



UNIVERSITAS INDONESIA

**KHAMIR ASAL TUMBUHAN SAEH
(*Broussonetia papyrifera* (L.) L' Her. ex Vent.) DAN
POTENSINYA SEBAGAI AGENS BIOKONTROL KAPANG
PADA BUAH TOMAT PASCAPANEN**

DISERTASI

DALIA SUKMAWATI

0906506385

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM PASCASARJANA
PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPOK
2014**



UNIVERSITAS INDONESIA

**KHAMIR ASAL TUMBUHAN SAEH
(*Broussonetia papyrifera* (L.) L' Her. ex Vent.) DAN
POTENSINYA SEBAGAI AGENS BIOKONTROL KAPANG
PADA BUAH TOMAT PASCAPANEN**

DISERTASI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Doktor**

DALIA SUKMAWATI

0906506385

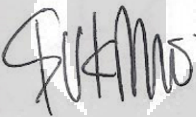
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM PASCASARJANA
PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPOK
2014**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Disertasi ini adalah karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Dalia Sukmawati

NPM : 0906506385

Tanda tangan: 

Tanggal : 7 Juli 2014.

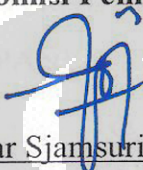
JUDUL : KHAMIR ASAL TUMBUHAN SAEH (*Broussonetia papyrifera* (L.) L' Her. ex Vent.) DAN POTENSINYA SEBAGAI AGENS BIOKONTROL KAPANG PADA BUAH TOMAT PASCAPANEN

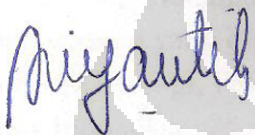
NAMA : DALIA SUKMAWATI

NPM : 0906506385

MENYETUJUI

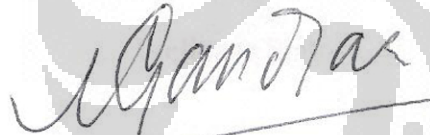
1. Komisi Pembimbing


Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D.
Promotor

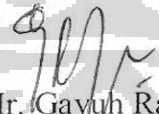

Ariyanti Oetari, Ph.D.
Ko-Promotor


Dr. Ir. Nampiah Sukarno
Ko-Promotor

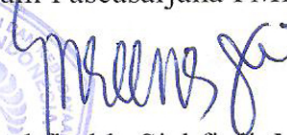
2. Penguji


Prof. Emeritus Dr. Indrawati Gandjar
Penguji


Prof. Dr. Retno Wahyuningsih
Penguji


Dr. Ir. Gayuh Rahayu
Penguji

3. Ketua Program Studi Biologi
Program Pascasarjana FMIPA-UI


Dr. Luthfiralda Sjahfirdi, M.Biomed
NIP. 1965040519910320001

4. Ketua Program Pascasarjana
FMIPA-UI


Dr. rer. nat. Abdul Haris
NIP. 197009211994031001

Tanggal Lulus : 7 Juli 2014

HALAMAN PENGESAHAN

Disertasi ini diajukan oleh :

Nama : Dalia Sukmawati

NPM : 0906506385

Program Studi : Biologi

Judul Disertasi : KHAMIR ASAL TUMBUHAN SAEH

(*Broussonetia papyrifera* (L.) L' Her. ex

Vent.) DAN POTENSINYA SEBAGAI AGENS

BIOKONTROL KAPANG PADA BUAH TOMAT

PASCAPANEN

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Promotor : Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D. (.....)

Ko-Promotor 1 : Ariyanti Oetari, Ph.D. (.....)

Ko-Promotor 2 : Dr. Ir. Nampiah Sukarno (.....)

Penguji 1 : Prof. Emeritus Dr. Indrawati Gandjar (.....)

Penguji 2 : Prof. Dr. Retno Wahyuningsih (.....)

Penguji 3 : Dr. Ir. Gayuh Rahayu (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 7 Juli 2014

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI

TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Dalia Sukmawati
NPM : 0906506385
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Spesies Karya : Disertasi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif** (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

KHAMIR ASAL TUMBUHAN SAEH (*Broussonetia papyrifera* (L.) L' Her. ex Vent.) DAN POTENSINYA SEBAGAI AGENS BIOKONTROL KAPANG PADA BUAH TOMAT PASCAPANEN

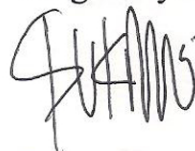
Beserta perangkatnya yang ada jika diperlukan. Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/format-kan, mengolah dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Depok

Pada tanggal 7 Juli 2014

Yang menyatakan,



Dalia Sukmawati

KATA PENGANTAR

Dengan nama Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang. Segala puji dipanjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasi dengan judul “Khamir asal tumbuhan saeh (*Broussonetia papyrifera* (L.) L' Her. ex Vent.) dan potensinya sebagai agens biokontrol kapang pada buah tomat pascapanen”. Disertasi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Studi Biologi, Program Pascasarjana, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Melalui kesempatan ini, penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D., sebagai promotor; Ariyanti Oetari, Ph.D., sebagai Ko-Promotor; Dr. Ir. Nampiah Sukarno, sebagai Ko-Promotor yang telah dengan sabar memberikan bimbingan, ilmu, arahan, dan saran sehingga penulisan disertasi ini menjadi lebih baik.
2. Hibah Riset Unggulan Bidang Prioritas untuk *Indigenous Studies* UI 2009 dan 2010 atas nama Ariyanti Oetari, Ph.D. yang telah membiayai penelitian ini.
3. Prof. Emeritus Dr. Indrawati Gandjar, Prof. Dr. Retno Wahyuningsih, dan Dr. Ir. Gayuh Rahayu, yang telah bersedia sebagai penguji, serta memberikan saran untuk lebih baiknya disertasi ini.
4. Rektor Universitas Negeri Jakarta dan jajarannya, yang telah memberikan ijin dan dukungan kepada penulis untuk mengikuti studi program doktoral.
5. Ketua *Center of Excellence for Indigenous Biological Resources-Genome Studies* (CoE IBR-GS) FMIPA UI, Kepala Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi, Dr. Luthfiralda Sjahfirdi, M.Biomed selaku Ketua Program Studi Biologi, serta Dr. Nisyawati, selaku Sekretaris Program Pascasarjana Biologi UI dan Penasehat Akademik.
6. Prof. Dr. Akira Yokota dan Iman Hidayat, Ph.D. atas diskusi selama penelitian dan ilmu yang diberikan.
7. Kepada Ibunda Imas Sumartini, Ibunda Hj. Tien Suartini, Aki Tatang Mustari, dan Ayahanda H. Soernarjo SH, yang dengan kasih sayangnya tidak pernah lelah mendoakan penulis.

8. Kepada suami tercinta Nana Dharmana dan anak-anakku Nanda Syahtidar dan Yudha Nadhika terima kasih atas doa, kesabaran, kasih sayang, dan pengertiannya, sehingga disertasi ini dapat terwujud dan terselesaikan dengan baik.
9. Sahabat terbaik Dr. Retno Widowati, Dr. Rini Puspitaningrum, Nining B. Prihantini. M.Sc., Murniati Purba S.Si. M.Si., dan Reno F. M.Si atas semua doa, dukungan, nasehat, dan semangat yang selalu diberikan selama penulis menyelesaikan studi. Kepada Dafina Ghossani Nurlaili S.Si., Dyah Restu Pamuji, S.Si., dan Ana Khoirotun Nisa, S.Si., yang banyak membantu selama melaksanakan penelitian.
10. Para dosen, teman-teman, sahabat, dan adik penulis yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, yang telah membantu, dan mendoakan selama penulis melakukan penelitian hingga terselesaikannya studi di Universitas Indonesia.

Semoga penelitian yang telah dilakukan dan disertasi yang telah ditulis dapat memberikan manfaat untuk kemajuan ilmu pengetahuan dan bagi masyarakat.

Depok, Juli 2014



Dalia Sukmawati

ABSTRAK

Nama : Dalia Sukmawati
Program Studi : Biologi
Judul : Khamir asal tumbuhan saeh (*Broussonetia papyrifera* (L.) L' Her. ex Vent.) dan potensinya sebagai agens biokontrol kapang pada buah tomat pascapanen

Penelitian bertujuan mengisolasi dan mengidentifikasi khamir *phylloplane Broussonetia papyrifera* asal Bandung (Dago Pojok), Garut (Tunggilis dan Sukadanu), dan Trowulan, menguji kemampuan khamir antagonis dari daun *B. papyrifera* asal Desa Sukadanu dan Desa Tunggilis, Garut, Jawa Barat yang berpotensi sebagai agens biokontrol terhadap kapang-kapang penyebab kebusukan pada buah tomat pascapanen serta mengetahui viabilitas khamir setelah dipreservasi pada suhu -80 °C. Sebanyak 2.543 isolat khamir diperoleh dari empat wilayah sampling menggunakan metode *washing* dan *membrane filter method*. Pemilihan 82 isolat khamir representatif berdasarkan kemiripan morfologi koloni. Identifikasi khamir dilakukan berdasarkan *sequence* pada daerah *internal transcribed spacer regions* ribosomal DNA. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa isolat khamir tersebut terdiri atas 17 genera dan 32 spesies: sebanyak 11 genera termasuk ke dalam *Ascomycota* (*Saccharomycetes* dan *Dothidiomycetes*), dan sebanyak enam genera termasuk *Basidiomycota* (*Tremellomycetes*, *Microbotryomycetes*, dan *Ustilaginomycetes*). Tiga kapang representatif berdasarkan hasil isolasi dari buah tomat dan uji patogenitas dapat menyebabkan kebusukan pada buah tomat pascapanen, yaitu *Alternaria alternata*, *Lasiodiplodia theobromae*, dan *Syncephalastrum racemosum*. Enam spesies khamir antagonis dapat menghambat pertumbuhan dan sporulasi *A. alternata*, *L. theobromae*, dan *Syn. racemosum* yaitu *Candida saopaulonensis* UICC Y-492, *Candida pseudojiufengensis* UICC Y-475, *Debaryomyces hansenii* UICC Y-488, *Geotrichum candidum* UICC Y-495, *Hyphopichia burtonii* UICC Y-496, dan *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-476. Khamir antagonis dari *B. papyrifera* memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan kapang *A. alternata* dan *L. theobromae* penyebab kebusukan pada buah tomat pada suhu 26--28°C selama 15 hari inkubasi. Khamir *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475 dapat menghambat pertumbuhan kapang dan gejala kebusukan pada buah tomat (100%) disebabkan kapang *A. alternata*. Khamir *C. saopoulenensis* UICC Y-492 dan *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 dapat menghambat pertumbuhan kapang dan gejala kebusukan pada buah tomat (67%) yang disebabkan *L. theobromae*. Hasil pengujian viabilitas khamir setelah dipreservasi pada suhu -80°C selama 180 hari menunjukkan metode tersebut baik untuk preservasi jangka panjang empat spesies khamir potensial agens biokontrol pada buah tomat, yaitu khamir *C. pseudojiutengensis* UICC Y-475, *C. saopoulenensis* UICC Y-492, *Hyp. burtonii* UICC Y-496, dan *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513. Seluruh strain yang diuji menunjukkan viabilitas yang tinggi (rerata CFU $\geq 1 \times 10^8$ /ml). Jumlah sel khamir antara lain: *C. pseudojiutengensis* UICC Y-475 ($1,08 \times 10^8$ CFU/ml), *C. saopoulenensis* UICC Y-492 ($0,65 \times 10^8$ CFU/ml), *Hyp. burtonii* UICC Y-496 ($1,76 \times 10^8$ CFU/ml), dan *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 ($2,13 \times 10^8$ CFU/ml).

Kata kunci: Antagonisme, biokontrol, *Broussonetia papyrifera*, khamir, tomat.
xxiii+243 pp: 16 gambar; 20 tabel; 30 lampiran; Bibl: 158 (1960-2013)

ABSTRACT

Name : Dalia Sukmawati
Study program : Biology
Title : Yeast isolates from paper mulberry or saeh plant (*Broussonetia papyrifera* (L.) L'Her. ex Vent.) and their potential as biocontrol agents against moulds from post-harvest tomato.

The study was aimed to isolate and identify phylloplane yeasts from *Broussonetia papyrifera* plants from Bandung (Dago Pojok), Garut (Tunggilis and Sukadanu), and Trowulan; to investigate the yeasts with antagonistic abilities against moulds which attack post-harvest tomato fruits; and to observe the yeast viability after preservation at a temperature of -80 °C. Two thousand five hundred and forty-three yeast isolates were obtained using the washing method and the membrane filter method. Eighty-two representative yeast isolates were selected based on similarity of colony morphology. Identification was based on sequence data of internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA (ITS rDNA). The identification result showed that the 82 representative isolates were consisted of 17 genera and 32 species. Eleven of these genera are belong to *Saccharomycetes* and one genus belongs *Dothidiomycetes* (*Ascomycota*). Six genera are belong to *Tremellomycetes*, *Microbotryomycetes*, and *Ustilaginomycetes* (*Basidiomycota*). Three representative moulds obtained from the pathogenicity test were able to cause serious damage on post-harvest tomato fruits. These moulds were identified as, i.e. *Alternaria alternata*, *Lasiodiplodia theobromae*, and *Syncephalastrum racemosum*. Six antagonistic yeasts were able to inhibit growth and sporulation of post-harvest tomato moulds, i.e. *Candida saopaulonensis* UICC Y-492, *Candida pseudojiufengensis* UICC Y-475, *Debaryomyces hansenii* UICC Y-488, *Geotrichum candidum* UICC Y-495, *Hyphopichia burtonii* UICC Y-496, and *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-476. The antagonistic yeasts were tested for their abilities to inhibit growth of *A. alternata* and *L. theobromae* which cause fruit rot on post-harvest tomatoes at 26--28°C for 15 days. *Candida pseudojiufengensis* UICC Y-475 was able to inhibit growth of *A. alternata* and reduce fruit rot symptoms in tomato fruit (100%). *Candida saopoulenensis* UICC Y-492 and *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 were able to inhibit growth of *L. theobromae* and reduce fruit rot symptoms in tomato fruit (67%). The yeast viability was observed after being preserved at -80°C on day-1 (H1), day-7 (H7), day-14 (H14), day-30 (H-30), and day-180 (H-180). The results showed that all strains do not lose their viability after freezing at -80°C for 180 days. The number of cells for each strain after revival from preservation after 180 days were counted: *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475 ($1,08 \times 10^8$ CFU/ml), *C. saopoulenensis* UICC Y-492 ($0,65 \times 10^8$ CFU/ml), *Hyp. burtonii* UICC Y-496 ($1,76 \times 10^8$ CFU/ml), and *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 ($2,13 \times 10^8$ CFU/ml).

Key words: Antagonism, biocontrol, *Broussonetia papyrifera*, tomato, yeast
xxiii+243 pp: 16 plates; 20 tables; 30 appendices; Bibl: 158 (1960-2013)

Name : Dalia Sukmawati Date: July 1th 2014
Title : Yeast isolates from paper mulberry or saeh plant (*Broussonetia papyrifera* (L.) L'Her. ex Vent.) and their potential as biocontrol agents against moulds from post-harvested tomato.
Promotor : Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D.
Co-Promotor : Ariyanti Oetari, Ph.D.; Dr. Ir. Nampiah Sukarno

SUMMARY

One of yeast habitats in the terrestrial ecosystem is the leaf surfaces. Leaves supply nutrients in the form of exudates and gutation products containing sugars, amino acids, plant hormones, vitamins, and minerals (Deak, 2008). The yeasts which inhabit the surface of leaves are called phylloplane yeasts (Fonseca & Inacio, 2006).

Several studies about the diversity of yeasts isolated from plants have been reported in Indonesia. Oetari *et al.* (2001) isolated yeasts from the leaves of rice plants (*Oryza sativa* L.) in Depok. These include, *Pichia* spp. E.C. Hansen, *Bullera piricola* Stadelmann, *Sporobolomyces puniceus* (Komagata & Nakase) Ahearn & Yarrow, and *Sp. roseus* Kluyver & C.B. Niel. Sjamsuridzal (2007) isolated and identified phylloplane yeasts from plants in Halimun National Park. The yeasts from the *Basidiomycota* were, among others, *Cryptococcus albidus*, *Cr. laurentii* (Kuff.) C.E. Skinner, *Pseudozyma aphidis* Bandoni emend. Boekhout, *Rhodotorula* sp. F.C. Harrison, *Trichosporon* sp. Spegazzini, *Ustilago* sp., and *Sporobolomyces* Nyland. The yeasts from *Ascomycota* were, among others, *Candida fukuyamaensis*, *C. parapsilopsis*, and *Debaryomyces hansenii*.

A number of yeasts that effectively control post-harvested pathogens has been identified as antagonists (Fonseca & Inacio 2006). Yeasts have the ability to act as antagonistic agents (Druvefors, 2005). Yeasts as antagonistic agents can be used as a substitute for synthetic fungicides. The use of synthetic fungicides for controlling post-harvested growth of microorganisms on fruit may leave synthetic chemical residues which are harmful to human health (Fleet, 2003). Yeast antagonists were reported to be able to control several different pathogens on various fruits. Biocontrol may in simple terms be defined as the use of one living organism to control another (Barton & Northup, 2011). Some antagonist yeasts

have been reported as biocontrol agents of fungal pathogens on fruits. Kalogiannis *et al.* (2006) reported that tomato fruit treated with *R. glutinis* Y-44 had significantly reduced disease incidence caused by *Botrytis cinerea* on tomatoes by 50% compared to the untreated control. Zhao *et al.* (2008) reported that the application of *Pichia guilliermondii* on tomato fruits resulted in a 25% lower decay incidence caused by *Rhizopus nigricans* compared to the water-treated control fruit. Tomato fruits suffering from fruit rot are characterized by small lesions on the surface of the skin, and surrounding the lesions are black, concentric, concave circles; the fruits are soft and soggy (Delahaut & Stevenson, 2004). Saeed and Khan (2010) reported that moulds and yeasts which can cause the post-harvested decay of tomato fruits were *Geotrichum candidum*, *A. alternata*, *Aspergillus niger*, *Asp. flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer*, and *Asp. fumigatus*.

Paper mulberry or saeh plant (in Indonesia) (*Broussonetia papyrifera* Vent.) has been widely exploited by humans (Whistler & Elevitch, 2006). The most significant part of this plant is its strong fibrous bark which was used as a raw material for paper-making and textiles for centuries throughout East and Southeast Asia, and Polynesia (Teijgeler, 1995; Permadi, 2005). In Indonesia, saeh plant has great cultural value. The plant was used in the past as the main ingredient for manuscript paper (Wiraraja, 2009). However, *B. papyrifera* plant can only be found in areas where there are *daluang* paper craftsmen. So far, there was only one report on microorganisms isolated from *B. papyrifera* and there is no information on the bioactive compounds isolated from its microorganisms. Errasti *et al.* (2010) isolated fungal endophytes from *B. papyrifera* and they found *Acremonium* Link., *Cladosporium* Link., *Penicillium* Link. ex. Fr., and *Trichoderma hamatum* (Bonord.) Bain.

It is important that microorganism resources are preserved in a physiologically and genetically stable state (Nagai *et al.* 2005). Permanent preservation is essential for strains with critically important characteristics and for type specimens. Maintaining and preserving fungal cultures are essential elements of systematics and biodiversity studies. Freezing methods, including

cryopreservation are versatile and widely applicable. Most fungal cultures frozen at -20° C to -80° C remain viable (Nakasone *et al.* 2004).

At present, there is no report on yeasts isolated from phylloplane of *B. papyrifera*. There is no report on the antagonistic properties of yeast species isolated from fresh leaves of *B. papyrifera* plant from Sukadanu and Tunggilis Villages, Garut, West Java, against pathogenic moulds which cause damage on tomato fruit. There is no information on antagonistic yeasts from *B. papyrifera* with the potential as biocontrol agents against moulds which cause fruit rot on post-harvested tomato fruits. The viability of antagonistic yeasts which can act as biocontrol agents after preservation at -80° C has never been reported.

The purpose of this study are described as follows: 1) to isolate the phylloplane yeasts of *B. papyrifera* from Bandung, Garut, and Trowulan, 2) to obtain the yeasts isolates from *B. papyrifera* which has the potential as biocontrol agents against moulds from rotten tomato fruits 3) to observe the viability of the potential yeasts after preservation by freezing at -80° C.

This dissertation is consisted of three paper topics: 1) the identification of phylloplane yeasts found on paper mulberry or saeh plant (*Broussonetia papyrifera* Vent.), 2) the ability of antagonistic yeasts from saeh plant against moulds on post-harvest tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits, 3) the viability of potential yeasts from saeh plant after preservation by freezing at -80° C.

The study was conducted at the Laboratory of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Indonesia, Depok, the *Center of Excellence for Indigenous Biological Resources-Genome Studies* (CoE IBR-GS), Laboratory FMIPA UI, and the Laboratory of Microbiology, Indonesian Institute of Science (Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia-LIPI), Cibinong.

The results showed that 2,543 yeast isolates were obtained from four sampling areas using the washing and membrane filter methods. Eighty-two representative yeast isolates were selected based on similarity of colony morphology. Identification was carried out by sequencing the internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA (ITS rDNA). The results showed that 82 yeast

isolates were composed of 17 genera and 32 species. Eleven genera and 18 species were classified as *Ascomycota*, *Saccharomycetes* i.e. *Candida* Berkhout (5 species), *Debaryomyces* Lodder & Kreger-van Rij ex Kreger-van Rij (2 species), *Geotrichum* Link (1 species), *Hanseniaspora* Zikes (2 species), *Kodamaea* Y. Yamada, Tom. Suzuki, M. Matsuda & Mikata (1 species), *Meyerozyma* Kurtzman & M. Suzuki (1 species), *Pichia* E.C. Hansen (1 species), *Hyphopichia* Arx & Van der Walt (1 species), *Saccharomycetales* Kudrjanzev (1 species), *Wickerhamomyces* Kurtzman, Robneet & Basehoar (1 species), and *Aureobasidium* Viala & G. Boyer (2 species). Six genera and 14 species were classified as *Basidiomycota*, *Tremellomycetes*, i.e. *Bullera* Derx (1 species), *Cryptococcus* Vuill (5 species), *Hannaella* F.Y. Bai & Q.M. Wang (2 species), *Trichosporon* Behrend (1 species); *Microbotryomycetes*, i.e. *Rhodotorula* (3 species); *Ustilaginomycetes*, i.e. *Pseudozyma* (2 species).

Three mould isolates obtained from the pathogenicity test were capable of causing fruit rot symptom post-harvest tomato fruits. The moulds were identified as, i.e. *Alternaria alternata*, *Lasiodiplodia theobromae*, and *Syncephalastrum racemosum*. Antagonistic test by co-culture showed that there was an antagonistic interaction between the antagonistic yeasts and the moulds, and shown by inhibition of mycelial growth and the delay of sporulation time.

Six antagonistic yeasts were able to inhibit the growth and sporulation of moulds from rotten tomato fruits, i.e. *Candida saopaulonensis* UICC Y-492, *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475, *Debaryomyces hansenii* UICC Y-488, *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-476, *Geotrichum candidum* UICC Y-495, and *Hyphopichia burtonii* UICC Y-496. The antagonistic yeasts were tested for their abilities to inhibit growth of *A. alternata* and *L. theobromae* which cause fruit rot on post-harvest tomatoes at 26--28 °C for 15 days. *Candida pseudojiufengensis* UICC Y-475 was able to inhibit growth of *A. alternata* and reduce fruit rot symptoms in tomato fruit (100%). *Candida saopoulensis* UICC Y-492 and *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 were able to reduce growth of *L. theobromae* and reduce fruit rot symptoms in tomato fruit (67%).

Four yeast species (*C. pseudojiufengensis* UICC Y-475, *C. saopoulenensis* UICC Y-492, *Hyp. burtonii* UICC Y-496, and *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513) were examined for their viability after preservation at -80° C. The viability of yeasts after preservation with addition of cryoprotectants (10% glycerol and 5% trehalose) and without protectant (aqua dest as control) were compared. The yeast viability was observed after being preserved at -80° C on day-1 (H1), day-7 (H7), day-14 (H14), day-30 (H-30), and day-180 (H-180). The results showed that all strains were still viable after freezing at -80° C for 180 days. The number of cells for each strain were counted after being preserved for 180 days: *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475 (1.08×10^8 CFU/ml), *C. saopoulenensis* UICC Y-492 (0.65×10^8 CFU/ml), *Hyp. burtonii* UICC Y-496 (1.76×10^8 CFU/ml), and *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 (2.13×10^8 CFU/ml). All strains showed high viability after being preserved at -80° C for 180 days. The number of cells after preservation at -80° C were stable (10^8 CFU/ml) or decrease at only 10^1 CFU/ml.

xxiii+243 pp: 16 plates; 20 tables; 30 appendices; Bibl: 158 (1960-2013)

PENGANTAR PARIPURNA

Khamir dapat ditemukan di berbagai habitat di alam, baik pada ekosistem terestrial maupun ekosistem akuatik. Salah satu mikrohabitat khamir pada ekosistem terestrial adalah permukaan daun. Daun memberikan nutrisi berupa eksudat dan hasil gutasi yang mengandung gula, asam amino, hormon tumbuhan, vitamin, dan mineral (Deak, 2008). Khamir yang hidup pada permukaan daun tumbuhan (*phylloplane*) termasuk khamir epifit (Fonseca & Inacio, 2006).

Beberapa penelitian mengenai keanekaragaman khamir *phylloplane* dari berbagai jenis tumbuhan telah dilaporkan. Cormack dkk. (1994) melakukan isolasi, identifikasi, dan pengujian kemampuan khamir *phylloplane* dari *Triticum aestivum* dan *Malus domestica* dalam menghasilkan senyawa antibakteri terhadap *Pseudomonas fluorescens* dan *Staphylococcus aureus*. Khamir *phylloplane* tersebut antara lain *Aur. pullulans*, *Citeromyces matritensis*, *Cr. laurentii*, *Rh. glutinis*, dan *Sporobolomyces roseus*. Ahansal dkk. (2008) melaporkan *Bullera variabilis* Nakase & M. Suzuki, *Rh. glutinis* (Fresenius) F.C. Harrison, dan *Pichia angusta* (Teunisson, Hall & Wickerman) Kurtzman ditemukan pada *phylloplane* *Argania spinosa* (L.) Skeels. Jager dkk. (2001) melaporkan khamir genera *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, dan *Sporobolomyces* sebagai khamir *phylloplane* mangga. Stohr dkk. (2008) melaporkan khamir *Basidiomycota* dari *phylloplane* *Festuca arundinacea* Schreb yaitu *Cryptococcus* Vuillemin dan *Sporobolomyces* Kluyver & van Niel.

Penelitian mengenai keanekaragaman khamir asal tumbuhan di Indonesia masih terbatas. Haryono dkk. (1996) melaporkan khamir *phylloplane* dari tumbuhan di daerah pinggiran kota Yogyakarta termasuk *Bullera*, *Bensingtonia*, dan *Sporobolomyces*. Oetari dkk. (2001) mengisolasi khamir dari daun *Oryza sativa* L. di wilayah Depok. Khamir yang ditemukan antara lain *Pichia*, *Bullera piricola*, *Spo. puniceus*, dan *Spo. roseus*. Sjamsuridzal (2007) mengisolasi dan mengidentifikasi khamir *phylloplane* dari tumbuhan di Cikurutug, Cikaniki, dan Gunung Kendeng (Taman Nasional Gunung Halimun). Khamir dari *Basidiomycota* yang ditemukan antara lain *Cr. albidus*, *Cr. laurentii*, *Pseu. aphidis* Bandoni emend. Boekhout, *Rhodotorula* sp., *Trichosporon* sp., *Ustilago*

sp. dan *Sporobolomyces* Nyland. Khamir dari *Ascomycota* yang ditemukan antara lain *C. fukuyamaensis*, *C. parapsilopsis*, dan *Deb. hansenii*. Basukriadi dkk. (2010) melaporkan pada bunga *Jatropha integerrima* Jacq. ditemukan khamir yang sangat beragam terutama spesies *Aur. pullulans*, *C. cf. apicola* (Hajsig) S.A. Meyer & Yarrow, *C. cf. azyma* (var der Walt, E. Johannsen & Yarrow) S.A. Meyer & Yarrow, dan *Metschnikowia* sp. Kamienski. Sjamsuridzal (2013) melaporkan khamir spesies baru *Metschnikowia cibodasensis* asal bunga *Saurauia pendula*, *Berberis nepalensis* dan *Brunfelsia americana* yang tumbuh di taman bunga di Kebun Raya Cibodas, Indonesia.

Khamir memiliki kemampuan melakukan interaksi antagonisme (Druvefors, 2005), yaitu interaksi yang merugikan suatu mikroorganisme, sedangkan mikroorganisme lain diuntungkan (Barton & Northup, 2011). Khamir yang memiliki kemampuan antagonisme disebut khamir antagonis (Fonseca & Inacio, 2006). Penelitian mengenai pengujian antagonisme khamir telah dilakukan oleh Oetari dkk. (2009). Pengujian antagonisme dilakukan menggunakan khamir-khamir koleksi UICC yang berasal dari Taman Nasional Gunung Halimun, Cagar Alam Muara Angke, dan Cagar Alam Pulau Rambut terhadap kapang *Aspergillus* yang merupakan kontaminan pada bahan pangan. Hasil pengujian menunjukkan *Candida* sp. strain UICC Y-216 dapat mereduksi lebar koloni *Asp. carbonarius* UICC 328 sebesar 89,92%.

Biokontrol merupakan penggunaan suatu organisme untuk mengontrol pertumbuhan organisme pathogen (Khan & Anwer 2011). Menurut Druvefors (2005) biokontrol adalah penggunaan mikroorganisme antagonis yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme lainnya pada substrat. Biokontrol dapat menjadi salah satu alternatif pengganti fungisida sintetik untuk mengatasi kerusakan pada tanaman akibat fungi patogen (Khan & Anwer 2011). Penggunaan fungisida sintetik dalam mengendalikan mikroorganisme pada buah pascapanen dapat meninggalkan residu bahan-bahan kimia sintesis yang berbahaya bagi kesehatan manusia (Fleet, 2003).

Khamir antagonis berpotensi sebagai agen biokontrol (Khan & Anwer, 2011). Chanchaichavivat dkk. (2007) melaporkan kemampuan khamir *P. guilliermondii* strain R13 sebagai agen biokontrol *Colletotrichum capsici*

ditunjukkan dengan berkurangnya diameter pertumbuhan miselium kapang pada buah cabai sebesar 6,5% dibandingkan dengan buah cabai yang tidak diinokulasikan dengan suspensi sel khamir.

Tomat merupakan salah satu tanaman sayuran yang sangat penting dalam pemenuhan kalsium dan sumber vitamin A dan C (Umesh, 2011). Produksi buah tomat di Indonesia masih rendah dibandingkan dengan produksi di negara lain (Mulyati, 2007). Salah satu penyebab penurunan produksi buah tomat adalah kerusakan yang disebabkan oleh penyakit. Penyakit busuk pada buah merupakan penyakit utama pasca panen yang dapat menurunkan kualitas buah dan hasil panen (Daniel dkk., 2010). Beberapa fungi penyebab kebusukan buah telah dilaporkan, *Alternaria solani*, *Asp. flavus*, *Asp. fumigatus*, *Asp. niger*, *Fus. oxysporum*, *Geo. candidum*, dan *R. stolonifer* adalah fungi penyebab kebusukan tomat pascapanen (Saeed dkk. 2010). *Rhizopus stolonifer* dan *Mucor hiemalis* adalah kapang penyebab kebusukan tomat pascapanen (Sonoda dkk. 1981). *Colletotrochum gloeosporioides*, *L. theobromae*, *A. alternata*, dan *Aspergillus niger* adalah kapang penyebab kebusukan buah mangga di pasar tradisional Punjab. Permukaan kulit buah yang busuk memperlihatkan luka berwarna hitam dengan lingkaran cekung (Merr dkk. 2013). *Botryodiplodia theobromae* menyebabkan penyakit busuk buah pada mangga (Sugiprihartini dkk., 2011).

