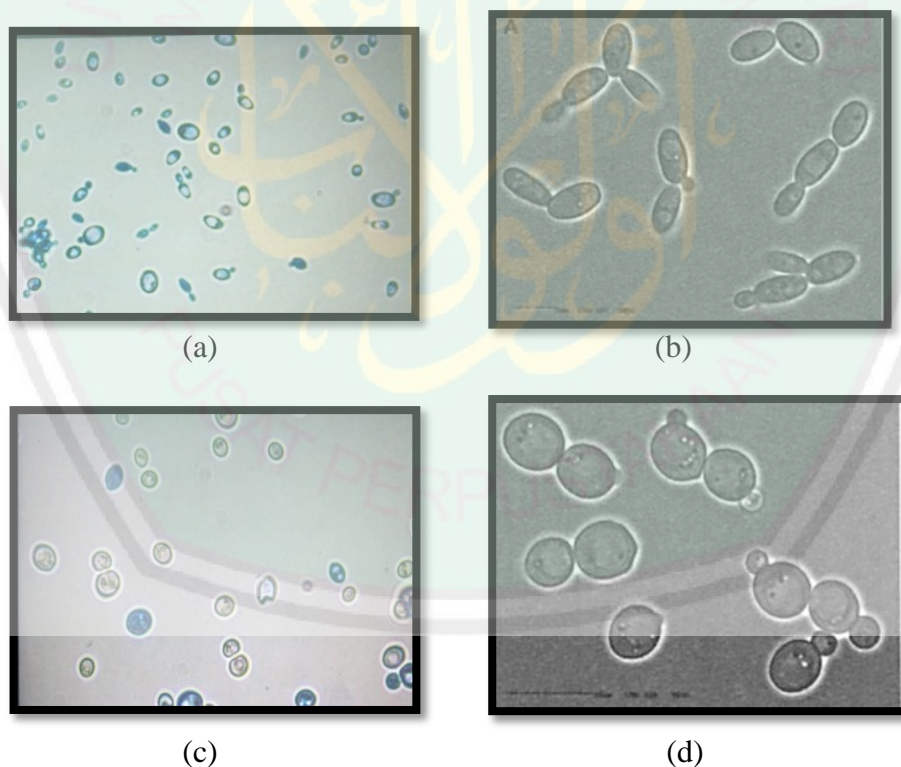
Gambar 4.3 Reproduksi aseksual. (a) Pertunasan monopolar sel isolat AMR-1 (ditunjukkan tanda panah), dibandingkan dengan (b) Pertunasan monopolar *Malassezia pachydermatis* (Kurtzman *et al.* 2011); (c) pertunasan multipolar sel isolat AAR-7 (ditunjukkan tanda panah), dibandingkan dengan (d) pertunasan multipolar *Pichia nakasei* (Kurtzman *et al.* 2011).



Gambar 4.4 Reproduksi seksual. (a) Askospora sel khamir isolat AMR-1 dengan perbesaran 100x10 (ditunjukkan tanda panah), dibandingkan dengan (b) Askospora sel khamir *Pichia scapromyzae* CBS 1329 (Boekhout dan Robert, 2003).

Isolat dari bunga apel ana (AAR) dapat dideskripsikan sebagai berikut: AAR-3 memiliki bentuk sel elipsoid (gambar 4.5a), reproduksi vegetatif dengan pertunasan satu kutub (monopolar), memiliki ukuran pada salah satu sel 6,42-

5,77 μm dan tidak memiliki pseudohifa maupun hifa sejati. Isolat AAR-4 memiliki bentuk sel elipsoid, reproduksi vegetatif dengan pertunasan satu kutub (monopolar), memiliki ukuran pada salah satu sel 5,22-4,53 μm dan tidak memiliki pseudohifa maupun hifa sejati. Isolat AAR-7 memiliki bentuk elipsoid, reproduksi vegetatif dengan pertunasan lebih dari 2 kutub (multipolar) (gambar 4.3c), memiliki ukuran pada salah satu sel 4,27-3,69 μm dan tidak memiliki pseudohifa maupun hifa sejati. Isolat AAR-8 memiliki bentuk sel subglobose (gambar 4.5c), reproduksi vegetatifnya dengan pembelahan (*fission*) dan ada juga secara pertunasan (monopolar) memiliki ukuran pada salah satu sel 5,87-5,64 μm dan tidak memiliki pseudohifa maupun hifa sejati. Semua isolat dari bunga apel manalagi memiliki reproduksi seksual yang sama yaitu dengan askospora.



Gambar 4.5 Morfologi sel. (a) Sel elipsoid isolat AAR-3, dibandingkan dengan (b) sel elipsoid *Pichia membranifaciens* var. *membranifaciens* CBS 107 (Boekhout dan Robert, 2003); (c) sel subglobose isolat AAR-8, dibandingkan dengan (d) sel subglobose *Torulaspora delbrueckii* CBS 133 (Boekhout dan Robert, 2003).

Tabel 4.2 Karakteristik morfologi mikroskopik sel khamir

Kode Isolat	Morfologi sel					
	Bentuk sel	Reproduksi vegetatif		Ukuran sel (μm)	+/- Pseudo Hifa atau hifa sejati	Reproduksi seksual
		Pertunasan	Pembelahan			
AMR-1	Subglobose	Monopolar		6,08-5,51	-	Askospora
AMR-4	Subglobose		+	5,83-4,20	-	Askospora
AMR-5	Elipsoid	Monopolar		5,64-5,00	-	Askospora
AMR-6	Elipsoid	Monopolar		5,14-3,25	-	Askospora
AAR-3	Elipsoid	Monopolar		6,42-5,77	-	Askospora
AAR-4	Elipsoid	Monopolar		5,22-4,53	-	Askospora
AAR-7	Elipsoid	Multipolar		4,27-3,69	-	Askospora
AAR-8	Subglobose	Monopolar	+	5,87-5,64	-	Askospora

Isolat yang telah diidentifikasi karakteristik morfologi mikroskopik dapat digolongkan ke dalam ascomycetes berdasarkan pengamatan reproduksi seksualnya dengan menghasilkan askospora di dalam bentukan askus sel khamir. Berdasarkan pendapat Marchant (1979), Mims *et al.* (1990), van Wyk dan Wingfield (1991) bahwa askospora berkembang pada kelas ascomycetes. Askospora merupakan spora jamur yang diproduksi secara seksual di dalam suatu askus (Wanger *et al.* 2017). Selanjutnya dari pengamatan ukuran sel khamir, khamir memiliki diameter yang bervariasi, berkisar antara 3-6 μm . Hal ini diperkuat pendapat Bhatia (2016), bahwa khamir umumnya memiliki diameter 3-4 μm dan hingga ada yang mencapai 40 μm .

4.6 Kemampuan Isolat Khamir yang Ditemukan di Bunga Apel dalam Fermentasi Karbohidrat

Identifikasi aktivitas fisiologi khamir dapat diketahui dengan melakukan uji biokimia. Aktivitas fisiologi khamir terutama berhubungan dengan aktivitas sistem kerja atau metabolisme dalam unit sel terhadap pengaruh lingkungan sekitarnya. Sifat fisiologi terutama untuk mendeskripsikan dan mengidentifikasi spesies khamir. Uji yang sering dilakukan untuk tujuan identifikasi diantaranya adalah fermentasi karbohidrat dan pertumbuhan pada gula dengan konsentrasi yang tinggi (Kurtzman dan Fell, 1998).

Khamir memiliki kemampuan yang berbeda untuk memfermentasi gula sebagai ukuran karbon dioksida yang dihasilkan. Khamir dari genus *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* dan *Zygosaccharomyces* misalnya, memfermentasi glukosa dengan maksimal, sebaliknya, genus *Rhodosporidium* dan *Sterigmatomyces* tidak signifikan memfermentasi beberapa gula. Kisaran species dari non-fermentatif hingga fermentatif kuat dapat ditemukan pada genus lainnya (Kurtzman dan Fell, 1998).

Tabel 4.3 Kemampuan delapan isolat khamir dalam memfermentasi glukosa, fruktosa dan galaktosa setelah 7 hari inkubasi

No.	Kode Isolat	Gula		
		Glukosa	Fruktosa	Galaktosa
1	AMR-1	+++	+	+
2	AMR-4	++++	+++	++++
3	AMR-5	+	+++++	++
4	AMR-6	++	++	+++
5	AAR-3	++	++++	++
6	AAR-4	+	+++	++++
7	AAR-7	++++	+	+++
8	AAR-8	+++	++	+

Keterangan: += sedikit

+++ = banyak

++ = cukup

++++ = sangat banyak

Tabel 4.4 Indikator adanya produksi asam pada media fermentasi masing-masing isolat khamir

No.	Kode Isolat	Gula		
		Glukosa	Fruktosa	Galaktosa
1	AMR-1	-	-	-
2	AMR-4	-	-	-
3	AMR-5	-	-	+
4	AMR-6	-	-	+
5	AAR-3	-	-	+
6	AAR-4	-	-	+
7	AAR-7	-	-	-
8	AAR-8	-	-	-

Keterangan: + = Adanya perubahan warna media fermentasi gula

Indikator untuk mengetahui adanya produksi asam ditandai dengan perubahan warna dari kemerahan menjadi kekuningan pada media fermentasi (Harley dan Prescott, 2002). Berdasarkan pengamatan pada media fermentasi gula pada tabel 4.4, semua isolat khamir pada media gula jenis glukosa dan fruktosa tidak dihasilkan produksi asam, karena tidak terdapat perubahan warna. Sedangkan pada fermentasi gula jenis galaktosa, beberapa media fermentasi mengalami perubahan warna menjadi kekuningan, yaitu pada isolat AMR-5, AMR-6, AAR-3 dan AAR-4. Hal ini menunjukkan bahwa isolate khamir AMR-5, AMR-6, AAR-3 dan AAR-4 memiliki kemampuan untuk menghasilkan asam.

Berdasarkan tabel 4.3, masing-masing isolat memiliki kemampuan yang berbeda dalam memfermentasi gula. Isolat dikelompokkan berdasarkan dari asal isolasi bunga apel. Fermentasi glukosa untuk isolat dari isolasi bunga apel manalagi, isolat AMR-4 memiliki kemampuan paling tinggi, sedangkan isolat AMR-5 memiliki kemampuan paling rendah. Fermentasi fruktosa, isolat AMR-5 memiliki kemampuan paling tinggi, sedangkan isolat AMR-1 memiliki kemampuan paling rendah. Fermentasi galaktosa, isolat AMR-4 memiliki

kemampuan paling tinggi, sedangkan isolat AMR-1 memiliki kemampuan paling rendah.

Untuk isolat dari isolasi bunga apel ana, isolat AAR-7 memiliki kemampuan paling tinggi dalam memfermentasi glukosa, sedangkan isolat AAR-4 memiliki kemampuan terendah. Fermentasi fruktosa, isolat AAR-3 memiliki kemampuan paling tinggi, sedangkan isolat AAR-7 memiliki kemampuan paling rendah. Fermentasi galaktosa, isolat AAR-4 memiliki kemampuan paling tinggi, sedangkan isolat AAR-8 memiliki kemampuan paling rendah.

Fermentasi gula yang dilakukan oleh khamir ditandai dengan dihasilkannya produk samping berupa CO₂ dan hasil akhirnya menghasilkan etanol dan asam asetat. Produk CO₂ ditandai dengan adanya gelembung yang dihasilkan pada tabung Durham. Proses fermentasi berawal dari metabolisme karbohidrat melalui jalur *Embden Meyerhof* menghasilkan piruvat. Selanjutnya piruvat melalui proses fermentasi yang dilakukan oleh khamir menghasilkan gas CO₂, etanol dan asam asetat (Okafor, 2007).

Isolat khamir selanjutnya dilakukan pengujian pada media dengan konsentrasi gula yang tinggi. Hal ini karena banyak spesies khamir dapat tumbuh dengan baik pada konsentrasi glukosa hingga 40%, sebaliknya beberapa spesies dapat tumbuh pada konsentrasi gula antara 50 dan 70%. Kemampuan untuk tumbuh dengan konsentrasi gula yang tinggi umumnya diuji dengan menumbuhkan pada media agar yang mengandung 50% dan atau 60% (w/w) glukosa (Kurtzman dan Fell, 1998).

