

Keanekaragaman Isolat Khamir Osmofilik pada Madu Hutan dari Sulawesi Tengah Ditinjau Menggunakan Teknik RAPD

Ferinta Rahmayanti¹, Miftahu Ilmi¹
¹Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada
Email: m.ilmii@ugm.ac.id

Abstract

Honey is a sweet substance with high sugar content produced by bees from flower nectar. Osmophilic yeast is one of organisms that can grow in honey because their ability to adapt in high osmotic pressure environment. Twenty-seven osmophilic yeast isolates were obtained from 11 forest honey samples to this research. This research objective is to determine the diversity of yeast isolates from genotypic characterization. Genotypic characterization was done using DNA fingerprint analysis using the RAPD PCR technique. This research used 2 types of primers, namely CDU primer (5'-GCGATCCCCA-3') and M13 primer (5'-GAGGGTGGCGTTCT GAGGGTGGCGTTCT-3'). Data in the form of electrophoregram are represented in table n (yeast strain) x t (character units) using binary scoring type. The data were analyzed using a numerical taxonomy method with similarity (OTU) and determined using Jaccard coefficient (SJ) in 70% of IS limit. The results of this research showed that 27 yeast isolates were divided into 2 clusters and 10 outliers with a correlation coefficient (r) of 0.924624.

Key Words : Central Sulawesi, forest honey, genotypic characterization, osmophilic yeast, RAPD

Abstrak

Madu merupakan substansi manis berkadar gula tinggi yang diproduksi oleh lebah dari nektar bunga. Khamir osmofilik adalah salah satu jenis organisme yang dapat tumbuh dalam madu karena kemampuannya beradaptasi pada lingkungan dengan tekanan osmotik yang tinggi. Pada penelitian ini didapatkan 27 isolat khamir osmofilik yang diisolasi dari 11 sampel madu hutan Sulawesi Tengah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman isolat khamir yang ditinjau dari karakterisasi genotipik. Karakterisasi genotipik dilakukan melalui analisis sidik jari DNA dengan teknik PCR RAPD. Pada penelitian ini digunakan 2 jenis primer yaitu primer CDU (5'-GCGATCCCCA-3') dan primer M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT GAGGGTGGCGTTCT-3'). Data berupa elektroforegram direpresentasikan kedalam tabel n (strain khamir) x t (unit karakter) menggunakan tipe skoring biner. Data yang didapatkan dianalisis menggunakan metode taksonomi numerik dengan tingkat kemiripan (OTU) yang ditentukan menggunakan *Jaccard coefficient* (SJ) dengan batas IS 70%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 27 isolat khamir terbagi kedalam 2 kluster dan 10 *outlier* dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0.924624.

Kata kunci : karakterisasi genotipik, khamir osmofilik, madu hutan, RAPD, Sulawesi Tengah

Pendahuluan

Khamir merupakan organisme eukariotik bersel tunggal, mikroskopis, tidak memiliki flagela dan beberapa genera membentuk filamen. Khamir hidup sebagai organisme saprofit atau parasit. Khamir dapat ditemukan di tanah, debu udara, tubuh serangga, permukaan buah, nektar bunga, cairan yang mengandung gula seperti madu dan lain sebagainya. Morfologi khamir bervariasi dari bulat, elips, hingga batang atau silindris. Khamir merupakan organisme anggota kelas Ascomycetes, Basidiomycetes dan Deuteromycetes (Fifendy 2017).