Tumbuhan *B. papyrifera* memiliki nilai budaya yang tinggi di Indonesia. *Broussonetia papyrifera* dimanfaatkan sebagai bahan dasar pembuatan kertas manuskrip sejak dahulu kala (Wiraraja, 2009). Bagian tumbuhan tersebut yang digunakan untuk pembuatan kertas adalah kulit kayu batang *B. papyrifera*. Kertas yang dihasilkan dikenal dengan nama kertas ‘daluang’ (‘dluwang’) dan digunakan dalam penulisan kertas manuskrip pada masa kerajaan Islam (Teijgeler, 1995). Pada abad ke-20, sentra produksi kertas ‘daluang’ hanya terdapat di Desa Tunggilis, Garut (Jawa Barat) dan Tegalsari, Ponorogo (Jawa Timur) (Permadi, 2005). Di wilayah lain Nusantara, *B. papyrifera* juga dimanfaatkan untuk pembuatan kertas seperti *laklak* atau *lampak* di Batak, *dlubheng* di Madura, *ranta* di Tana Toraja Sulawesi Selatan (Suganda, 2001). Setelah Perang Dunia kedua, pembuatan kertas ‘daluang’ hanya dilakukan oleh satu keluarga di Desa Tunggilis, Garut (Permadi, 2005). Selain digunakan sebagai bahan pembuatan kertas, *B.*

papyrifera di era pra-Islam (1550 sebelum Masehi) juga digunakan untuk pembuatan kain pakaian dari kulit kayu terutama oleh pemuka agama seperti para pertapa (Teijgeler, 2000). Akan tetapi kemajuan teknologi pembuatan kertas, mengakibatkan pembuatan kertas daluang makin terdesak. Hal tersebut mengakibatkan usaha pembuatan kertas daluang hampir tidak ada lagi, sehingga saat ini *B. papyrifera* sudah semakin sulit ditemukan (Suganda, 2001). Oetari (2010) menyatakan saat ini *B. papyrifera* sudah jarang ditemukan.

Selain memiliki nilai sejarah yang tinggi, *B. papyrifera* dilaporkan beberapa peneliti menghasilkan senyawa bioaktif yang berguna bagi kesehatan. Ko dkk. (1998) melaporkan bagian akar dari *B. papyrifera* mengandung berbagai jenis flavonoid (*flavans*, *flavanones*, *chalcones*, dan *flavones*), dan memiliki aktivitas antimikroba (Ho-Yong dkk., 2010). Xu dkk. (2010) melaporkan kulit batang dari *B. papyrifera* memiliki aktivitas antioksidan. Sun dkk. (2012) melaporkan bahwa buah *B. papyrifera* memiliki aktivitas antioksidan. Daun *B. papyrifera* memiliki aktivitas antifungi (Zafar dkk., 2002) dan aktivitas antioksidan (Xu dkk., 2010). Daun *B. papyrifera* dapat digunakan sebagai makanan bagi manusia dan hewan (Whistler & Elevitch, 2006). Namun demikian, hanya sedikit laporan penelitian mengenai keberadaan mikroorganisme dan kandungan senyawa bioaktif yang dimiliki oleh mikroorganisme yang tumbuh pada *B. papyrifera*. Keberadaan mikroorganisme pada *B. papyrifera* telah dilaporkan oleh Errasti dkk. (2010), yaitu kapang endofit telah diisolasi dari *B. papyrifera*, dan diidentifikasi sebagai *Acremonium* Link., *Cladosporium* Link., *Penicillium* Link ex Fr., dan *Trichoderma hamatum* (Bonord.) Bain. Penelitian mengenai keberadaan khamir asal *B. papyrifera* dan potensinya sebagai agens biokontrol terhadap kapang penyebab kebusukan pada buah tomat pascapanen belum pernah dilaporkan.

Identifikasi khamir dapat dilakukan secara molekuler berdasarkan karakter genotipik, yaitu karakter asam nukleat (DNA atau RNA). Salah satu asam nukleat yang dapat digunakan untuk identifikasi khamir adalah gen ribosomal RNA. Gen ribosomal lokus RNA merupakan kelompok gen multikopi (100-200 kopi) yang posisinya terdapat secara berulang dan berurutan (*tandem repeat*) di dalam genom. Gen rRNA terdiri dari *coding region* dan *non-coding region*. *Coding*

region terdiri dari gen 5S, 5,8S, 18S (*small subunit*, SSU), dan 28S (*large subunit*) rRNA. *Non-coding region* terdiri dari daerah *internal transcribed spacer* (ITS), dan IGS (Deak, 2008). Identitas khamir dapat diketahui berdasarkan analisis data *sequence* daerah *internal transcribed spacer* (ITS) rDNA. Menurut Carvajal dkk. (2006) daerah ITS rDNA umumnya memiliki susunan nukleotida sangat bervariasi antar spesies, sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi khamir sampai tingkat spesies.

Mikroorganisme yang telah diketahui memiliki peran penting bagi ekosistem, dan memiliki nilai ekonomi tinggi di bidang teknologi perlu dikonservasi untuk pemanfaatan yang berkelanjutan (Karabulut & Baykal, 2003; Sjamsuridzal, 2007). Preservasi khamir merupakan upaya penyimpanan yang bertujuan mempertahankan viabilitas dan stabilitas karakter (genetik, morfologi dan fisiologi) khamir (Robert dkk., 2006). Salah satu metode preservasi jangka panjang yang dapat digunakan adalah *freezing*. Metode *freezing* dapat menjaga viabilitas *Kluyveromyces marxianus* dan *P. fermentans* selama penyimpanan (Chen, 2006). Nagai dkk. (2005) melakukan preservasi khamir dari *National Institute Agrobiological Sciences* (NIAS) dengan metode *freezing* pada suhu -80° C. Hasil preservasi menunjukkan khamir koleksi NIAS memiliki viabilitas tinggi, yaitu *Ascomycota* (96,1%), dan *Basidiomycota* (98%). Nabilah (2010) melaporkan khamir *Ascomycota* dari spesies *C. parapsilosis* UICC Y-275, *C. pseudointermedia* UICC Y-313, *C. saitoana* UICC Y-162, *Deb. hansenii* var. *fabryi* UICC Y-119, dan *Kluyveromyces hubeiensis* UICC Y-288 memiliki viabilitas 100% setelah dipreservasi dengan metode *freezing* setelah 2 minggu inkubasi.

Penelitian mengenai khamir *phylloplane B. paprifera* sampai saat ini belum pernah dilaporkan. Penelitian ini bertujuan memperoleh isolat dan identitas khamir *phylloplane B. paprifera* dari wilayah Pojok Dago, Bandung; Sukadanu, Garut; Tunggilis, Garut; dan Trowulan, Mojokerto, mengetahui potensi khamir antagonis sebagai agens biokontrol pada kapang penyebab busuk buah tomat pascapanen, serta mengetahui viabilitas khamir tersebut setelah dipreservasi pada suhu -80° C.

Pemilihan lokasi *B. papyrifera* ditentukan berdasarkan keberadaan perajin kertas daluang atau lokasi ditemukan tumbuhan tersebut di daerah Jawa. Lokasi pengambilan sampel adalah Desa Dago Pojok, Bandung, Desa Sukadanu, Garut, Desa Tunggilis, Garut, dan Desa Bejijong Trowulan Mojokerto di daerah Jawa Timur.

RUMUSAN MASALAH

Penelitian yang telah dilaporkan mengenai *B. papyrifera* hanya terbatas pada isolasi kapang endofit dari tumbuhan tersebut (Errasti dkk., 2010; Oetari dkk., 2011 belum dipublikasikan), serta penelitian mengenai isolasi senyawa bioaktif di bidang kesehatan dari bagian *B. papyrifera* (Zafar dkk., 2002; Ko dkk., 2008). Informasi mengenai keberadaan khamir dari *B. papyrifera* belum diteliti. Permasalahan penelitian ini adalah:

1. Belum diisolasi dan diketahui identitas khamir *phylloplane B. papyrifera* asal Bandung, Garut, dan Trowulan.
2. Belum diperoleh khamir *phylloplane B. papyrifera* dengan kemampuan antagonis yang berpotensi sebagai agens biokontrol terhadap kapang penyebab kebusukan buah tomat pascapanen.
3. Belum diketahui viabilitas khamir *phylloplane B. papyrifera* setelah dipreservasi dengan metode *freezing* pada suhu -80°C .

TUJUAN PENELITIAN

Tujuan penelitian adalah sebagai berikut:

1. Melakukan identifikasi khamir *phylloplane B. papyrifera* dari Bandung, Garut, dan Trowulan, secara molekuler.
2. Melakukan pengujian kemampuan khamir *phylloplane B. papyrifera* dari Bandung, Garut, dan Trowulan untuk kemampuan antagonisme dan biokontrol terhadap kapang penyebab kebusukan buah tomat pascapanen.
3. Melakukan preservasi dengan metode *freezing* pada suhu -80°C pada khamir *phylloplane B. papyrifera*.

HIPOTESIS PENELITIAN

Hipotesis penelitian adalah:

1. Isolat-isolat khamir *phylloplane B. papyrifera* dapat diidentifikasi secara molekuler hingga tingkat spesies.
2. Khamir *phylloplane B. papyrifera* memiliki kemampuan antagonis dan berpotensi sebagai agens biokontrol terhadap kapang penyebab kebusukan buah tomat pascapanen.
3. Viabilitas khamir *phylloplane B. papyrifera* dipengaruhi oleh preservasi pada suhu -80° C.

MAKALAH DALAM PENELITIAN

Makalah pada penelitian terbagi menjadi tiga bagian yaitu

1. Identifikasi khamir *phylloplane* asal tumbuhan saeh (*Broussonetia papyrifera* (L.) L'Hér. ex Vent.) di Pulau Jawa Indonesia.
2. Kemampuan antagonistik khamir *phylloplane* asal tumbuhan saeh (*Broussonetia papyrifera* (L.) L'Hér. ex Vent.) di Jawa Barat sebagai agens biokontrol terhadap kapang pada buah tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pascapanen.
3. Viabilitas khamir antagonis asal tumbuhan saeh (*Broussonetia papyrifera* (L.) L'Hér. ex Vent.) yang memiliki kemampuan biokontrol setelah dipreservasi pada suhu -80° C.

MANFAAT PENELITIAN

Diharapkan penelitian ini bermanfaat untuk:

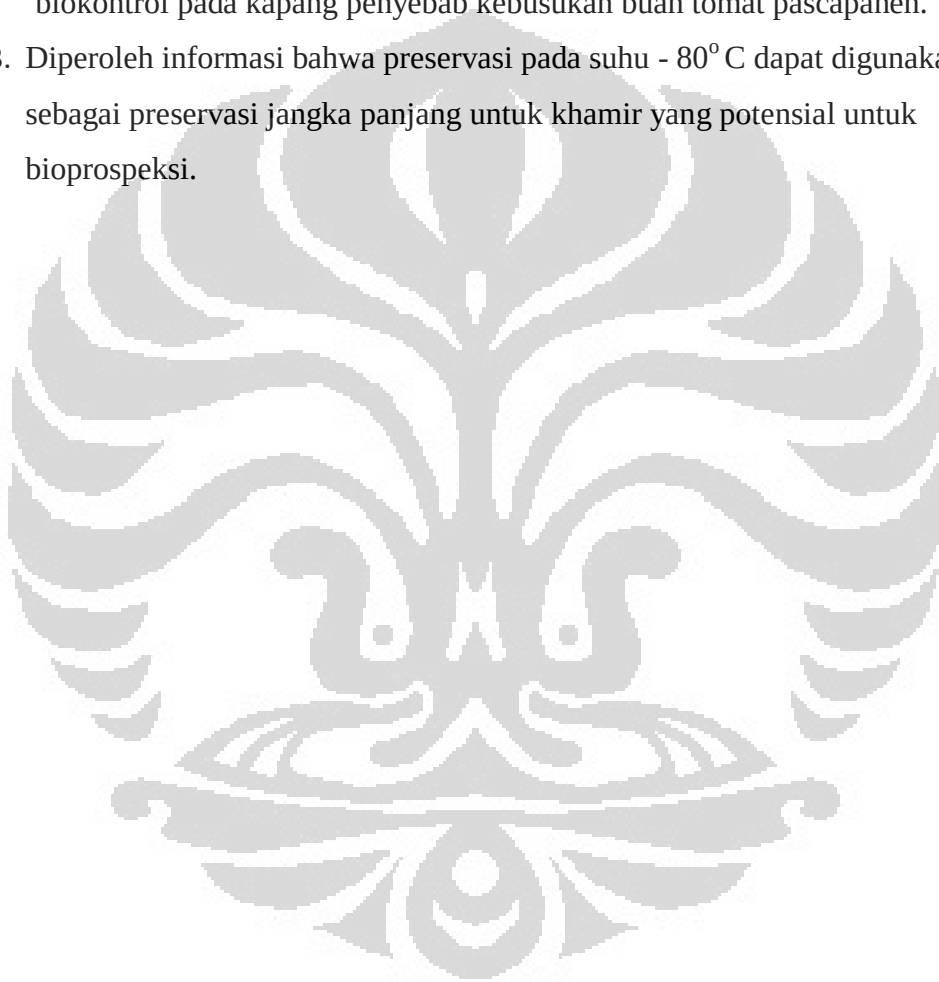
1. Memberikan informasi mengenai identitas khamir *phylloplane B. papyrifera* asal Bandung, Garut, dan Trowulan.
2. Memberikan informasi mengenai khamir *phylloplane B. papyrifera* dari Bandung, Garut, dan Trowulan dengan kemampuan antagonis yang berpotensi sebagai agens biokontrol terhadap kapang penyebab kebusukan buah tomat pascapanen.
3. Memberikan informasi mengenai viabilitas khamir *phylloplane* asal tumbuhan *B. papyrifera* tersebut setelah dipreservasi pada suhu -80°C .

NILAI KEBARUAN PENELITIAN

Broussonetia papyrifera merupakan tumbuhan yang memiliki nilai budaya yang tinggi bagi bangsa Indonesia. Salah satu nilai budaya dari *B. papyrifera* adalah sejak 1550 sebelum Masehi kulit batang tumbuhan tersebut telah digunakan sebagai bahan dasar kertas daluang untuk pembuatan manuskrip pada masa kerajaan Islam dan sebagai bahan dasar pembuatan kain bagi pemuka agama seperti para pertapa. Di wilayah Sulawesi Tengah *B. papyrifera* juga digunakan sebagai bahan dasar pembuatan kain bagi pemuka agama (Teijgeler, 1995; Teijgeler, 2000). *Broussonetia papyrifera* juga memiliki manfaat bagi kesehatan. Ko dkk. (1998) melaporkan akar *B. papyrifera* menghasilkan berbagai jenis flavonoid (*flavans*, *flavanones*, *chalcones*, dan *flavones*) serta memiliki aktivitas antimikroba (Ho-Yong dkk., 2010). Xu dkk. (2010) melaporkan bagian kulit batang memiliki aktivitas antioksidan. Penelitian mengenai keberadaan khamir pada *B. papyrifera* dan potensinya sebagai agens biokontrol terhadap kapang-kapang penyebab kebusukan buah tomat pascapanen belum pernah dilakukan.

Penelitian ini memiliki nilai kebaruan antara lain:

1. Diperoleh isolat khamir *phylloplane B. papyrifera* indigenous Indonesia dengan identitas spesies yang akurat, untuk menambah koleksi serta melengkapi database Universitas Indonesia Culture Collection (UICC), FMIPA UI.
2. Diperoleh khamir indigenous Indonesia dengan kemampuan sebagai agens biokontrol pada kapang penyebab kebusukan buah tomat pascapanen.
3. Diperoleh informasi bahwa preservasi pada suhu - 80° C dapat digunakan sebagai preservasi jangka panjang untuk khamir yang potensial untuk bioprospeksi.



MAKALAH I

IDENTIFIKASI KHAMIR *PHYLLOPLANE* ASAL TUMBUHAN SAEH (*Broussonetia papyrifera* (L.) L'Hér.ex Vent.) DI PULAU JAWA INDONESIA

IDENTIFICATION OF PHYLLOPLANE YEASTS FROM PAPER MULBERRY OR SAEH PLANT (*Broussonetia papyrifera* (L.) L'Hér.ex Vent.) IN JAVA, INDONESIA

Dalia Sukmawati

ABSTRACT

Isolation and identification of yeasts from fresh leaves of *Broussonetia papyrifera* from Java, Indonesia have been carried out. The yeasts were isolated from the phylloplane of six months-old and 1.5 year-old plants from three locations in West Java and one location in East Java, Indonesia. A total of 2,543 yeast isolates were obtained by using washing and filter membrane methods. Based on similarity of colony morphology, 82 representative yeast isolates were selected and identified based on the internal transcribed spacer (ITS) regions of DNA sequence data analysis. The identification results showed that those 82 yeast isolates consisted of 17 genera and 32 species. Based on our analysis, thirty six isolates belong to phylum *Ascomycota* within classes *Saccharomycetes* and *Dothidiomycetes*, e.g. *Aureobasidium* (4 isolates), *Candida* (9 isolates), *Debaryomyces* (4 isolates), *Geotrichum* (1 isolate), *Hanseniaspora* (4 isolates), *Kodamaea* (2 isolates), *Meyerozyma* (3 isolates), *Pichia* (1 isolate), *Hyphopichia* (3 isolates), *Saccharomycetales* (1 isolate), and *Wickerhamomyces* (4 isolates). Forty six of the remaining isolates belong to *Basidiomycota* within the classes *Tremellomycetes*, *Microbotryomycetes*, and *Ustilaginomycetes*, e.g. *Bullera* (1 isolate), *Cryptococcus* (22 isolates), *Hannaella* (3 isolates), *Trichosporon* (4 isolates), *Pseudozyma* (4 isolates), and *Rhodotorula* (12 isolates).

Key words : *Broussonetia papyrifera*, ITS regions of rDNA, phylogenetic analysis, phylloplane, yeasts

PENDAHULUAN

Broussonetia papyrifera (paper mulberry) dapat ditemukan di negara-negara Asia Pasifik (Thailand, Cina, Myanmar, Laos, Jepang, Korea, dan Indonesia) (Whistler & Elevitch, 2006). *Broussonetia papyrifera* di Indonesia dapat ditemukan di Pulau Jawa, Sulawesi, Kalimantan, Bali, Papua, dan Maluku (Permadi, 2010). *Broussonetia papyrifera* dikenal dengan beberapa nama lokal seperti 'saeh' (Sunda), 'galugu' atau 'glugu' (Jawa), 'sepukau' (Basemah, Sumatera), 'kembali', 'rowa' (Sumba), dan 'linggowas' (Banggai) (Permadi, 1998).

Pemanfaatan *B. papyrifera* oleh masyarakat Indonesia sudah diketahui sejak 1550 sebelum Masehi sebagai bahan pembuat kertas daluang di Jawa, ritual keagamaan di Bali, dan bahan pembuatan kain tradisional di Sulawesi (Permadi, 2010; Teijgeler, 2000). Tumbuhan tersebut di luar negeri selain sebagai bahan pembuat kertas dan pakaian tradisional, juga dimanfaatkan sebagai obat tradisional yaitu sebagai obat pencakar dan penurun panas (Hussain, dkk., 2008).

Penelitian ilmiah mengenai aspek potensi pemanfaatan *B. papyrifera* khususnya dibidang kesehatan dan pangan cukup banyak dilaporkan. Ko dkk. (1998) melaporkan kandungan flavonoid (*flavans*, *flavanones*, *chalcones*, dan *flavones*) pada akar. Ho-Yong dkk. (2010) melaporkan aktivitas antimikroba dari akar *B. papyrifera*. Xu dkk. (2010) melaporkan aktivitas antioksidan dari kulit batang, sedangkan Sun dkk. (2012) melaporkan aktivitas antioksidan dari buah. Zafar dkk. (2002) melaporkan aktivitas antifungi, sedangkan Xu dkk. (2010) melaporkan aktivitas antioksidan dari daun. Daun *B. papyrifera* dapat digunakan sebagai makanan bagi manusia dan hewan (Whistler & Elevitch, 2006).

Namun, hanya sedikit laporan penelitian mengenai keberadaan mikroorganisme yang berasal dari *B. papyrifera*. Errasti dkk. (2010) melaporkan kapang-kapang endofit yang diisolasi dari *B. papyrifera* antara lain *Acremonium* Link., *Cladosporium* Link., *Penicillium* Link ex Fr., dan *Trichoderma hamatum* (Bonord.) Bain. Sampai saat ini, penelitian mengenai isolasi khamir dari *B. papyrifera* belum pernah dilakukan.

Permukaan daun (*phylloplane*) merupakan habitat bagi khamir. Nutrien yang tersedia pada daun berupa hasil gutasi (Fonseca & Inacio, 2006) terdiri dari karbohidrat, protein, lemak, asam nukleat, garam mineral dan vitamin merupakan sumber nutrien bagi khamir (Charlie & Watkinson, 1995).

Khamir yang hidup pada *phylloplane* disebut khamir *phylloplane*. Khamir *phylloplane* merupakan khamir epifit. Komposisi dan jumlah spesies khamir *phylloplane* sangat dipengaruhi oleh nutrien yang tersedia pada daun. Perubahan komposisi nutrien dapat terjadi akibat perubahan usia dan tingkat degradasi daun, yaitu pada daun muda, tua, dan yang sudah lepas dari tumbuhan tersebut. Perubahan komposisi nutrien akan mempengaruhi komposisi mikroorganisme pada daun (Charlie & Watkinson, 1995). Keberadaan khamir pada *phylloplane* dapat terbawa oleh partikel tanah dan partikel lain dari udara (Charlie & Watkinson, 1995), dan terbawa serangga dari satu tumbuhan ke tumbuhan lain (Spencer & Spencer, 1997).

Penelitian mengenai khamir *phylloplane* telah banyak dilaporkan (Crestani dkk., 2009; Fonseca & Inacio, 2006; Hong dkk., 2002; Soon dkk., 2002). Secara umum laporan penelitian tersebut mengenai keanekaragaman khamir *phylloplane*, peran khamir *phylloplane* dalam siklus nutrien (biogeokimia) dan potensial khamir dalam pengendalian mikroorganisme patogen pada tumbuhan inang (Herrera & Pozo, 2014).

Beberapa laporan mengenai keanekaragaman khamir epifit yang berasal dari daun antara lain sebagai berikut: Ahansal dkk. (2008) melaporkan khamir yang diisolasi dari permukaan daun *Argania spinosa* Skeels yang termasuk *Ascomycota* yaitu *P. angusta* (Teunisson, Hall, & Wickerman) Kurtzman dan termasuk *Basidiomycota* antara lain *Bul. variabilis* Nakase Her. & M. Suzuki, *Rh. glutinis* (Fresenius) F.C. Harrison, dan khamir. Stohr dkk. (2008) melaporkan khamir-khamir dari daun *Festuca sasanqua* Schreb termasuk dalam *Basidiomycota*, yaitu *Cr. Vuillemin* dan *Sporobolomyces* Kluyver & van Niel. Carvajal dkk. (2006) mengisolasi dan mengidentifikasi khamir *phylloplane* terutama *Candida* Berkhout, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Rhodotorula*, dan *Trichosporon* Behrend. Penelitian khamir *phylloplane* di Indonesia antara lain: Oetari dkk. (2001) mengisolasi khamir dari daun padi (*Oryza sativa* L.) di wilayah Depok. Khamir-

khamir yang ditemukan antara lain *Pichia*, *Bul. piricola*, *Spo. puniceus*, dan *Spo.roseus*. Sjamsuridzal (2007) mengisolasi dan mengidentifikasi khamir *phylloplane* dari tanaman di Cikurutug, Cikaniki, dan Gunung Kendeng Taman Nasional Gunung Halimun, Jawa Barat. Khamir dari *Basidiomycota* yang ditemukan antara lain *Cr. albidus*, *Cr. laurentii*, *Pseu. aphidis* Bandoni emend. Boekhout, *Rhodotorula* sp., *Trichosporon* sp., *Ustilago* sp. dan *Sporobolomyces* Nyland. Khamir *Ascomycota* yang ditemukan antara lain *C. fukuyamaensis*, *C. parapsilopsis*, dan *Deb. hansenii*. Sampai saat ini belum ada laporan penelitian mengenai khamir *phylloplane* dari *B. papyrifera*.

Dalam rangka penelitian mengenai “Kajian Kekayaan Tradisional Indonesia: Daluang (Dluwang) dari Tanaman Saeh (*Broussonetia papyrifera* Vent.) ditinjau dari Aspek Hayati dan Budaya”, Oetari dkk. (2009) telah melakukan penelitian mengenai khamir *phylloplane* dari *B. papyrifera* yang digunakan dalam pembuatan kertas daluang. Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian Oetari dkk. (2009), khususnya mengenai khamir *phylloplane* dari *B. papyrifera* yang bertujuan mengetahui keberadaan khamir *phylloplane* dari *B. papyrifera* berusia usia enam bulan dan 1,5 tahun, yaitu usia tumbuhan yang digunakan oleh perajin kertas daluang. *Broussonetia papyrifera* diperoleh dari lokasi di Jawa di mana masih ditemukan perajin kertas daluang atau masih ditemukan tumbuhan tersebut. Lokasi pengambilan sampel adalah Desa Dago Pojok, Bandung, Desa Sukadanu, Garut, Desa Tunggilis, Garut, dan Desa Bejijong Trowulan Mojokerto di daerah Jawa Timur. Identifikasi isolat khamir dilakukan berdasarkan analisis data *sequence* daerah ITS rDNA. Untuk mengetahui kekerabatan antara khamir *phylloplane* dari *B. papyrifera* dengan spesies khamir yang terdapat di data base Genbank dilakukan analisis filogenetik.

BAHAN DAN CARA KERJA

A. Lokasi pengambilan sampel

Sampel daun diperoleh dari empat lokasi yang berbeda yaitu Desa Dago Pojok, Bandung, Jawa Barat (April 2009), Desa Sukadanu, Garut, Jawa Barat (April & Maret 2009), Desa Tunggilis, Garut, Jawa Barat (April 2009), dan Desa Bejijong, Trowulan, Mojokerto, Jawa Timur (Juli 2009).

B. Bahan

1. Sampel Daun *B. papyrifera*

Dua tumbuhan dipilih dari setiap lokasi yaitu tumbuhan yang berumur enam bulan dan 1,5 tahun, dari setiap tumbuhan diambil sebanyak dua helai daun. Daun yang diperoleh merupakan daun ke-5 dari bagian pucuk. Total sampel daun yang diambil berjumlah 16 helai. Sampel tersebut kemudian dimasukkan ke dalam kantung steril yang telah dilubangi dengan jarum steril. Kantung plastik tersebut dimasukkan ke dalam *cooling box* dan dibawa ke laboratorium.

2. Medium

Medium *yeast malt extract agar* (YMA) digunakan sebagai medium isolasi khamir dan medium untuk pengamatan morfologi. Medium *potato dextrose agar* (PDA) digunakan untuk *working culture* dan *stock culture*.

3. Bahan kimia dan bahan habis pakai lainnya

Medium yang digunakan dari Difco adalah *yeast extract*, *malt extract*, pepton, agar (*bacto agar*), dan *potato dextrose agar* (PDA). Bahan kimia dari Promega yang digunakan adalah *Ethidium bromide*, *buffer tris acetate EDTA* (TAE), *nuclease free water* (NFW), *DNA ladder* 100 bp, *loading dye* dan agarose.

Bahan kimia lain adalah sodium asetat pH 5,5 (Novagen), ETOH 100% (Merck), ETOH 70% (Merck), PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR beads (GE Healthcare), primer terdiri atas sepasang primer *forward* ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACA AGG-3') dan primer *reverse* ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (1st BASE), *Big Dye Terminator* v 3.1, dan *Pellet Paint® NF Co-Precipitant* (Novagen).

C. Cara kerja

1. Isolasi khamir

Isolasi khamir dari daun segar *B. papyrifera* menggunakan metode *washing* dan *membrane filter method* berdasarkan Sjamsuridzal dkk. (2013). Daun ditimbang (1 g), dan dipotong-potong menjadi bagian kecil. Potongan daun dicuci dengan akuades steril 25 ml (dalam tabung konikal 50 ml) dan dihomogenisasi dengan *vorteks* selama 10 menit. Potongan daun yang telah dicuci diletakkan di medium YMA. Sebanyak 0,1 ml suspensi hasil pencucian daun *B. papyrifera* diinokulasikan ke medium YMA dengan tiga kali pengulangan. Suspensi hasil pencucian daun kemudian disaring menggunakan *membrane filter* 0,45 µm (Millipore). *Membrane filter* kemudian ditempatkan di atas medium YMA dan diinkubasi, selama 3 hari pada suhu 27--28 °C. Koloni khamir yang tumbuh, ditransfer menggunakan tusuk gigi steril ke medium YMA untuk pembuatan *colony library*. Seleksi khamir representatif dari *colony library* berdasarkan morfotipe koloni yaitu warna, ukuran, dan tekstur koloni. Koloni khamir representatif kemudian dipurifikasi sebanyak 2 kali menggunakan *quadrant streak* berdasarkan Cappuccino dan Sherman (2001) pada medium YMA. Isolat murni dipelihara pada medium PDA miring dan dipreservasi di dalam gliserol 10% trehalose 5% pada suhu -80 °C. Isolat-isolat khamir hasil isolasi disimpan sebagai koleksi Universitas Indonesia *Culture Collection* (UICC), Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

2. Identifikasi khamir

2.1. Isolat representatif

Sebanyak 82 isolat khamir representatif dipilih untuk identifikasi secara molekuler. Pemilihan isolat khamir berdasarkan warna dan tekstur koloni dari empat lokasi pengambilan sampel yaitu Desa Dago Pojok, Bandung, (Jawa Barat) (20 isolat), Desa Sukadanu, Garut, (Jawa Barat) (22 isolat), Desa Toenggilis, Garut, (Jawa Barat) (20 isolat), dan Desa Bejijong, Trowulan, Mojokerto, (Jawa Timur) (20 isolat).

2.2. Isolasi DNA khamir

Biakan khamir yang digunakan untuk isolasi DNA ditumbuhkan pada medium YMA. Biakan khamir yang digunakan untuk isolasi DNA berada pada fase logaritmik pertumbuhan. Ekstraksi DNA dilakukan dengan mengambil satu ose biakan khamir, kemudian disuspensikan ke dalam 300 μL *milliQ* steril dalam tabung mikro, dan dihomogenkan menggunakan *vortex* (Bio Rad: BR 2000, California, USA). Ekstraksi DNA khamir menggunakan *boiling method* berdasarkan Sjamsuridzal dan Oetari (2003).

2.3. Persiapan reaksi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan kondisi PCR

Amplifikasi daerah ITS rDNA menggunakan sepasang primer *forward* ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACA AGG-3') dan primer *reverse* ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') berdasarkan White dkk. (1990). Reaksi PCR menggunakan PuReTaqTM Ready-To-GoTM PCR beads (GE Healthcare) dengan volume akhir 25 μL yang terdiri dari PuReTaqTM Ready-To-Go (RTG) PCR beads (GE Healthcare) dilarutkan dalam 15 μL *nuclease free water* (NFW) (Promega), masing-masing primer (ITS5 dan ITS4) sebanyak 0,5 μL dengan konsentrasi 10 μM dan *template* DNA sebanyak 9 μL dengan konsentrasi 10 μM .