Uji pertumbuhan pada media *Glucose Peptone Yeast Extract Agar* (GPY Agar) dilakukan dengan 2 kali ulangan pada setiap isolat. Metode penanaman

dengan *spread plate* dengan mengambil sampel sebanyak 5-10 μm . Pengamatan pertumbuhan khamir dilakukan selama 24 hingga 48 jam. Berdasarkan tabel 4.5 dapat dilihat bahwa semua isolat memiliki hasil yang positif. Hal ini menunjukkan isolat merupakan khamir yang memiliki kemampuan untuk tumbuh pada media dengan tekanan osmotik yang tinggi. Menurut Gandjar dan Sjamsuridzal (2006), bahwa organisme yang mampu untuk hidup pada tekanan osmotik yang tinggi disebut osmotoleran.

Tabel 4.5 Pengamatan uji pertumbuhan pada media *Glucose Peptone Yeast Extract Agar* (GPY Agar) konsentrasi gula 50%.

Nama Isolat	Hasil
AMR-1	+
AMR-4	+
AMR-5	+
AMR-6	+
AAR-3	+
AAR-4	+
AAR-7	+
AAR-8	+

Keterangan: + = Isolat khamir dapat tumbuh pada media YMEA dengan konsentrasi gula 50%

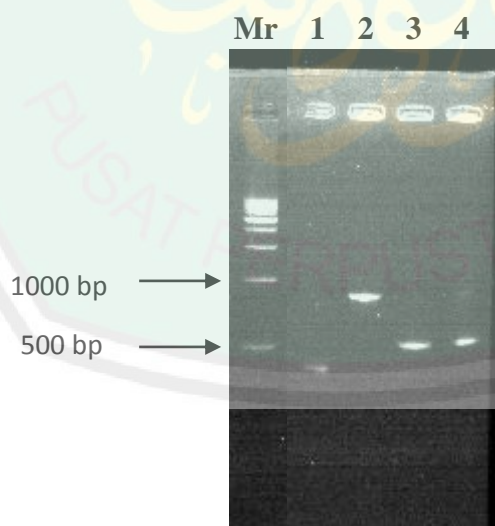
4.3 Identifikasi secara Molekular Jenis Isolat Khamir dengan Kemampuan Fermentasi Karbohidrat Terbaik

4.3.1 Identifikasi Khamir Hasil PCR-Koloni

Isolat khamir yang digunakan untuk identifikasi molekular pada penelitian ini berasal dari isolat yang mempunyai kemampuan memfermentasi karbohidrat terbaik dan juga berdasarkan karakter morfologi. Masing-masing sampel dari

varietas apel diambil sebanyak 2 isolat dalam menghasilkan gelembung sebagai indikator telah terjadi aktivitas fermentasi gula oleh khamir (Kurtzman dan Fell, 1998) terutama pada jenis gula glukosa yang digunakan sebagai bahan baku skala industri (Bachruddin, 2014). Glukosa dipecah menjadi asam piruvat dalam proses katabolisme karbohidrat jalur *The Embden-Meyerhof-Parnas (EMP Pathways)* (Okafor, 2007) pada metabolisme isolat dari bunga apel manalagi meliputi isolat AMR-1 dan AMR-4, sedangkan isolat dari bunga apel ana meliputi isolat AAR-7 dan AAR-8.

Hasil amplifikasi dengan *Polymerase Chain Reaction (PCR)* isolat AMR-1, AMR-4, AAR-7 dan AAR-8 ditunjukkan pada gambar 4.6. Berdasarkan hasil amplifikasi daerah ITS dengan menggunakan primer ITS1 *forward*, diketahui semua isolat memiliki ukuran antara 450-1000 bp. Hal ini diperkuat Fujita (2001), bahwa primer ITS1 dan ITS4 memiliki rentan panjang fragmen 350 hingga 880 bp.



Gambar 4.6 Hasil amplifikasi daerah ITS isolat ke-1: AMR-1, ke-2: AMR-4, ke-3: AAR-7 dan ke-4: AAR-8 dengan konsentrasi gel agarose 1,5% dan marker.

4.3.2 Analisis Hasil Sekuensing dan Kekekabatan Spesies

Hasil yang diperoleh dari PCR selanjutnya disekuensing untuk mengetahui urutan basa nukleotida dari masing-masing sampel isolat. Hasil sekuensing isolat AAR-7, AAR-8, AMR-1 dan AMR-4 selanjutnya dianalisis menggunakan *Basic Alignment Search Tool* (BLAST) pada website *National Center for Biotechnology Information* (NCBI): (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Hasil BLAST dari masing-masing isolat dengan primer forward ITS1 memiliki *query length* yang berbeda-beda. Isolat AAR-7 memiliki *query length* 370 bp, isolat AAR-8 memiliki *query length* 824 bp, isolat AMR-1 memiliki *query length* 486 dan isolat AMR-4 memiliki *query length* 488 bp. Hasil analisis homologi menggunakan BLAST ditunjukkan pada tabel 4.6.

Tabel 4.6 Hasil analisis homologi isolat khamir pada bunga apel menggunakan BLAST (*Basic Local Allignment Search Tools*)

No.	Kode Isolat	Hasil Blast			
		Nama Spesies	Ident	Seq Id	Bp
1.	AAR-7	<i>Clavispora lusitaniae</i> strain 37C	97%	KP764965.1	370
2.	AAR-8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain LYY	99%	MF944081.1	824
3.	AMR-1	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain YS156	100%	KX942034.1	486
4.	AMR-4	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain YS156	99%	KX942034.1	488

Isolat AAR-7 yang didapatkan termasuk spesies yang berbeda dengan isolat pembanding yang terdapat pada *database* NCBI karena memiliki tingkat kemiripan 97% atau kurang dari 99%. Homologi sekuen yang rendah atau dibawah 99% terhadap isolat pembanding menunjukkan kemungkinan bahwa isolat AAR-7 yang didapatkan merupakan taksa baru yang memiliki kemiripan

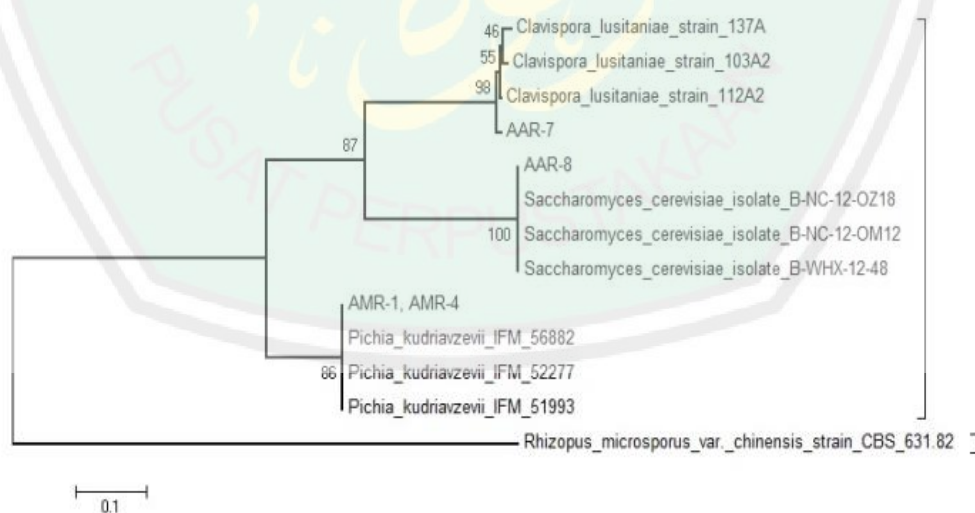
dengan *Clavispora lusitaniae* strain 37C. Hal ini diperkuat Sugita (1999), bahwa secara keseluruhan kesamaan urutan basa nukleotida adalah 99% atau lebih.

Isolat AAR-8 yang didapatkan termasuk spesies yang sama dengan isolat pembandingan yang terdapat pada *database* NCBI karena memiliki tingkat kemiripan 99%. Isolat AMR-1 dan AMR-4 yang didapatkan termasuk spesies yang sama dengan isolat pembandingan yang terdapat pada *database* NCBI dan memiliki nama spesies yang sama meskipun berbeda 1%, karena memiliki tingkat kemiripan antara 99% sampai 100%. Hal ini diperkuat Sugita (1999), bahwa secara keseluruhan kesamaan urutan basa nukleotida adalah 99% atau lebih, meskipun strain pada spesies yang sama tidak sepenuhnya memiliki sekuen yang identik.

Setelah ditemukan nama spesies dari masing-masing isolat, selanjutnya dibuat rekonstruksi pohon filogenetik. Tujuan dibuat pohon filogenetik adalah untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar isolat maupun dengan beberapa spesies pembandingan yang diperoleh dari *database* NCBI. Rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan *software* MEGA versi 5.05 dengan metode statistik Neighbor-Joining (NJ). Penentuan uji filogeni dengan *bootstrap* 1000 dengan model substitusi Kimura 2-parameter model.

Metode Neighbor-Joining merupakan salah satu pendekatan yang digunakan dalam merekonstruksi pohon filogenetik. Metode *Neighbor-Joining* termasuk kelompok *Distance-based method* dengan prinsip jumlah perbedaan nukleotida antara dua sekuen DNA menunjukkan jarak evolusi yang terjadi (Widodo dkk. 2018).

Pembuatan pohon filogeni dilakukan melalui penyejajaran dengan *type strain* dan *outgroup* dari anggota Divisi Mucoromycota (*Rhizopus microsporus* var. *chinensis*) (Gambar 4.7). Pemilihan *outgroup* biasanya secara acak maupun berdasarkan hubungan yang tidak jelas antara kelompok (*taxa*) *ingroup* dan *outgroup* (Lyons-Weiler et al. 1998; Sanderson dan Shaffer, 2002; Cameron et al. 2004). Kelompok *outgroup* sangat dibutuhkan dalam analisis filogenetik dan menyebabkan polarisasi karakter atau ciri, yaitu karakter plesiomorfik dan apomorfik. Karakter plesiomorfik merupakan karakter primitif yang terdapat pada *outgroup*, sedangkan karakter apomorfik adalah karakter yang berubah dan diturunkan dan terdapat pada *ingroup*. Karakter sinapomorfik adalah karakter yang diturunkan dan terdapat pada kelompok monofiletik (Hidayat dan Pancoro, 2008). Hasil rekonstruksi pohon filogenetik dari sekuen daerah ITS tergambar sebanyak 3 *clade* khamir yaitu *Clavispora*, *Saccharomyces*, dan *Pichia*.



Gambar 4.7 Pohon filogenetik isolat AMR-1, AMR-4, AAR-7, AAR-8 dari bunga apel manalagi dan ana dengan spesies lain.

Hasil rekonstruksi pohon filogenetik menunjukkan pemisahan sesi menjadi 3 kelompok besar. Kelompok pertama sebagai *outgroup* yaitu *Rhizopus microspores* sebagai spesies pembanding dari genus yang berbeda. Kelompok kedua sebagai *ingroup* dibagi menjadi 2 kelompok. Kelompok pertama didukung dengan nilai *Bootstrap/frequency* 86% meliputi *Pichia kudriavzevii* strain YS156 (AMR-1 dan AMR-4) hasil dari isolasi bunga apel manalagi, *Pichia kudriavzevii* IFM 56882, *Pichia kudriavzevii* IFM 52277 dan *Pichia kudriavzevii* IFM 51993. Kelompok kedua didukung dengan nilai *frequency* 87% terdiri dari 2 sub kelompok dengan nilai *frequency* 100% meliputi *Saccharomyces cerevisiae* strain LYY (AAR-8) hasil dari isolasi bunga apel ana, *Saccharomyces cerevisiae* isolate B-NC-12-OZ18, *Saccharomyces cerevisiae* isolate B-WHX-12-48 dan *Saccharomyces cerevisiae* isolate B-NC-12-OAMR-12. Sub kelompok lainnya dengan nilai *frequency* 98% meliputi *Clavispora lusitaniae* strain 37C (AAR-7) hasil dari isolasi bunga apel ana, *Clavispora lusitaniae* strain 103A2 memiliki nilai *frequency* 55%, *Clavispora lusitaniae* strain 112A2 dan *Clavispora lusitaniae* strain 137A memiliki nilai *frequency* 46%.

Nilai *frequency/stats* yang diperoleh dari pengelompokan *ingroup* menunjukkan angka lebih dari 80. Hal ini diperkuat pendapat Widodo dkk (2018) terkait akurasi pembentukan cabang pada pohon filogenetik. Jika nilai *frequency/bootstrap* menunjukkan angka lebih dari 80 berarti cabang tersebut sudah akurat atau sudah benar, sedangkan jika kurang dari 80 menandakan bahwa cabang tersebut masih bisa berubah lagi. Perubahan cabang tersebut diduga keterbatasan panjang gen yang digunakan untuk merekonstruksi pohon filogenetik

sehingga beberapa anggota dalam percabangan yang dapat berubah tersebut didominasi basa yang sama.