Madu merupakan substansi manis berkadar gula tinggi yang diproduksi oleh lebah dari nektar bunga (Bryant 2001). Salah satu jenis organisme yang dapat tumbuh dalam madu adalah khamir osmofilik. Khamir osmofilik dapat tumbuh di dalam madu karena mampu beradaptasi pada lingkungan dengan tekanan osmotik yang tinggi. Secara alamiah madu bersifat antimikrobia karena memiliki tekanan osmotik yang tinggi, aktifitas air yang rendah (aw), pH yang rendah, rasio C-N yang tinggi, potensial redoks yang rendah, kandungan protein yang rendah, sistem

glukosa oksidase dan viskositas yang tinggi dan mengandung senyawa metabolit sekunder (Molan 1992). Namun, penanganan pada saat pemanenan dan pasca-panen madu, dapat menyebabkan madu terkontaminasi mikrobia. Menurut Snowdon dan Cliver (1996), khamir osmofilik yang ditemukan dalam sampel madu pada umumnya berasal dari genera *Ascosphaera*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Nematospira*, *Oosporidium*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Schwanniomyces*, *Trichosporan*, *Torula*, *Torulopsis* dan *Zygosaccharomyces*.

Prihartini dan Ilmi (2018) telah melakukan penelitian mengenai karakterisasi dan klasifikasi numerik terhadap 27 isolat khamir osmofilik menggunakan 63 jenis karakter fenotipik. Khamir tersebut diisolasi dari 11 sampel madu yang berasal dari 10 kabupaten di Sulawesi Tengah, yaitu dari kabupaten Poso, Morowali, Banggai, Banggai Kepulauan, Donggala, Parigi Moutong, Tojo Una-Una, Sigi, dan Tolitoli. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa keragaman khamir osmofilik dari 11 sampel madu hutan Sulawesi Tengah tergolong rendah. Sebab, dari 27 isolat khamir yang didapatkan, hanya terdapat 6 kluster

dan 1 single item/*outlier* berdasarkan batas indeks similaritas 70%.

Akan tetapi, khamir merupakan organis me eukariotik yang bersifat mikroskopis. Oleh sebab itu, analisis morfologi atau fenotipik saja tidak cukup untuk menentukan keanekaragaman jenis khamir, karena dalam hal ini peristiwa epigenetik sangat mungkin terjadi. Oleh karena itu, perlu dilakukan karakterisasi genotipik khamir osmofilik untuk melengkapi data karakterisasi fenotipik, antara lain melalui identifikasi sidik jari DNA

Menurut Van Belkum (1994) analisis sidik jari DNA merupakan metode yang cukup sederhana dan dapat digunakan untuk mengetahui variasi genetik organisme, bahkan di dalam satu spesies. Pada penelitian ini, identifikasi sidik jari DNA dilakukan dengan teknik RAPD. Teknik RAPD dipilih karena teknik tersebut dapat digunakan untuk analisa DNA eukariotik. Selain itu, dalam teknik RAPD primer dapat digunakan tanpa mengetahui sekuens spesifik dari DNA target, hanya memerlukan DNA dalam jumlah yang kecil dan proses amplifikasi berlangsung lebih cepat apabila dibandingkan dengan teknik identifikasi sidik jari lainnya (Khumari dan Thakur 2014).

Metode

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei hingga Desember 2018 di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 11 sampel madu hutan dari 10 kabupaten di Sulawesi Tengah, larutan chelex 100 ® *Resin (Bio-Rad Laboratories, Inc.)* 10 %, primer oligonukelotida M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT GAGGGTGGCGGTTCT-3') dan CDU (5'-GCGATCCCCA-3') (Fadda *et al* 2010), *double destiled aquadest* (ddH₂O), *nuclease free water, reaction mix PCR (Promega GoTaq Green Master Mix, Product No. M7122)*, agarosa (*Vivantis*), buffer Tris-EDTA konsentrasi 1X, DNA ladder 100 bp (*Genaid Biotech Ltd.*),

DNA stain (*Sybr Safe Invitrogentm*). Sedangkan alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah *PCR thermal cyclcer (Bio-Rad T100TM)*, *chamber gel electrophoresis (Mupid-exU)*, UV transiluminator (*MaestrogenTM SLB-01W*), perangkat lunak Ms.Excel, perangkat lunak *Image Raster*, dan perangkat lunak analisis klastering MVSP 3.1.