Kondisi PCR (BioRad: MyCycler™. Thermal Cycler) sebagai berikut 95 °C selama 2 menit (1 siklus); 94 °C selama 15 detik; 56 °C selama 30 detik; 68 °C selama 10 menit (40 siklus); dan proses ekstensi akhir berlangsung pada 68 °C selama 10 menit (1 siklus).

2.4. Visualisasi produk PCR

Pembuatan gel agarosa dilakukan berdasarkan Sambrook & Russell, 2001. Gel agarose 2% diletakkan di atas *tray*. Buffer TAE 1x (*Tris Acetate EDTA*) dimasukkan ke dalam alat elektroforesis sehingga gel agarosa terendam. Sebanyak 5 µL sampel produk PCR ditambahkan 1 µL *loading dye*, kemudian campuran dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa. DNA marker 100 bp sebanyak 5 µL dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa yang lain. Alat elektroforesis (Optima®: Mupid®-2 plus) dinyalakan dengan tegangan 100 volt selama 25 menit. Gel agarosa kemudian direndam dalam larutan *ethidium bromide* 1% selama 20 menit. Visualisasi fragmen DNA dilakukan di bawah sinar ultraviolet menggunakan *gel documentation* (BioRad).

2.5. Pemurnian produk PCR

Pemurnian produk PCR dilakukan dengan metode presipitasi etanol. Produk PCR dimurnikan kemudian diukur kuantitas dan kualitas DNA dengan menggunakan spektrofotometer Nanodrop.

2.6. Sequencing daerah ITS rDNA

PCR *cycle sequencing* dilakukan berdasarkan sesuai petunjuk pada kemasan *Big Dye Terminator v3.1 kit sequencing ready reaction kit* (Applied Biosystem). Total reaksi PCR *cycle sequencing* adalah 10 µL, terdiri dari 1 µL produk PCR (100 ng/ µL); 1 µL *Big Dye Terminator*; 0,5 µL primer (10 µM/µL); 7 µL *sequencing buffer*; dan 0,5 µL *nuclease free water*. Kondisi PCR *cycle sequencing* sebagai berikut: 96 °C selama 2 menit (1 siklus), 96 °C selama 10

detik, 50 °C selama 5 detik, 60 °C selama 4 menit (30 siklus). Produk PCR *cycle sequencing* dimurnikan dengan menggunakan *Pellet Paint® NF Co-Precipitant* (Novagen). Proses *sequencing* DNA dilakukan pada *Automated DNA sequencer* ABI 310 *Prism Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

2.7. Analisis filogenetik

Pencarian homologi *sequence* DNA hasil *sequencing* dilakukan dengan membandingkan *sequence* yang diperoleh dengan *sequence* yang tersimpan di DNA *database* (GenBank) menggunakan program *Basic Local Algorithm Search Tools* (BLAST) berdasarkan Altschul dkk.(1997). *Sequence* data daerah ITS rDNA diedit secara manual dan disusun menggunakan MEGA versi 4 berdasarkan Tamura dkk.(2007). Pohon filogenetik dibuat dengan menggunakan metode *Neighbor Joining* (NJ). *Distance matrix* dari data yang diurutkan (*aligned data*) dihitung dengan menggunakan model *Kimura two parameter* berdasarkan Saitou dan Nei (1987). *Reliability* setiap cabang pada pohon filogenetik diestimasi menggunakan analisis *bootstrap* dengan 1000 kali replikasi berdasarkan Felsenstein (1985).

2.8. Deskripsi karakter morfologi isolat-isolat khamir representatif

Deskripsi karakter morfologi isolat-isolat khamir representatif dilakukan berdasarkan Yarrow (1998). Satu ose khamir ditumbuhkan pada medium YMB, kemudian diinkubasikan pada suhu ruang selama tiga hari. Pembuatan preparat dilakukan menggunakan pipet pasteur steril di atas gelas objek dan ditutup dengan kaca penutup. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop trinokuler (Carl Zeiss). Pengukuran sel dilakukan sebanyak 20 pengulangan pada sel yang berbeda. Karakter yang diamati berupa bentuk sel, tipe pertunasan, ada tidaknya hifa, dan ada tidaknya spora seksual. Pengelompokan khamir berdasarkan monograf Boekhout dkk. (2011) dan Kurtzman (2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi khamir-khamir dari daun *B. papyrifera*

Sebanyak 2.543 isolat diperoleh dari empat lokasi (Tabel I.1) (Gambar I.1) yaitu dari Desa Dago Pojok, Bandung, Jawa Barat (756 isolat), Desa Sukadanu, Garut, Jawa Barat (182 isolat), Desa Tunggilis, Garut, Jawa Barat (578 isolat), dan Desa Bejijong, Trowulan, Mojokerto, Jawa Timur (1.027 isolat).

Tabel I.1. Isolat khamir yang diperoleh dari daun *B. papyrifera*.

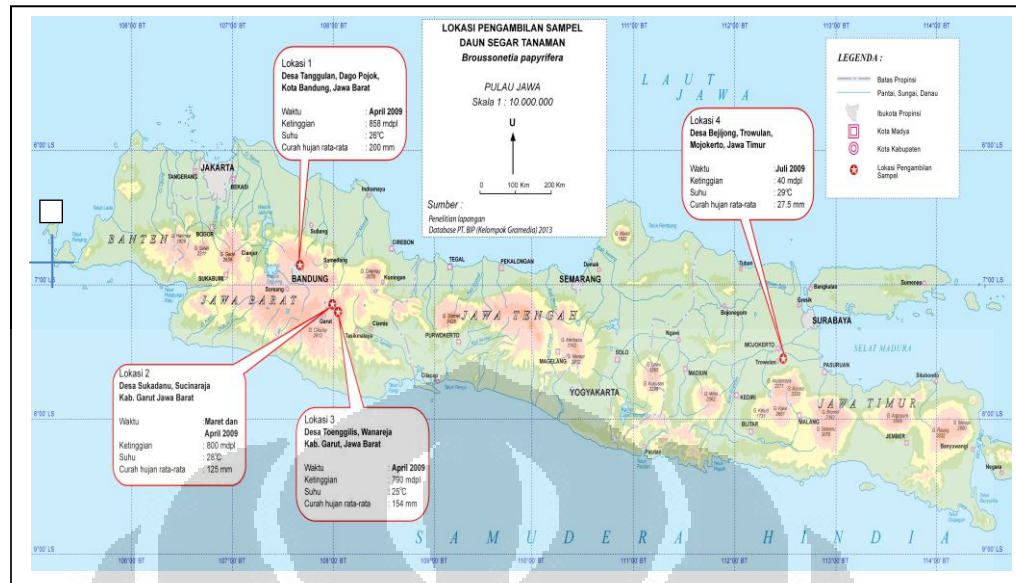
Lokasi, dan waktu pengambilan sampel	Kondisi lokasi pengambilan sampel	Suhu lokasi (°C)	Kelembaban (%)	Jumlah total isolat yang diperoleh	Jumlah isolat terpilih untuk identifikasi
Desa Dago Pojok, Bandung (Jawa Barat) 11.00 WIB, April 2009	Dataran rendah dan penduduk padat	26	54	756	20
Desa Sukadanu, Garut (Jawa Barat) 12.10 WIB, April 2009	Dataran tinggi dan penduduk jarang	28	53	182	22
Desa Tunggilis, Garut, (Jawa Barat) 11.38 WIB, April 2009	Dataran rendah dan penduduk padat	25	56	578	20
Desa Bejijong, Trowulan, Mojokerto (Jawa Timur) 17.28 WIB, July 2009	Dataran rendah dan penduduk padat	29	53	1.027	20
				2.543	82

Delapan puluh dua isolat khamir representatif dari daun *B. papyrifera* (Tabel I.2; Lampiran I.5) dipilih berdasarkan karakter warna dan tekstur koloni yang bervariasi. Warna, tekstur, dan presentase koloni khamir dari *B. papyrifera* yang ditumbuhkan pada medium YMA, selama 3 hari inkubasi pada suhu 27-28° C adalah sebagai berikut: putih *butyrous* (26,8%), putih *mucoïd* (13,4%), krem *butyrous* (9,8%), krem *mucoïd* (29,3%), merah *butyrous* (2,4%), merah *mucoïd* (12,2%), dan merah muda kehitaman *butyrous* (6,1%).

Hasil penelitian menunjukkan isolat-isolat khamir *phylloplane* dari *B. papyrifera* terdiri dari kelompok khamir yang tidak berpigmen (40,2%) dan kelompok khamir berpigmen (59,8%). Kelompok khamir tidak berpigmen terdiri

dari isolat-isolat yang memiliki warna koloni putih, sedangkan kelompok khamir berpigmen terdiri dari isolat-isolat yang memiliki warna koloni krem, merah muda, merah, dan merah muda kehitaman (59,8%) (Tabel I.2). Persentase khamir berpigmen lebih banyak dibandingkan yang tidak berpigmen. Banyaknya isolat-isolat khamir *phylloplane* dari *B. papyrifera* yang berpigmen diduga karena khamir *phylloplane* terpapar sinar matahari secara langsung. Hasil penelitian ini sesuai dengan laporan peneliti lain yang menyatakan bahwa khamir *phylloplane* banyak yang menghasilkan pigmen. Menurut Atlas & Bartha (1998) khamir yang hidup pada permukaan tumbuhan mengalami paparan sinar matahari langsung, kekeringan, dan suhu tinggi. Untuk dapat bertahan pada kondisi ekstrim tersebut, khamir *phylloplane* umumnya memiliki pigmen, dan menghasilkan lendir. Khamir menghasilkan lendir pada permukaan daun untuk membantu pelekatan sehingga tidak mudah terbawa angin dan hujan. Menurut (Herrera & Pozo, 2014), lendir pada khamir merupakan polisakarida ekstraselular yang merupakan salah satu mekanisme pertahanan diri sel khamir dari kondisi kekeringan.

Berdasarkan laporan beberapa peneliti (Azeredo dkk., 1998; Joshi dkk., 2003; Sampaio dkk., 2004; Fonseca & Inacio, 2006; dan Dufosse, 2006). Khamir-khamir *phylloplane* harus bertahan terhadap paparan sinar ultraviolet (UV) langsung pada daun. Pigmen mikroorganisme *phylloplane* diduga berhubungan dengan respons mikroorganisme tersebut terhadap radiasi sinar ultraviolet. Stout (1960) menyatakan bahwa khamir *phylloplane* menghasilkan pigmen dalam upaya adaptasi terhadap radiasi sinar ultraviolet. Lindow dan Brandl (2003) menyatakan bahwa pigmen pada bakteri epifit diduga berperan dalam mencegah pengaruh radiasi sinar ultraviolet. Fonseca dan Inacio (2006) melaporkan khamir *phylloplane* dari genera *Rhodotorula* dan *Sporobolomyces* spp. menghasilkan senyawa protektif berupa karotenoid. Moliné dkk. (2009) menyatakan bahwa karotenoid pada khamir berperan mencegah radiasi sinar ultraviolet-B.



Gambar I.1. Lokasi pengambilan sampel di Desa Dago Pojok, Bandung (Jawa Barat); Desa Sukadanu, Garut (Jawa Barat); Desa Tunggilis, Garut (Jawa Barat); Desa Beji Jong, Trowulan, Mojokerto (Jawa Timur), Indonesia (Peta dibuat oleh PT. Gramedia Group, 2013).

Tabel I.2. Morfologi isolat-isolat khamir pada medium YMA, inkubasi 3 hari pada suhu 27--28 °C.

Lokasi	Total jumlah isolat	Putih <i>butyrous</i>	Putih <i>muroid</i>	Krem <i>butyrous</i>	Krem <i>muroid</i>	Merah <i>butyrous</i>	Merah <i>muroid</i>	Merah muda kehitaman <i>butyrous</i>
		Jumlah Isolat	Jumlah Isolat	Jumlah Isolat	Jumlah Isolat	Jumlah Isolat	Jumlah Isolat	Jumlah Isolat
Desa Dago Pojok, Bandung, Jawa Barat	20	6	5	2	4	1	2	-
Desa Sukadanu, Garut, Jawa Barat	22	6	4	3	8	-	1	-
Desa Tunggilis, Garut, Jawa Barat	20	7	1	3	6	1	2	-
Desa Bejijong, Trowulan, Mojokerto, Jawa Timur	20	3	1	0	6	-	5	5
Total	82 (100%)	22 (26,8%)	11 (13,4%)	8 (9,8%)	24 (29,3%)	2 (2,4%)	10 (12,2%)	5 (6,1%)

B. Identifikasi dan analisis filogenetik khamir *phylloplane*

***B. papyrifera* dari empat lokasi sampling**

Identitas isolat-isolat khamir *phylloplane B. papyrifera* diperoleh berdasarkan nilai homologi sekuen pada daerah ITS dengan spesies terdekatnya menggunakan program BLAST di NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Katsu dkk. (2003) menyatakan panjang daerah ITS rDNA khamir bervariasi antar spesies dengan ukuran antara 300-900 nukleotida. Sugita dkk. (1999) melaporkan kesamaan *sequence* DNA pada daerah ITS sebesar lebih dari atau sama dengan 99% dianggap spesies yang sama dengan spesies terdekatnya. Data hasil identifikasi isolat-isolat khamir dari *B. papyrifera* dari empat lokasi sampling ditunjukkan pada Tabel I.3--I.6.

Delapan puluh dua isolat khamir representatif memiliki nilai homologi daerah ITS rDNA terhadap spesies terdekatnya sebesar 98-100%; 7 isolat 100%, 63 isolat 99%, dan 12 isolat 98%. Data *sequence* dari 12 isolat yang memiliki nilai homologi 98% perlu dilakukan pengecekan kembali ada tidaknya perbedaan nukleotida, dengan melakukan pengulangan *sequencing*.

Tabel I.3. Hasil identifikasi isolat-isolat khamir *phylloplane B. papyrifera* berdasarkan daerah ITS rDNA dari Desa Dago Pojok, Bandung, Jawa Barat.

Kode isolat	Kode UICC	Takson terdekat hasil BLAST di NCBI	Accession number	Similarity (%)	Max score	Total score	Query (%)	E-value	Identities	Gaps
BD2S1.MF1.3	Y-469	<i>Candida quercitrusa</i> JHSb	DQ665264	99	935	935	93	0,0	541/548(99%)	2/548(0%)
BD2S1.D.11	Y-470	<i>Candida quercitrusa</i> JHSb	DQ665264	99	970	970	95	0,0	534/538(99%)	1/538(0%)
BD1S1. WM 1.5	Y-456	<i>Debaryomyces nepalensis</i> R305	JQ665426	99	555	555	96	0,0	309/314(98%)	1/314(0%)
BD2S2.WM1.20	Y-465	<i>Hyphopichia burtonii</i> DQ9	KC621079	99	675	675	98	0,0	317/319(99%)	1/319(0%)
BD2S2.WM1.32	Y-468	<i>Hyphopichia burtonii</i> 798-05	AM420292	99	710	710	90	0,0	322/324(99%)	1/324(0%)
BD2S2 D.12	Y-471	<i>Kodamaea ohmeri</i> WM10.220	JN183449	100	680	680	97	0,0	326/326(100%)	0/326(0%)
BD2S1. WM.34	Y-472	<i>Kodamaea ohmeri</i> WM10.208	JN183448	99	680	680	97	0,0	377/381(99%)	1/381(0%)
BD2S2.D1.15	Y-462	<i>Saccharomycetales</i> sp. LM434	EF060740	98	246	246	67	7e-62	162/165(98%)	2/165(1%)
BD1S1. WM 1.7	Y-453	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	JF781480	99	292	292	63	4e-75	190/191(99%)	1/191(0%)
BD1S1. DM 5	Y-455	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> 32	HF952837	99	762	762	100	0,0	254/255(99%)	0/255(0%)
BD2S2 WM1.3	Y-460	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> SX1	JN839959	97	466	466	81	6e-128	376/381(99%)	1/380(0%)
BD2S2 WM 1.6	Y-461	<i>Cryptococcus luteolus</i> (55)4	AM176652	99	845	845	100	0,0	530/531(99%)	1/531(0%)
BD1S2. WM 1.2	Y-458	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i> 15L	AM262325	99	564	564	98	0,0	305/309(99%)	2/309(0%)
BD2.D2.W.25	Y-467	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i> 15L	AM262325	99	841	841	92	0,0	459/461(99%)	0/461(0%)
BD2D1.1 W1.20	Y-463	<i>Hannaella zeae</i> CMT28	JQ754020	99	686	686	98	0,0	396/398(99%)	0/398(0%)
BD2D1.1.W2.15	Y-464	<i>Hannaella zeae</i> CMT29	JQ754020	99	780	780	97	0,0	426/428(99%)	0/428(0%)
BD1S2. WM 2.1	Y-459	<i>Pseudozyma aphidis</i> 302	JQ743064	99	771	771	98	0,0	406/409(99%)	3/409(0%)
BD1S1. WM 1.8	Y-457	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	NR_073270	99	302	302	99	0,0	214/215(99%)	0/215(0%)
BD1S1. DM 1	Y-454	<i>Rhodotorula glutinis</i> IWBT-Y824	JQ993380	98	302	302	97	1e-78	191/194(98%)	3/194(1%)
BD2S2WM2.4	Y-466	<i>Rhodotorula mucilaginos</i>	AF321544	99	852	852	97	0,0	472/477(99%)	1/477(0%)

Tabel I.4. Hasil identifikasi isolat-isolat khamir *phylloplane B. papyrifera* berdasarkan daerah ITS rDNA dari Desa Sukadanu, Garut, Jawa Barat.

Kode isolat	Kode UICC	Takson terdekat hasil BLAST di NCBI	Accession number	Similarity (%)	Max score	Total score	Query (%)	E-value	Identities	Gaps
SUK2S2. WM 1.1	Y-473	<i>Candida metapsilosis</i> LEMI8448	JQ585714	99	579	579	98	0,0	329/330(99%)	1/330(0%)
SUK2S1. WM 1.1	Y-474	<i>Candida metapsilosis</i> LEMI8449	JQ585714	99	761	761	98	0,0	448/449(99%)	1/449(0%)
SUK2S1. WM 1	Y-475	<i>Candida pseudojiufengensis</i> ATCC MYA-4595	GU291263	99	855	855	98	0,0	430/434(99%)	1/434(0%)
SUK1 D1.2.W1.8	Y-487	<i>Candida saopaulonensis</i> SJ18	FJ515172	100	866	866	100	0,0	298/298(100%)	0/298(0%)
SUK1.D1.WM.8	Y-492	<i>Candida saopaulonensis</i> SJ18	FJ515172	99	765	765	98	0,0	297/298(99%)	0/298(0%)
SUK2D1.2.W1.81	Y-494	<i>Candida saopaulonensis</i> SJ18	FJ515172	99	831	831	98	0,0	289/293(99%)	0/293(0%)
SUK1D1.2.W1.16	Y-488	<i>Debaryomyces hansenii</i>	AB305097	99	685	685	97	0,0	343/348(99%)	3/348(0%)
SUK 2D2.2 W1.14	Y-480	<i>Hanseniaspora thailandica</i> BCC 14944	AB501150	99	675	675	98	0,0	186/188(99%)	0/188(0%)
SUK1.D2.2.W1.2	Y-481	<i>Hanseniaspora thailandica</i> BCC 14944	AB501150	99	775	775	98	0,0	293/295(99%)	0/295(0%)
SUK1 D2.2.W1.8	Y-484	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	KC349934	100	823	823	100	0,0	294/297(99%)	3/297(1%)
SUK1 D1.2.W1.4	Y-485	<i>Hanseniaspora uvarum</i> NT0103	AB469379	100	679	679	100	0,0	271/271(100%)	0/271(0%)
SUK2S2.DM2	Y-490	<i>Pichia veronae</i> CECT 11800	DQ414543	99	769	769	98	0,0	436/441(99%)	2/441(0%)
SUK 2D2.1. W1.1	Y-479	<i>Cryptococcus</i> sp. LCF-06 strain GG2M05	HQ623595	100	531	531	96	0,0	392/392(100%)	0/392(0%)
SUK 2D2.2 W1.13	Y-477	<i>Cryptococcus luteolus</i> IHEM 4406	FJ591129	99	488	488	99	0,0	389/391(99%)	0/391(0%)
SUK.1.D1.2.W1.20	Y-493	<i>Cryptococcus luteolus</i> clone (15)10	AM176654	99	678	678	98	0,0	401/404(99%)	0/404(0%)
SUK1D2.1.W1.5	Y-486	<i>Cryptococcus luteolus</i> clone (24)26	AM176656	99	678	678	98	0,0	400/402(99%)	0/402(0%)
SUK1D1.2.W1.12	Y-482	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i> LCF-20 strain GJ8L06	HQ623596	99	598	598	98	0,0	421/427(99%)	3/427(0%)
SUK1S2.DM1	Y-489	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i> LH41	HQ832836	99	695	695	98	0,0	434/440(99%)	1/440(0%)
SUK1S2. DM.5	Y-491	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i> 15L	AM262325	98	604	604	90	2e-69	419/424(99%)	3/424(0%)

SUK2D2.2 W1. 15	Y-478	<i>Hannaella zeae</i> CMT28	JQ754020	99	713	713	100	0,0	393/396(99%)	1/396(0%)
SUK2S2. WM 2.4	Y-476	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	AF321544	99	702	702	100	0,0	472/477(99%)	1/477(0%)
SUK1D2.2.W1.7	Y-483	<i>Trichosporon asahii</i> KTSMBNL-12	KC127676	100	695	695	98	0,0	464/464(100%)	0/464(0%)

Tabel I.5. Hasil identifikasi isolat-isolat khamir *phylloplane B. papyrifera* berdasarkan daerah ITS rDNA dari Desa Tunggilis, Garut, Jawa Barat.

Kode isolat	Kode UICC	Takson terdekat hasil BLAST di NCBI	Accession number	Similarity (%)	Max score	Total score	Query (%)	E-value	Identities	Gaps
T.D1.2.W1.16	Y-514	<i>Debaryomyces hansenii</i> JEY420	KC111444	99	855	855	95	0,0	500/505(99%)	0/505(0%)
T1S2. MF 4	Y-503	<i>Debaryomyces nepalensis</i> R305	JQ665426	99	786	786	98	0,0	326/327(99%)	0/327(0%)
T2S2. MF 3	Y-495	<i>Geotrichum candidum</i> ITEM10461	FN376417	99	553	553	98	0,0	302/306(99%)	0/306(0%)
T2S2.WM 1.4	Y-496	<i>Hypopichia burtonii</i> 798-05	AM420292	99	492	492	98	0,0	296/299(99%)	0/299(0%)
T2S1. MF 8	Y-497	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> 40	KC568565	99	931	931	98	0,0	508/514(99%)	1/514(0%)
T.D1.2.W1	Y-509	<i>Bullera sinensis</i> JCM 6253	AF314989	99	739	739	97	0,0	404/406(99%)	0/406(0%)
T2S2. WM 2.9	Y-498	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i> 15L	AM262325	99	887	887	92	0,0	475/481(99%)	2/481(0%)
T.D2.1.W1	Y-502	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i> 15L	AM262325	98	883	883	98	0,0	488/496(98%)	4/496(0%)
T1S1. WM 1.3	Y-504	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i> 15L	AM262325	99	931	931	98	0,0	309/313(99%)	1/313(0%)
T.D2.1.W1.1	Y-508	<i>Hannaella kunmingensis</i> BI203	JN181160	99	680	680	99	0,0	398/405(98%)	3/405(0%)
T.D1.2.W1.2	Y-510	<i>Hannaella zeae</i> CMT28	JQ754020	99	685	685	98	0,0	428/430(99%)	0/430(0%)
T.D.1 W1.4	Y-511	<i>Hannaella zeae</i> CMT28	JQ754020	99	785	785	92	0,0	406/407(99%)	0/407(0%)
T.D1.2.W1.12	Y-512	<i>Pseudozyma aphidis</i> LH59	HQ832804	99	608	608	98	0,0	363/366(99%)	3/366(0%)
T2S2 WM 2.3	Y-501	<i>Pseudozyma aphidis</i> 302	JQ743064	99	608	608	97	0,0	423/424(99%)	1/424(0%)
T1S2. MF 2.3	Y-500	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	NR_073270	99	767	767	90	0,0	338/343(99%)	3/343(0%)
T2S1. MF 6	Y-499	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> B-WHX-12-01	KC544481	99	479	479	85	1e-131	320/323(99%)	1/323(0%)

T.D1.2.W1.11	Y-513	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	AF321544	99	767	767	95	0,0	534/536(99%)	0/536(0%)
T1S1. MF 2	Y-505	<i>Trichosporon asahii</i> KDLYL4-1	JX174411	99	694	694	90	0,0	300/304(99%)	4/304(1%)
T1S2. MF	Y-506	<i>Trichosporon asahii</i> KDLYL4-1	JX174411	98	562	562	96	9e-154	303/306(99%)	3/306(0%)
T1S2. MF 2	Y-507	<i>Trichosporon asahii</i> KDLYL4-1	JX174411	99	695	696	92	0,0	300/304(99%)	4/304(1%)

Tabel I.6. Hasil identifikasi isolat-isolat khamir *phylloplane B. papyrifera* berdasarkan daerah ITS rDNA dari Desa Bejijong Trowulan, Mojokerto, Jawa Timur.

Kode isolat	Kode UICC	Takson terdekat hasil BLAST di NCBI	Accession number	Similarity (%)	Max score	Total score	Query (%)	E-value	Identities	Gaps
TR1S1 WM 2.6	Y-516	<i>Aureobasidium</i> sp. Cs/3/6	JN585936	98	819	819	97	0,0	460/469(98%)	3/469(0%)
TR1S2 MF3.5	Y-519	<i>Aureobasidium pullulans</i> UTHSC 09-1190	GU475133	100	859	859	99	0,0	511/511(100%)	0/511(0%)
TR2S2 WM2.10	Y-527	<i>Aureobasidium pullulans</i> 4MA3	HM855960	99	758	758	89	0,0	480/485(99%)	3/485(0%)
TR2S2 WM 2.9	Y-528	<i>Aureobasidium pullulans</i> P-22	JQ235065	99	902	902	99	0,0	499/505(99%)	2/505(0%)
TR1.D1.D.30	Y-533	<i>Candida orthopsilosis</i> B-WHX-12-21	KC544482	99	688	688	98	0,0	412/413(99%)	0/413(0%)
TR1S2 WM 1.3	Y-517	<i>Meyerozyma caribbica</i> WM10.15	JN183445	99	950	950	95	0,0	523/528(99%)	3/528(0%)
TR1S2 WM 1.5	Y-518	<i>Meyerozyma caribbica</i> F4	JX910353	99	950	950	94	0,0	523/525(99%)	1/525(0%)
TR2S1 WM 1.5	Y-529	<i>Meyerozyma caribbica</i> F4	JX910353	99	860	860	96	0,0	524/525(99%)	0/525(0%)
TR2S2. WM1.1	Y-523	<i>Cryptococcus flavescens</i> IMUFRJ 51986	FN428902	99	680	680	99	0,0	449/451(99%)	1/451(0%)
TR2S1.WM1.11	Y-524	<i>Cryptococcus flavescens</i> IMUFRJ 51986	FN428902	98	599	599	85	1e-167	433/443(98%)	5/443(1%)
TR2S2. WM 1	Y-525	<i>Cryptococcus flavescens</i> IMUFRJ 52043	FN428920	98	353	353	71	8e-94	334/335(99%)	1/335(0%)
TR2S1. WM 1.3	Y-526	<i>Cryptococcus flavescens</i>	KC294323	98	195	195	61	3e-46	186/190(98%)	0/190(0%)
TR1S1 WM 2.3	Y-515	<i>Cryptococcus flavescens</i> IMUFRJ 51986	FN428902	98	453	453	84	2e-85	438/441(99%)	1/441(0%)

TR2.D1.W1.11	Y-534	<i>Cryptococcus flavus</i> WH	EU177576	99	769	769	95	0,0	450/452(99%)	0/452(0%)
TR2S1. WM 1.51	Y-530	<i>Pseudozyma thailandica</i> M9933	AB089354	98	730	730	98	0,0	430/438(98%)	3/438(0%)
TR1S2 MF6.9	Y-520	<i>Rhodotorula glutinis</i> AUMC 7774	JQ425397	99	767	767	90	0,0	436/440(99%)	1/440(0%)
TR2S1.DW 1.1	Y-531	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> IMUFRJ 52029	FN428899	99	759	759	98	0,0	472/476(99%)	0/476(0%)
TR2S1.DW 1.2	Y-532	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> IMUFRJ 52028	FN428885	99	758	758	95	0,0	469/473(99%)	1/473(0%)
TR1S2 DW 1.3	Y-521	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> IMUFRJ 52028	FN428885	99	789	789	96	0,0	469/473(99%)	1/473(0%)
TR1S1 WM 2.1	Y-522	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> L3	FN428886	98	758	758	83	0,0	469/473(99%)	1/473(0%)

Hasil identifikasi menunjukkan bahwa 82 isolat khamir representatif *phylloplane B. papyrifera* yang berasal dari empat lokasi sampling terdiri atas 36 isolat (44%) termasuk kedalam phylum *Ascomycota* dan sebanyak 46 isolat (56%) termasuk ke dalam phylum *Basidiomycota* (Tabel I.1--I.6). Berdasarkan taksonominya, khamir dari *B. papyrifera* terdiri 17 genera dan 32 spesies, yang terdiri dari classes *Pezizomycotina* dan *Saccharomycotina* (*Ascomycota*), dan classes *Agaricomycotina*, *Pucciniomycotina*, dan *Ustilaginomycotina* (*Basidiomycota*) (Gambar I.2-- I.5).

Khamir *phylloplane B. papyrifera* terdiri atas *Aureobasidium* (4 isolat), *Bullera* (1 isolat), *Candida* (9 isolat), *Cryptococcus* (22 isolat), *Debaryomyces* (4 isolat), *Geotrichum* (1 isolat), *Hanseniaspora* (4 isolat), *Hyphopichia* (3 isolat), *Hannaella* (3 isolat), *Kodamaea* (1 isolat), *Meyerozyma* (3 isolat), *Pichia* (1 isolat), *Pseudozyma* (4 isolat), *Rhodotorula* (12 isolat), *Saccharomycetales* (1 isolat), *Trichosporon* (4 isolat), dan *Wickerhamomyces* (4 isolat). *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, dan *Candida* adalah tiga genera dengan jumlah isolat terbanyak, yaitu berturut-turut sebanyak 22, 12, dan 9 isolat.

Banyaknya jenis khamir *phylloplane B. papyrifera* menunjukkan bahwa daun *B. papyrifera* menyediakan nutrisi yang cukup bagi berbagai jenis khamir. Menurut Kuang dkk. (2012), daun *B. papyrifera* memiliki kandungan nutrisi antara lain karbohidrat, asam amino, dan beberapa senyawa *phytohormones*. Menurut Redford dkk. (2010) karakter dari spesies tumbuhan memiliki pengaruh pada struktur komunitas *phyllosphere*.

Belanger & Avis (2002) dan Inacio dkk. (2002), menyatakan bahwa fungi nonpatogen yang hidup pada *phyllosphere* tergantung pada nutrisi yang dikeluarkan dalam bentuk eksudat dari daun atau materi yang berasal dari atmosfer. Breeze & Dix (1981), Sundin (2002), dan Zak (2002), melaporkan bahwa selain ketersediaan nutrisi, pertumbuhan dan kelimpahan fungi *phylloplane* juga dipengaruhi oleh kondisi lingkungan seperti ketersediaan air, radiasi UV, dan suhu.