Nilai *frequency/stats* yang diperoleh memperlihatkan tingkat kepercayaan cabang yang terbentuk cukup tinggi. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa genus *Clavispora*, *Saccharomyces* dan *Pichia* kemungkinan besar merupakan genus yang berasal dari satu nenek moyang yang sama. Genus *Clavispora* dan genus *Saccharomyces* memiliki kedekatan garis keturunan. Sedangkan genus *Pichia* memiliki garis keturunan lebih jauh dari genus *Clavispora* dan genus *Saccharomyces*. Hal ini dapat dilihat dengan membandingkan garis horizontal antar cabang dengan skala (Widodo dkk. 2018).

4.4 Dialog Hasil Penelitian tentang Khamir dalam Perspektif Islam

Penelitian eksplorasi khamir dari alam yang sudah dilakukan telah berhasil mengidentifikasi dan mengelompokkan spesies khamir yang menguntungkan dan merugikan terutama bagi manusia. Spesies khamir yang menguntungkan oleh manusia dimanfaatkan dalam bioteknologi khamir. Cakupan bidang bioteknologi sangat luas dan beragam. Tentunya, apabila dikaitkan dengan nilai-nilai Islam, akan dijumpai beberapa aturan dan batasan yang telah diatur dalam Al-Qur'an dan As-Sunnah.

Produk atau hasil dari pemanfaatan khamir ada yang termasuk halal dan ada yang haram dalam tinjauan agama. Penggunaan khamir dalam proses fermentasi untuk menghasilkan minuman beralkohol misalnya bir, *sake*, *wine* adalah minuman yang diharamkan. Sesuai dengan firman Allah swt. dalam surah al-Maidah ayat 90: “Hai orang-orang yang beriman, sesungguhnya meminum

khamar, berjudi, berkorban untuk berhala dan mengundi nasib dengan panah adalah perbuatan-perbuatan yang keji yang termasuk perbuatan syaitan. Maka jauhilah perbuatan-perbuatan itu agar kamu mendapat keberuntungan.”

Sekian minuman yang tersedia hanya satu kelompok saja yang diharamkan yaitu khamar. Khamar termasuk minuman yang memabukkan sesuai dengan penjelasan Rasulullah saw berdasarkan hadits yang diriwayatkan oleh Ahmad dan Abu Daud dari Abdullah bin Umar: “setiap yang memabukkan adalah khamar dan setiap khamar adalah diharamkan.” Dari penjelasan Rasulullah tersebut jelas bahwa batasan khamar didasarkan atas sifatnya, bukan jenis bahannya, bahannya sendiri dapat berupa apa saja.

Hasil penelitian lainnya terkait khamir, telah dimanfaatkan pada pelbagai bidang dan ini semua masih diperbolehkan selama tidak bertentangan dengan syari'at yang telah ditetapkan. Bidang yang memanfaatkan organisme khamir meliputi biokatalisis diantaranya biotransformasi dan *pharmaceutical*. Bidang penelitian dasar biologi, meliputi biologi molekular dan selular, genomik, genom fungsional, dan mekanisme sistem biologi. Hingga bidang biofuel diantaranya bioethanol, biodiesel. Biokontrol diantaranya proteksi panen, keamanan makanan dan probiotik. Penelitian biomedik diantaranya ketahanan obat, penemuan obat, metabolisme, uraian mekanisme penyakit, dan bioteknologi lingkungan diantaranya bioremediasi, degradasi polutan. Semuanya memanfaatkan peran khamir (Walker, 1998). Pemanfaatan khamir bertujuan untuk mempermudah manusia dalam memproses ataupun mendaur ulang bahan kimia maupun biologi, pengembangan penelitian hingga penurunan cemaran yang ada di lingkungan. Sehingga dapat meminimalkan potensi negatif dan menambah nilai guna serta

manfaat bagi manusia. Hal ini untuk memperbaiki citra manusia dihadapan Allah swt. karena perbuatan tangan manusia sehingga nampak kerusakan di darat maupun di laut. Selaras dengan firman Allah pada surah ar-Rum ayat 40:

ظَهَرَ الْفَسَادُ فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ بِمَا كَسَبَتْ أَيْدِي النَّاسِ لِيُذِيقَهُمْ بَعْضَ الَّذِي عَمِلُوا لَعَلَّهُمْ يَرْجِعُونَ ﴿٤٠﴾

“Telah nampak kerusakan di darat dan di laut disebabkan karena perbuatan tangan manusi, supay Allah merasakan kepada mereka sebahagian dari (akibat) perbuatan mereka, agar mereka kembali (ke jalan yang benar).”

Kata *zhahara* pada mulanya berarti terjadinya sesuatu di permukaan bumi. Sehingga, karena dia di permukaan, dia menjadi tampak dan terang serta diketahui dengan jelas. Kata al-fasad, menurut al-Ashfahani, adalah keluarnya sesuatu dari keseimbangan, baik sedikit maupun banyak. Kata ini digunakan menunjuk apa saja, baik jasmani, jiwa, maupun hal-hal lain. Ia juga diartikan sebagai antonim dari *ash-shalah* yang berarti manfaat atau berguna (Shihab, 2017).

Memang, Allah swt. menciptakan semua makhluk saling berkait. Dalam keterkaitan itu, lahir keserasian dan keseimbangan dari yang terkecil hingga yang terbesar, dan semua tunduk dalam pengaturan Allah Yang Mahabesar. Bila terjadi gangguan pada keharmonisan dan keseimbangan itu, kerusakan terjadi dan ini, kecil atau besar, pasti berdampak pada seluruh bagian alam, termasuk manusia, baik yang merusak maupun yang merestui perusakan itu (Shihab, 2017).

Atas dasar itulah, manusia sebagai makhluk yang berakal harus bisa melihat dan mengambil hikmah pada setiap ciptaan-Nya baik yang hidup maupun yang mati. Sebagaimana firman Allah swt. pada surah al-Mulk ayat 3-4, “Yang telah menciptakan tujuh langit berlapis-lapis, engkau tidak melihat pada ciptaan ar-Rahman sedikit pun ketidakseimbangan. Maka, ulangilah pandangan itu adakah

engkau melihat sedikit pun keretakan?” kemudian ulangilah pandangan itu dua kali niscaya akan kembali padamu pandangan itu kecewa, dan ia menjadi lelah.”

Kata *tafawut* pada mulanya berarti kejauhan. Dua hal yang berjauhan mengesankan ketidakserasian. Dari sini, kata tersebut diartikan tidak serasi atau tidak seimbang. Bahwa Allah menciptakan langit-bahkan seluruh makhluk-dalam keadaan seimbang sebagai rahmat karena seandainya ciptaan-Nya tidak seimbang, tentulah akan terjadi kekacauan antara yang satu dan yang lain, dan ini pada gilirannya mengganggu kenyamanan hidup manusia di pentas bumi ini. Thabathaba'i (Shihab, 2017) memahami ketiadaan *tafawut* itu dalam arti adanya hubungan satu dengan yang lain dari sisi tujuan dan manfaat yang diperoleh dari hubungan antara satu dan yang lain. Ini serupa dengan dua sisi timbangan dan pertarungannya dalam hal berat atau ringan juga tinggi dan rendahnya salah satu sisi timbangan. Kedua sisi tersebut berbeda tetapi keduanya membantu siapa yang menggunakannya untuk mengetahui kadar timbangan barang yang ditimbang. Demikian Allah mengatur perincian ciptaan-ciptaan-Nya sehingga masing-masing menuju kepada tujuannya tanpa adanya satu bagian pun membatalkan tujuan bagian yang lain atau menjadikan sebagian yang lain tidak memperoleh sifatnya yang mesti dia sandang guna mencapai tujuan.

Sebagai kaum terpelajar, Kita harus ikut andil untuk memelihara lingkungan sekitar. Manusia merupakan aktor utama organisme yang mampu untuk menentukan masa depan kehidupan di bumi pada arah kemaslahatan ataupun kemudharatan. Hal ini terkait dengan peran manusia sebagai khalifah di bumi, senada dengan firman Allah pada surah al-Baqarah ayat 30, “Ingatlah ketika Tuhanmu berfirman kepada para malaikat, “Sesungguhnya Aku hendak

menjadikan satu khalifah di muka bumi.’ Mereka berkata, “Apakah Engkau hendak menjadikan di bumi itu siapa yang akan membuat kerusakan padanya dan menumpahkan darah, padahal kami senantiasa bertasbih dengan memuji-Mu dan menyucikan-Mu?” Tuhan berfirman, “Sesungguhnya Aku mengetahui apa yang tidak kamu ketahui.”

Kata *khalifah* pada mulanya berarti yang menggantikan atau yang datang sesudah siapa yang datang sebelumnya. Ayat ini menunjukkan bahwa kekhalfahan terdiri dari wewenang Allah swt. makhluk yang disertai tugas, yakni Adam as. dan anak cucunya, serta wilayah tempat bertugas, yakni bumi yang terhampar ini. Jika demikian, kekhalfahan mengharuskan makhluk yang disertai tugas itu melaksanakan tugasnya sesuai dengan petunjuk Allah yang memberinya tugas dan wewenang. Kebijakan yang tidak sesuai dengan kehendak-Nya adalah pelanggaran terhadap makna dan tugas kekhalfahan (Shihab, 2017).

Alam ini memiliki sumber daya yang melimpah dan membutuhkan pengelolaan dan penjagaan demi untuk memelihara keberlangsungan kehidupan di muka bumi ini. Pada penelitian ini, peneliti ingin mengetahui keberadaan mikroorganisme yaitu khamir yang berasosiasi dengan bunga apel. Khamir telah diketahui lebih lanjut pada abad ini yang sebagian besar berada pada nektar bunga (Boutroux, 1884; Nadson dan Krassilnikov, 1927). Selanjutnya melalui tahapan identifikasi, khamir yang telah ditemukan dapat diidentifikasi jenisnya dan bisa untuk diaplikasikan pada bidang-bidang yang terkait, misalnya pada bidang bioteknologi konvensional maupun bioteknologi modern.

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Jenis khamir yang ditemukan pada bunga apel (*Malus sylvestris* Mill) berdasarkan karakter morfologi termasuk ke dalam kelompok ascomycetes.
2. Semua isolat mempunyai kemampuan dalam fermentasi karbohidrat (glukosa, fruktosa dan galaktosa) dan mempunyai kemampuan tumbuh pada media agar YME konsentrasi gula 50%.
3. Identifikasi secara molekular jenis isolat khamir dengan kemampuan fermentasi karbohidrat terbaik, yaitu isolat khamir AAR-7 memiliki kemiripan dengan *Clavispora lusitaniae* strain 37C (97%), isolat khamir AAR-8 memiliki kemiripan dengan *Saccharomyces cerevisiae* strain LYY (99%), isolat khamir AMR-1 memiliki kemiripan dengan *Pichia kudriavzevii* strain YS156 (100%) dan isolat khamir AMR-4 memiliki kemiripan dengan *Pichia kudriavzevii* strain YS156 (99%).

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan untuk penelitian selanjutnya yaitu perlu dilakukan pembuatan kultur khamir yang berkelanjutan, meliputi kultur stok (*stock culture*) dan kultur kerja (*working culture*) dan dilakukan uji fisiologi dan biokimia lebih lanjut untuk mengetahui kemampuan khamir dalam metabolisme suatu zat kimia.

DAFTAR PUSTAKA

- Aidoo, KE., MJR. Nout, & PK. Sarkar. (2006). Occurrence and Function of Yeasts in Asian Indigenous Fermented Foods. *FEMS Yeast Research*, 6(1): 30–39.
- Alexopoulos, CJ, Mims, CW, & Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Articus, K. (2004). *Phylogenetic Studies in Usnea (Parmeliaceae) and Allied Genera. Comprehensive Summaries of Uppsala. Disertations. Acta Universitatis Upsaliensis: Faculty of Science and Technology*.
- Bachruddin, Z. (2014). *Teknologi fermentasi pada industri peternakan*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Bai, F. Y., Liang, H. Y., & Jia, J. H. (2000). Taxonomic relationships among the taxa in the *Candida guilliermondii* complex, as revealed by comparative electrophoretic karyotyping. *International journal of systematic and evolutionary Microbiology*, 50(1), 417-422.
- Barnett, J. A., Payne, R. W., & Yarrow, D. (1983). *Yeasts: Characteristics and identification*. Cambridge University Press.
- Basukriadi, A., Sjamsuridzal, W., & Putra, B. B. (2010). Molecular identification and diversity of yeasts associated with *Apis cerana* foraging on flowers of *Jatropha integerrima*. *Microbiology Indonesia*, 4(1), 9.
- Bhatia, S.C. 2016. *Food Biotechnology*. New Delhi : Woodhead Publishing India Ltd.
- Boekhout, T., R.J. Bandoni, J.W. Fell & K.J. Kwonchung. (1998). *Discussion of teleomorphic and anamorphic genera of heterobasidiomycetous yeasts*. Dalam: Kurtzman, C. P. & J. W. Fell. (eds.). (1998). *The yeasts: A taxonomic study*. 4rd ed. Amsterdam: Elsevier.
- Boundy-Mills, K. (2006). Methods for investigating yeast biodiversity. In *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (pp. 67-100). Heidelberg: Springer, Berlin.
- Bourdichon, F., S. Casaregola, C. Farrokh, JC. Frisvad, ML. Gerds, WP. Hammes, & J. Harnett. 2012. Food Fermentations: Microorganisms with Technological Beneficial Use. *International Journal of Food Microbiology*. 154(3): 87–97.
- Boutroux, L. (1884). Conservation des ferments alcooliques dans la nature. *Annales des Sciences Naturelles, Série IV, Botanique* 17, 145–209.