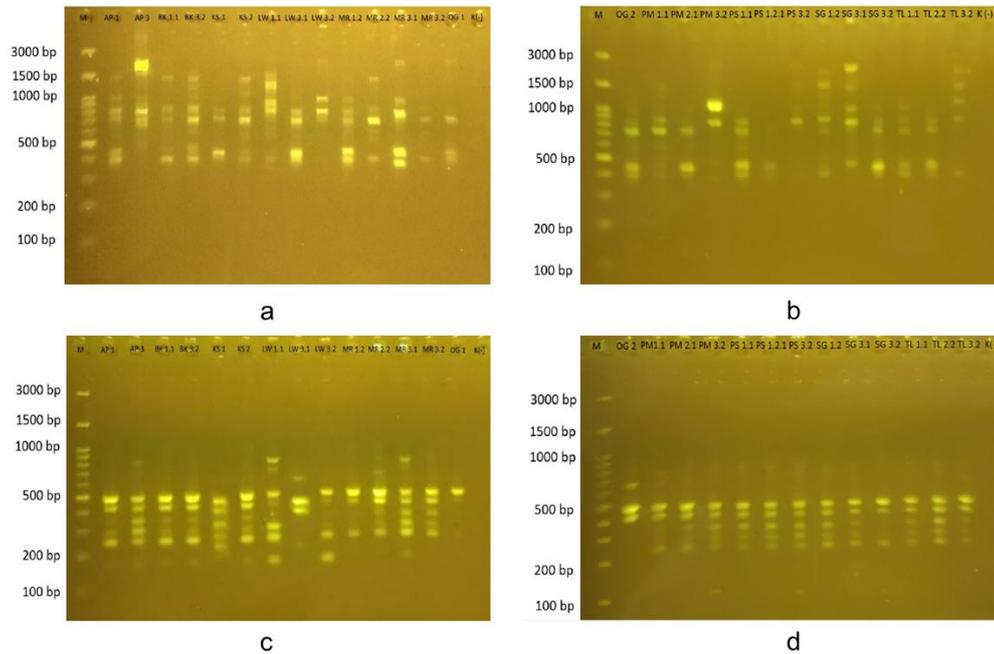
DNA dari isolat khamir yang didapatkan diekstraksi menggunakan larutan chelex 10%. Kemudian DNA diamplifikasi menggunakan primer M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTTCT-3') dan primer CDU (5'-GCGATCCCCA-3'). Selanjutnya amplikon dielektroforesis menggunakan tegangan 50 volt selama 55 menit. Kemudian, fragmen-fragmen DNA divisualisasikan menggunakan transiluminator sinar UV, dan didokumentasikan menggunakan kamera digital. Selanjutnya ukuran pita DNA ditentukan dengan cara mengukur jarak migrasi pita DNA dari sumuran gel agarosa menggunakan perangkat lunak *Image Raster*. Data dimasukkan kedalam tabel n (isolat khamir) x t (unit karakter) dengan sistem skoring biner, yaitu bernilai 1 apabila karakter positif, dan bernilai 0 karakter negatif. Selanjutnya, dilakukan analisis taksonomi numerik dengan tingkat kemiripan (similaritas) masing-masing strain khamir (OTU/ Operational Taxonomical Unit) ditentukan menggunakan *Jaccard's coefficient* (SJ) dengan mengabaikan sifat *double negative*. Kemudian, strain khamir dikelompokkan (*clustering*) menggunakan metode *Unweighted Paired Group Method with Aritmetic Averages* (UPGMA) (Singh 2004). Data disajikan dalam bentuk dendrogram yang dikonstruksi menggunakan program Multi Variate Statistical Package (MVSP 3.1).

Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan didapatkan 27 isolat khamir osmofilik (Tabel 1.)

Tabel 1. Daftar isolat khamir osmofilik yang diisolasi dari madu hutan.