Khamir yang mampu bertahan hidup pada *phylloplane* harus memiliki enzim-enzim yang diperlukan untuk mencerna metabolit sekunder yang terdapat pada habitatnya. Inacio dkk. (2003) melaporkan khamir genus *Cryptococcus*

memiliki kemampuan menghasilkan enzim ekstraselular (protease, lipase, pectinase, selulase, dan xylanase), serta beberapa anggota *Ustilaginomycetes* menghasilkan protease dan lipase. Redford dkk. (2010) menyatakan bahwa *phylloplane* merupakan habitat khamir berpigmen seperti *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, dan *Sporobolomyces*. Menurut Lindow & Brandl (2003), mikroorganisme yang berpigmen memiliki toleransi paling tinggi terhadap paparan radiasi sinar UV. Menurut Jadhav & Gawal (2013) *Aureobasidium pullulans* (De Bary) merupakan *yeast-like fungi* yang bersifat kosmopolit, dapat ditemukan pada berbagai jenis habitat. Fungi tersebut dapat menghasilkan pigmen melanin, oleh karena itu disebut sebagai khamir hitam (*black yeast*).

Beberapa khamir yang ditemukan pada penelitian ini pernah juga ditemukan peneliti lain pada daun tumbuhan di daerah hujan tropis, khususnya di Indonesia. Sjamsuridzal (2004) melaporkan bahwa *Candida*, *Rhodotorula*, dan *Pseudozyma* diisolasi dari daun tumbuhan di hutan mangrove, Muara Angke. Wayanti (2005) melaporkan khamir yang berhasil diidentifikasi dari tumbuhan asal pulau Natuna yaitu *Candida*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Klyuveromyces*, *Pseudozyma*, dan *Rhodotorula*. Kanti dkk. (2013) melaporkan khamir dari *phylloplane* tumbuhan sirih *Piper nigrum* dan *P. betle* dari Bali, adalah *Aureobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Wickerhamomyces*, *Rhodotorula*, dan *Pseudozyma*.

Inacio dkk. (2009) menemukan *Aureobasidium* sp. (asal daun tanaman *Caparica* di Portugal), *Cryptococcus*, dan *Rhodotorula* asal *phylloplane* *Cistus albidus* di Portugal. McCormack dkk. (1993) dan McCormack (1994) menemukan *Aureobasidium*, *Citeromyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, dan *Sporobolomyces* dari *phylloplane* *Triticum aestivum* dan *Malus domestica*. Takashima dkk. (2012) memperoleh *Cryptococcus* dan *Sporobolomyces* dari tumbuhan baik di wilayah *subtropical* maupun di wilayah *cool temperate*. Azeredo dkk. (1998) memperoleh khamir *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, dan *Rhodotorula* dari daun tebu di Rio de Janeiro, Brazil. Stohr dkk. (2008) melaporkan khamir *Cryptococcus* dan *Sporobolomyces* dari *phylloplane* *Festuca arundinacea*. Sjamsuridzal (2007) menemukan khamir *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Pseudozyma*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Trichosporon*, dan

Ustilago dari *phylloplane* di kawasan Taman Nasional Gunung Halimun, Jawa Barat.

Pada penelitian ini diperoleh 17 genera 32 spesies khamir *phylloplane* *B. papyrifera* yang berasal dari kelompok taksonomi yang heterogen, yaitu terdiri atas 11 genera 18 spesies dari *Ascomycota* dan enam genera 14 spesies dari *Basidiomycota*. Sebanyak 18 spesies khamir berasal dari *Ascomycota*: terdiri atas *Saccharomycetes* (*C. metapsilosis*, *C. pseudijiufengensis*, *C. quercitrusa*, *C. saopaulonensis*, *C. orthopsilosis*, *Deb. hansenii*, *Deb. nepalensis*, *Geo. candidum*, *H'spora. thailandica*, *H'spora. uvarum*, *Hyp. burtonii*, *Kodamaea ohmeri*, *Meyerozyma carribica*, *Pichia veronae*, *Saccharomycetales* sp., dan *Wic. anomalus*); dan *Dothidiomycetes* (*Aureobasidium* sp. dan *Aur. pullulans*). Khamir *Basidiomycota* terdiri atas *Tremellomycetes* (*Bullera sinensis*, *Cr. flavus*, *Cr. rajasthanensis*, *Cr. luteolus*, *Cryptococcus* sp., *Cr. flavescens*, *Han. zae*, *Han. kunmingensis*, dan *Trichosporon asahii*); *Microbotryomycetes* (*Rh. glutinis*, *Rh. dairenensis*, *Rh. mucilaginoso*); dan *Ustilaginomycetes* (*Pseu. thailandica* dan *Pseu. aphidis*).

Limtong dkk. (2014) melaporkan keragaman spesies khamir *phylloplane* tebu (*sugarcane*) di Thailand tinggi. Khamir-khamir tersebut termasuk dalam 13 genera 24 spesies (*Ascomycota*) terdiri atas *C. akabanensis*, *C. dendronema*, *C. mesorugosa*, *C. michaelii*, *C. nivariensis*, *C. rugosa*, *C. orthopsilosis*, *C. quercitrusa*, *C. tropicalis*, *C. xylopsoci*, *Cyberlindnera fabianii*, *Cyb. rhodanensis*, *Deb. nepalensis*, *Hannaella* aff. *coprosmaensis*, *H'spora. guilliermondii*, *Kluveromyces marxianus*, *Lachancea thermotolerans*, *Lodderomyces elongisporus*, *Metchnikowia koreensis*, *M. carribica*, *Millerozyma koratensis*, *P. kudriavzevii*, *Torulospora delbrueckii*, dan *Wic. edaphicus*. Sedangkan khamir *Basidiomycota* yang ditemukan dari *phylloplane* tebu terdiri atas enam genera 12 spesies, yaitu *Cr. flavescens*, *Cr. laurentii*, *Cr. rajasthanensis*, *Kwoniella heveanensis*, *Rh. mucilaginoso*, *Rh. sesimbrana*, *Rh. taiwanensis*, *Rhodospiridium fluviale*, *Rho. paludigenum*, *Sporidiobolus ruineniae*, *Spo. carnicolor* dan *Spo. nylandii*. Veenendaal dkk. (1995) mengisolasi sebanyak 62 isolat khamir dari *phylloplane* *Milica excelsa* yang terdiri atas *Cr. laurentii* (87%), *C. humicola*

(5%), *C. curvata* (3%), *C. membranafaciens* (1,5%), *Rho. minuta* (1,5%), dan *Rh. rubra* (1,5%).

Berdasarkan distribusi keberadaan spesies khamir asal *B. papyrifera* menunjukkan terdapat beberapa spesies yang sama pada lokasi sampling yang berbeda (Gambar I.2--I.5). Khamir *Rh. mucilaginosa* ditemukan pada seluruh lokasi sampling. Beberapa spesies khamir yang sama ditemukan pada tiga lokasi di Jawa Barat yaitu dari Desa Dago Pojok, Bandung, dan Desa Tunggilis, Garut. Spesies yang sama pada ketiga lokasi tersebut yaitu *Deb. nepalensis*, *Hyp. burtonii*, *Wic. anomalus*, *Cr. rajasthanensis*, *Han. zaeae*, *Rh. mucilaginosa*, dan *Pseu. aphidis* (Gambar I.2--I.5).

Hubungan kekerabatan antara spesies khamir dari *B. papyrifera* dengan spesies-spesies terdekatnya dapat dilihat pada pohon filogenetik pada Gambar I.2 - I.5. Berdasarkan hasil analisis filogenetik data *sequence* daerah ITS rDNA, khamir *phylloplane B. papyrifera* secara taksonomi terdiri atas *Ascomycota* dan *Basidiomycota* terdistribusi ke dalam lima *subphylum* (*Agaricomycotina*, *Saccharomycotina*, *Pezizomycotina*, *Pucciniomycotina*, dan *Ustilaginomycotina*) dan lima *classes* (*Dothideomycetes*, *Saccharomycetes*, *Microbotryomycetes*, *Tremellomycetes*, dan *Ustilaginomycetes*).

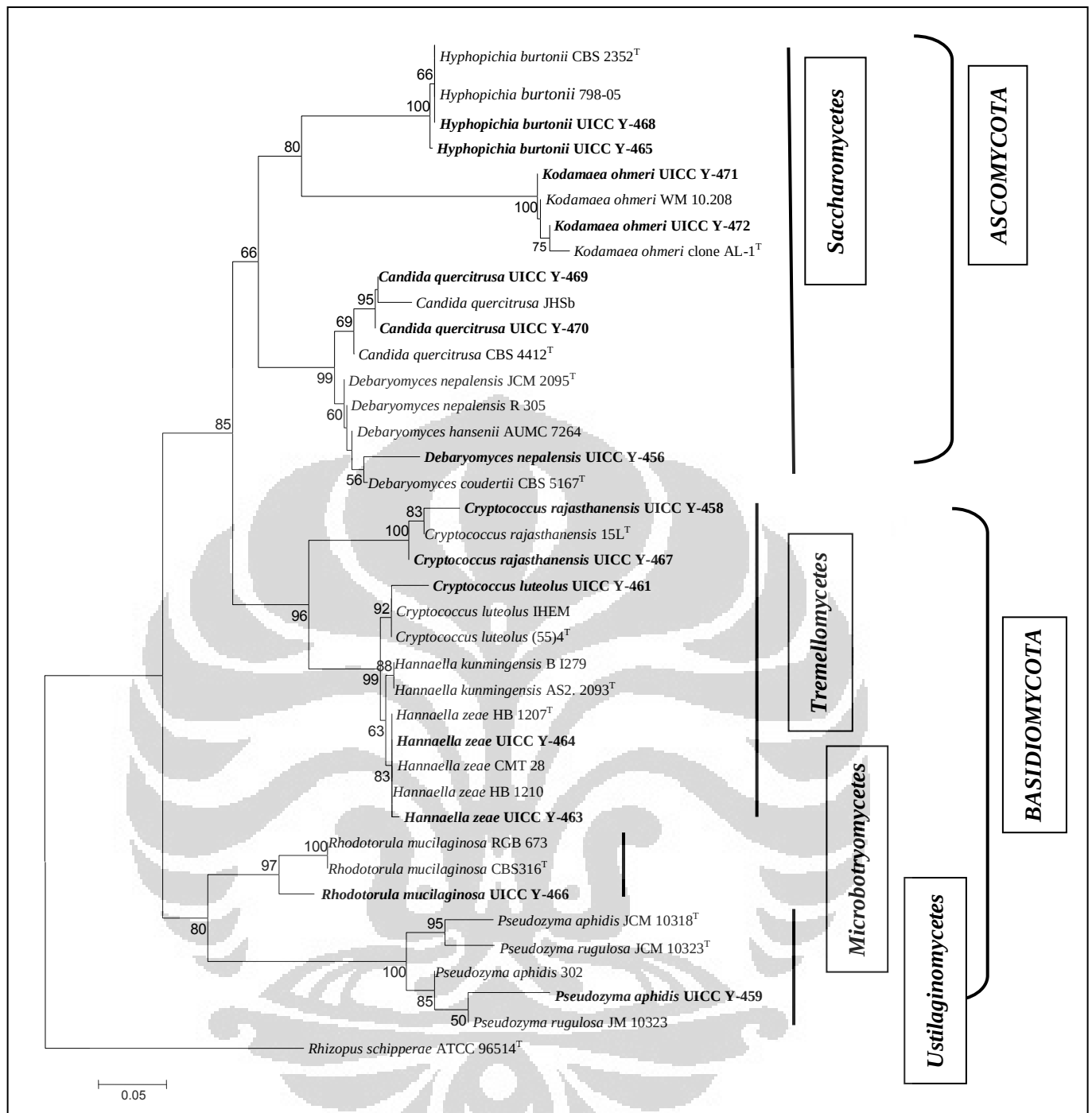
Kedudukan taksonomi isolat khamir dari *B. papyrifera* sebagai berikut: sepuluh genera berasal dari *Saccharomycetes* yaitu *Candida* (5 spesies, 9 isolat), *Debaryomyces* (2 spesies, 4 isolat), *Geotrichum* (1 spesies, 1 isolat), *Hanseniaspora* (2 spesies, 4 isolat), *Kodamaea* (1 spesies, 2 isolat), *Meyerozyma* (1 spesies, 3 isolat), *Pichia* (1 spesies, 1 isolat), *Hyphopichia* (1 spesies, 3 isolat), *Saccharomycetales* (1 spesies, 1 isolat), dan *Wickerhamomyces* (1 spesies, 4 isolat); satu genus berasal dari *Dothideomycetes* yaitu *Aureobasidium* (2 spesies, 4 isolat); empat genera berasal dari *class Tremellomycetes* yaitu *Bullera* (1 spesies, 1 isolat), *Cryptococcus* (5 spesies, 22 isolat), *Hannaella* (2 spesies, 3 isolat), *Trichosporon* (1 spesies, 4 isolat); satu genus *Rhodotorula* (3 spesies, 12 isolat) termasuk dalam *Microbotryomycetes*; dan satu genus *Pseudozyma* (2 spesies, 4 isolat) termasuk dalam *Ustilaginomycetes*.

Pohon filogenetik pada Gambar I.2--I.5 menunjukkan bahwa khamir-khamir dari *Saccharomycetes* dan *Tremellomycetes* selalu ditemukan dari *B.*

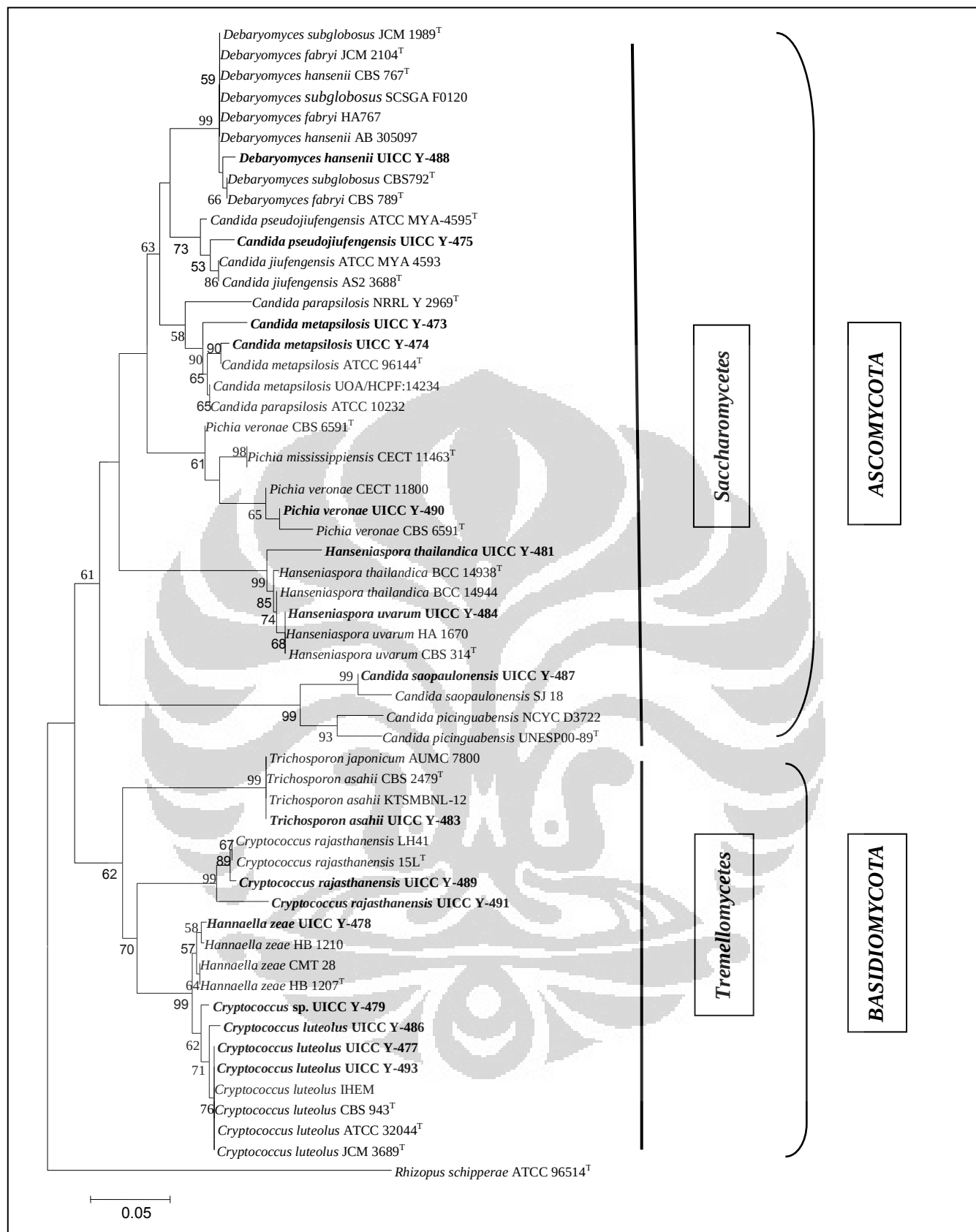
papyrifera di seluruh lokasi sampling. Khamir *Microbotryomycetes* dan *Ustilaginomycetes* ditemukan di Desa Dago Pojok, Bandung (Jawa Barat); Desa Tunggilis, Garut (Jawa Barat); Desa Bejijong, Trowulan, Mojokerto (Jawa Timur) (Gambar I.2, I.4, dan I.5). Khamir *Dothideomycetes* ditemukan di Desa Bejijong, Trowulan, Mojokerto (Jawa Timur) (Gambar I.5).

Spesies khamir yang ditemukan dari *phylloplane B. papyrifera* di Jawa Barat (Desa Dago Pojok, Bandung, Desa Tunggilis, Garut, dan Desa Sukadanu, Garut) antara lain *Cr. rajasthanensis*, *Rh. mucilaginoso*, dan *Han. zae*. Sedangkan spesies khamir yang hanya ditemukan di Desa Trowulan, Mojokerto adalah *Aur. pullulans*, *Cr. flavescens*, *Cr. flavus*, *Meyerozyma caribbica*, *Pseu. thailandica*, dan *Rh. taiwanensis*.

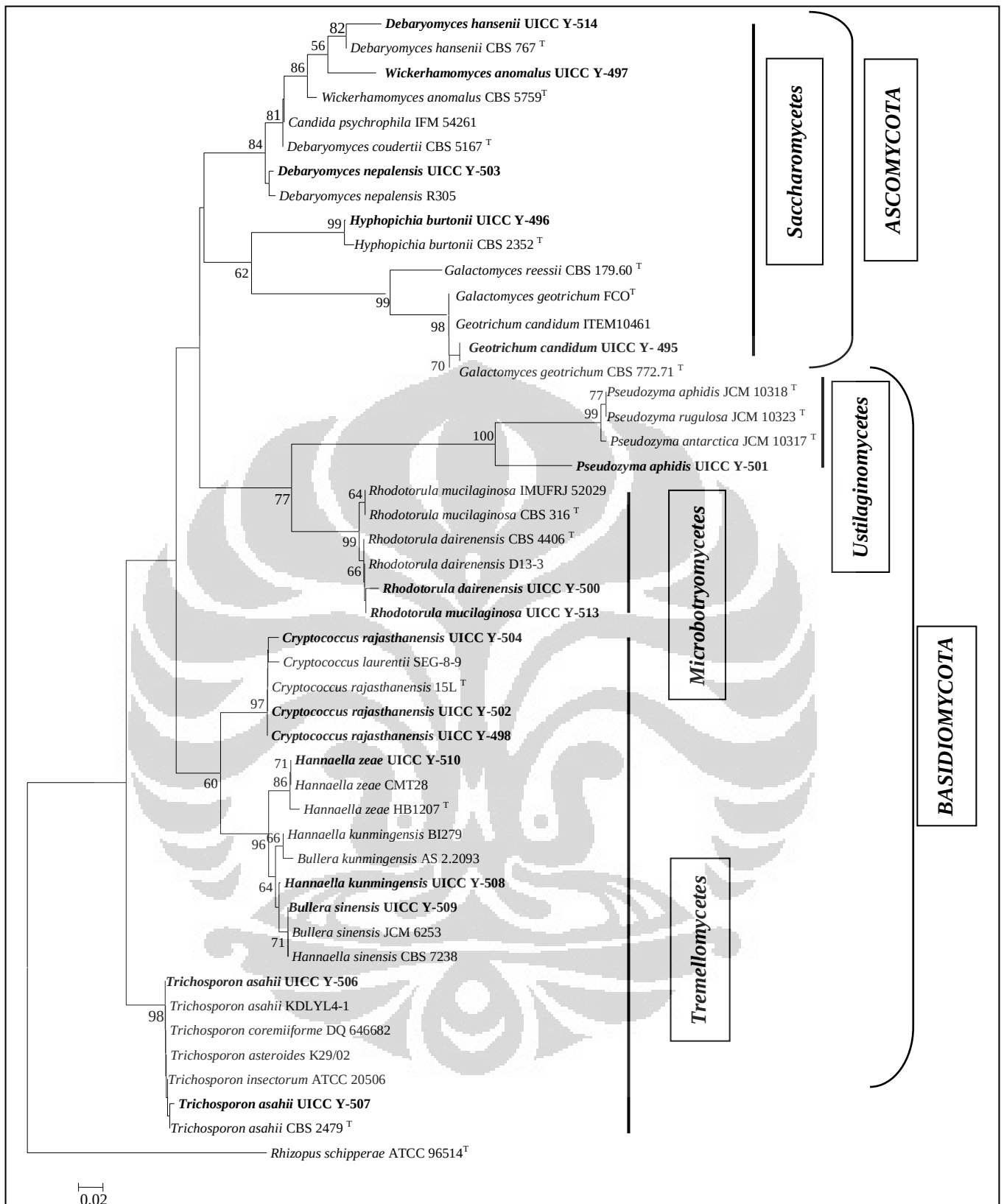
Pada penelitian ini belum diketahui pasti faktor yang menyebabkan perbedaan spesies khamir *phylloplane B. papyrifera* pada lokasi yang berbeda. Untuk memperjelas hal tersebut, perlu dilakukan penelitian lanjut mengenai faktor spesifik pada struktur daun, kimia, dan fisik yang kemungkinan menyebabkan perbedaan dalam komunitas khamir *phylloplane B. papyrifera*. Menurut Redford dkk. (2010) perbedaan interspesies komunitas *phyllosphere* kemungkinan disebabkan oleh perbedaan pada karakter daun spesifik misalnya struktur kutikula halus, usia daun, komposisi kimia dan atau senyawa organik volatil yang dihasilkan daun.



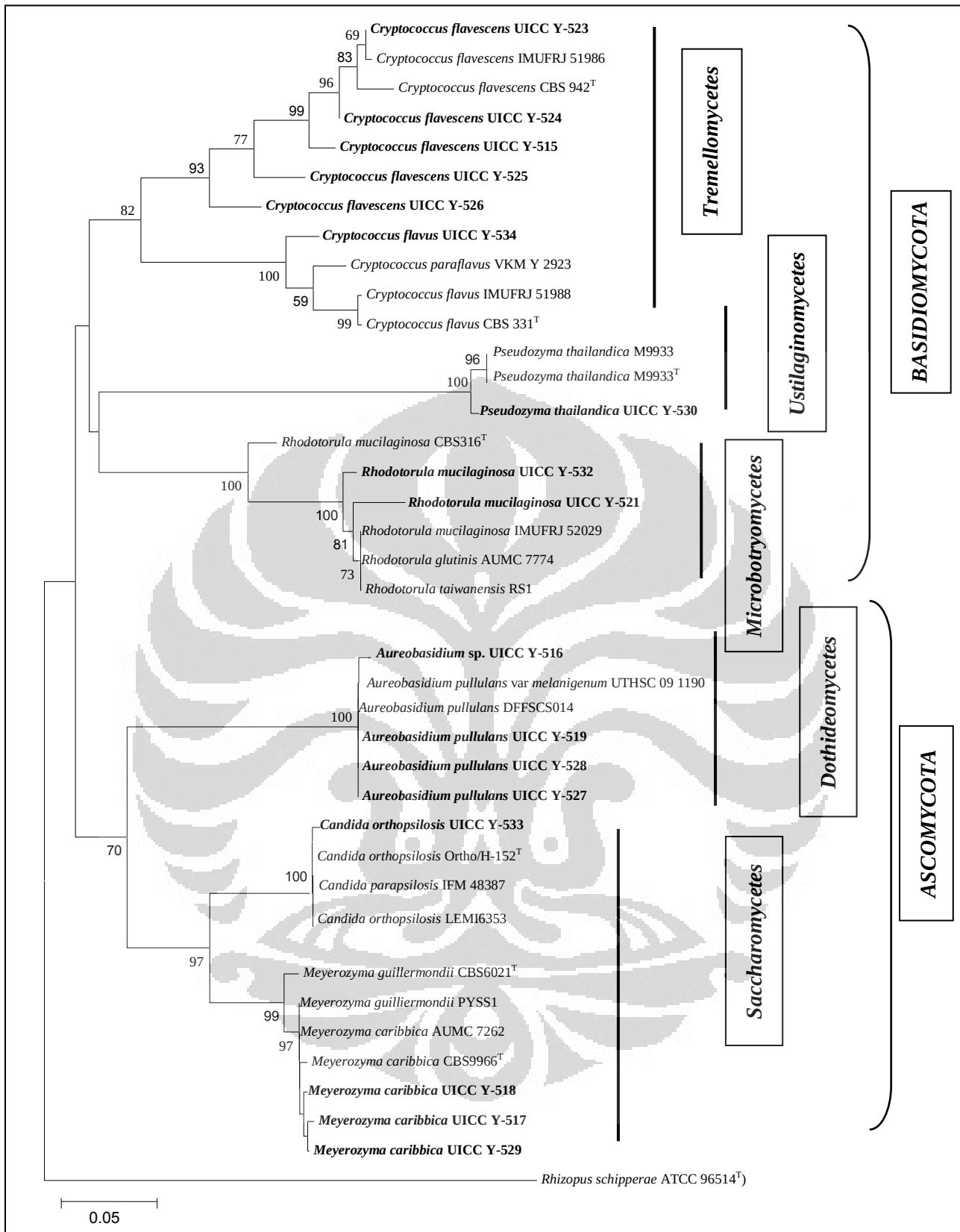
Gambar I.2. Pohon filogenetik isolat khamir dari *B. papyrifera* asal Desa Dago Pojok, Bandung, Jawa Barat berdasarkan data *sequence* daerah ITS rDNA dengan metode NJ, hanya nilai *bootstrap* > 50% yang ditampilkan. *Rhizopus schipperae* ATCC 96514^T sebagai *outgroup*.



Gambar I.3. Pohon filogenetik isolat khamir dari *B. papyrifera* asal Desa Sukadanu, Garut, Jawa Barat berdasarkan data *sequence* daerah ITS rDNA dengan metode NJ, hanya nilai *bootstrap* > 50% yang ditampilkan. *Rhizopus schipperae* ATCC 96514^T sebagai *outgrup*.



Gambar I.4. Pohon filogenetik isolat khamir dari *B. papyrifera* asal Desa Tunggilis, Garut, Jawa Barat berdasarkan data *sequence* daerah ITS rDNA dengan metode NJ, hanya nilai *bootstrap* > 50% yang ditampilkan. *Rhizopus schipperae* ATCC 96514^T sebagai *outgroup*.



Gambar I.5. Pohon filogenetik isolat asal *B. papyrifera* dari Desa Trowulan, Mojokerto, Jawa Timur berdasarkan data *sequence* daerah ITS rDNA dengan metode NJ, hanya nilai *bootstrap* > 50% yang ditampilkan. *Rhizopus schipperae* ATCC 96514^T sebagai outgrup.

C. Khamir *phylloplane B. papyrifera* pada usia tumbuhan yang berbeda

Isolasi khamir dari *B. papyrifera* usia 6 bulan dan 1,5 tahun berasal dari empat lokasi pengambilan sampel yaitu Desa Dago Pojok, Bandung, (Jawa Barat), Desa Sukadanu, Garut, (Jawa Barat), Desa Toenggilis, Garut, (Jawa Barat), dan Desa Bejijong, Trowulan, Mojokerto, (Jawa Timur) telah dilakukan (Tabel I.7).

Gambar I.7--I.8 memperlihatkan bentuk daun pada tumbuhan berusia 6 bulan dan 1,5 tahun berbeda. Bentuk daun pada *B. papyrifera* sangat bervariasi, daun dalam satu tumbuhan dapat berbentuk menjari dan menyirip. Daun tumbuhan yang berusia tua memiliki ukuran lebar yang lebih besar dibandingkan dengan daun muda, dengan ukuran antara 8-25 cm. Menurut Morgan & Overholt (2008), bentuk daun secara keseluruhan seperti hati, pada daun yang lebih tua tepi daun lebih berlekuk. Whistler & Elevitch (2006) melaporkan *B. papyrifera* merupakan tumbuhan dengan daun berbentuk bulat telur hingga elips, pangkal berbentuk jantung hingga membulat, tepi berombak, dengan letak daun berseling.

Perubahan komposisi nutrisi dapat terjadi akibat perubahan usia dan tingkat degradasi daun, yaitu pada daun muda, tua, dan yang sudah lepas dari tumbuhan tersebut. Perubahan komposisi nutrisi mempengaruhi komposisi mikroorganisme pada daun (Charlie & Watkinson, 1995).



Gambar I.7. Daun pada usia *B. papyrifera* 6 bulan (Dokumentasi sanggar Saeh, Dago Pojok Bandung)



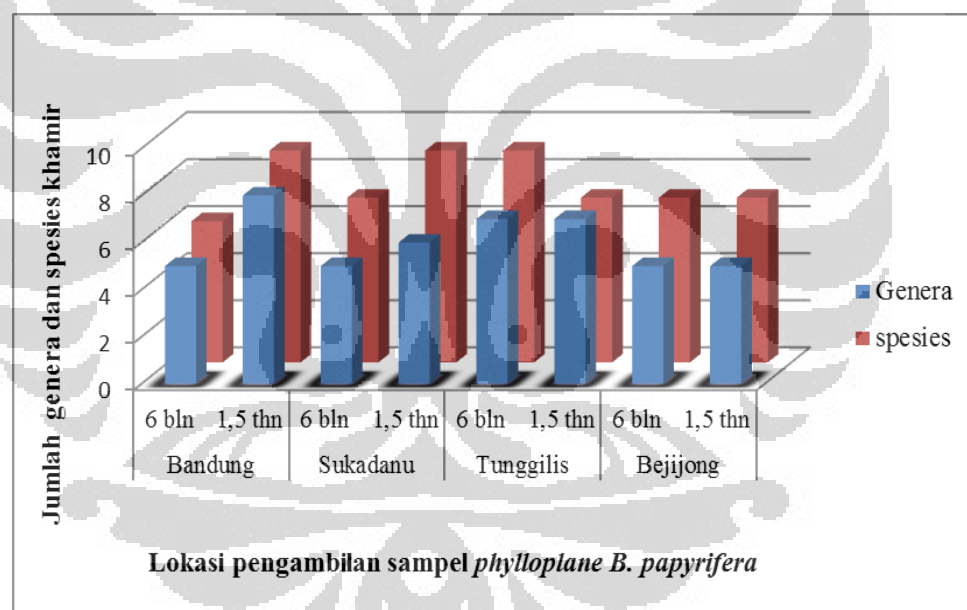
Gambar I.8. Daun pada usia *B. papyrifera* 1,5 tahun
(Dokumentasi sanggar Saeh, Dago Pojok Bandung)

Tabel I.7 menunjukkan bahwa jumlah genera dan spesies khamir dari usia tumbuhan 1,5 tahun (14 genera 23 spesies) lebih banyak dibandingkan usia enam bulan (12 genera 21 spesies). Gambar I.9. menunjukkan jumlah genera dan spesies pada usia tumbuhan 1,5 tahun lebih banyak dibandingkan usia enam bulan dari lokasi Desa Dago, Pojok Bandung, Desa Sukadanu Garut, dan Desa Tunggilis, Garut, kecuali pada Desa Bejijong, Trowulan, Mojokerto yang menunjukkan jumlah genera dan spesies yang sama untuk usia tumbuhan yang berbeda.