- Buenrostro-Figueroa, JJ., A. Carolina, C. Flores-gallegos, R. Rodríguez-Herrera, H. Garza-Toledo, & CN. Aguilar. (2012). Identification of Yeast Isolated from Sotol (*Dasyilirion* spp.) Natural Fermentation. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de de Coahuila*. 4(8): 18–23.
- Cameron SL., Miller KB., D’Haese CA., Whiting MF., Barker SC. (2004). Mitochondrial genome data alone are not enough to unambiguously resolve the relationship of Entognatha, Insecta and Crustacea sensu lato (Arthropoda). *Cladistics*. 20: 534-557.
- Campbell, N. A., dan Reece, J. B. (2008). *Biologi. Edisi 8, Jilid 1*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Canto, A., Pérez, R., Medrano, M., Castellanos, M.C., Herrera, C.M. (2007). Intraplant variation in nectar sugar composition in two *Aquilegia* species (Ranunculaceae): contrasting patterns under field and greenhouse conditions. *Annals of Botany* 99: 653–660.
- Canto, A., Herrera, C.M., Medrano, M., Pérez, R., García, I.M. (2008). Pollinator foraging modifies nectar sugar composition in *Helleborus foetidus* L. (Ranunculaceae): an experimental test. *American Journal of Botany* 95: 315–320.
- Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (2002). *Microbiology: a Laboratory Manual* 6th edn. San Francisco Benjamin Cummings Pearson Education.
- Carrau, F., C. Gaggero, & PS. Aguilar. (2015). Yeast Diversity and Native Vigor for Flavor Phenotypes. *Trends in Biotechnology*, 33(3): 1-7.
- Castillo-Castillo, Y., Ruiz-Barrera, O., Burrola-Barraza, E., Arzola-Alvarez, C., Corral-Luna, A., Rodriguez-Muela, C., & Murillo-Ortiz, M. (2015). Inclusion levels of fermented apple bagasse on in vitro rumen fermentation of alfalfa hay. *J Agric Sci Technol A*, 5, 40-46.
- Castillo-Castillo, Y., Ruiz-Barrera, O., Burrola-Barraza, M. E., Marrero-Rodriguez, Y., Salinas-Chavira, J., Angulo-Montoya, C., & Camarillo, J. (2016). Isolation and characterization of yeasts from fermented apple bagasse as additives for ruminant feeding. *Brazilian journal of microbiology*, 47(4), 889-895.
- CBD Secretariat. (2016). Convention on Biological Diversity (CBD): List of Parties. <https://www.cbd.int/information/parties.shtml>. Accessed on: 2016-9-22.
- Choudhary, D. K & Johri, B. N. (2009). *Basidiomycetous Yeasts: Current Status*. New Delhi: Springer Science.

- Ciardo, D. E., Schär, G., Böttger, E. C., Altwegg, M., & Bosshard, P. P. (2006). Internal transcribed spacer sequencing versus biochemical profiling for identification of medically important yeasts. *Journal of clinical microbiology*, 44(1), 77-84.
- Daniel, H. M., & Meyer, W. (2003). Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts. *International journal of food microbiology*, 86(1), 61-78.
- de Llanos Frutos, R., Fernández-Espinar, M. T., & Querol, A. (2004). Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85(3), 175-185.
- Dufour, J. P., Verstrepen, K., Derdelinckx, G., Boekhout, T., & Robert, V. (2003). *Yeasts in Food—Beneficial and Detrimental Aspects*. Woodhead Publishing: New York, USA.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic and evolutionary microbiology*, 49(1), 329-337.
- Fatchiyah, Arumingtyas, E. L., Widyarti, S., Rahayu, S. (2011). *Biologi Molekular Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Fell J.W., Boekhout, T., and Freshwater, D.W. (1995). The role of nucleotide sequence analysis in the systematics of the yeast genera *Cryptococcus* and *Rhodotorula*. *Stud. Mycol.*, 38, 129-146.
- Fell, J. W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., & Statzell-Tallman, A. (2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(3), 1351-1371.
- Fernández-Espinar, M. T., P. Martorell., R. De Llanos & Amparo Querol. (2006). *Molecular methods to identify and characterize yeasts in foods and beverages*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Firani, N. K. (2017). *Metabolisme karbohidrat tinjauan biokimia dan patologis*. Malang: UB Press.
- Fujita, S. I., Senda, Y., Nakaguchi, S., & Hashimoto, T. (2001). Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *Journal of clinical microbiology*, 39(10), 3617-3622.

- Gange, A.C., Smith, A.K. (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi influence visitation rates of pollinating insects. *Ecological Entomology* 30, 600–606.
- Gehring, C., Bennet, A. (2009). Mycorrhizal fungal–plant–insect interactions: the importance of a community approach. *Environmental Entomology* 38, 93–102.
- Geiser, D. M. (2004). *Practical molecular taxonomy of fungi*. In *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine* (pp. 3-14). Springer, Boston, MA.
- Haddad, R., Alemzadeh, E., Ahmadi, A. R., Hosseini, R., & Moezzi, M. (2014). Identification of Chlorophyceae based on 18S rDNA sequences from Persian Gulf. *Iranian journal of microbiology*, 6(6), 437.
- Hagler, A. (1987). *Ecology of aquatic yeasts*. The yeasts, 1, 181-205.
- Han, S. M., Hyun, S. H., Lee, H. B., Lee, H. W., Kim, H. K., & Lee, J. S. (2015). Isolation and identification of yeasts from wild flowers collected around Jangseong lake in Jeollanam-do, republic of Korea, and characterization of the unrecorded yeast *Bullera coprosmaensis*. *Mycobiology*, 43(3), 266-271.
- Harley, J. P. and L. M. Prescott. (2002). *Laboratory Exercise in Microbiology*. 5th edition. New York: McGraw-Hill Education.
- Herrera, C.M., García, I.M., Pérez, R. (2008). Invisible floral larcenies: microbial communities degrade floral nectar of bumble bee-pollinated plants. *Ecology* 89, 2369–2376.
- Herrera, C., De Vega, C., Canto, A., Pozo, M.I. (2009). Yeasts in floral nectar: a quantitative survey. *Annals of Botany* 103, 1415–1423.
- Herrera, C.M. (2000). Measuring the effects of pollinators and herbivores: evidence for non-additivity in a perennial herb. *Ecology* 81, 2170–2176.
- Hidayat, T. dan Pancoro, A. (2008). Kajian filogenetika molekuler dan peranannya dalam menyediakan informasi dasar untuk meningkatkan kualitas sumber genetik anggrek. *Jurnal AgroBiogen* 4(1):35-40.
- James, S. A., Collins, M. D., & Roberts, I. N. (1996). Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspota*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(1), 189-194.
- James, S.A & M. Stratford. (2003). *Spoilage yeasts with emphasis on the genus Zygosaccharomyces*. Dalam: Dufour, J. P., Verstrepen, K., Derdelinckx,

- G., Boekhout, T., & Robert, V. (2003). *Yeasts in Food—Beneficial and Detrimental Aspects*. Woodhead Publishing: New York, USA.
- Jespersen, L. 2003. Occurrence and Taxonomic Characteristics of Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Predominant in African Indigenous Fermented Foods and Beverages. *FEMS Yeast Research*. 3: 191-200.
- Kanti, A. T. I. T. (2004). Identifikasi jenis khamir yang diisolasi dari tanah gambut Taman Nasional Bukit Duabelas, Jambi. *BioSmart*, 6(1), 10-14.
- Katsir, I. 2004. *Tafsir Ibnu Katsir*. Bogor: Pustaka Imam Asy-Syafi'i.
- Kik, C., Korpelainen, H., Hogel, R., Asdal, A., Elias, P., Draper, D. & Magos, B. J. (2013). *Malus sylvestris*, Crab Apple. The IUCN Red List of Threatened Species.
- Kurtzman CP and Fell, J.W. (2006). *Yeast systematics and phylogeny-implication of molecular identification methods for studies in ecology. Biodiversity and Ecophysiology of Yeast*. Berlin: Springer-verlag.
- Kurtzman, C. P. (1990). *Classification and general properties of yeasts. Yeast biotechnology and biocatalysis*. New York: Marcel Dekker, 1-34.
- Kurtzman, C. P., Boekhout, T. E. U. N., Robert, V. I. N. C. E. N. T., Fell, J. W., & Deak, T. I. B. O. R. (2003). *Methods to identify yeasts*. *Yeasts in Food, Beneficial and Detrimental Aspects*, 69-121.
- Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (1998). *The Yeast A Taxonomic Study*. New York: Elsevier.
- Lachance & Starmer. 1998. *Ecology and yeasts*. Dalam: Kurtzman, C.P. & Fell, J.W.(eds.). (1998). *The yeasts: A taxonomic study*. 4rd. Amsterdam: Elsevier.
- Lachance, M.A., W.T. Starmer and H.J. Phafif. (1990). *Metschnikowia hawaiiensis* sp. nov., a heterothallic haploid yeast from Hawaiian morning glory and associated drosophilids. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 415-420.
- Lyons-Weiler J., Hoelzer GA., Tausch RJ. (1998). Optimal outgroup analysis. *Biol. J. Linn. Soc.* 64: 493-511.
- Marchant, R. 1979. Wall growth during spore differentiation and germination. In: J.H. Burnett and A.P.J. Trinci (Eds.), *Fungal Walls and Hyphal Growth*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-148.
- McLaughlin, D.J., Hanson, R.W., Frieders Swann, E.C., and Szabo, L.J. (2004). *Am. J. Bot.* 91: 808 – 15.

- Merseguel, K. B., Nishikaku, A. S., Rodrigues, A. M., Padovan, A. C., e Ferreira, R. C., de Azevedo Melo, A. S., ... & Colombo, A. L. (2015). Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. *BMC infectious diseases*, 15(1), 57.
- Mims, C.W, E.A. Richardson and J.W Kimbrough. 1990. Ultrastructure of ascospore delimitation in fi-eeze substituted samples of *Ascodesmis nigricans* (Pezizales). *Protoplasma* 156, 94-102.
- Mirhendi, H., Diba, K., Rezaei, A., Jalalizand, N., Hosseinpur, L., Khodadadi, H. 2007. Colony-PCR Is a Rapid and Sensitive Method for DNA Amplification in Yeasts. *Iranian J Publ Health*, Vol. 36, No.1, pp.40-44.
- Muladno. (2002). *Teknik Rekayasa Genetika*. Bogor: Pustaka Wirausaha Muda.
- Nadson, G.A., Krassilnikov, N.A., (1927). La levure du nectar des fleurs: *Anthomyces reukaufii* Gruess. *Bulletin de la Société Mycologique de France* 43, 232–244.
- Nurchayati, E. (2014). *Khasiat dan Manfaat Dahsyatnya Kulit Apel*. Tanpa Kota: Jendela Sehat.
- Okafor, N. (2007). *Modern industrial microbiology and biotechnology*. Amerika: Science Publishers.
- Prescott, D. M. (1975). *Methods in Cell Biology*, Yeast Cells. Vol. XII. New York: Academic Press.
- Price, C. W., Fuson, G. B., & Phaff, H. J. (1978). Genome comparison in yeast systematics: delimitation of species within the genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, and *Pichia*. *Microbiological reviews*, 42(1), 161.
- Querol, A. and Fleet, G. H. (2006). *Yeast in Food and Beverages*. New York: Springer-Verlag.
- Roosheroe, I.G., Sjamsuridzal, W., Oetari, A. (2006). *Mikologi: Dasar dan terapan*. Jakarta: Yayasan Pustaka Obor Indonesia.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol*, 4(4), 406-425.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual. third*. Cold pring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanderson MJ., Shaffer HB. 2002. Troubleshooting molecular phylogenetic analyses. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33: 49-72.