No	Sampel Madu Hutan	Jumlah isolat	Kode isolat
1	Kecamatan Ampana, Kabupaten Tojo Una-Una	2	AP 1; AP 3
2	Kabupaten Banggai Kepulauan	2	BK 1.1; BK 3.2
3	Kecamatan Kasimbar, Kabupaten Parigi-Moutong	2	KS 1; K2
4	Kecamatan Luwuk, Kabupaten Banggai	3	LW 1.1; LW3.1; LW 3.2
5	Kabupaten Morowali	4	MR 1.2; MR 2.2; MR 3.1; MR 3.2
6	Kelurahan Ogoamas, Kabupaten Donggala	2	OG 1; OG2
7	Kabupaten Parigi-Moutong	3	PM 1.1; PM 2.1; PM 3.2
8	Kabupaten Poso	3	PS 1.1; PS 1.2.1; PS 3.2
9	Kabupaten Sigi	3	SG 1.2; SG 3.1; SG 3.2
10	Kabupaten Toli-Toli	3	TL 1.1; TL 2.2; TL 3.2
11	Kecamatan Balaesang, Kabupaten Donggala	1	BL 1



Gambar 1. Elektroforegram hasil RAPD. a dan b: M13, c dan d: CDU, M: marker, K(-): kontrol negatif (akuades)

Tabel 2. Karakter yang muncul pada isolat khamir osmofilik hasil analisis RAPD menggunakan primer M13 dan CDU

Karakter (bp)	Muncul (%)	Tidak muncul (%)	Karakter (bp)	Muncul (%)	Tidak muncul (%)
3139	3.7	96.3	906	40.7	59.3
2040	18.5	81.5	778	11.1	88.9
1981	14.8	85.2	740	7.4	92.6
1575	11.1	88.9	682	22.2	77.8
1467	37	63	551	70.4	29.6
1311	7.4	92.6	498	77.8	22.2
1065	7.4	92.6	488	22.2	77.8
1028	18.5	81.5	441	7.4	92.6
1015	48.1	51.9	418	22.2	77.8
933	14.8	85.2	390	51.9	48.1
839	77.8	22.2	363	11.1	88.9
738	85.1	14.9	342	74.1	25.9
706	3.7	96.3	299	74.1	25.9
645	14.8	85.2	294	14.8	85.2
571	14.8	85.2	271	70.4	29.6
511	3.7	96.3	257	18.5	81.5
464	70.4	29.6	245	14.8	85.2
417	7.4	92.6	228	7.4	92.6
378	77.8	22.2	173	37	63

Pada penelitian ini digunakan 2 jenis primer dengan tujuan untuk memperbanyak jumlah karakter yang dibandingkan. Adapun jenis primer yang dipilih adalah primer M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT GAGGGTGGCGTTCT-3') dan CDU (5'-GCGATCCCCA-3'). Primer M13 digunakan karena primer tersebut merupakan primer yang lazim digunakan dalam proses identifikasi khamir secara molekuler. Sedangkan primer CDU digunakan karena primer tersebut

memiliki oligobukelotida yang pendek, sehingga bersifat lebih umum karena probabilitas region yang teramplifikasi lebih banyak. Selain itu kedua primer ini dipilih karena Fadda *et al.* (2010) berhasil melakukan karakterisasi khamir secara molekuler menggunakan kedua primer tersebut.

Marker 100 bp (*Genaid Biotech Ltd.*) menampilkan 12 pita DNA yang berukuran 100 bp, 200, bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700, bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp, 1500 bp dan 3000

Tabel 3. Karakter monomorfik pada isolat khamir osmofilik.