Berdasarkan jumlah isolat dan jenis khamir yang diperoleh secara keseluruhan, terdapat perbedaan antara tumbuhan berumur enam bulan dan 1,5 tahun. Kemungkinan pada daun yang tua lebih banyak tersedia nutrisi bagi khamir daripada daun muda, sehingga daun tua memiliki jumlah dan jenis khamir lebih banyak dibandingkan daun muda.

Hasil penelitian ini sejalan dengan laporan peneliti lain. Pengaruh usia daun terhadap komunitas khamir *phylloplane* dilaporkan oleh Kumaresan & Suryanarayanan (2002). Menurut mereka jumlah spesies dan jumlah isolat fungi endofit yang diperoleh dari daun meningkat dengan bertambahnya usia daun. Glushakova & Chernov (2007) dan Pennycook & Newhook (1981) melaporkan bahwa daun yang muda memiliki kepadatan khamir *phylloplane* lebih sedikit dibandingkan daun dewasa dan serasah. Menurut Glushakova & Chernov (2004) daun yang muda menghasilkan eksudat dalam jumlah sedikit sehingga nutrisi yang tersedia tidak cukup untuk populasi mikroorganisme dalam jumlah besar.

Mechaber dkk. (1996) melaporkan bahwa perubahan topografi permukaan daun mempengaruhi proses biologi dan fisika yang terjadi di permukaan daun. Perubahan pada permukaan mempengaruhi penempatan senyawa yang dihasilkan tumbuhan pada permukaan daun, distribusi senyawa metabolit sekunder, dan pelepasan senyawa volatil dari tumbuhan. Pada daun yang tua, secara umum memiliki debris (yang merupakan materi organik) lebih banyak dibandingkan daun muda. Menurut hipotesis yang disampaikan Redford dkk (2010), selain usia daun, struktur dan komposisi kutikula halus, komposisi kimia dan atau senyawa organik volatil yang dikeluarkan oleh daun dapat mempengaruhi komunitas *phyllosphere*. Meskipun demikian, faktor lingkungan turut mempengaruhi struktur komunitas *phyllosphere*. Untuk melihat pengaruh usia tumbuhan pada jumlah dan jenis khamir, diperlukan penelitian lebih lanjut dengan menambah jumlah sampel pada setiap lokasi dan melakukan pengambilan sampel pada lokasi yang berbeda.



Gambar I.9. Jumlah genera dan spesies khamir asal *B. papyrifera* pada usia enam bulan dan 1,5 tahun dari lokasi Desa Dago Pojok, Bandung, Desa Sukadanu, Garut, Desa Tunggilis, Garut, dan Desa Bejjong, Trowulan Mojokerto.

Walaupun terdapat perbedaan jumlah dan jenis khamir pada usia tumbuhan yang berbeda, terdapat 9 genera dan 12 spesies yang sama pada usia tumbuhan yang berbeda (Tabel 1.7). Spesies khamir yang ditemukan pada usia *B. papyrifera* yang berbeda adalah *classes Dothideomycetes (Aur. pullulans)*,

Saccharomycetes (*C. saopaulonensis*, *Han. thailandica*, *M. caribbica*, *Wic. anomalus*); *Microbotryomycetes* (*Rh. dairenensis* dan *Rh. mucilaginoso*), *Tremellomycetes* (*Cr. rajasthanensis*, *Cr. luteolus*, *Cr. flavescens*, *Han. zaeae*), dan *Ustilaginomycetes* (*Pseu. aphidis*).

Adanya kesamaan 12 spesies khamir pada usia tumbuhan yang berbeda menunjukkan kemungkinan terdapatnya asosiasi antara khamir-khamir tersebut dengan *B. papyrifera* (Tabel I.7). Inácio dkk. (2010) melaporkan satu spesies khamir yang hanya ditemukan pada satu spesies daun tumbuhan, yaitu *Cr. cistialbidi* hanya ditemukan pada *Cistus albidus*. Untuk mengetahui adanya asosiasi antara spesies khamir dan tumbuhan inang perlu dilakukan konfirmasi dengan melakukan penelitian lebih lanjut, yaitu dengan menambah jumlah sampel dan melakukan isolasi khamir dari daun *B. papyrifera* pada lokasi yang berbeda.

Tabel I.7. Khamir *phylloplane* dari usia *B. papyrifera* yang berbeda.

Tumbuhan usia 6 bulan	Jumlah isolat	Tumbuhan usia 1,5 tahun	Jumlah isolat	Common species
<i>Dothideomycetes</i>				
<i>Aureobasidium</i> sp. (UICC Y-516)	1	-	-	-
<i>Aureobasidium pullulans</i> (UICC Y-519)	1	<i>Aureobasidium pullulans</i> (UICC Y-527, UICC Y-528)	2	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Total <i>Dothideomycetes</i>	2		2	
<i>Saccharomycetes</i>				
<i>Candida saopaulonensis</i> (UICC Y-487, UICC Y-492)	2	<i>Candida saopaulonensis</i> (UICC Y-494)	1	<i>Candida saopaulonensis</i>
-		<i>Candida metapsilosis</i> (UICC Y-473, UICC Y-474)	2	-
-		<i>Candida pseudojiufengensis</i> (UICC Y-475)	1	-
-		<i>Candida quercitrusa</i> (UICC Y-469, UICC Y-470)	2	-
<i>Candida orthopsilosis</i> (UICC Y-533)	1	-	-	-
<i>Debaryomyces nepalensis</i> (UICC Y-503, UICC Y-456)	2	-	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i> (UICC Y-514, UICC Y-488)	2	-	-	-
-		<i>Geotrichum candidum</i> (UICC Y-495)	1	-
<i>Hanseniaspora thailandica</i> (UICC Y-481)	1	<i>Hanseniaspora thailandica</i> (UICC Y-480)	1	<i>Hanseniaspora thailandica</i>
<i>Hanseniaspora uvarum</i> (UICC Y-484, UICC Y-485)	2	-	-	-

-		<i>Hyphopichia burtonii</i> (UICC Y-465, UICC Y-468, UICC Y-496)	3	-
-		<i>Kodamaea ohmeri</i> (UICC Y-471, UICC Y-472)	2	-
<i>Meyerozyma caribbica</i> (UICC Y-517, UICC Y-518)	2	<i>Meyerozyma caribbica</i> (UICC Y-529)	1	<i>Meyerozyma caribbica</i>
-		<i>Pichia veronae</i> (UICC Y-490)	1	-
-		<i>Saccharomycetales</i> sp. (UICC Y-462)	1	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (UICC Y-453, UICC Y-455)	2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (UICC Y-497, UICC Y-460)	2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
Total Saccharomycetes			18	
Tremellomycetes				
<i>Bullera sinensis</i> (UICC Y-509)	1	-	-	-
-		<i>Cryptococcus flavus</i> (UICC Y-534)	1	-
<i>Cryptococcus rajasthanensis</i> (UICC Y-504, UICC Y-482, UICC Y-489, UICC Y-491, UICC Y-458)	5	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i> (UICC Y-498, UICC Y-502, UICC Y-467)	3	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>
<i>Cryptococcus luteolus</i> (UICC Y-486, UICC Y-493)	2	<i>Cryptococcus luteolus</i> (UICC Y-461, UICC Y-477)	2	<i>Cryptococcus luteolus</i>
<i>Cryptococcus flavescens</i> (UICC Y-515)	1	<i>Cryptococcus flavescens</i> (UICC Y-523, UICC Y-524, UICC Y-525, UICC Y-526)	4	<i>Cryptococcus flavescens</i>
-		<i>Cryptococcus</i> sp. (UICC Y-479)	1	-
<i>Hannaella zeae</i> (UICC Y-510, UICC Y-511)	2	<i>Hannaella zeae</i> (UICC Y-478, UICC Y-463, UICC Y-464)	3	<i>Hannaella zeae</i>
<i>Hannaella kunmingensis</i> (UICC Y-508)	1	-	-	-
<i>Trichosporon asahii</i> (UICC Y-505, UICC Y-506, UICC Y-507, UICC Y-483)	4	-	-	-
Total Tremellomycetes			14	
Ustilaginomycetes				
<i>Pseudozyma aphidis</i> (UICC Y-512, UICC Y-459)	2	<i>Pseudozyma aphidis</i> (UICC Y-501)	1	<i>Pseudozyma aphidis</i>
-		<i>Pseudozyma thailandica</i> (UICC Y-530)	1	-
Total Ustilaginomycetes			2	
Microbotryomycetes				
<i>Rhodotorula dairenensis</i> (UICC Y-457)	1	<i>Rhodotorula dairenensis</i> (UICC Y-500)	1	<i>Rhodotorula dairenensis</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (UICC Y-521, UICC Y-522, UICC Y-513)	3	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (UICC Y-531, UICC Y-499, UICC Y-476, UICC Y-466, UICC Y-532)	5	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
<i>Rhodotorula glutinis</i> (UICC Y-520, UICC Y-454)	2	-	-	-
Total Microbotryomycetes			6	

KESIMPULAN

Hasil identifikasi berdasarkan data *sequence* pada daerah ITS rDNA, sebanyak 82 isolat khamir representatif yang diperoleh dari sampel daun *B. papyrifera* terdiri atas dua *class* dari *Ascomycota* dan tiga *class* dari *Basidiomycota*. Tiga puluh enam dari 82 isolat khamir representatif berdasarkan taksonominya termasuk ke dalam *Ascomycota*, *Saccharomycotina* dan *Pezizomycotina*. Tiga puluh dua isolat *Saccharomycotina* terdiri dari 10 genera yaitu *Candida* (9 isolat), *Debaryomyces* (4 isolat), *Geotrichum* (1 isolat), *Hanseniaspora* (4 isolat), *Kodamaea* (2 isolat), *Meyerozyma* (3 isolat), *Pichia* (1 isolat), *Hyphopichia* (3 isolat), *Saccharomycetales* (1 isolat), dan *Wickerhamomyces* (4 isolat). Empat isolat *Pezizomycotina* (*Hemiascomycetes*) merupakan anggota genus *Aureobasidium*. Sedangkan empat puluh enam dari jumlah isolat khamir representatif terdiri dari enam genera termasuk ke dalam *Basidiomycota*, *Agaricomycotina* (*Hymenomycetes*), *Pucciniomycotina* (*Urediniomycetes*), dan *Ustilaginomycotina* (*Ustilaginomycetes*). Tiga puluh isolat termasuk ke dalam *Hymenomycetes* ke dalam empat genera yaitu *Bullera* (1 isolat), *Cryptococcus* (22 isolat), *Hannaella* (3 isolat), dan *Trichosporon* (4 isolat). Dua belas termasuk ke dalam *Urediniomycetes* ke dalam satu genus *Rhodotorula* (12 isolat). Empat isolat termasuk ke dalam *Ustilaginomycetes* yaitu *Pseudozyma*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada A. O. yang telah membiayai penelitian ini melalui Hibah Penelitian *Indigenous Studies* UI 2009 dan 2010. Terima kasih penulis ucapkan kepada kurator Universitas Indonesia *Culture Collection* (UICC) dan ketua *Centre of Excellence for Indigenous Biological Resources-Genome Studies* (CoE IBR-GS) FMIPA UI, atas dukungan semua fasilitas yang diberikan. Ucapkan terima kasih juga ditujukan pada Bapak Iman Hidayat, Ph.D. LIPI, Cibinong, dalam membantu analisis filogenetik. Terima

kasih pada Bapak Agung Adiputra, S.Si. dari PT. BIP (Gramedia Group) membantu membuat peta lokasi pengambilan sampel.

DAFTAR ACUAN

- Ahansal, L., A. Sassi, A. Martini, A. Vaughan, G. Walker & A. Boussaid. 2008. Biodiversity of yeasts isolated from the indigenous forest of Argan (*Argania spinosa*) in Morocco. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 777--782.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and psi-BLAST: A new generation of protein database search program. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389--3402.
- Atlas, R.M. & R. Bartha. 1993. *Microbial ecology fundamental and applications*. Cummings Publishing Company. Canada. pp. 83--84.
- Azeredo, L.A.I., A.T. Gomes, L.M. Hagler & A.N. Hagler. 1998. Yeast community associated with sugarcane in compos Rio de Janeiro, Brazil. *International Microbiol.* **1**: 205--208.
- Bellager, R.R. & T.J. Avis. 2002. Ecological process and interaction occurring in leaf surface fungi. In: Lindow, S.E., E.I. Hecht-Poinar & V.j. Elliot (eds). *Phyllosphere Microbiology*. APS Press. St. Paul. pp. 193-- 207.
- Breeze, E.M. & N.j. Dix. 1981. Seasonal analysis of the fungal community on *Acer platanoides* leaves. *Trans. Mycol. Soc.* **77**: 321--328.
- Boekhout, T., Á. Fonseca, J.P. Sampaio, R.J. Bandoni, J.W. Fell & K.J. Kwon. 2011. Discussion of teleomorphic and anamorphic *Basidiomycetous* yeasts, pp. 1339--1372. Dalam: P. Kurtzman, J. W. Fell, & T. Boekhout, *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 5th Ed. Elsevier, Amsterdam: 1339--1475.
- Cappuccino, J. G. & N. Sherman. 2002. *Microbiology: A laboratory manual*. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., San Francisco: xvi + 491 hlm.
- Carvajal, M. V., A. Querol & C. Belloch. 2006. Identification of species in the genus *Pichia* by restriction of the internal transcribed spacers (ITS1 and

- ITS2) and the 5.8S ribosomal DNA gene. *Antonie van Leeuwenhoek*. **90**: 171--181.
- Charlie, M. & S.C. Watkinson. 1995. The fungi. Academic press London: xiii+ 481 hlm.
- Crestani, J., M.F. Landell, J. Faganello, M.H. Vainstein, H.S. Vishniac & P. Valente. 2009. *Cryptococcus terrestris* sp. nov. Tremellaceous, anamorphic yeast phylogenetically related to *Cryptococcus flavescens*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 631--636.
- Dufossé, L. 2006. Microbial production of food grade pigments. *Food Technol. Biotechnol.* **44**: 313--321.
- Errasti, A., C.C. Carmaran & V. Novas. 2010. Diversity and significance of fungal endophytes from living stems of naturalized trees from Argentina. *Fungal Diversity*. **41**: 29--40.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. **39**: 783--791.
- Fonseca, Á. & J. Inácio. 2006. Phylloplane yeasts, pp. 263--301. *Dalam*: G. Peter, and C. Rosa, *The Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 263--405.
- Glushakova A M, & I. Yu. Chernov. 2004. Seasonal dynamics in a yeast population on the common wood sorrel *Oxalis acetosella* L. leaves. *Microbiology Journal*. **2**: pp.532.
- Glushakova, A. M. & I. Yu. Chernov. 2007. Seasonal Dynamic of the Numbers of Epiphytic Yeasts. *Mikrobiologiya*. **5**: 590--595.
- Herrera, C. M. & M. Pozo. 2014. Nectar yeasts warm the flowers of a winter-blooming plant *Proc. R. Soc. B.* doi:10.1098/rspb.2009.2252. 1-8.
- Hussain, K., A. Shahazad & S. Zia-ul-Hussnain. 2008. An Ethnobotanical Survey of Important Wild Medicinal Plants of Hattar District Haripur, Pakistan. *Ethnobotanical Leaflets*. **12**: 29--35.
- Hong, S. G., K. H. Lee & K. S. Bae. 2002. Diversity of yeasts associated with natural environments in Korea. *J. Microbiol.* **40**: 55--62.

- Ho-Yong S., K.C. Suk & S. K. Ho. 2010. Fungicidal effect of prenylated flavonol, papyriflavonol A, isolated from *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. against *Candida albicans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 1397--1402.
- Inácio, J., P. Pierra, A. Fonseca, M. T. Amaral Collaco & I. S. Martini. 2002. Estimation and diversity of phylloplane mycobiota on selected plants in a Mediterranean type ecosystem Portugal. *Microb. Ecol.* **44**: 344--353.
- Inácio, J. 2003. Yeast occurrence and diversity on the phylloplane of selected plants from Arrabida Natural park. PhD thesis (in Portuguese). Universidade Nova de Lisboa Portugal. pp. 1261--1275.
- Inácio, J., P. Laura, M. Isabel & F. Alvaro. 2006. Phylloplane yeasts from Portugal: Seven novel anamorphic species in the *Tremellales* lineage of *Hymenomycetes* (*Basidiomycota*) producing orange-coloured colonies. *FEMS Yeast Res.* **5**: 1167--1183.
- Inácio, J., L. Wolfgang, I. Spencer-Martins & Á. Fonseca. 2010. Assessment of phylloplane yeasts on selected Mediterranean plants by FISH with group- and species-specific oligonucleotide probes. *FEMS. Microbiol. Ecol.* **71**: 61--72.
- Jandhav, D.M. & D.U. Gawal. 2013. Isolation and characterization of *Aureobasidium pullulans* (De Barry) a phylloplane yeast of sandal and guava. *Bionano Frontier*. **6**: 0974--0979.
- Joshi, V.K., D. Atri, A. Bala & S. Bhushan. 2003. Microbial pigments. *Indian J. Biotechnol.* **2**: 363--369.
- Kanti, A., E. Sukara, K. Latifah, N. Sukarno & K. Boundy-Mills. 2013. Indonesian oleaginous yeasts isolated from *Piper betle* and *P. nigrum*. *Mycosphere*. **4**: 1015--1026.
- Ko H.H., Y.S. Meei, K.F. Nien, T.C. Ming & L.C. Nan. 1998. Bioactive constituents of *Morus australis* and *Broussonetia papyrifera*. *J. Nat. Prod.* **60**: 1008--1011.
- Kuang, Y., D. Xi, J., X. Zhu & L. Zhang. 2012. Traffic pollution influences leaf biochemistries of *Broussonetia papyrifera*. *Sci. Res.* **2**: 71--76.

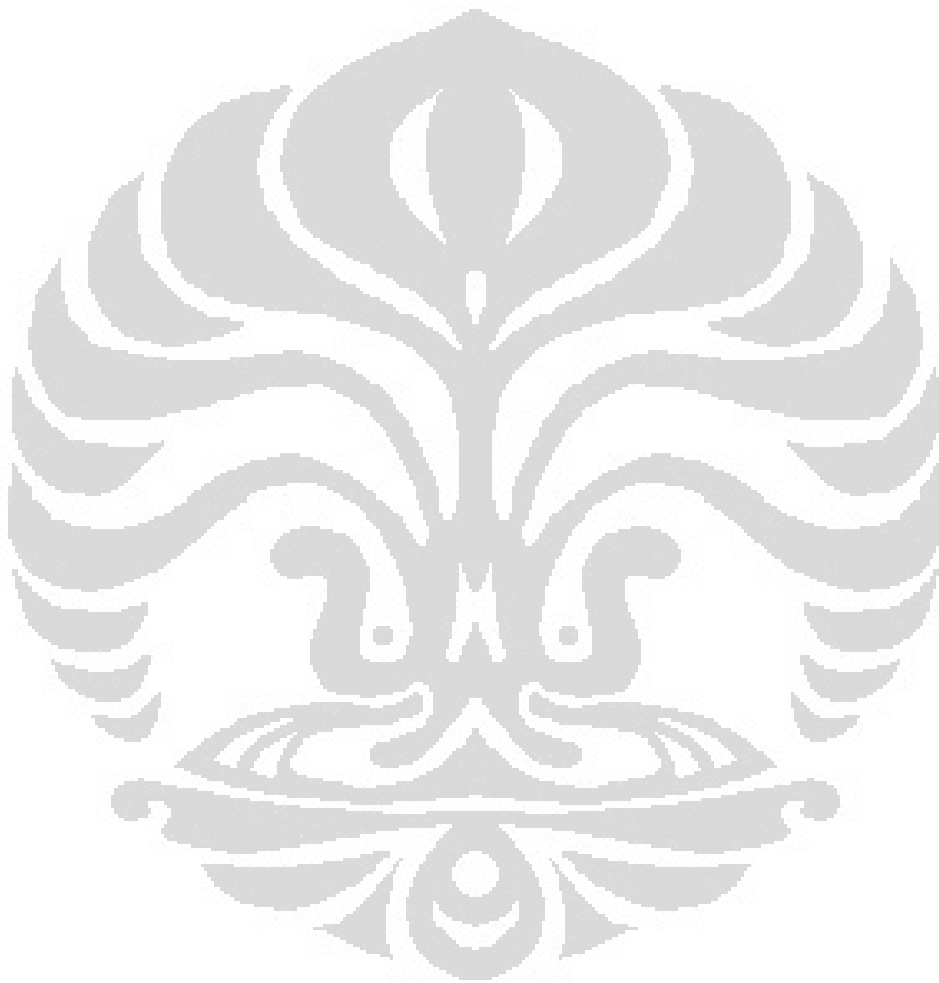
- Kumaresan, V. & T.S. Suryanarayanan. 2002. Endophyte assemblages in young, mature and senescent leaves of *Rhizophora apiculata*: evidence for the role of endophytes in mangrove litter degradation. *Fungal Diversity*. **9**: 81-91.
- Kurtzman, C.P. 2011. Discussion of teleomorphic and anamorphic *Ascomycetous* yeasts and yeast-like taxa, pp. 293--307. *Dalam*: C.P. Kurtzman, J.W. Fell and T. Boekhout, *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 5th Ed. Elsevier, Amsterdam.
- Lee, D., P.L. Krishna, H.S. Harry, R.N. Farnsworth, P. John & A. D. Kinghorn. 2001. Aromatase inhibitors from *Broussonetia papyrifera*. *J. Nat. Prod.* **64**: 1286--1293.
- Lindow, S.E. & M.T. Brandl. 2003. Minireview microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1875--1883.
- Limtong S., R. Kaewwichian, W. Yongmanitchai, H. Kawasaki. 2014. Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid. *World J Microbiol Biotechnol.* DOI 10.1007/S11274-014-1602-7.
- Mechaber. W. L., T. Durwood, B. Marshall, A. Richard, T. J. Renner & S. C. Frances. 1996. Mapping leaf surface landscapes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 4600-4603.
- McCormack, P.J., G. Howards, G. Wildman & P. Jeffries. 1994. Production of Antibacterial Compounds by Phylloplane-Inhabiting Yeasts and Yeastlike Fungi. *Applied. Microbiology.* **21**: 927-931
- Moliné, M., D. Libkind, M.C. Diéguez & M. van Broock. 2009. Photoprotective role of carotenoids in yeasts: Response to UV-B of pigmented and naturally-occurring albino strains. *J. Photochem Photobiol B.* **95**: 156- 161.
- Morgan, E.C. & W.A. Overholt. 2008. Wildland Weeds: Paper Mulberry, *Broussonetia papyrifera*. <http://edis.ifas.ufl.edu>. IFAS Invasive Plant Working Group. 2008. Accessed June, 2013, <http://plants.ifas.ufl.edu/assessment/>.

- Oetari, A., A. Akbar, A. Salamah, A. Soemiati, D. Hendrayanti, Katrin, M. Atria, N.S. Lestari, T. Susetyo-Salim, & W. Sjamsuridzal. 2009. *Kajian kekayaan tradisional Indonesia: daluang (dluwang) dari tanaman saeh (Broussonetia papyrifera Vent.) ditinjau dari aspek hayati dan budaya*. Laporan Akhir Hibah Riset Unggulan Bidang Prioritas Tahun 2010. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam serta Fakultas Ilmu Pengetahuan Budaya, Univeritas Indonesia: x + 109 hlm.
- Pennycook, S. R. & F. J. Newhook. 1981. Seasonal changes in the apple phylloplane microflora. *New Zealand Journal o/Botany*. **19**: 273--283.
- Permadi, T. 1998. Daluang kertas tradisional Jawa Barat. Saga Olah Citra, Bandung: 44 hlm.
- Permadi, T. 2005. Konservasi tradisi pembuatan daluang sebagai salah satu upaya penyelamatan teknologi tradisional Nusantara. Program Studi Bahasa dan Sastra Indonesia, Jurusan Pendidikan Bahasa dan Sastra Indonesia, Fakultas Pendidikan Bahasa dan Seni, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung: 1--19.
- Permadi, T. 2010. Asal-usul pemanfaatan dan karakteristik daluang: Bahan naskah dalam tradisi Nusantara. Bandung: 1--29.
- Redford, A. J., R. Bowers, R. Knight, Y. Linhart & N. Fierer. 2010. The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environmental Microbiology* . **11**: 2885--2893.
- Saitou, N. & M. Nei. 1987. The neighbor joining method a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406--425.
- Sambrook, J. & D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, pp. 8.17--8.98. 3th Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sampaio, A., R. Cortes & C. Leao. 2004. Yeast and macroinvertebrate communities associated with leaf litter decomposition in a second order stream. *Internat. Rev. hydrobiol.* **89**: 453--466.
- Spencer, J.F.T. & D.M. Spencer. 1997. Ecology: Where yeasts live. *Dalam*: Spencer, J.F.T. & D.M. Spencer. (eds). 1997. *Yeasts in natural and artificial habitats*. Springer, Berlin. pp. 33--67.

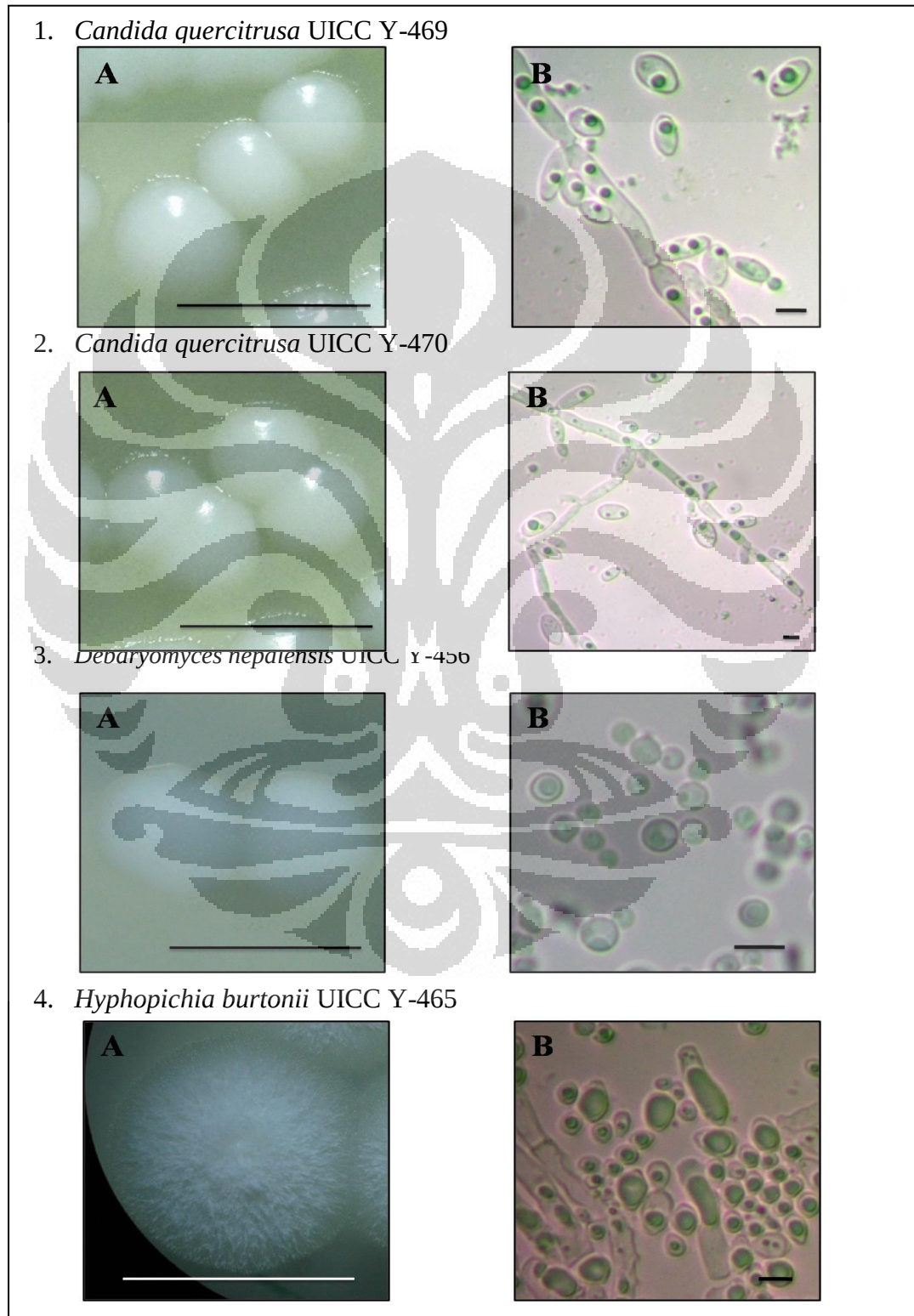
- Sjamsuridzal, W. & A. Oetari. 2003. Rapid preparation of fungal and bacterial genomic DNA for PCR. *Hayati*. **10**: 122--124.
- Sjamsuridzal, W. 2007. *Yeast diversity and conservation Gunung Halimun National Park, Indonesia*. Nagao Natural Environment Foundation, Depok: iii + 254 hlm.
- Sjamsuridzal, W., A. Oetari, A. Kanti, R. Saraswati, C. Nakashima, Y. Widyastuti & K. Ando. 2010. Ecological and taxonomical perspective of yeasts in Indonesia. *Microbiol. Indonesia*. **4**: 60--67.
- Sjamsuridzal, W., A. Oetari, C. Nakashima, A. Kanti, R. Saraswati, Y. Widyastuti & K. Ando. 2013. New species of genus *Metschnikowia* isolated from flowers in Indonesia, *Metschnikowia cibodasensis* sp. nov. *J. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 1--8.
- Stout, J. D. 1960. Bacteria of soil and pasture leaves at Claudelands show-grounds. *N. Z. J. Agric. Res.* **3**: 413--430.
- Stohr, S. N., L. Leon & W.B. James. 2008. The influence of exogenous nutrients on the abundance of yeasts on the phylloplane of Turfgrass. Springer Science. DOI: 10.10007/s00248-007-9247-x. **55**: 15--20.
- Sundin, G.W. 2002. Ultraviolet radiation on leaves: its influences on microbial communities and their adaptations. *Phyllosphere Microbiology*. APS Press. St. Paul. pp. 27--42.
- Sugita, T., A. Nishikawa, R. Ikeda & T. Shinoda. 1999. Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1985--1993.
- Sun, J., L.S. Fang, Z. Chu, Y. Lina, B. Jie, Z. Fang & Y. Ging-li. 2012. Chemical composition and antioxidant activities of *Broussonetia papyrifera* fruits. *Plos One* 7: (2): e32021. Doi:10.1371/journal.pone.0032021.
- Soon G.H., K.H. Lee & K.S. Bae. 2002. Diversity of yeasts associated with natural environments in Korea. *J. Microbiol.* **40**: 55--62.