- Sasmitamihardja, D. dan Siregar, A. H. (1990). *Dasar-dasar fisiologi tumbuhan*. Bandung: ITB Press.
- Satyanarayana, T. & Kunze, G. (2009). *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. New Delhi: Springer Science.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... & Miller, A. N. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (*ITS*) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246.
- Sheffield, C. S., Smith, R. F., & Kevan, P. G. (2005). Perfect syncarpy in apple (*Malus* × *domestica* ‘Summerland McIntosh’) and *ITS* implications for pollination, seed distribution and fruit production (Rosaceae: Maloideae). *Annals of Botany*, 95(4), 583-591.
- Shihab, M. Q. (2015). *Dia Di Mana-Mana*. Jakarta: Lentera Hati.
- Shihab, M. Q. (2017). *Tafsir Al-Mishbah*. Jakarta: Lentera Hati.
- Slaughter, J. C., Priest, F. G., and Campbell, I. 2003. *Brewing Microbiology*. New York: Springer Science.
- Spencer, J.F.T., and Spencer, D.M. (1997). (eds. Spencer J.F.T., Spencer D.M.) *Taxonomy: the names of the yeasts*. Berlin: Springer-Verlag, pp. 11–32.
- Sugita, T., Nishikawa, A., Ikeda, R., & Shinoda, T. (1999). Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. *Journal of clinical microbiology*, 37(6), 1985-1993.
- Sulisetijono. (2015). *Bahan Serahan: Fungi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Sumerta, I. N., & Kanti, A. (2016). Keanekaragaman Khamir Yang Diisolasi Dari Sumber Daya Alam Pulau Enggano, Bengkulu Dan Potensinya Sebagai Pendegradasi Selulosa [Diversity of Yeasts Isolated From Natural Resources of Enggano Island, Bengkulu and *ITS* Cellulolytic Potency]. *Berita Biologi*, 15(3).
- Suryaningsih, V., Ferniah, R. S., & Kusdiyantini, E. (2018). Karakteristik Morfologi, Biokimia, Dan Molekuler Isolat Khamir Ik-2 Hasil Isolasi Dari Jus Buah Sirsak (*Annona muricata* L.). *Jurnal Biologi*, 7(1), 18-25.
- Tavanti, A., Davidson, A. D., Gow, N. A., Maiden, M. C., & Odds, F. C. (2005). *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace

- Candida parapsilosis* groups II and III. *Journal of clinical microbiology*, 43(1), 284-292.
- Teixido, N., Usall, J., Magan, N., & Vinas, I. (1999). Microbial population dynamics on Golden Delicious apples from bud to harvest and effect of fungicide applications. *Annals of applied biology*, 134(1), 109-116.
- Turker, M. (2014). *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. 27th VH Yeast Conference, Istanbul. Advances in Science and Industrial Productionss of Baker's Yeast.
- Vadkertiová, R., Molnárová, J., Vránová, D., & Sláviková, E. (2012). Yeasts and yeast-like organisms associated with fruits and blossoms of different fruit trees. *Canadian journal of microbiology*, 58(12), 1344-1352.
- Van der Vossen, J. M. B. M., Rahaoui, H. A. K. I. M., de Nijs, M. W., & Hartog, B. J. (2003). *PCR methods for tracing and detection of yeasts in the food chain*. Dalam: Dufour, J. P., Verstrepen, K., Derdelinckx, G., Boekhout, T., & Robert, V. (2003). *Yeasts in Food—Beneficial and Detrimental Aspects*. Woodhead Publishing: New York, USA.
- van Wyk, R.W.J., and M.J. Wingfield. 1991. Ultrastructure of ascosporeogenesis in *Ophiostoma davidsonii*. *Mycol. Res.* 95, 725-730.
- Vaughan-Martini A., & Kurtzman CP. (1985). Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces sensu stricto*. *Int J Syst Bacteriol* 35:508–511.
- Walker, G.M. (1998). *Yeast physiology and biotechnology*. New York: Wiley.
- Wang, H., Xiao, M., Chen, S. C. A., Kong, F., Sun, Z. Y., Liao, K., & Hu, Z. D. (2012). In vitro susceptibilities of yeast species to fluconazole and voriconazole as determined by the 2010 National China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF-NET) study. *Journal of clinical microbiology*, 50(12), 3952-3959.
- Wanger, A., Chavez, V., Huang, R., Wahed, A., Dasgupta, A., Actor, J. (2017) *Microbiology and molecular diagnosis in pathology*. Amsterdam: Elsevier Science B. V.
- Watanabe, M., Uchida, N., Fujita, K., Yoshino, T., & Sakaguchi, T. (2016). Bread and effervescent beverage productions with local microbes for the local revitalization. *International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology*, 6(3), 381-384.
- Yarrow D. (1998). *Methods for the isolation, maintenance and identification of yeast*. Dalam: Kurtzman, C. P. & Fell, J.W. (eds.). (1998). *The yeasts: A taxonomic study*. 4rd ed. Amsterdam: Elsevier Science B. V.

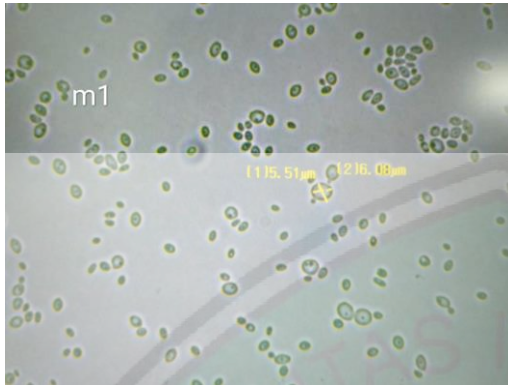
Yulianti, S., Irlansyah, Junaedi, E., dan Mufatis W. (2015). *Khasiat dan Manfaat Apel*. Malang: Agromedia Pustaka.

Zhang, L., Xiao, M., Wang, H., Gao, R., Fan, X., Brown, M., ... & Xu, Y. C. (2014). Yeast identification algorithm based on use of the Vitek MS system selectively supplemented with ribosomal DNA sequencing: proposal of a reference assay for invasive fungal surveillance programs in China. *Journal of clinical microbiology*, 52(2), 572-577.

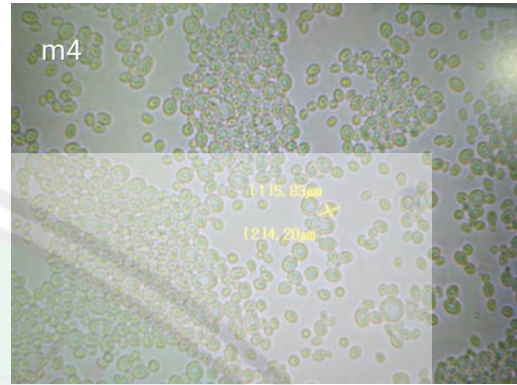


LAMPIRAN 1 GAMBAR SEL KHAMIR HASIL ISOLASI BUNGA APEL
(*Malus sylvestris* Mill)

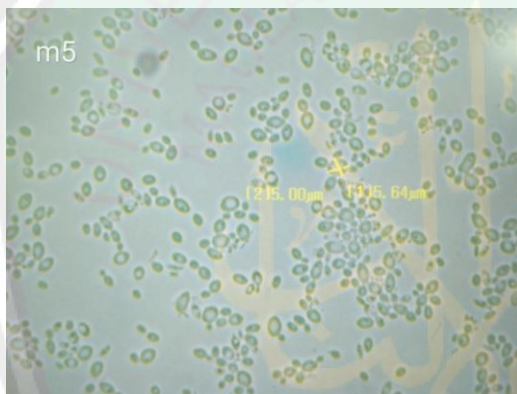
Isolat Bunga Apel Manalagi



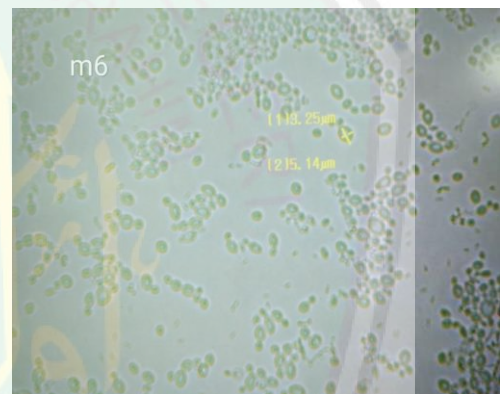
AMR-1



AMR-4

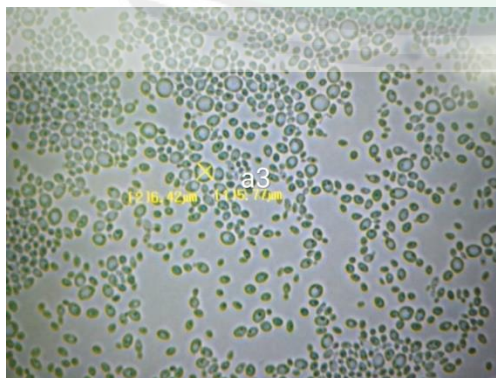


AMR-5

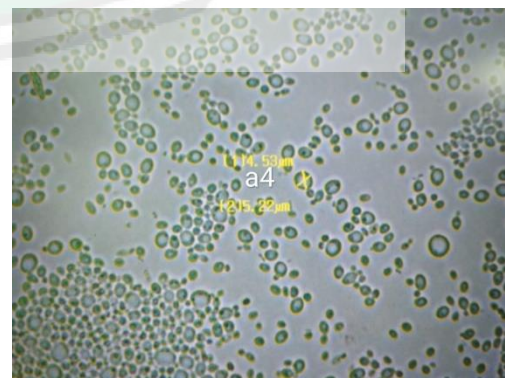


AMR-6

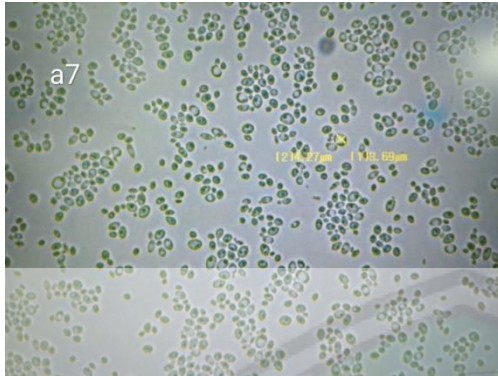
Isolat Bunga Apel Ana



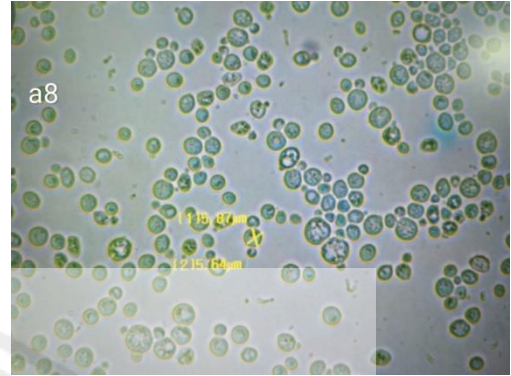
AAR-3



AAR-4



AAR-7



AAR-8



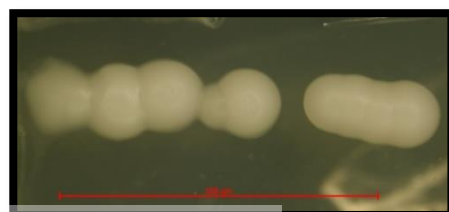
**LAMPIRAN 2 PENGAMATAN MAKROSKOPIS KOLONI KHAMIR
HASIL ISOLASI BUNGA APEL (*Malus sylvestris* Mill)**