Karakter Monomorfik (bp) / Primer	Anggota
• 551 / CDU	• PM 1.1, OG 2, SG 3.1, SG 1.2, MR 3.1, TL 2.2, PS 1.2.1, TL 1.1, PS 1.1, PM 2.1, SG 3.2, MR 1.2, PS 3.2, LW 3.2.
• 498 / CDU	• PM 1.1, OG 2, SG 3.1, SG 1.2, MR 3.1, TL 2.2, PS 1.2.1, TL 1.1, PS 1.1, PM 2.1, SG 3.2, MR 1.2, PS 3.2, LW 3.2.
• 342 / CDU	• PM 1.1, OG 2, SG 3.1, SG 1.2, MR 3.1, TL 2.2, PS 1.2.1, TL 1.1, PS 1.1, PM 2.1, SG 3.2, MR 1.2, PS 3.2, LW 3.2.
• 299 / CDU	• PM 1.1, OG 2, SG 3.1, SG 1.2, MR 3.1, TL 2.2, PS 1.2.1, TL 1.1, PS 1.1, PM 2.1, SG 3.2, MR 1.2, PS 3.2, LW 3.2.
• 1467 / M13	• KS 2, BK 3.2, BK 1.1.
• 738 / M13	• KS 2, BK 3.2, BK 1.1.
• 488 / CDU	• KS 2, BK 3.2, BK 1.1.
• 363 / CDU	• KS 2, BK 3.2, BK 1.1.
• 294 / CDU	• KS 2, BK 3.2, BK 1.1.
• 257 / CDU	• KS 2, BK 3.2, BK 1.1.
• 173 / CDU	• KS 2, BK 3.2, BK 1.1.

Hasil klastering karakter genotipik (Gambar 2.), membagi isolat khamir osmofilik menjadi 2 klaster dan 10 *outlier*. Isolat yang bersifat *outlier* adalah isolat yang tidak masuk kedalam klaster manapun karena memiliki indeks similaritas yang lebih rendah dari nilai batas IS, yaitu 70%. Klaster I beranggotakan 15 isolat, yaitu PM 1.1, OG 2, SG 3.1, SG 1.2, MR 3.1, TL 2.2, PS 1.2.1, TL 1.1, PS 1.1, PM 2.1, SG 3.2, MR 1.2, PS 3.2, LW 3.2. Hubungan kekerabatan dari ke-15 isolat tersebut dekat karena memiliki 4 karakter yang bersifat monomorfik, yaitu karakter pada primer CDU untuk pita DNA dengan ukuran 551 bp, 498 bp, 342 bp dan 299 bp. Sedangkan klaster II beranggotakan 3 isolat yaitu KS 2, BK 3.2, BK 1.1. Ketiga isolat tersebut berkerabat dekat karena memiliki 7 karakter yang bersifat monomorfik, yaitu karakter pada primer M13 untuk pita DNA dengan ukuran 1467 bp, 738 bp dan karakter pada primer CDU untuk pita DNA dengan ukuran 488 bp, 363 bp, 294 bp, 257 bp, dan 173 bp (Tabel 3.)

Analisis genotipik menghasilkan jumlah klaster lebih sedikit daripada jumlah klaster yang dihasilkan dari analisis karakter fenotipik yang dilakukan oleh Prihartini dan Ilmi (2018). Pada analisis fenotipik isolat PS 1.1 merupakan isolat yang bersifat outlier, sedangkan pada analisis genotipik isolat PS 1.1 merupakan anggota dari klaster I. Pada analisis genotipik isolat MR 3.2, MR 2.2, PM 3.2, TL 3.2, OG 1, LW 3.1, KS I, AP 3, LW 1.1 dan AP 1. merupakan isolat yang bersifat outlier. Sedangkan berdasarkan hasil analisis fenotipik isolat MR 3.2, MR 2.2 dan LW 1.1 merupakan isolat yang berada dalam satu klaster besar yang beranggotakan 10 isolat khamir osmofilik. Berdasarkan analisis fenotipik isolat PM 3.2, AP 3 dan AP 1 dan PM 2.1 berada dalam 1 klaster, isolat TL 3.2 dan KS 1 berada dalam 1 klaster yang beranggotakan 5 isolat khamir osmofilik, isolat OG 1 berada dalam satu klaster yang beranggotakan 3 isolat khamir

osmofilik, sedangkan LW 3.1 berada dalam satu klaster yang beranggotakan 2 isolat khamir osmofilik.