- Takashima, M., T. Sugita, B.H. Van, M. Nakamura, R. Endoh & M. Ohkuma. 2012. Taxonomic richness of yeasts in Japan within subtropical and cool temperate areas. *Plos One* **7**(11): e50784. Doi: 10.1371/journal.pone.00050784.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar. 2007. Mega 4: Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 1596-1599.
- Teijgeler, R. 1995. Dluwang, a Javanese/ Madurese tapa from paper mulberry tree. Writing material from Indonesia. International Institute for Asian Studies. Newsletter: 25.
- Teijgeler, R. 2000. Dluwang, a near-paper from Indonesia, pp. 134--145. In R. Teygeler, *International Association of Paper Historians*. Congress book, Marburg: 135--159.
- Veenendaal, H.Li., N.A. Ab Shukor, J.R. Cobbinah & C. Leifert. 1995. Yeast populations on the tropical timber tree species *Milica excelsa*. *Applied Microbiology*. **21**: 322--326.
- Whistler, W.A. & C. R. Elevitch. 2006. *Broussonetia papyrifera* (paper mulberry), pp. 1--13. *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee & J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315--322. Dalam: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, *PCR Protocols: Guide to Methods and Applications*. Academic Press Incorporation, New York. pp. 315--450.
- Xu M.L, W. Lan, H. Jian, L.S. Ki & W.M. Hyeon. 2010. Antioxidant activities and related polyphenolic constituents of the methanol extract fractions from *Broussonetia papyrifera* stem bark and wood. *Food Sci. Biotechnol.* **19**: 677--682.
- Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintance & identification, pp. 77--105. Dalam Kurtzman, C. P., and J. W. Fell. 1998. *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4th Ed. Elsevier, Amsterdam. pp. 78--120.

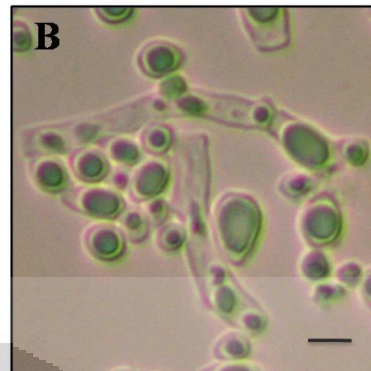
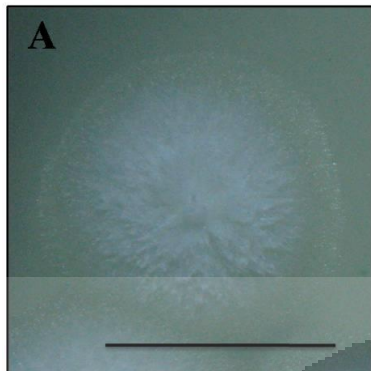
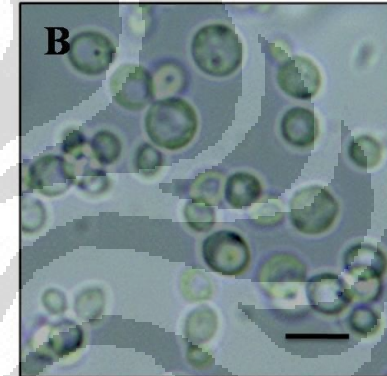
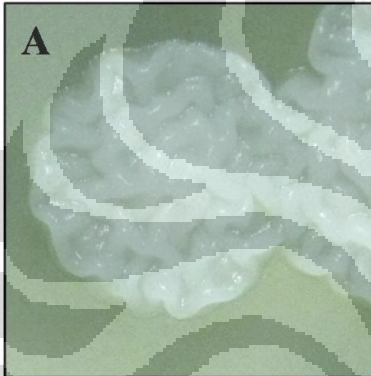
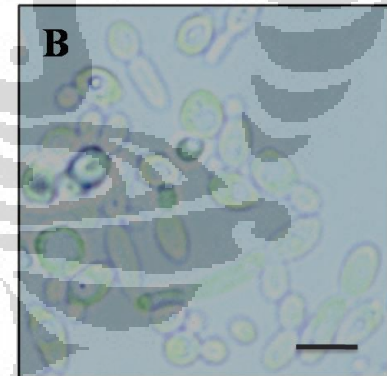
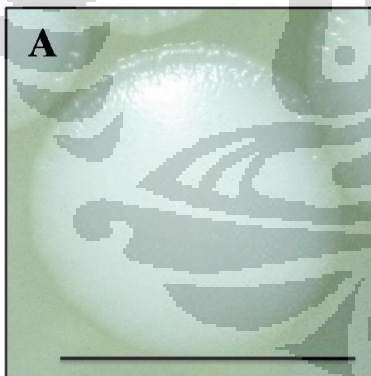
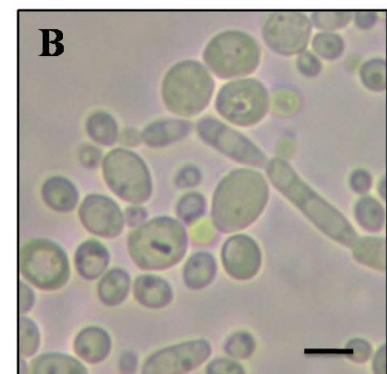
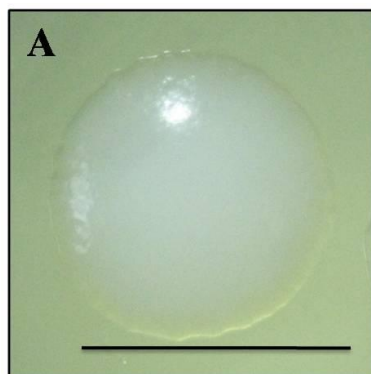
- Zafar, I., S. Mussarat, H. Farrakh, B. Sheraz, I. Mohammad, Z. Shahida & A. Bashir. 2002. Antifungal properties of some indigenous plants from Peshawar Valley. *Asian J. Plant Sci.* **6**: 708--709.
- Zak, J.C. 2002. Implications of leaf surface habitat for fungal community structure and function. *Phyllosphere Microbiology*. APS Press. St. Paul. pp. 299--315.



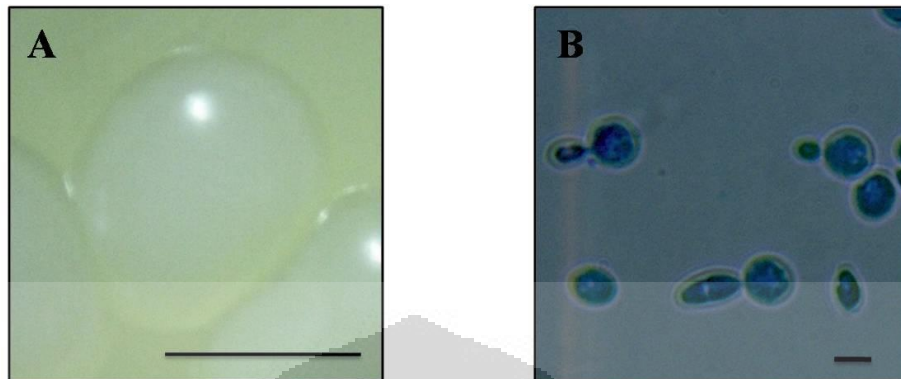
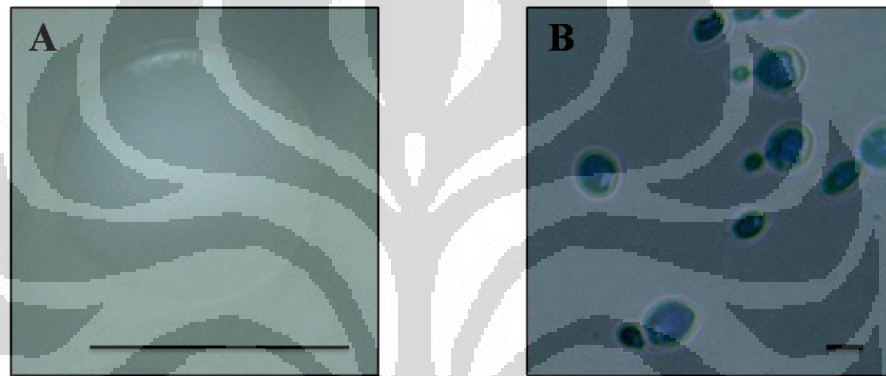
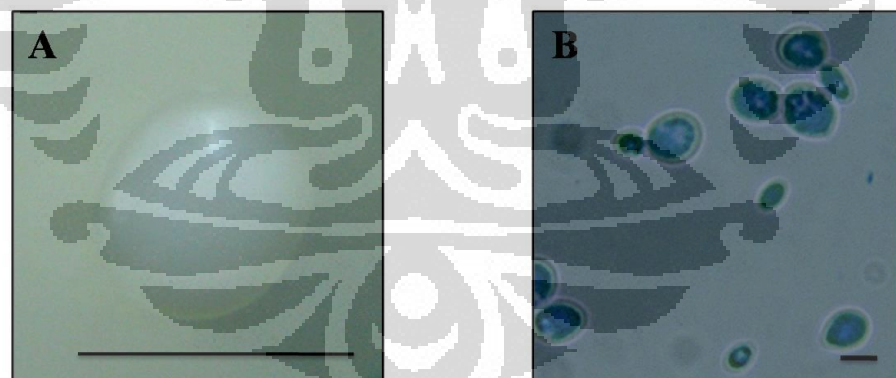
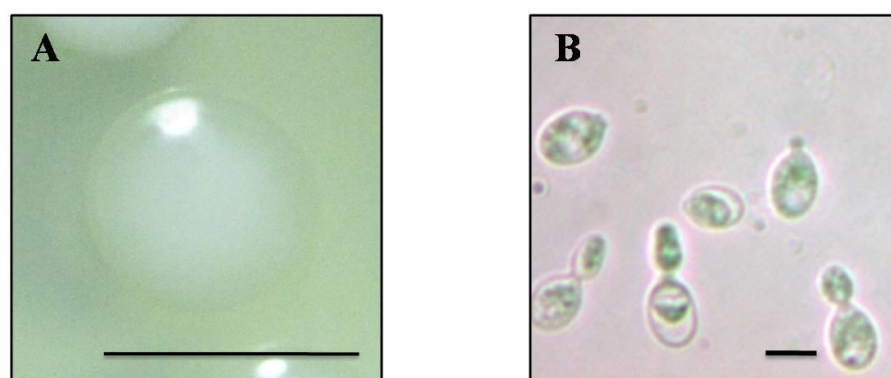
Lampiran I.1 Morfologi makroskopik isolat-isolat khamir dari tumbuhan *B. papyrifera* asal Desa Dago Pojok, Bandung, Jawa Barat pada medium YMA hari ke-3, serta morfologi mikroskopik pada medium YMB hari ke-3 pada suhu 28--30 °C. A. Morfologi makroskopik B. Morfologi mikroskopik. Skala garis pada koloni menunjukkan 1 mm. Skala garis mikroskopik menunjukkan 5 µm.



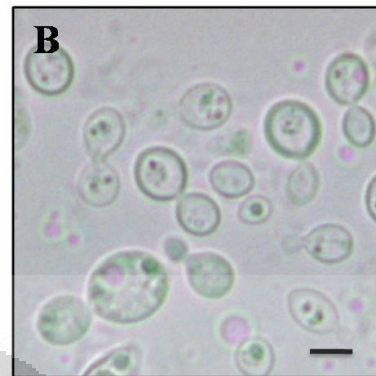
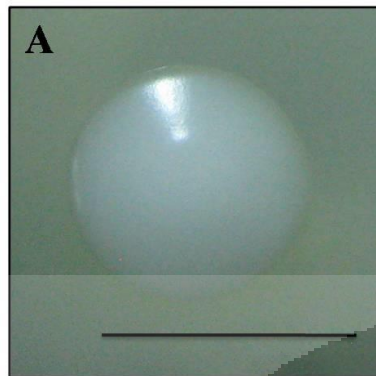
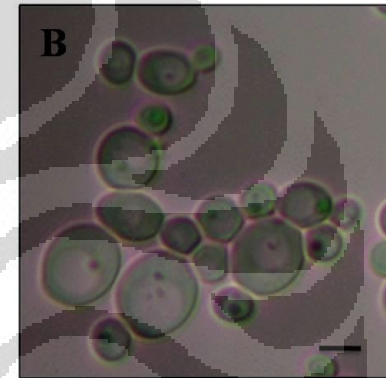
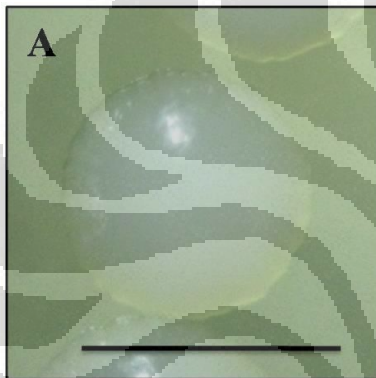
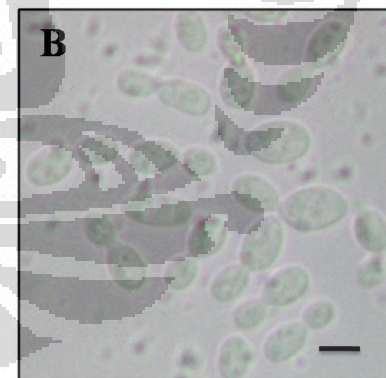
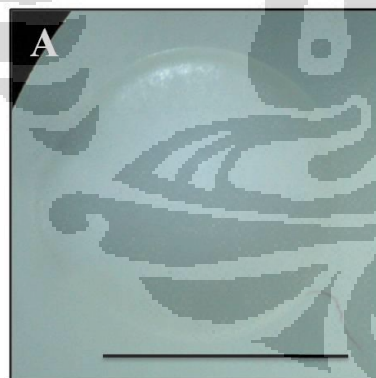
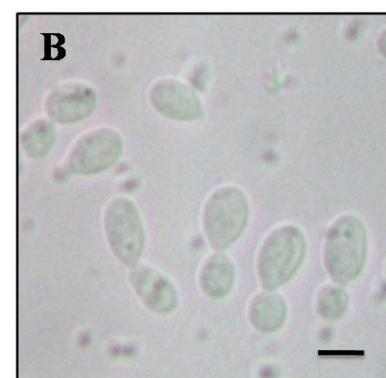
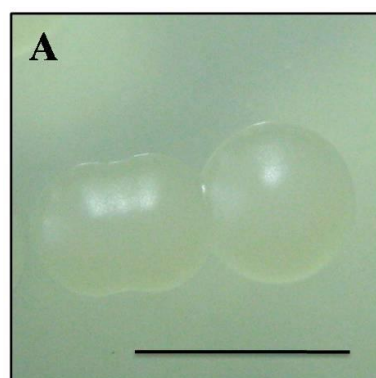
Lampiran I.1 (lanjutan)

5. *Hyphopichia burtonii* UICC Y-4686. *Kodamaea ohmeri* UICC Y-4717. *Kodamaea ohmeri* UICC Y-4728. *Saccharomycetales* sp. UICC Y-462

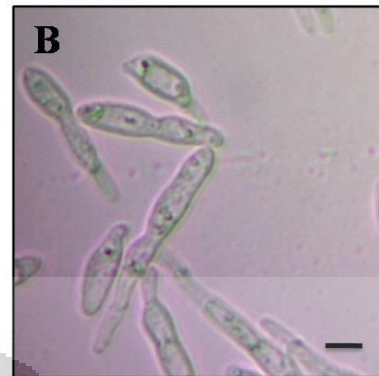
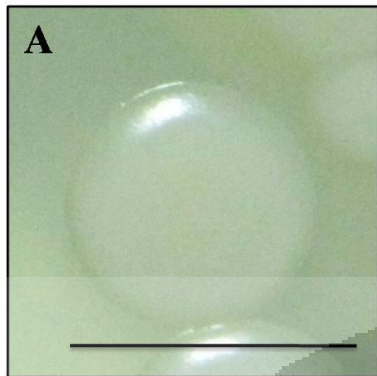
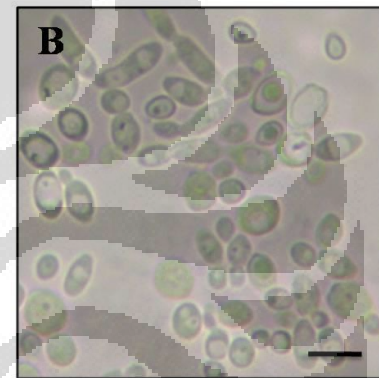
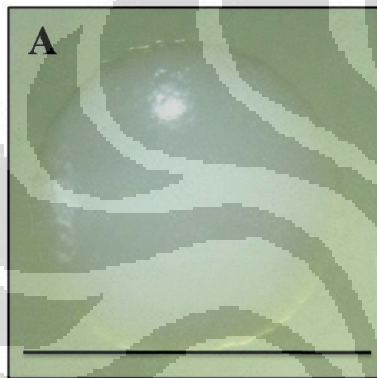
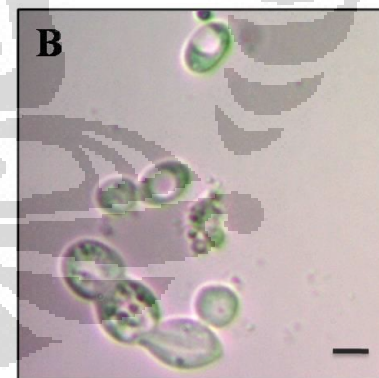
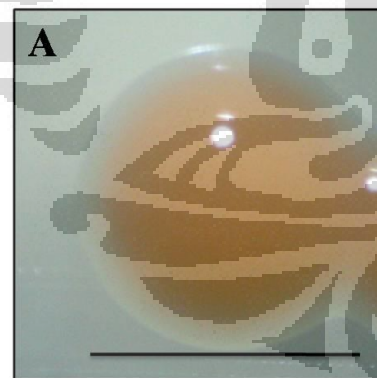
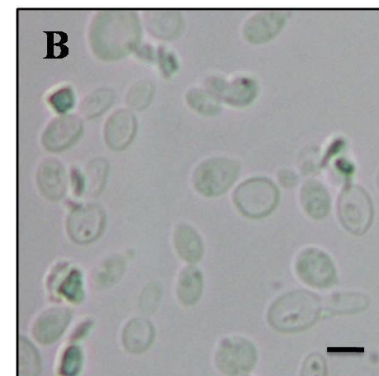
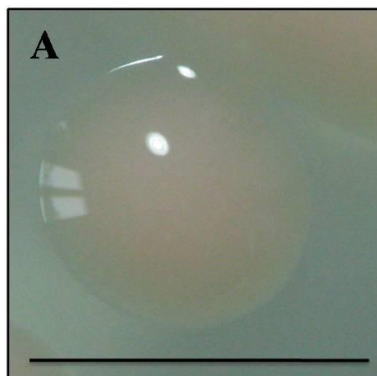
Lampiran I.1 (lanjutan)

9. *Wickerhamomyces anomalus* UICC Y-45310. *Wickerhamomyces anomalus* UICC Y-45511. *Wickerhamomyces anomalus* UICC Y-46012. *Cryptococcus luteolus* UICC Y-461

Lampiran I.1 (lanjutan)

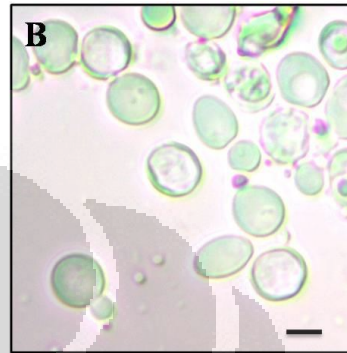
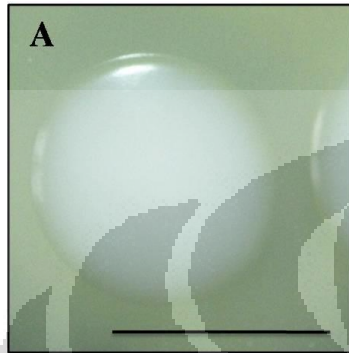
13. *Cryptococcus rajasthanensis* UICC Y-45814. *Cryptococcus rajasthanensis* UICC Y-46715. *Hannaella zae* UICC Y-46316. *Hannaella zae* UICC Y-464

Lampiran I.1 (lanjutan)

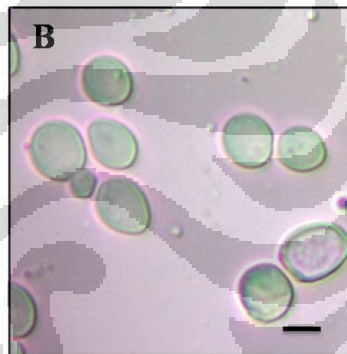
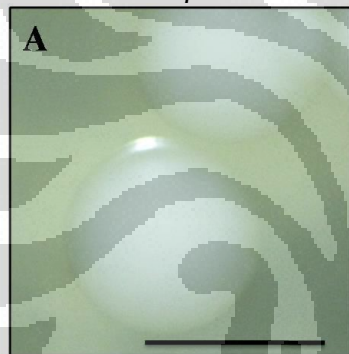
17. *Pseudozyma aphidis* UICC Y-45918. *Rhodotorula dairenensis* UICC Y-45719. *Rhodotorula glutinis* UICC Y-45420. *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-466

Lampiran I.2 Morfologi makroskopik isolat-isolat khamir dari tumbuhan *B. papyrifera* asal Desa Sukadanu, Garut, Jawa Barat pada medium YMA hari ke-3, serta morfologi mikroskopik di medium YMB hari ke-3 pada suhu 28--30 °C. A. morfologi makroskopik, B. morfologi mikroskopik. Skala garis pada koloni menunjukkan 1 mm. Skala garis mikroskopik menunjukkan 5 μ m.

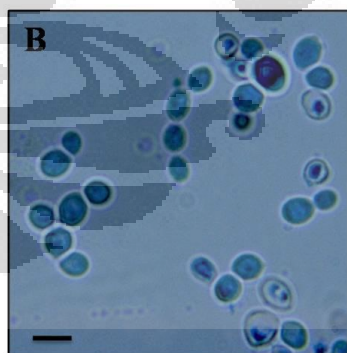
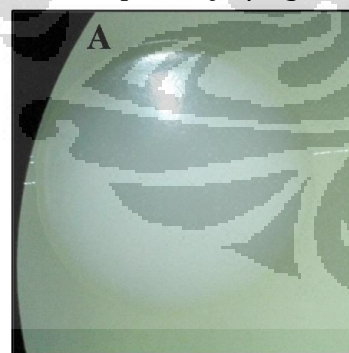
1. *Candida metapsilosis* UICC Y-473



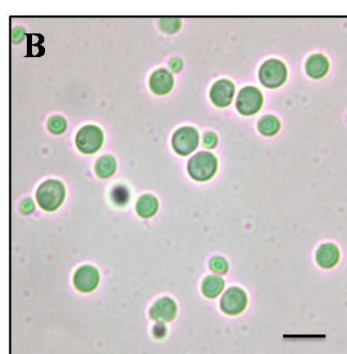
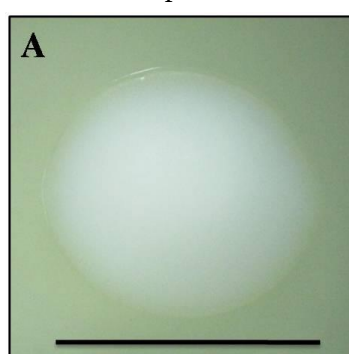
2. *Candida metapsilosis* UICC Y-474



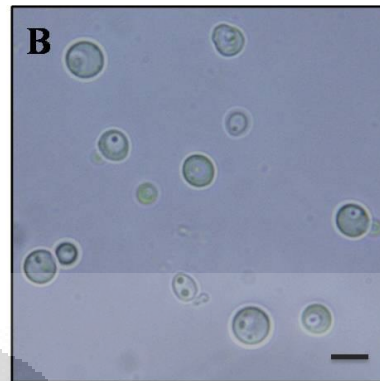
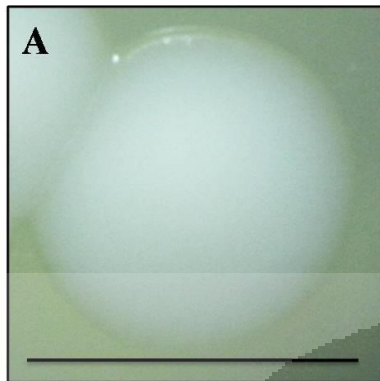
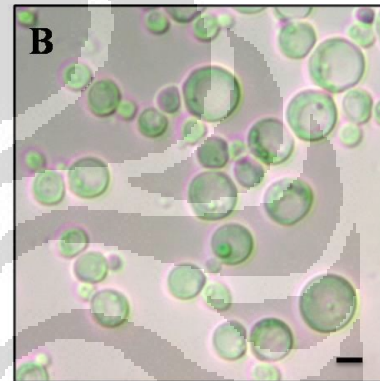
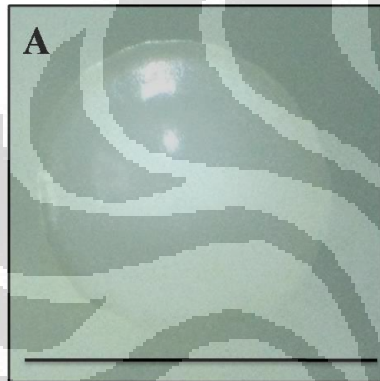
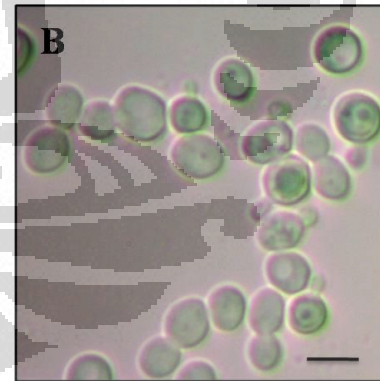
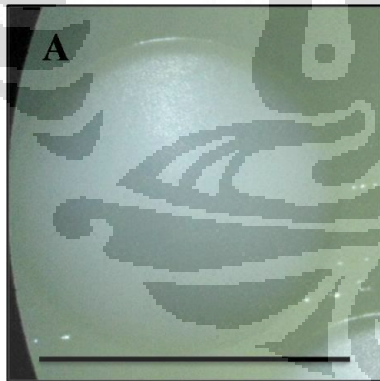
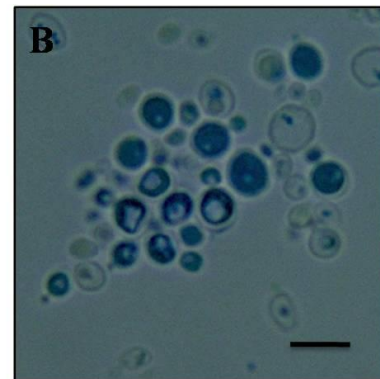
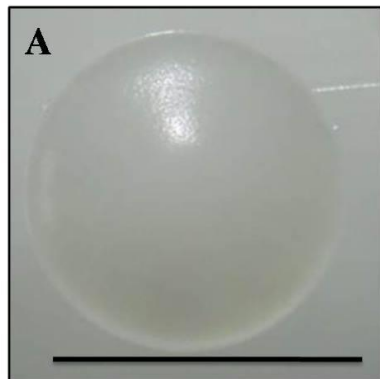
3. *Candida pseudojiufengensis* UICC Y-475



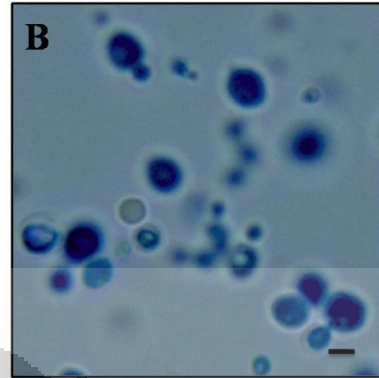
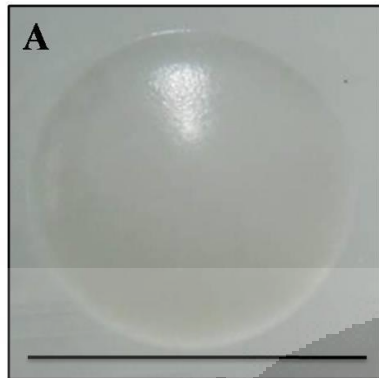
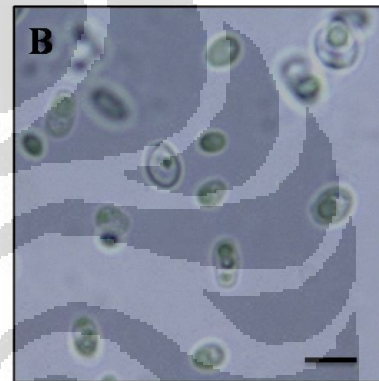
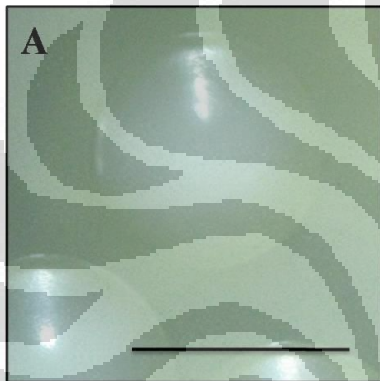
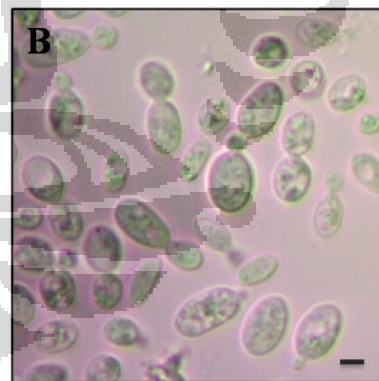
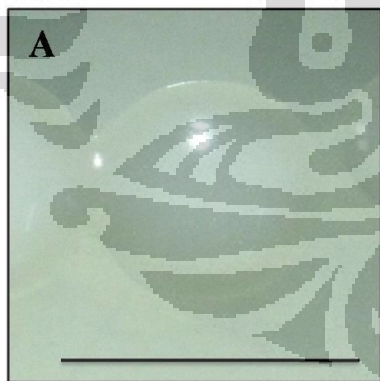
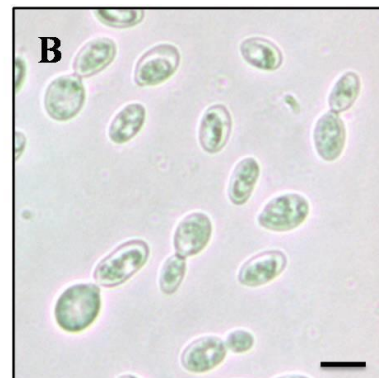
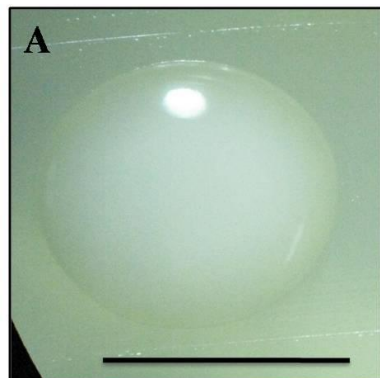
4. *Candida saopaulonensis* UICC Y-487