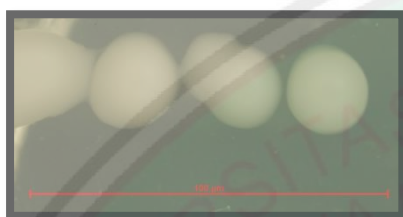
Koloni AAR-3



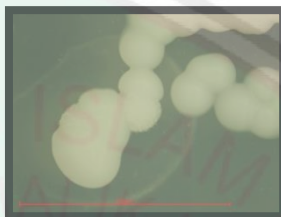
Koloni AAR-4



Koloni AAR-7



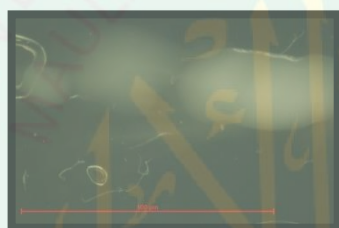
Koloni AAR-8



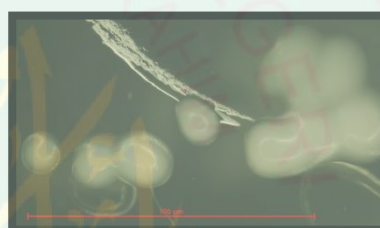
Koloni AMR-1



Koloni AMR-4



Koloni AMR-5

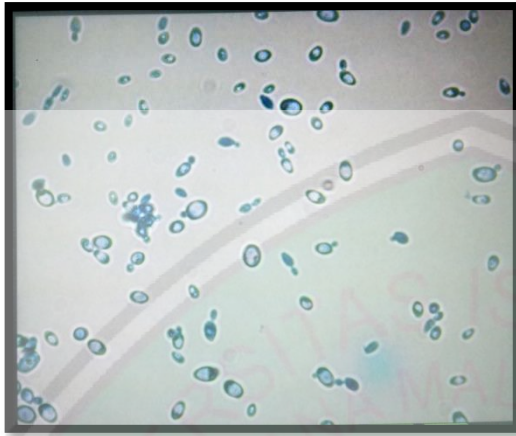


Koloni AMR-6

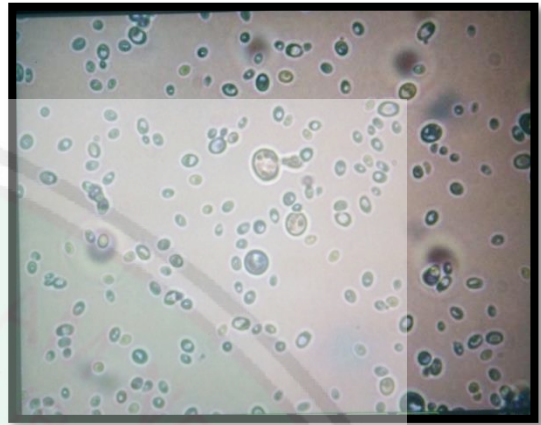
Keterangan: Kode AAR: Isolat khamir dari bunga apel ana

Kode AMR: Isolat khamir dari bunga apel manalagi

LAMPIRAN 3 PENGAMATAN MIKROSKOPIS SEL KHAMIR HASIL ISOLASI BUNGA APEL (*Malus sylvestris* Mill)



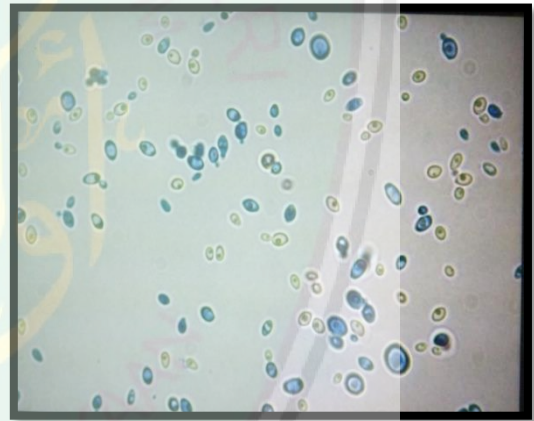
A) AAR-3



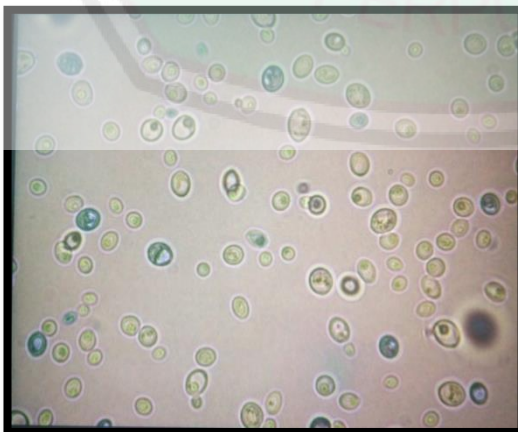
B) AAR-7



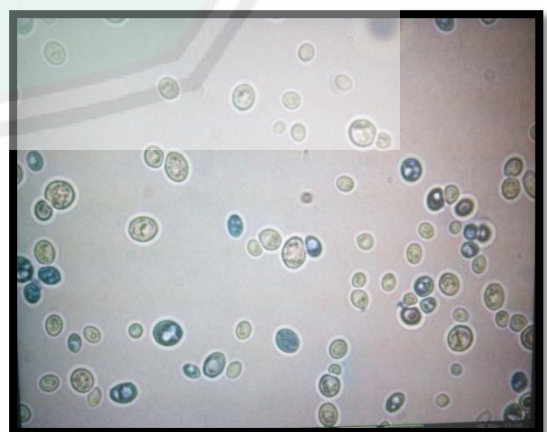
C)AAR-8



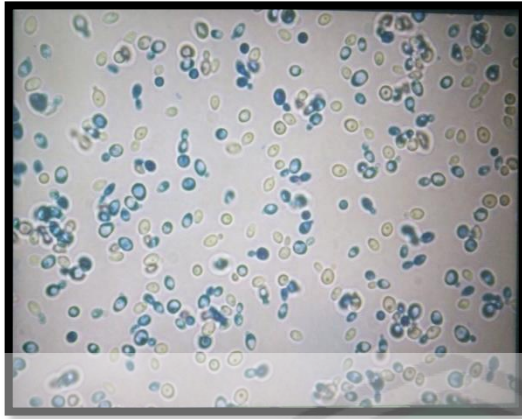
D)AAR-4



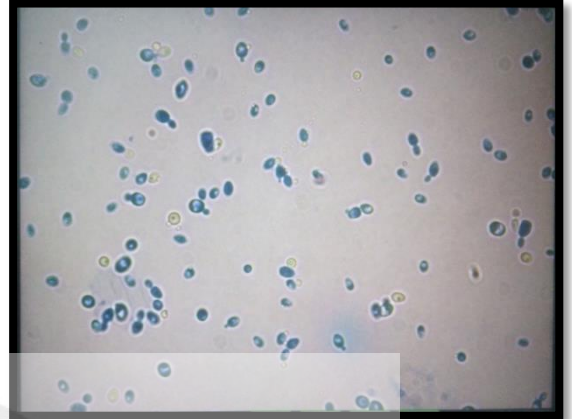
E)AMR-1



F)AMR-4



G)AMR-5



H)AMR-6

Keterangan: Kode AAR: Isolat khamir dari bunga apel ana

Kode AMR: Isolat khamir dari bunga apel manalagi



**LAMPIRAN 4 HASIL FERMENTASI KARBOHIDRAT DARI ISOLAT
KHAMIR**

Hasil Fermentasi Glukosa

Nama Isolat	Ulangan																				
	Hari Ke-1			Hari Ke-2			Hari Ke-3			Hari Ke- 4			Hari Ke-5			Hari Ke-6			Hari Ke-7		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
AMR- 1				+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMR- 4	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMR- 5			+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMR- 6							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AAR- 3				+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AAR- 4				+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AAR- 7				+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AAR- 8				+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan: + = Adanya gelembung gas hasil fermentasi pada tabung durham.

Hasil Fermentasi Fruktosa

Nama Isolat	Ulangan																							
	Hari Ke-1			Hari Ke-2			Hari Ke-3			Hari Ke-4			Hari Ke-5			Hari Ke-6			Hari Ke-7					
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
AMR-1								+			+	+		+	+		+	+		+	+		+	+
AMR-4	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMR-5							+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMR-6									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AAR-3							+		+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AAR-4					+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AAR-7										+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AAR-8						+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan: + = Adanya gelembung gas hasil fermentasi pada tabung durham.

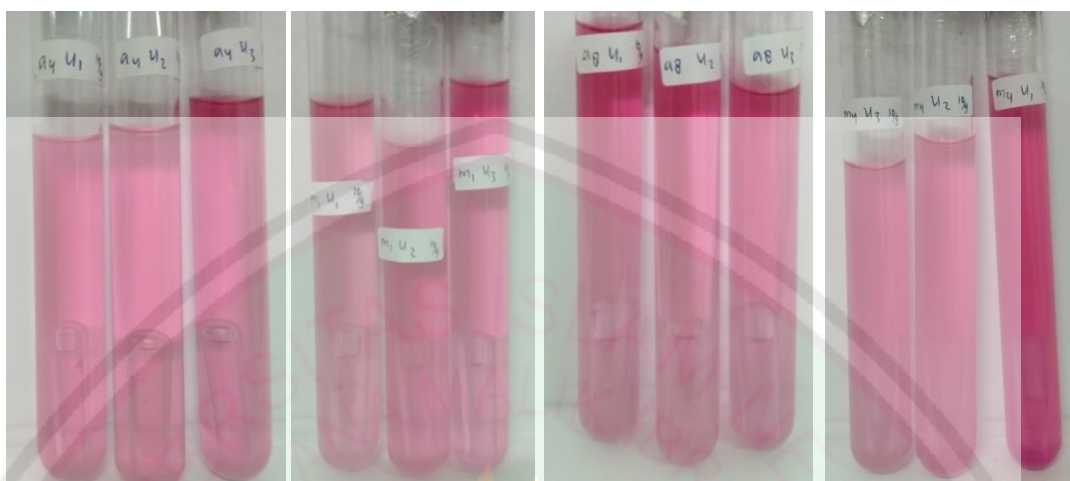
Hasil Fermentasi Galaktosa

Nama Isolat	Ulangan																							
	Hari Ke-1			Hari Ke-2			Hari Ke-3			Hari Ke-4			Hari Ke-5			Hari Ke-6			Hari Ke-7					
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
AMR-1												+				+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMR-4				+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMR-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMR-6		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AAR-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AAR-4	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AAR-7						+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AAR-8				+				+	+		+	+		+	+		+	+		+	+		+	

Keterangan: + = Adanya gelembung gas hasil fermentasi pada tabung durham.

LAMPIRAN 5 PENGAMATAN FERMENTASI KARBOHIDRAT DARI ISOLAT KHAMIR (Hari ke-7)

Fermentasi glukosa

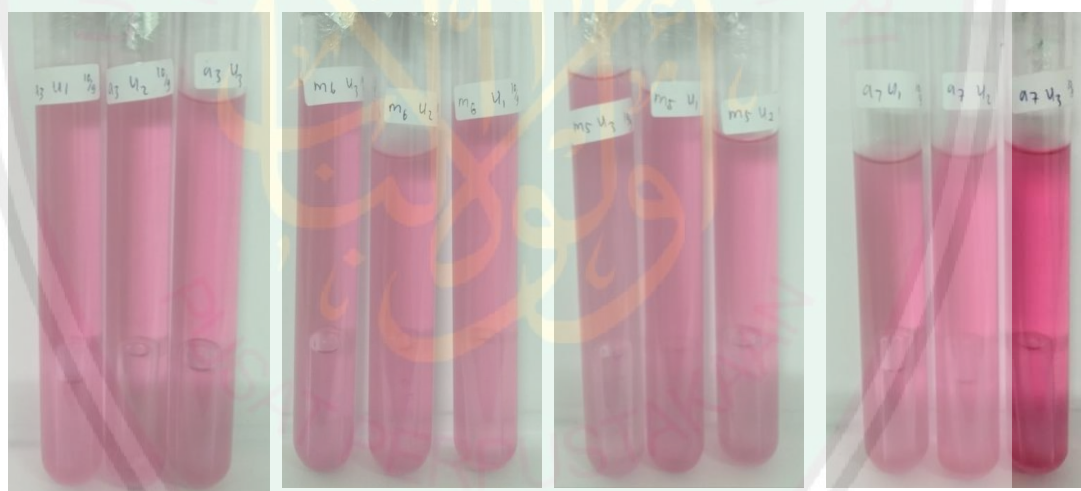


Isolat AAR-4

Isolat AMR-1

Isolat AAR-8

Isolat AMR-4



Isolat AAR-3

Isolat AMR-6

Isolat AMR-5

Isolat AAR-7

Fermentasi fruktosa



Fermentasi galaktosa

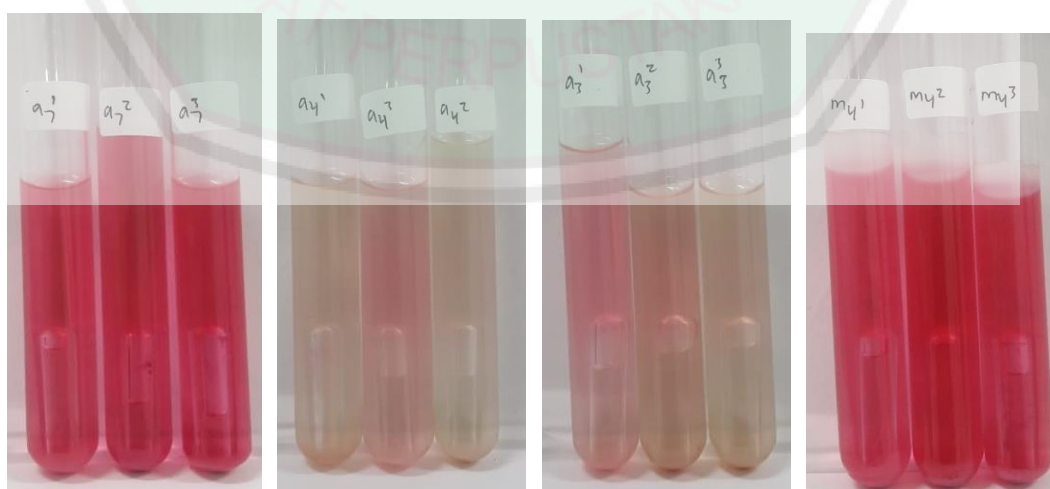


Isolat AMR-1

Isolat AAR-8

Isolat AMR-6

Isolat AMR-5



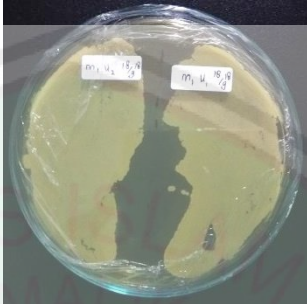
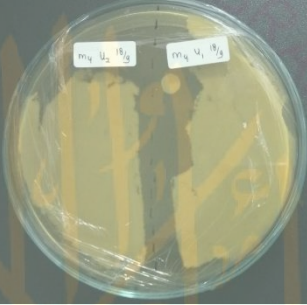