Perbedaan yang signifikan dari hasil klastering analisis fenotipik dan genotipik pada isolat khamir osmofilik terjadi karena tidak ada parameter standar yang digunakan dalam menentukan karakter yang bersifat sama pada kedua jenis analisis (fenotipik dan genotipik). Meskipun jumlah karakter pada analisis genotipik (76 karakter) lebih banyak dari analisis fenotipik (63 karakter), tidak dapat diketahui apakah karakter genotipik yang digunakan sudah merepresentasikan seluruh karakter yang digunakan dalam analisis fenotipik. Dan sebaliknya, apakah karakter fenotipik yang teramati memang berasal dari karakter genotipik. Sebab, peristiwa epigenetik mungkin saja terjadi pada saat khamir beradaptasi dengan lingkungan hidupnya, sehingga merubah karakter fenotipiknya. Epigenetik merupakan sebuah peristiwa perubahan karakter yang berasal dari luar gen atau DNA (Haryono *et al.* 2018). Sehingga, dalam penelitian ini, hasil analisis klastering karakter genotipik tidak dapat dibandingkan dengan hasil analisis klastering dari karakter fenotipik. Hal ini dibuktikan oleh nilai *r* dari kedua jenis analisis klastering tersebut yang sebelumnya telah dibahas. Hasil analisis klastering genotipik dan fenotipik seperti ini dapat dibandingkan apabila identitas isolat telah diketahui sebelumnya. Akan tetapi, kedua jenis analisis klastering tersebut dapat disatukan untuk mendapatkan sebanyak-banyaknya karakter isolat.

Simpulan

Pada penelitian ini didapatkan total 27 isolat khamir osmofilik dari 11 sampel madu hutan Sulawesi Tengah. Amplifikasi DNA khamir menghasilkan total 76 karakter genotipik dari primer M13 dan primer CDU dengan ukuran pita

yang berkisar antara 173 bp hingga 3139 bp. Analisis klastering menggunakan *Jaccard coefficient* dengan batas IS 70%, menghasilkan 2 klaster dan 10 *outlier* dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0.92462. Hasil klastering dari analisis genotipik pada penelitian ini dan analisis fenotipik yang telah dilakukan oleh Prihartini dan Ilmi (2018) tidak dapat dibandingkan.

Daftar Referensi

- Bryant, V.M., 2001. Pollen Content of Honey. *CAP Newsletter*, 24(1),10 - 24.
- Fadda, M.E., Viale, S., Deplano, M., Pisano, M.B., & Cosentino, S., 2010. Characterization of Yeast Population and Molecular Fingerprinting of *Candidazeylanoides* Isolated from Goat's Milk Collected in Sardinia. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 376 – 380.
- Fifendy, M., 2017. *Mikrobiologi*. Depok: Kencana.65 - 66.
- Haryono, S. J., Anwar, S. L., & Salim, A., 2018. *Dasar-Dasar Biologi Molekuler Kanker Bagi Praktis Klinis*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. 45 - 46.
- Khumari, N. & Thakur, S.K., 2014. Review: Randomly Amplified Polymorphic DNA-A Brief. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 9(1), 6 - 13.
- Molan, P., 1992. The Antibacterial Activity of Honey. 1. The Nature of the Antibacterial activity. *Bee World*. 73, 5 - 28.
- Prihartini, M. & Ilmi, M., 2018. Karakterisasi dan Klasifikasi Numerik Khamir Madu Hutan dari Sulawesi Tengah. *Jurnal Mikologi Indonesia*, 2(2),112 - 127.
- Goodfellow, M. & O'Donnell, A.G., 1993. *Handbook of New Bacrterial Systematics*. London: Academic Press. 282 - 217.
- Singh, G., 2004. *Plant Systematics : An Integrated Approach*. Enfield: Science Publishers, Inc. p.181.
- Snowdon, J.A., & Cliver, D.O. 1996. Review Article: Microorganism in Honey. *Food Microbiology*, (31),1 - 26.
- Van Belkum, A., 1994. DNA Fingerprinting of Medically Important Microorganisms by Use of PCR. *Clin Microbiol Rev*, 7, 174 – 84.

Ucapan Terima Kasih

Terima Kasih ditujukan kepada Dr. Ratna Susandarini, M.Sc. (Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi UGM) yang telah mengizinkan penggunaan sampel madu hutan Sulawesi Tengah.