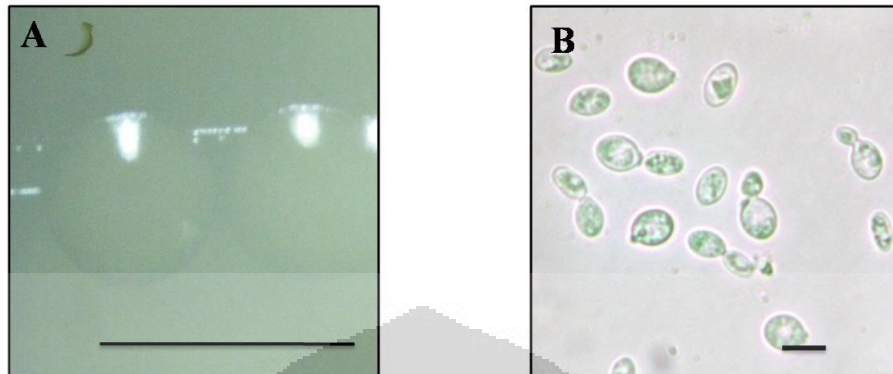
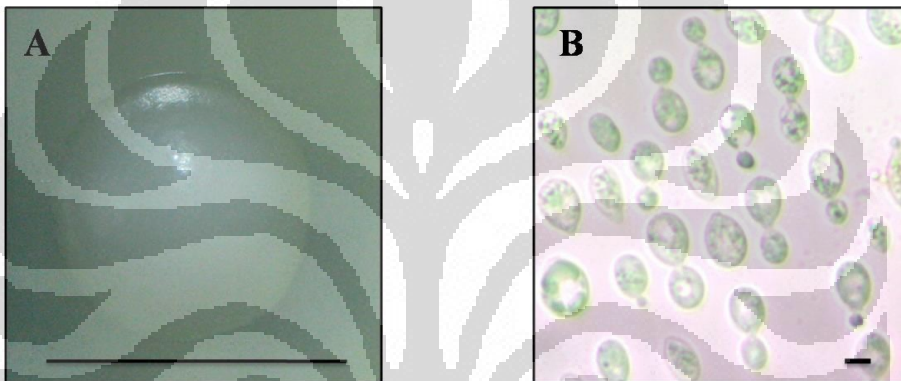
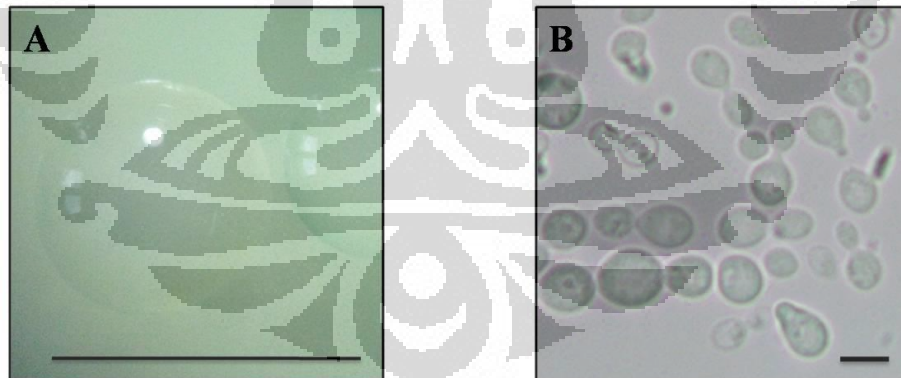
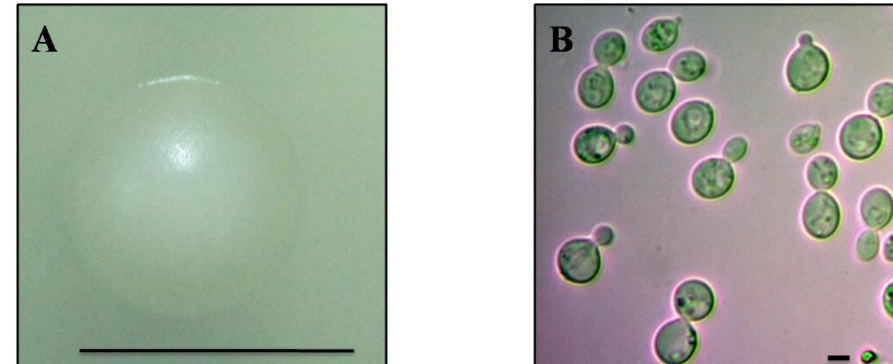
Lampiran I.2 (lanjutan)

5. *Candida saopaulonensis* UICC Y-4926. *Candida saopaulonensis* UICC Y-4947. *Debaryomyces hansenii* UICC Y-4888. *Hanseniaspora uvarum* UICC Y-484

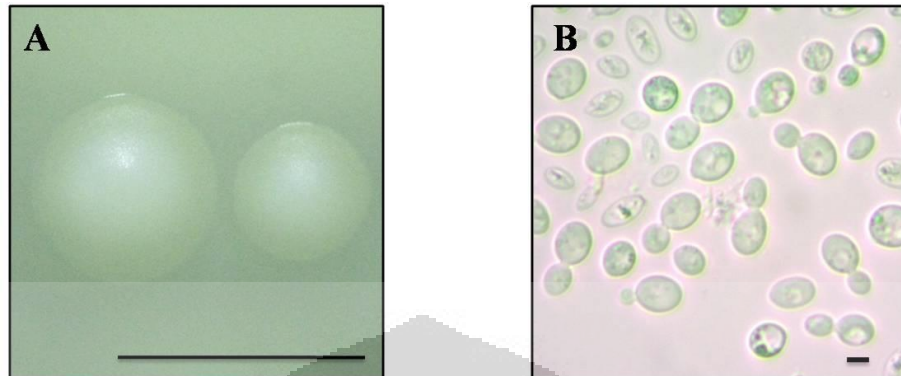
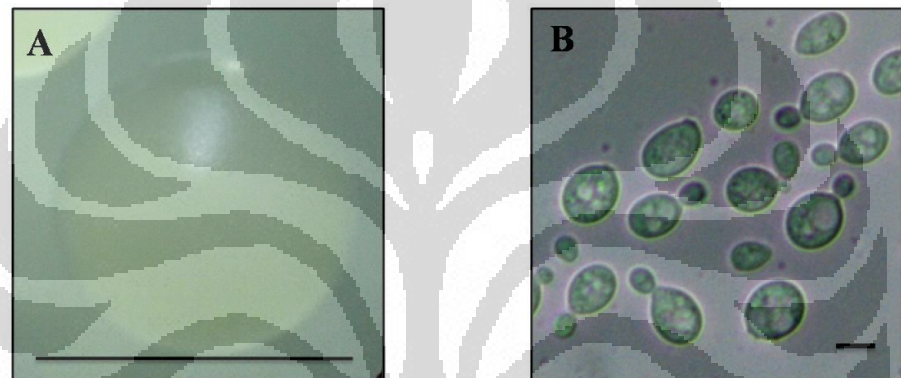
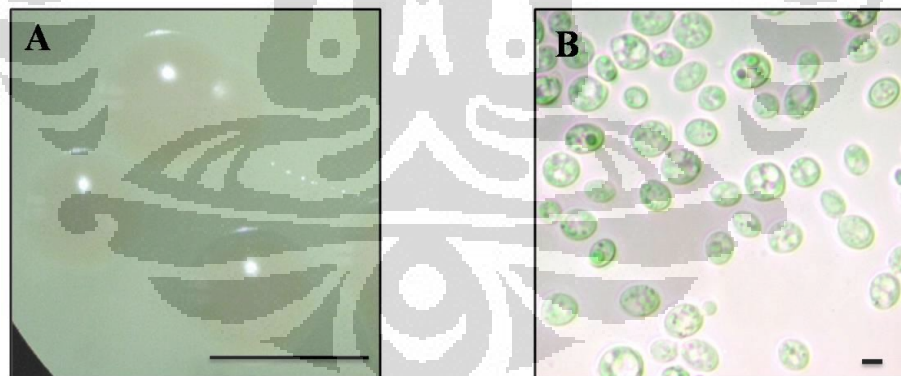
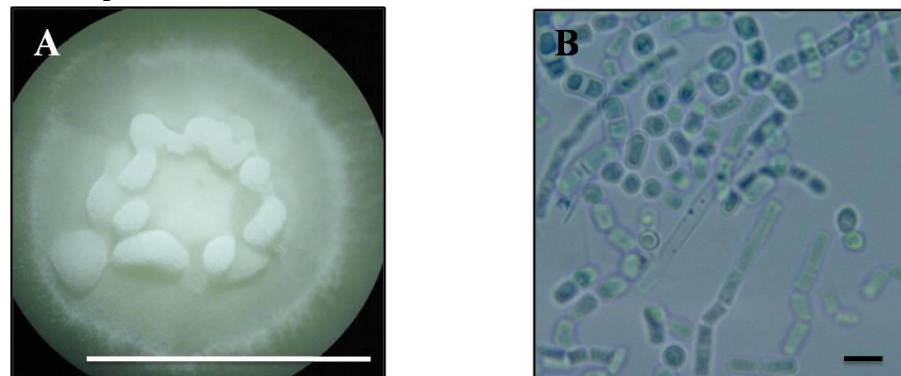
Lampiran I.2 (Lanjutan)

9. *Hanseniaspora uvarum* UICC Y-48510. *Pichia veronae* UICC Y-49011. *Cryptococcus* sp. UICC Y-47912. *Cryptococcus luteolus* UICC Y-477

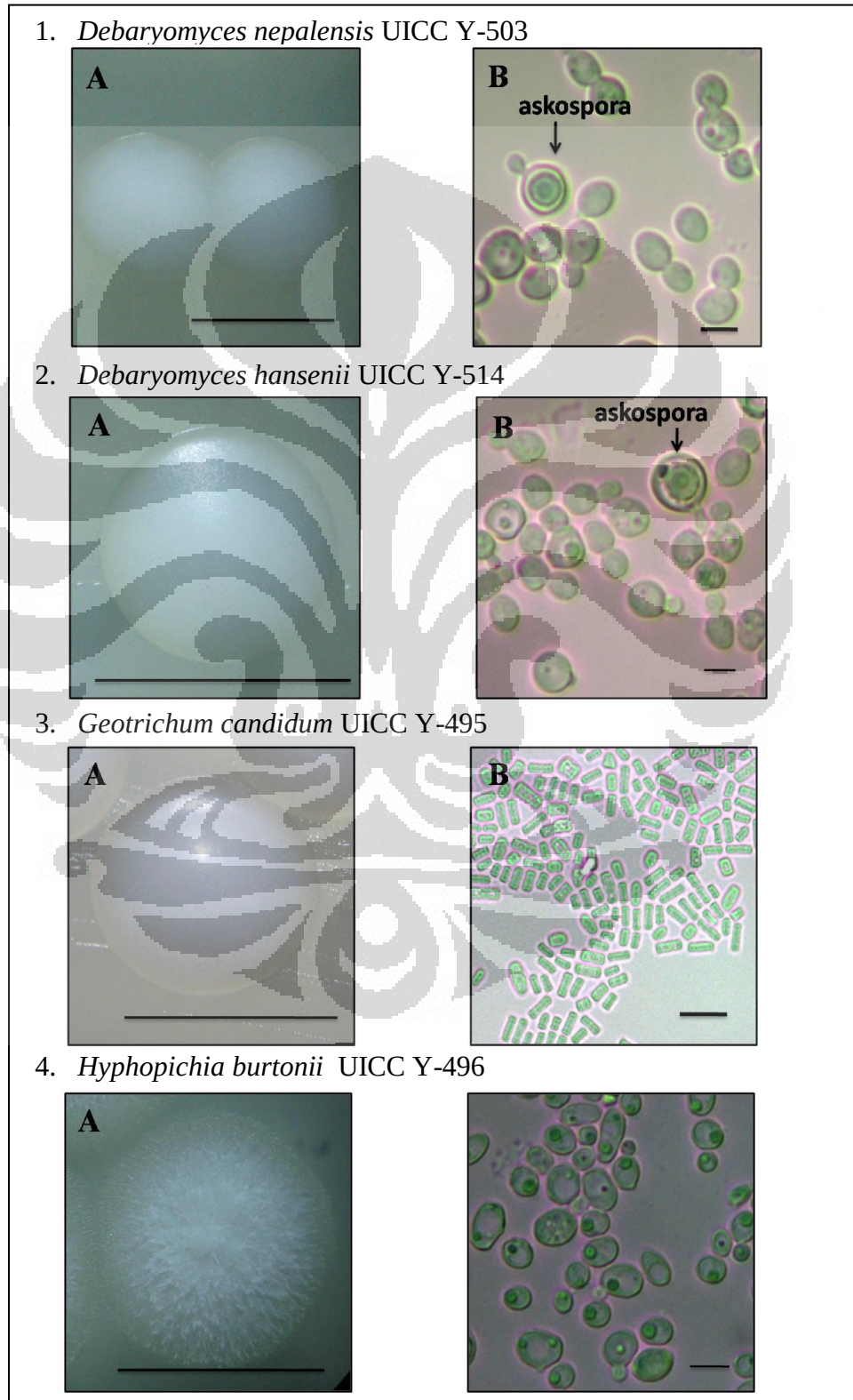
Lampiran I.2 (lanjutan)

13. *Cryptococcus luteolus* UICC Y-48614. *Cryptococcus luteolus* UICC Y-49315. *Cryptococcus rajasthanensis* UICC Y-48216. *Cryptococcus rajasthanensis* UICC Y-489

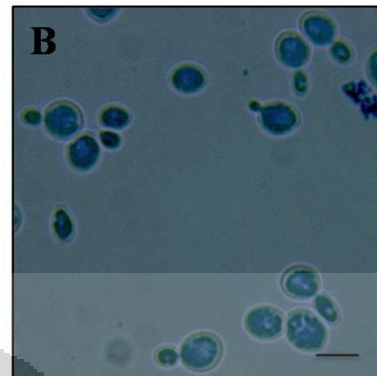
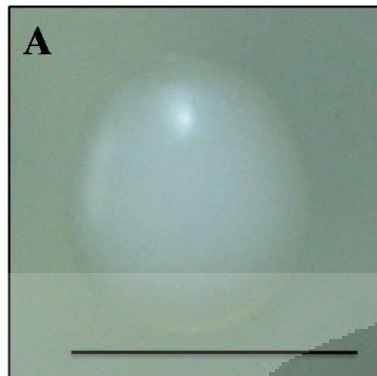
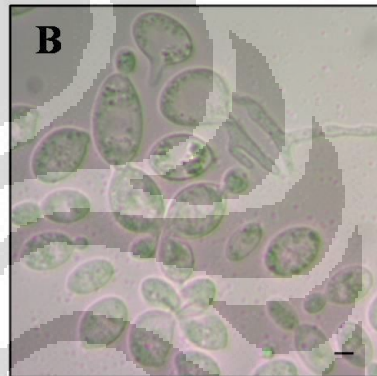
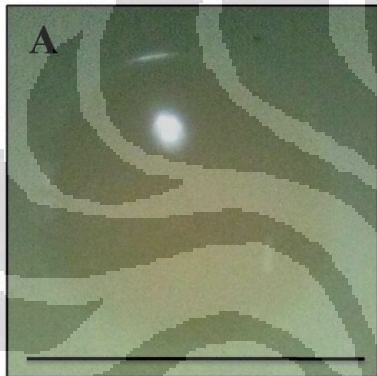
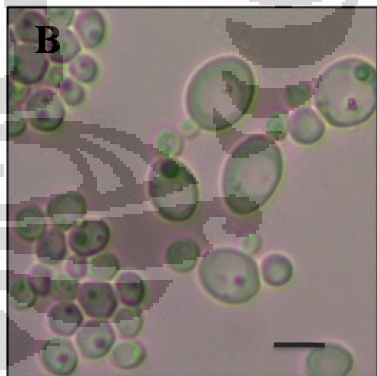
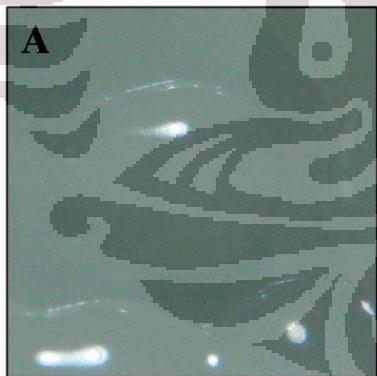
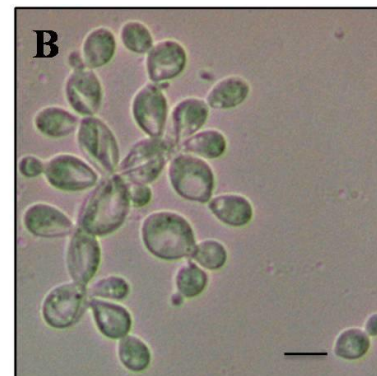
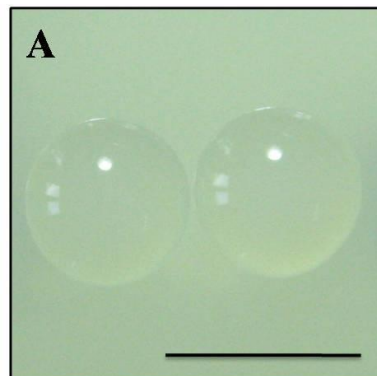
Lampiran I.2 (Lanjutan)

17. *Cryptococcus rajasthanensis* UICC Y-49118. *Hannaella zeae* UICC Y-47819. *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-47620. *Trichosporon asahii* UICC Y-483

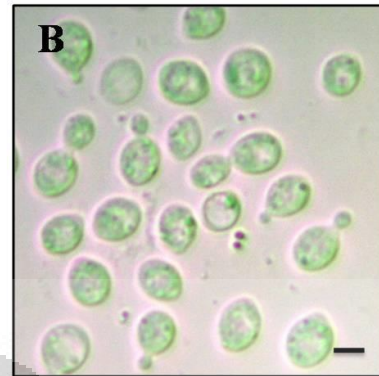
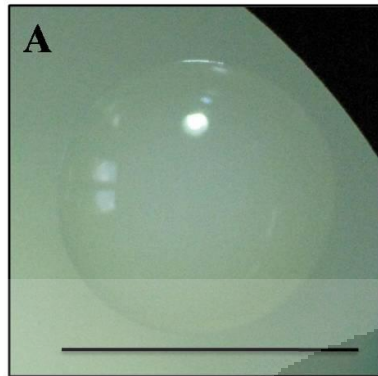
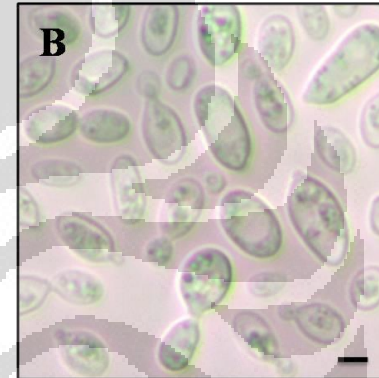
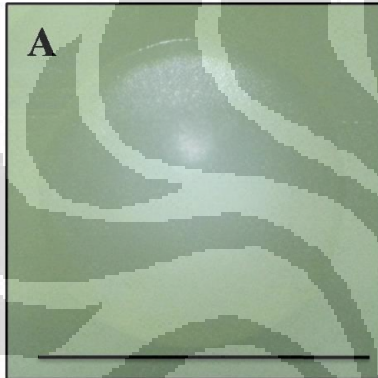
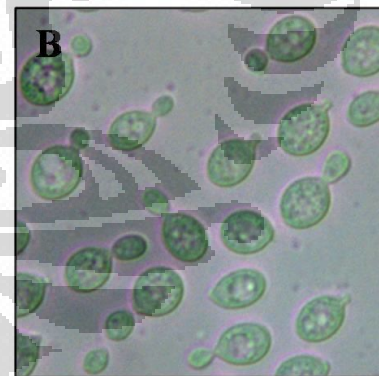
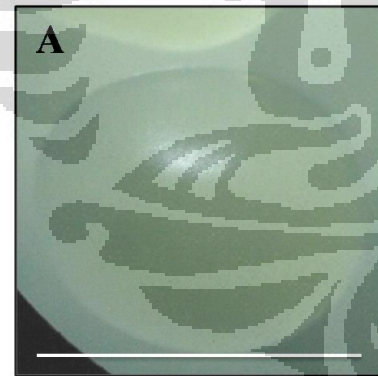
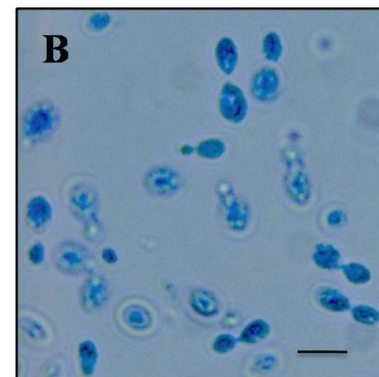
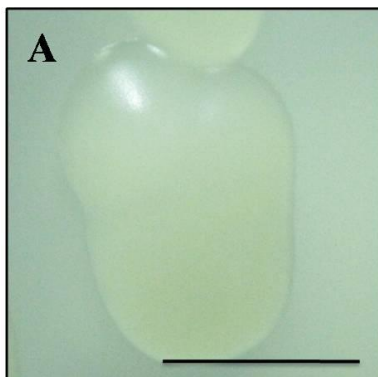
Lampiran I.3 Morfologi makroskopik isolat-isolat khamir dari tumbuhan *B. papyrifera* asal Desa Tunggilis, Garut (Jawa Barat) pada medium YMA hari ke-3, serta morfologi mikroskopik pada medium YMB hari ke-3 pada suhu 28--30 °C. A. Morfologi makroskopik B. Morfologi mikroskopik. Skala garis pada koloni menunjukkan 1 mm. Skala garis mikroskopik menunjukkan 5 μ m.



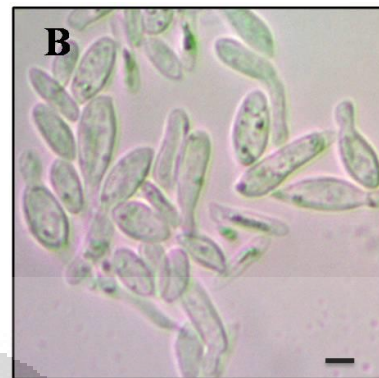
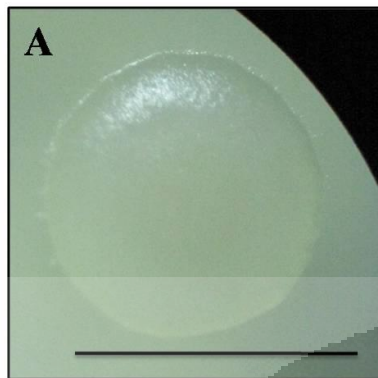
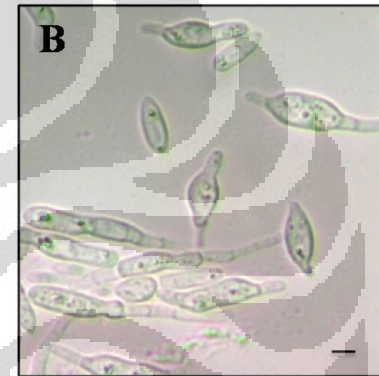
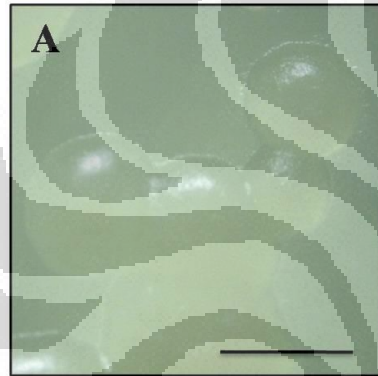
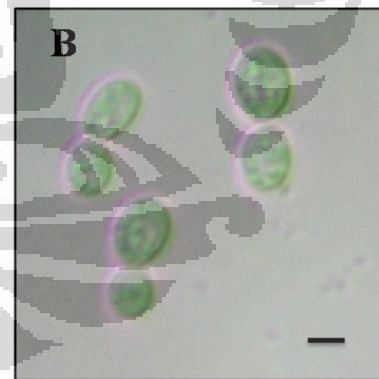
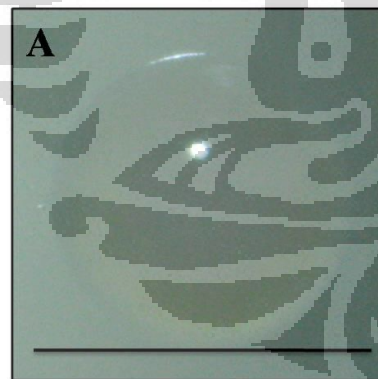
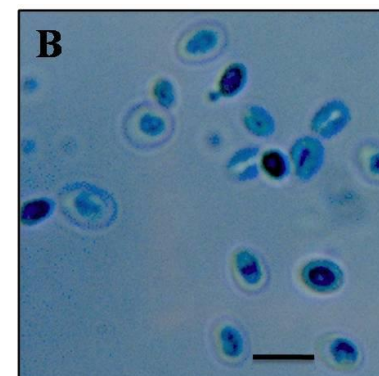
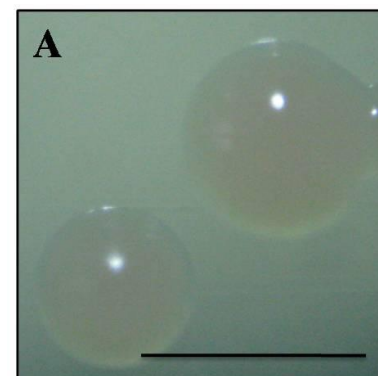
Lampiran I.3 (Lanjutan)

5. *Wickerhamomyces anomalus* UICC Y-4976. *Bullera sinensis* UICC Y-5097. *Cryptococcus rajasthanensis* UICC Y-4988. *Cryptococcus rajasthanensis* UICC Y-502

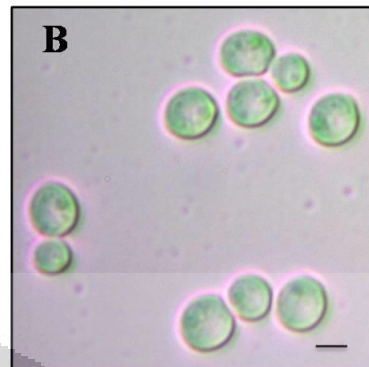
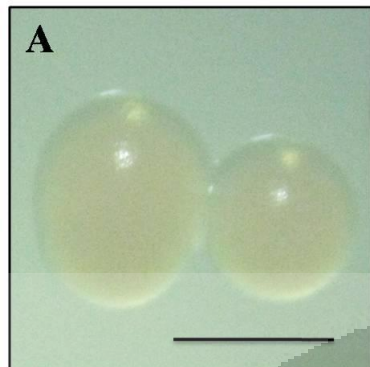
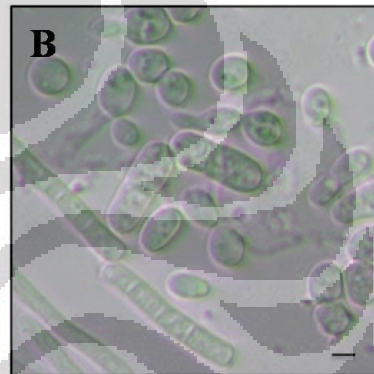
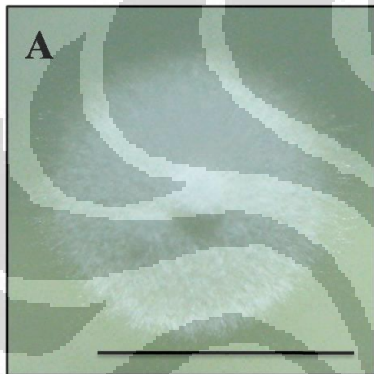
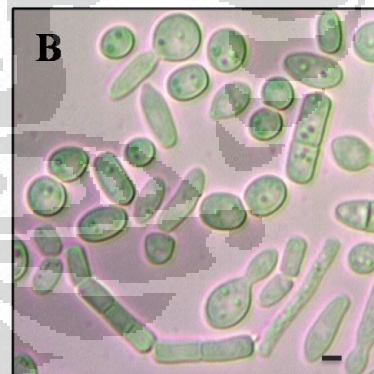
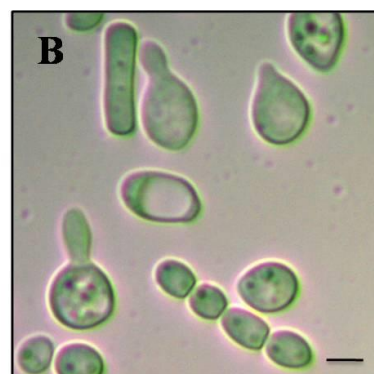
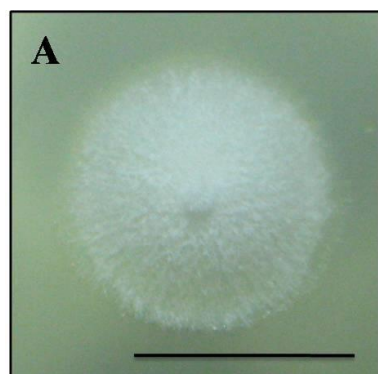
Lampiran I.3 (Lanjutan)

9. *Cryptococcus rajasthanensis* UICC Y-50410. *Hannaella kunmingensis* UICC Y-50811. *Hannaella zeae* UICC Y-51012. *Hannaella zeae* UICC Y-511

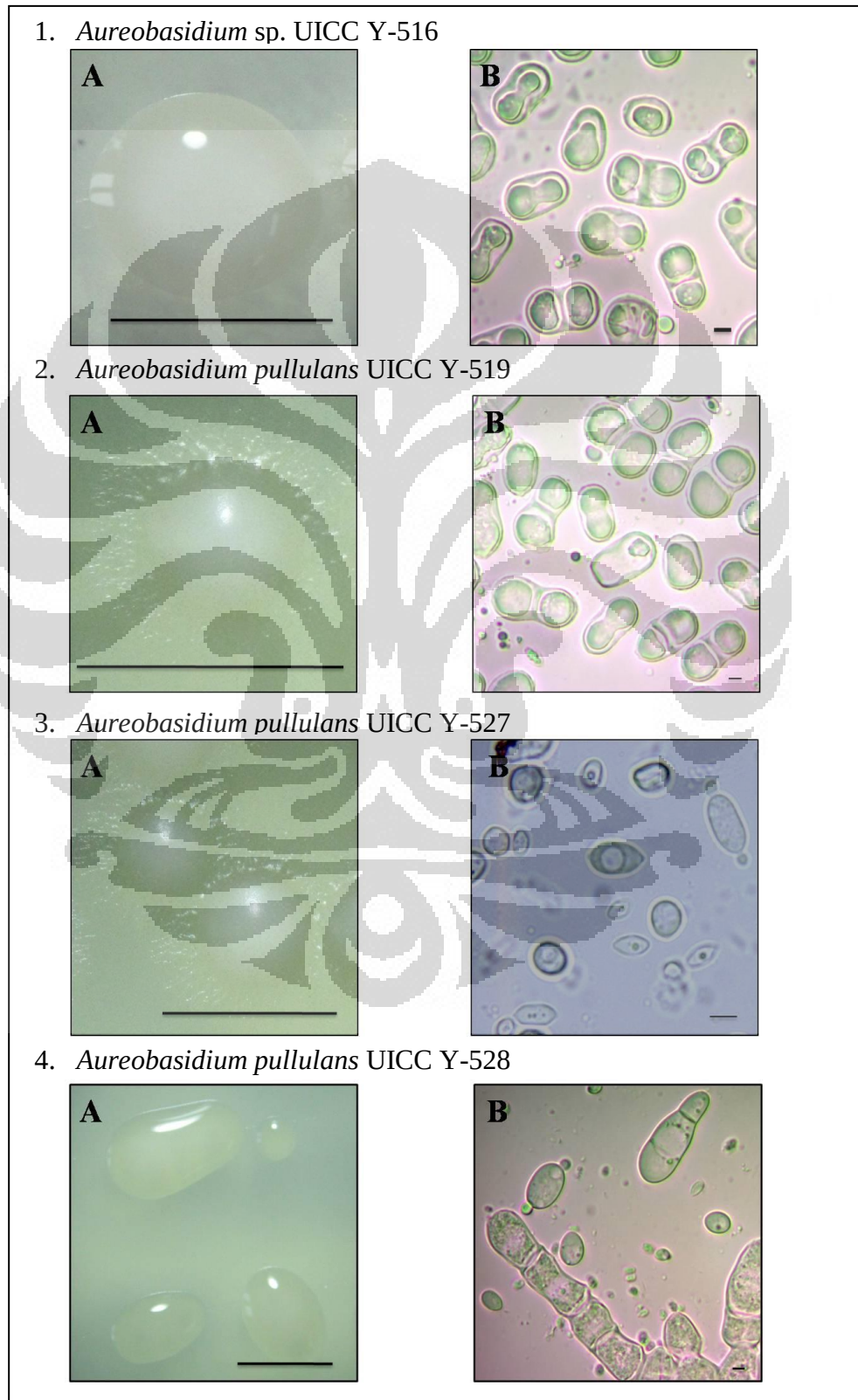
Lampiran I.3 (Lanjutan)