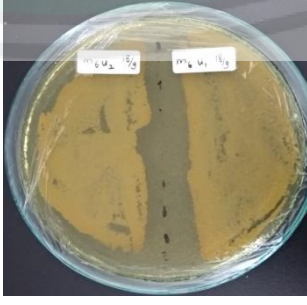
Isolat AAR-7

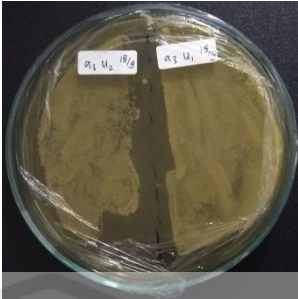
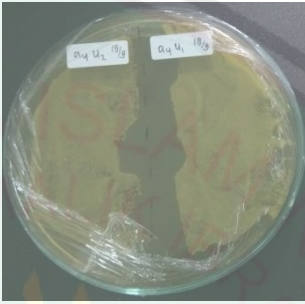
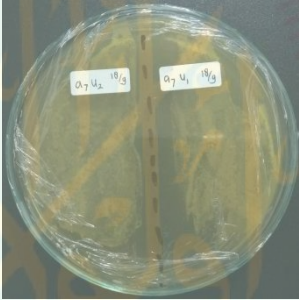
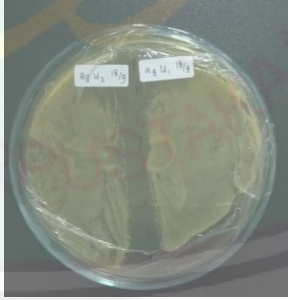
Isolat AAR-4

Isolat AAR-3

Isolat AMR-4

**LAMPIRAN 6 PENGAMATAN UJI PERTUMBUHAN ISOLAT KHAMIR
PADA MEDIA *Glucose Peptone Yeast Extract Agar* (GPY Agar)
KONSENTRASI GULA 50%**

Nama Isolat	Pengamatan	Hasil
AMR-1		+
AMR-4		+
AMR-5		+
AMR-6		+

<p>AAR-3</p>		<p>+</p>
<p>AAR-4</p>		<p>+</p>
<p>AAR-7</p>		<p>+</p>
<p>AAR-8</p>		<p>+</p>

Keterangan: + = Isolat khamir dapat tumbuh pada media YMEA dengan konsentrasi gula 50%

**LAMPIRAN 7 HASIL SEKUENSING ISOLAT KHAMIR DARI BUNGA
APEL (*Malus sylvestris* Mill)**

> *Clavispora lusitaniae* strain 37C

TGTTTCGTGTT TGTACTTACG CACTGTCTTT TCGACAAAA AATA G AATCT TTATC TA TCA
TTCTGAA TACTACTTTATA TATC AAAACTT T C AACACG GATCTCT TGG TTCT CGC ATC
GATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAGTATGACTTGCAGACGTGAATCATCGAATCT
TTGAACGCACATTGCGCCTCGAGGCATTCTCGAGGCATGCCTGTTTGAGCGTCGCATCCCC
TCTAACCCCGGTTAGGCGTTGCTCCGAAATATCAACCGCGCTGTCAAACACGTTTACAGCA
CGACATTTCCGCCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGA
GGAA

Keterangan: Isolat AAR-7 yang diisolasi dari bunga apel ana.

> *Saccharomyces cerevisiae* strain LYY

TAAACTAATTATCGGTCGTTGTGTTTTGAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAG
AGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC
GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGT
GCTTTTGTATAGGACAATAAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTCATATC
TTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACA
ATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACGGAAATTTAA
AATATTAACAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
AATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT
TGCGCCCTTGGTATTCTAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCAAACATT
CTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGG
ATGTTTTTTTTCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTGC
TTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATTTTTTATACTGAGCGTATTGGACGTTATCGA
TAAGAAGAGAAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTTAAAGTTTTGACCTCAAATCAGGTAG
GAGTACCCGCTGAACTTTGTCATATCATTAAAGCAGAAGGAATAG

Keterangan: Isolat AAR-8 yang diisolasi dari bunga apel ana.

> *Pichia kudriavzevii* strain YS156

TTTTGCTTTGGAGTAGTACTACACTGCGTGAGCGGACGAAAACAAAAACACCTAAAATGT
GGAATATAGCATATAGTCGACAAGAGAAATCTACGAAAAACAAACAAACTTTCAACAAC
GGATCTCTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATT
GCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCTCGGCATTCCGGGGG
GCATGCCTGTTTGAGCGTCGTTTCCATCTTGCFCGTGCGCAGAGTTGGGGGAGCGGAGCG
GACGACGTGTAAGAGCGTCCGAGCTGCGACTCGCCTGAAAGGGAGCGAAGCTGGCCGAG
CGAACTAGACTTTTTTTCAGGGACGCTTGCGGCCGAGAGCGAGTGTTCGAGACAACAA
AAAGCTCGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCG
AGGAAA

Keterangan: Isolat AMR-1 yang diisolasi dari bunga apel manalagi.

> *Pichia kudriavzevii* strain YS156

```
GACAACCAATCGTTTCGATTGTCTACACTGCGTGAGCGGACGAAAACAAAAACACCTAAA  
ATGTGGAATATAGCATATAGTCGACAAGAGAAATCTACGAAAAACAAACAAAACCTTTCAA  
CAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTG  
AATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCCTCGGCATTCCG  
GGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCGTTTCCATCTTGC GCGTGCGCAGAGTTGGGGGAGCGG  
AGCGGACGACGTGTAAGAGCGTCGGAGCTGCGACTCGCCTGAAAGGGAGCGAAGCTGGC  
CGAGCGAACTAGACTTTTTTTCAGGGACGCTTGGCGGCCGAGAGCGAGTGTTGCGAGACA  
ACAAAAGCTCGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAG  
CGGAGGAA
```

Keterangan: Isolat AMR-4 yang diisolasi dari bunga apel manalagi.

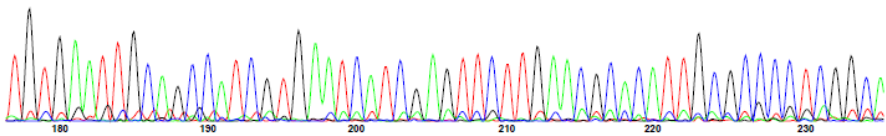


**LAMPIRAN 8 SEKUEN DNA ITS ISOLAT DAN SPESIES PEMBANDING
DARI GENBANK**

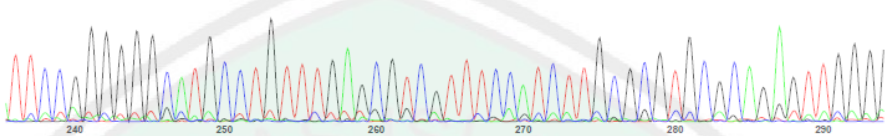
No.	Spesies	Nomor Akses
1	<i>Clavispora lusitaniae</i> strain 37C	KP764965.1
2	<i>Clavispora lusitaniae</i> strain 137A	KP765034.1
3	<i>Clavispora lusitaniae</i> strain 103A2	KP764993.1
4	<i>Clavispora lusitaniae</i> strain 112A2	KP765005.1
5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain LYY	MF944081.1
6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> isolate B-NC-12-OZ18	KF728798.1
7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> isolate B-NC-12-OAMR-12	KF728774.1
8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> isolate B-WHX-12-48	KC544501.1
9	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain YS156	KX942034.1
10	<i>Pichia kudriavzevii</i> IFM 56882	LC389036.1
11	<i>Pichia kudriavzevii</i> IFM 52277	LC389013.1
12	<i>Pichia kudriavzevii</i> IFM 51993	LC389012.1
13	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>chinensis</i> strain CBS 631.82	MH873277.1

Bioneer 10-ITS1-F

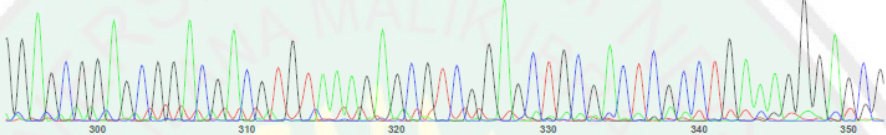
43 62 51 59 59 51 43 59 59 51 49 41 56 56 36 56 59 51 50 54 54 59 59 59 51 56 59 34 51 51 56 56 56 56 56 59 59 56 51 49 56 43 50 51 56 59 62 35 37 49 46 49 46 40 46 50 56 35 46
T G T G A A T T G C A G C C A T C G T G A A T C A T C G A G T T C T T G A A C G C A C A T T G C G C C C C T C G G C A



59 56 49 46 48 54 62 62 59 56 34 30 39 51 59 46 48 62 50 50 56 46 49 34 34 32 34 43 34 39 56 51 51 51 39 51 51 50 48 54 46 50 51 56 51 59 46 50 43 41 30 43 29 37 43 59 59 46
T T C G G G G G G G C A T G C T G T T T G A C G T C G T C G T T T C A T C T T G C G C G T G C G A G A G T T G G G



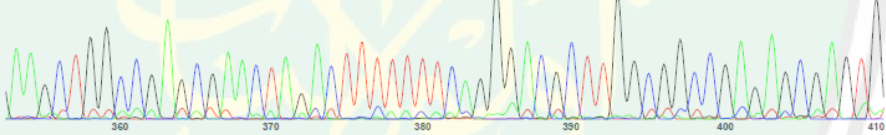
43 62 55 45 51 51 50 59 34 43 45 45 59 43 41 59 44 39 51 59 45 45 45 43 34 46 38 51 50 50 51 34 59 62 42 56 56 56 56 51 47 44 51 51 30 38 51 51 56 38 51 51 62 56 56 35 37 38
G G A G C G G A G C G G A C G A C G T G T A A A G A G C G T C G A G C T G C G A C T C G C C T G A A A G G A G C G



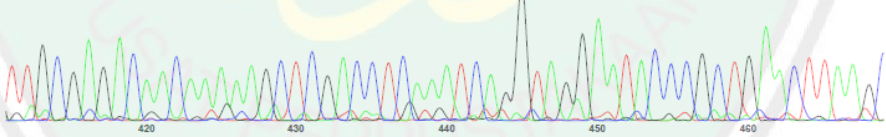
Instrument Model/Name:3730xl/Bioneer 3730xl Electropherogram Data Page 2 of 3

Bioneer 10-ITS1-F

51 51 42 56 56 56 62 51 56 51 62 42 51 42 56 56 56 56 56 24 43 51 56 56 56 56 56 56 56 23 56 36 28 38 23 62 56 56 62 31 47 56 47 43 56 50 56 32 54 39 52 42 52 38 39 52
A A G C T G G C G A G C G A A C T A G A C T T T T T T C A G G G A C G C T T G G C G C G A G A G C G A G T G



35 35 47 43 35 54 43 47 52 42 45 52 32 32 35 32 38 35 42 42 50 47 49 45 33 33 39 23 27 35 52 52 46 32 58 30 32 23 42 47 32 47 52 44 52 52 54 47 23 43 52 40 52 52 42 41 50 34 52
T T G C G A G A C A A C A A A A G C T C G A C C T C A A T C A G G T A G G A A T A C C G C T G A A C T T A A G C

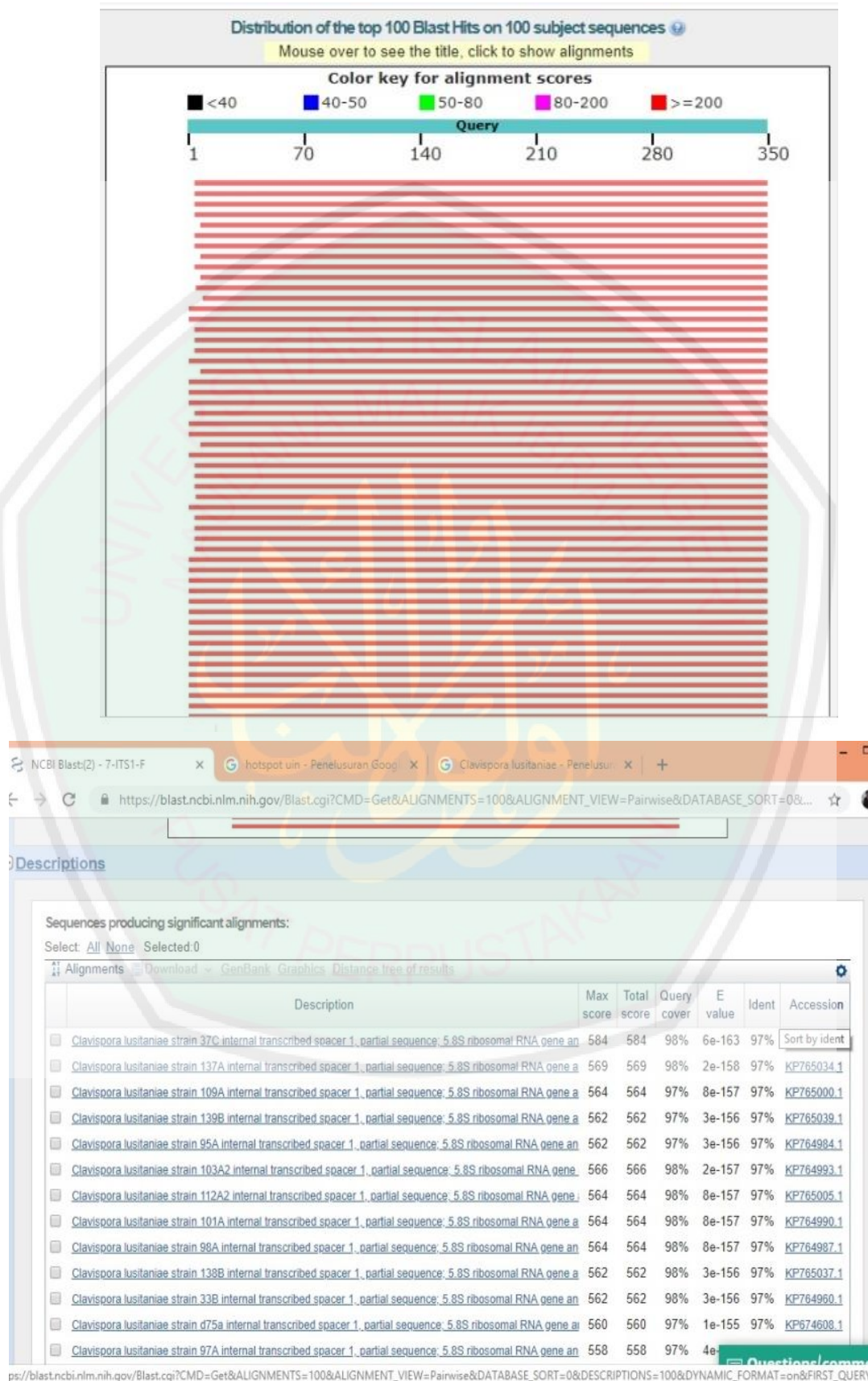


42 52 52 49 41 39 39 52 52 38 29 47 52 46 54 25 54 59 20
A T A T C A T A A G C G G A G G A

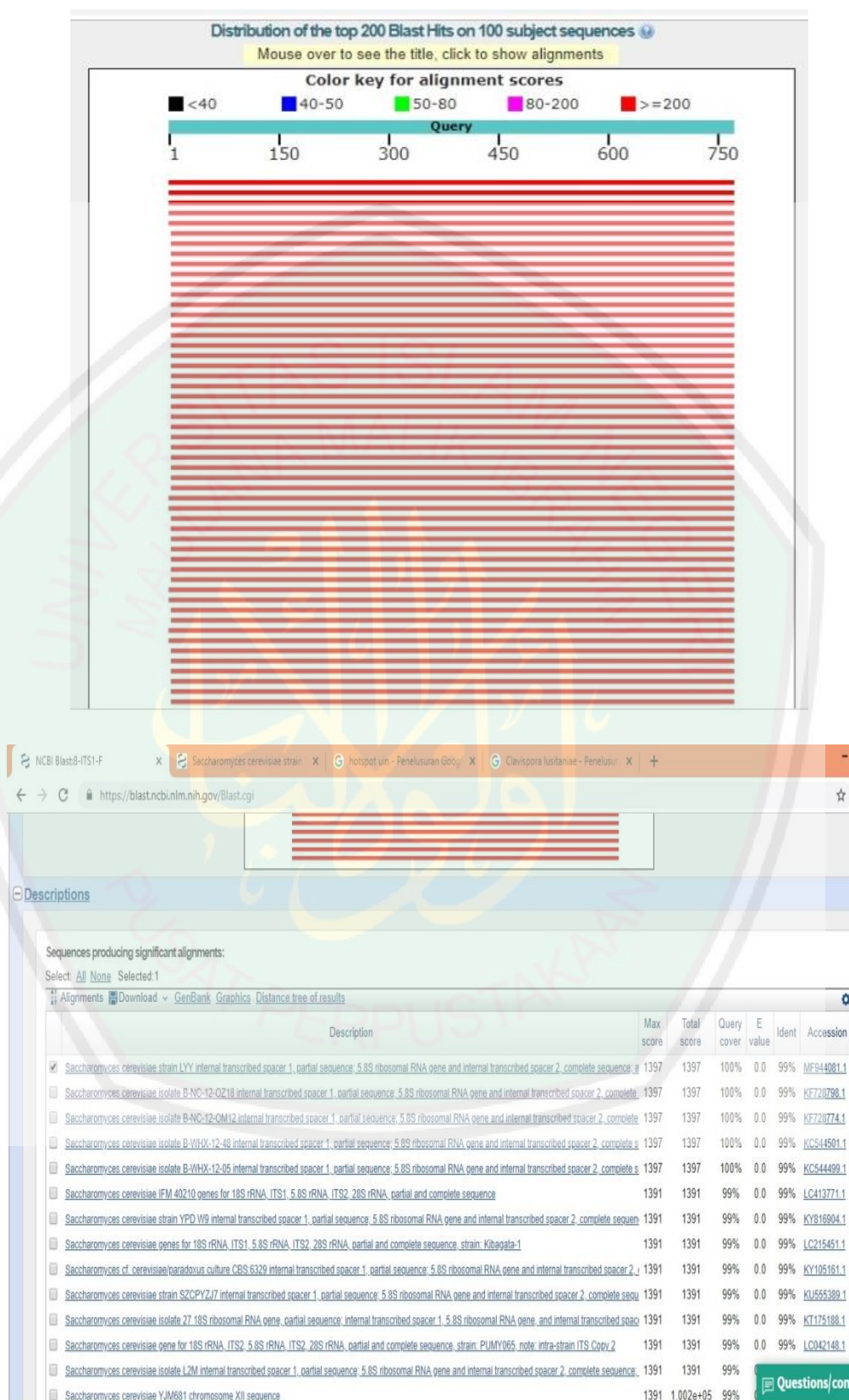


Instrument Model/Name:3730xl/Bioneer 3730xl Electropherogram Data Page 3 of 3

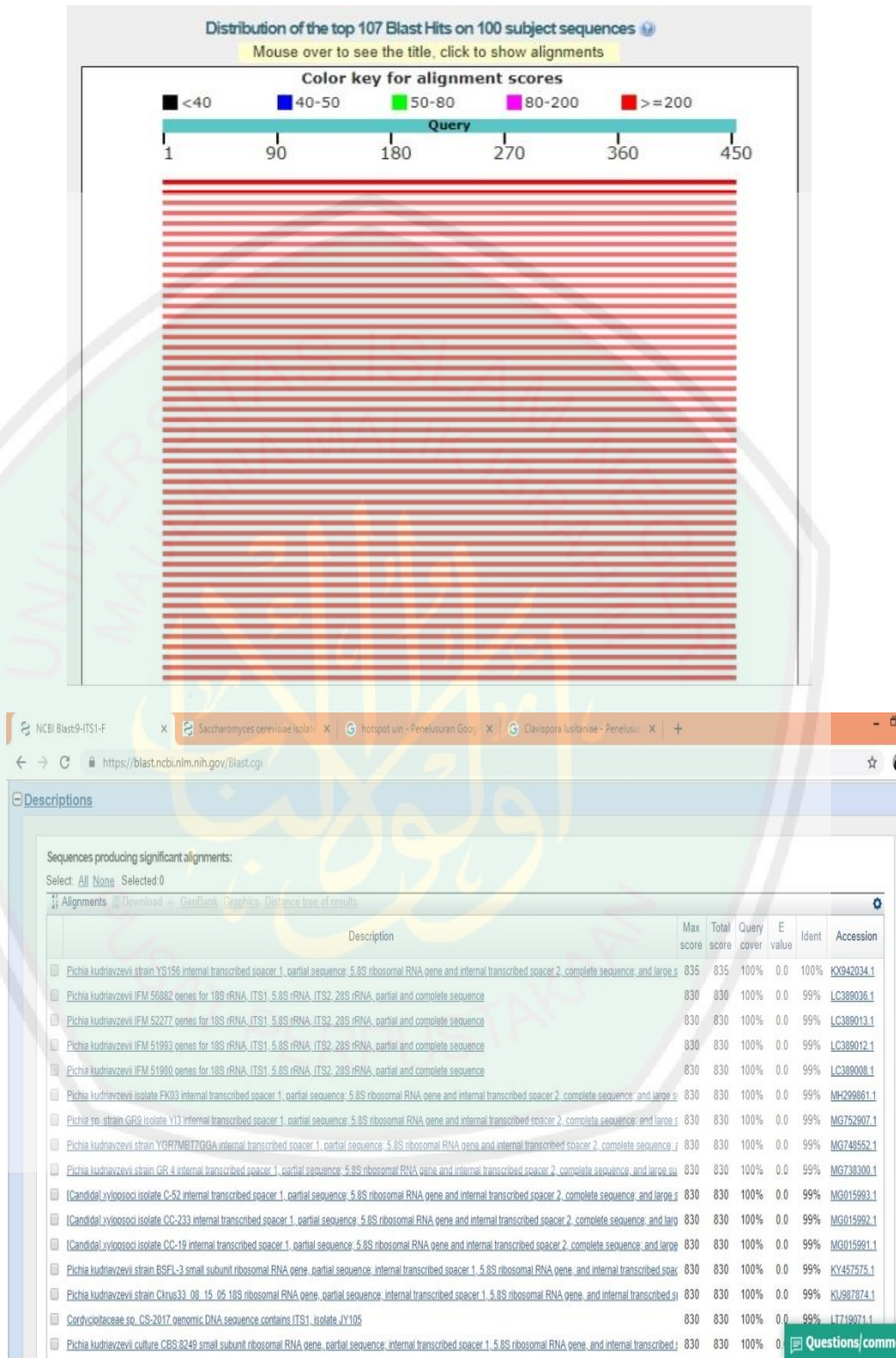
LAMPIRAN 10 HASIL BLAST SEKUEN *Clavispora lusitaniae* strain 37C DENGAN NCBI



LAMPIRAN 11 HASIL BLAST SEKUEN *Saccharomyces cerevisiae* strain LYY DENGAN NCBI



LAMPIRAN 12 HASIL BLAST SEKUEN *Pichia kudriavzevii* strain YS156
DENGAN NCBI



LAMPIRAN 13 HASIL BLAST SEKUEN *Pichia kudriavzevii* strain YS156 DENGAN NCBI