13. *Pseudozyma aphidis* UICC Y-50114. *Pseudozyma aphidis* UICC Y-51215. *Rhodotorula dairenensis* UICC Y-50016. *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-499

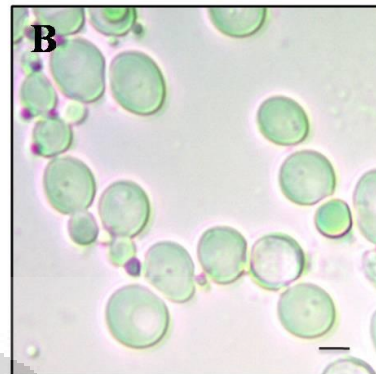
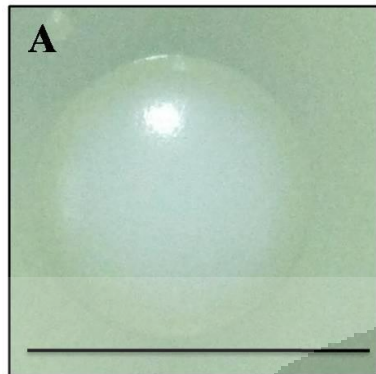
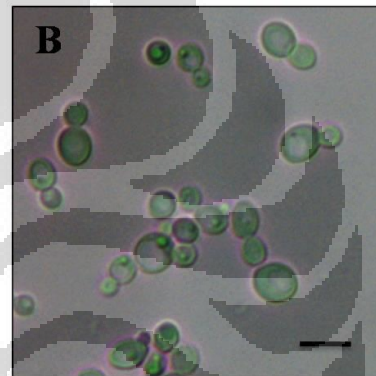
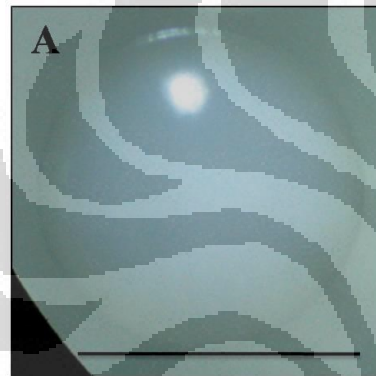
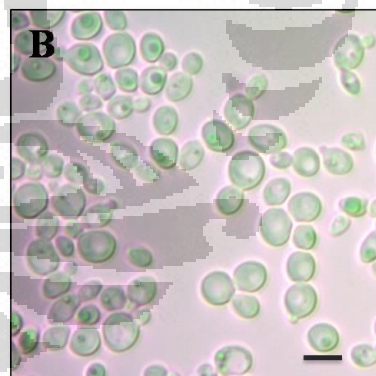
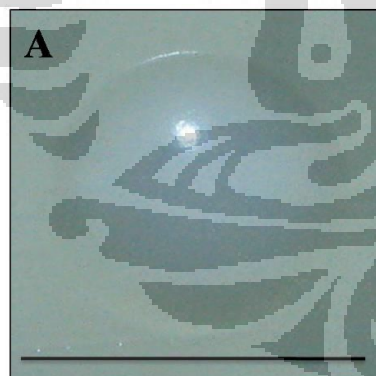
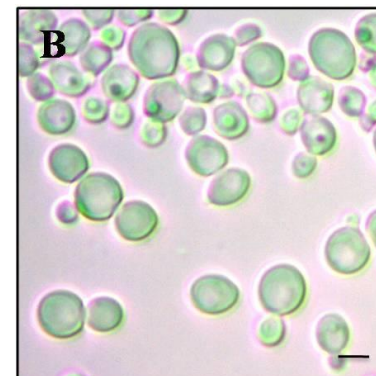
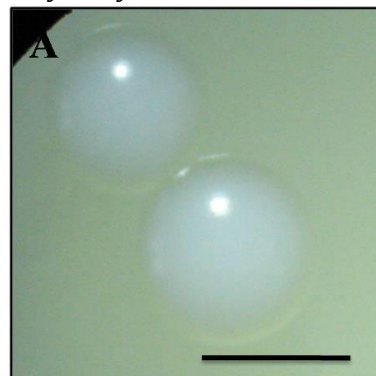
Lampian I.3 (Lanjutan)

17. *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-51318. *Trichosporon asahii* UICC Y-50519. *Trichosporon asahii* UICC Y-50620. *Trichosporon asahii* UICC Y-507

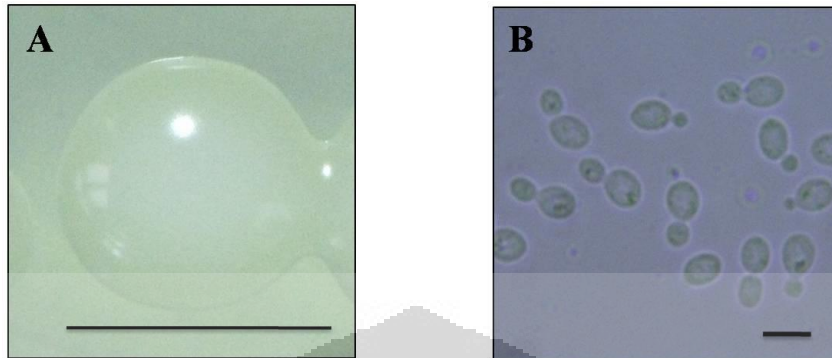
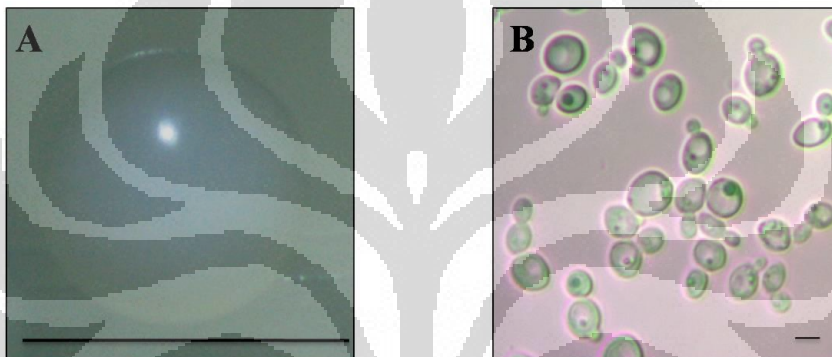
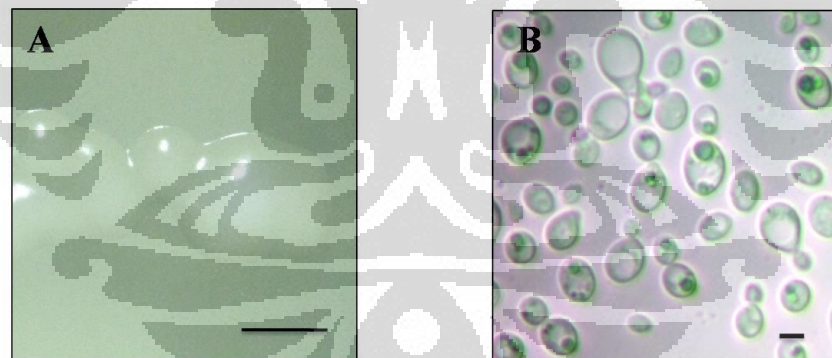
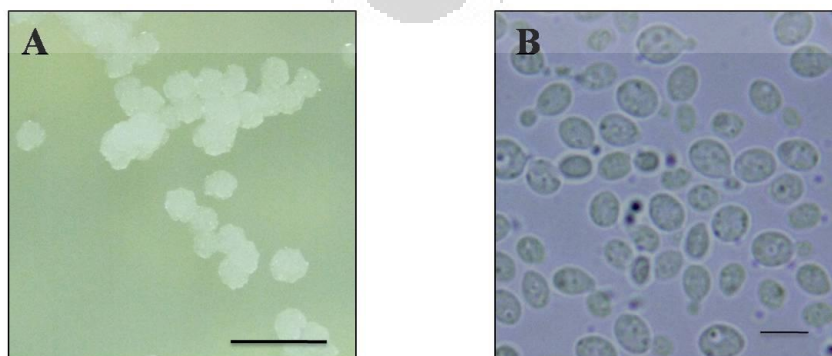
Lampiran I.4 Morfologi makroskopik isolat-isolat khamir dari tumbuhan *B. papyrifera* asal Desa Bejjong, Trowulan, Mojokerto, Jawa Timur pada medium YMA hari ke-3, serta morfologi mikroskopik pada medium YMB hari ke-3 pada suhu 28--30 °C. A. Morfologi makroskopik B. Morfologi mikroskopik. Skala garis pada koloni menunjukkan 1 mm. Skala garis mikroskopik menunjukkan 5 μ m.



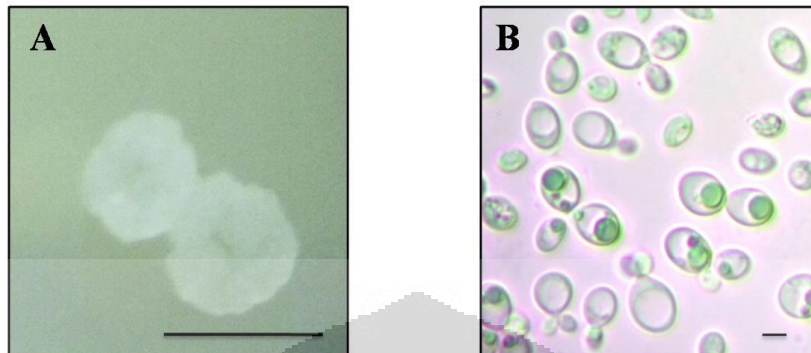
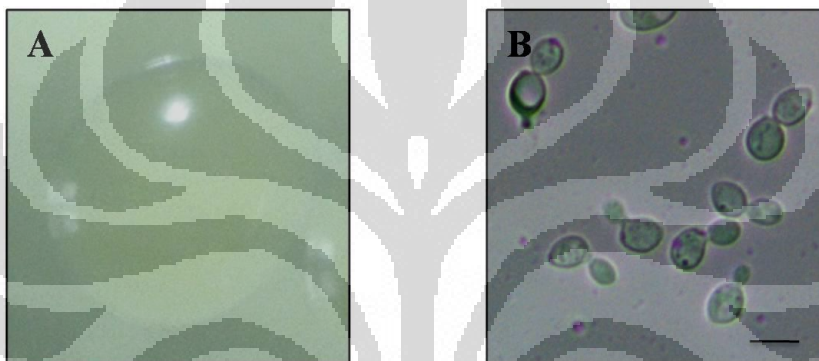
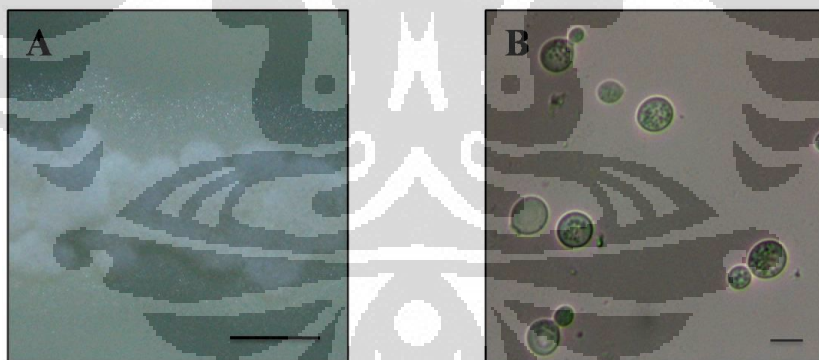
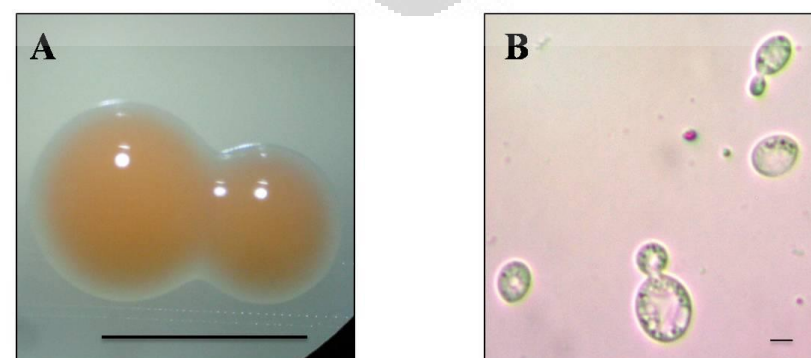
Lampiran I.4 (Lanjutan)

5. *Candida orthopsilosis* UICC Y-5336. *Meyerozyma caribbica* UICC Y-5177. *Meyerozyma caribbica* UICC Y-5188. *Meyerozyma caribbica* UICC Y-529

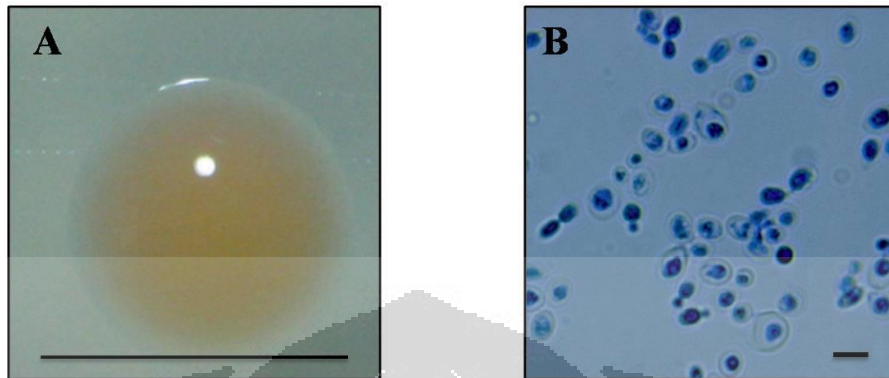
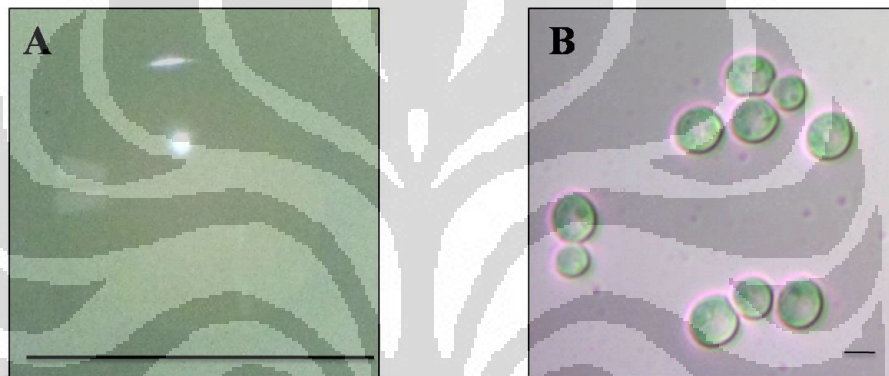
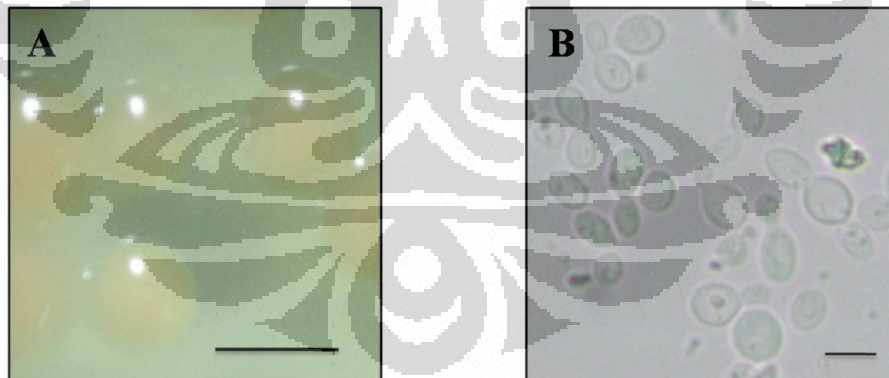
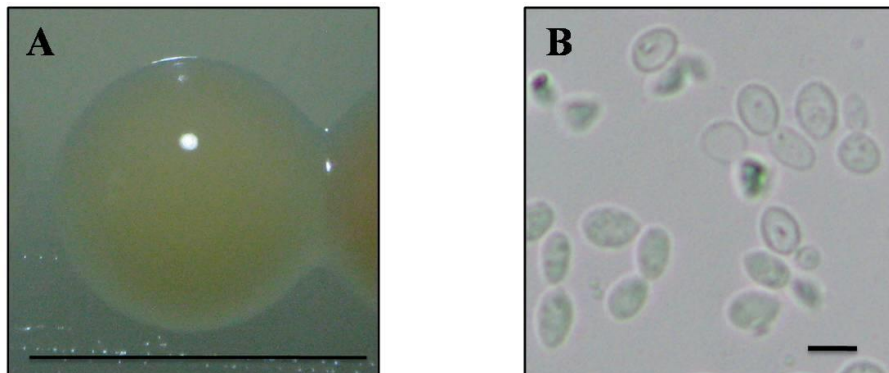
Lampiran I.4 (Lanjutan)

9. *Cryptococcus flavescens* UICC Y-51510. *Cryptococcus flavescens* UICC Y-52311. *Cryptococcus flavescens* UICC Y-52412. *Cryptococcus flavescens* UICC Y-525

Lampiran I.4 (Lanjutan)

13. *Cryptococcus flavescens* UICC Y-52614. *Cryptococcus flavus* UICC Y-53415. *Pseudozyma thailandica* UICC Y-53016. *Rhodotorula glutinis* UICC Y-520

Lampiran I.4 (Lanjutan)

17. *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-52118. *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-52219. *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-53120. *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-532

Lampiran I.5. Hasil pengamatan makroskopik 20 isolat khamir *phylloplane B. papyrifera* dari Desa Dago Pojok, Bandung, Jawa Barat pada medium YMA inkubasi pada suhu ruang (28--30 °C) selama 3 hari.

No.	Kode isolat	Kode UICC	Spesies terdekat hasil BLAST daerah ITS rDNA	Warna koloni	Permukaan koloni dan tekstur koloni	Profil dan tepi koloni
1	BD1S1.WM1.7	Y-453	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Putih	Licin, kusam; seperti mentega	Menggunung; rata
2	BD1S1.DM1	Y-454	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Merah muda	Licin, mengilap; berlendir	Menggunung; rata
3	BD1S1.DM5	Y-455	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Putih	Licin, kusam; seperti mentega	Menggunung; rata
4	BD1S1.WM1.5	Y-456	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	Putih	Licin, kusam; seperti mentega	Menggunung; rata
5	BD1S1.WM1.8	Y-457	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	Merah muda	Kering, kusam; seperti mentega	Menggunung; rata
6	BD1S2.WM1.2	Y-458	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	Krem	Licin, kusam; seperti mentega	Menggunung; rata
7	BD1S2.WM2.1	Y-459	<i>Pseudozyma aphidis</i>	Krem	Kering, kusam; kering	Bergelombang; seperti akar
8	BD2S2.WM1.3	Y-460	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Putih	Licin, kusam; seperti mentega	Menggunung; rata
9	BD2S2.WM1.6	Y-461	<i>Cryptococcus luteolus</i>	Krem	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
10	BD2S2.D1.15	Y-462	<i>Saccharomycetales</i> sp.	Putih	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
11	BD2D1.1.W1.20	Y-463	<i>Hannaella zeae</i>	Krem	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
12	BD2D1.1.W2.15	Y-464	<i>Hannaella zeae</i>	Krem	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
13	BD2S2.WM1.20	Y-465	<i>Hyphopichia burtonii</i>	Putih	Kusam; kering	Rata; berfilamen
14	BD2S2.WM2.4	Y-466	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Merah muda	Licin, kusam; seperti mentega	Menggunung; rata
15	BD2.D2.W.25	Y-467	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	Krem	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
16	BD2S2.WM1.32	Y-468	<i>Hyphopichia burtonii</i>	Putih	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; berfilamen

No.	Kode isolat	Kode UICC	Spesies terdekat hasil BLAST daerah ITS rDNA	Warna koloni	Permukaan koloni dan tekstur koloni	Profil dan tepi koloni
17	BD2S1.MF1.3	Y-469	<i>Candida quercitrusa</i>	Putih	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
18	BD2S1.D.11	Y-470	<i>Candida quercitrusa</i>	Putih	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
19	BD2S2 D.12	Y-471	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Putih	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
20	BD2S1.WM.34	Y-472	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Putih	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata

Lampiran I.6. Hasil pengamatan makroskopik 22 isolat khamir *phylloplane B. papyrifera* dari Desa Sukadanu, Garut, Jawa Barat pada medium YMA inkubasi pada suhu ruang (28--30 °C) selama 3 hari.

No.	Kode isolat	Kode UICC	Spesies terdekat hasil BLAST daerah ITS rDNA	Warna	Permukaan	Profil dan tepi koloni
1	SUK2S2.WM1.1	Y-473	<i>Candida metapsilosis</i>	Putih	Licin, kusam; seperti mentega	Menggunung; rata
2	SUK2S1.WM1.1	Y-474	<i>Candida metapsilosis</i>	Putih	Licin, kusam; seperti mentega	Menggunung; rata
3	SUK2S1.WM1	Y-475	<i>Candida pseudojiufengensis</i>	Putih	Kusam; seperti mentega	Rata; rata
4	SUK2S2.WM2.4	Y-476	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Merah muda	Licin, kusam; seperti mentega	Menggunung; rata
5	SUK2D2.2W1.13	Y-477	<i>Cryptococcus luteolus</i>	Krem	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
6	SUK2D2.2W1.15	Y-478	<i>Hannaella zeae</i>	Krem	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
7	SUK 2D2.1. W1.1	Y-479	<i>Cryptococcus</i> sp.	Krem	Licin, kusam; seperti mentega	Menggunung; rata
8	SUK2D2.2W1.14	Y-480	<i>Hanseniaspora thailandica</i>	Krem	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
9	SUK1.D2.2.W1.2	Y-481	<i>Hanseniaspora thailandica</i>	Putih	Licin, kusam; seperti mentega	Menggunung; rata
10	SUK1D1.2.W1.12	Y-482	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	Krem	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
11	SUK1D2.2.W1.7	Y-483	<i>Trichosporon asahii</i>	Putih	Kusam; seperti mentega	Rata; berfilamen
12	SUK1D2.2.W1.8	Y-484	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Putih	Kusam; seperti mentega	Menggunung; rata
13	SUK1D1.2.W1.4	Y-485	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Putih	Kusam; seperti mentega	Menggunung; rata
14	SUK1D2.1.W1.5	Y-486	<i>Cryptococcus luteolus</i>	Krem	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
15	SUK1D1.2.W1.8	Y-487	<i>Candida saopaulonensis</i>	Putih	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
16	SUK1D1.2.W1.16	Y-488	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Putih	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
17	SUK1S2.DM1	Y-489	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	Krem	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata

No.	Kode isolat	Kode UICC	Spesies terdekat hasil BLAST daerah ITS rDNA	Warna koloni	Permukaan koloni dan tekstur koloni	Profil dan tepi koloni
18	SUK2S2.DM2	Y-490	<i>Pichia veronae</i>	Krem	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
19	SUK1S2. DM.5	Y-491	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	Krem	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
20	SUK1D1.WM.8	Y-492	<i>Candida saopaulonensis</i>	Putih	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
21	SUK1D1.2.W1.20	Y-493	<i>Cryptococcus luteolus</i>	Krem	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
22	SUK2D1.2.W1.81	Y-494	<i>Candida saopaulonensis</i>	Putih	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata

Lampiran I.7. Hasil pengamatan makroskopik 20 isolat khamir *phylloplane B. papyrifera* dari Desa Tunggilis, Garut, Jawa Barat pada medium YMA inkubasi pada suhu ruang (28--30 °C) selama 3 hari.

No.	Kode isolat	Kode UICC	Spesies terdekat hasil BLAST daerah ITS rDNA	Warna	Permukaan dan tekstur koloni	Profil dan tepi koloni
1	T2S2.MF3	Y-495	<i>Geotrichum candidum</i>	Putih	Licin, kusam; seperti mentega	Rata; berfilamen
2	T2S2.WM1.4	Y-496	<i>Hypopichia burtonii</i>	Putih	Licin, kusam; seperti mentega	Menggunung; rata
3	T2S1.MF8	Y-497	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Putih	Licin, kusam; seperti mentega	Menggunung; rata
4	T2S2.WM2.9	Y-498	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	Krem	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
5	T2S1.MF6	Y-499	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Merah muda	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
6	T1S2.MF2.3	Y-500	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	Merah muda	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
7	T2S2.WM2.3	Y-501	<i>Pseudozyma aphidis</i>	Krem	Kering, kusam; kering	Bergelombang; seperti akar
8	T.D2.1W1	Y-502	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	Krem	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
9	T1S2.MF4	Y-503	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	Putih	Licin, kusam	Menggunung; rata
10	T1S1.WM1.3	Y-504	<i>Cryptococcus rajathanensis</i>	Krem	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
11	T1S1.MF2	Y-505	<i>Trichosporon asahii</i>	Putih	Kusam; seperti mentega	Rata; berfilamen
12	T1S2.MF	Y-506	<i>Trichosporon asahii</i>	Putih	Kusam; seperti mentega	Rata; berfilamen
13	T1S2.MF2	Y-507	<i>Trichosporon asahii</i>	Putih	Kusam; seperti mentega	Rata; berfilamen
14	T.D2.1.W1.1	Y-508	<i>Hannaella kunmingensis</i>	Krem	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
15	T.D1.2.W1	Y-509	<i>Bullera sinensis</i>	Kuning	Licin, kusam; seperti mentega	Menggunung; rata
16	T.D1.2.W1.2	Y-510	<i>Hannaella zeae</i>	Krem	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
17	T.D.1 W1.4	Y-511	<i>Hannaella zeae</i>	Krem	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata

No.	Kode isolat	Kode UICC	Spesies terdekat hasil BLAST daerah ITS rDNA	Warna koloni	Permukaan koloni dan tekstur koloni	Profil dan tepi koloni
18	T.D1.2.W1.12	Y-512	<i>Pseudozyma aphidis</i>	Krem	Kering, kusam; kering	Bergelombang
19	T.D1.2.W1.11	Y-513	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Merah muda	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
20	T.D1.2.W1.16	Y-514	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Putih	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata

Lampiran I.8. Hasil pengamatan makroskopik 20 isolat khamir *phylloplane B. papyrifera* dari Desa Trowulan, Mojokerto, Jawa Timur pada medium YMA inkubasi pada suhu ruang (28--30 °C) selama 3 hari.

No.	Kode isolat	Kode UICC	Spesies terdekat hasil BLAST daerah ITS rDNA	Warna	Permukaan dan tekstur koloni	Profil dan tepi koloni
1	TR1S1.WM 2.3	Y-515	<i>Cryptococcus flavescens</i>	Putih	Licin, mengilap; berlendir	Menggunung; rata
2	TR1S1.WM2.6	Y-516	<i>Aureobasidium</i> sp.	Merah muda kehitaman	Licin, kusam; kering	Rata; berfilamen
3	TR1S2.WM1.3	Y-517	<i>Meyerozyma caribbica</i>	Putih	Licin, kusam; seperti mentega	Menggunung; rata
4	TR1S2.WM1.5	Y-518	<i>Meyerozyma caribbica</i>	Putih	Licin, kusam; seperti mentega	Menggunung; rata
5	TR1S2.MF3.5	Y-519	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Merah muda kehitaman	Licin, kusam; kering	Rata; berfilamen
6	TR1S2.MF6.9	Y-520	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Merah muda kekuningan	Licin, mengilap; berlendir	Menggunung; rata
7	TR1S2.DW.1.3	Y-521	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Merah muda	Licin, kusam; seperti mentega	Menggunung; rata
8	TR1S1.WM.2.1	Y-522	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Merah muda	Licin, kusam; seperti mentega	Menggunung; rata
9	TR2S2.WM1.1	Y-523	<i>Cryptococcus flavescens</i>	Kream keputihan	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
10	TR2S1.WM1.11	Y-524	<i>Cryptococcus flavescens</i>	Kream keputihan	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
11	TR2S2.WM1	Y-525	<i>Cryptococcus flavescens</i>	Kream keputihan	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
12	TR2S1.WM1.3	Y-526	<i>Cryptococcus flavescens</i>	Kream keputihan	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
13	TR2S2.WM2.10	Y-527	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Merah muda kehitaman	Licin, kusam; kering	Rata; berfilamen
14	TR2S2.WM2.9	Y-528	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Merah muda kehitaman	Licin, kusam; kering	Rata; berfilamen
15	TR2S1.WM1.5	Y-529	<i>Meyerozyma caribbica</i>	Putih	Licin, kusam; seperti mentega	Menggunung; rata
16	TR2S1.WM1.51	Y-530	<i>Pseudozyma thailandica</i>	Merah muda kehitaman	Licin, kusam; seperti mentega	Bergelombang; berfilamen
17	TR2S1.DW1.1	Y-531	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Merah muda	Licin, kusam; seperti mentega	Menggunung; rata

No.	Kode isolat	Kode UICC	Spesies terdekat hasil BLAST daerah ITS rDNA	Warna koloni	Permukaan koloni dan tekstur koloni	Profil dan tepi koloni
18	TR2S1.DW1.2	Y-532	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Merah muda	Licin, kusam; seperti mentega	Menggunung; rata
19	TR1.D1.D.30	Y-533	<i>Candida orthopsilosis</i>	Putih	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata
20	TR2.D1.W1.11	Y-534	<i>Cryptococcus flavus</i>	kream kekuningan	Licin, mengilap; seperti mentega	Menggunung; rata

Lampiran I.9. Hasil pengamatan karakter mikroskopik spesies khamir umur 3 hari pada medium YMA inkubasi pada suhu ruang (28--30 °C).

No.	Nama Spesies	Kode UICC	Asal daerah sampling	Askospora	Bentuk sel	Kisaran ukuran sel (µm)		Tipe pertunasan	Susunan sel
						Lebar (µm)	Panjang (µm)		
1	<i>Candida quercitrusa</i>	Y-469	Dago Pojok, Bandung	-	Oval	3,01-4,14	3,89-5,52	Multipolar	Tunggal, berpasangan
2	<i>Candida quercitrusa</i>	Y-470	Dago Pojok, Bandung	-	Oval	2,04-4,76	3,76-6,75	Multipolar	Tunggal, berpasangan
3	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	Y-456	Dago Pojok, Bandung	+	Oval	2,57-4,76	2,88-4,63	Multipolar	Tunggal, berpasangan
4	<i>Hyphopichia burtonii</i>	Y-465	Dago Pojok, Bandung	+	Oval	3,01-4,67	4,7-6,11	Multipolar	Tunggal, berpasangan, berantai
5	<i>Hyphopichia burtonii</i>	Y-468	Dago Pojok, Bandung	+	Oval	3,81-6,02	4,38-6,01	Multipolar	Tunggal, berpasangan
6	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Y-471	Dago Pojok, Bandung	+	Oval	3,63-5,19	4,16-5,26	Multipolar	Tunggal, berpasangan
7	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Y-472	Dago Pojok, Bandung	+	Oval	2,57-4,16	3,72-6,18	Multipolar	Tunggal, berpasangan
8	<i>Saccharomycetales</i> sp.	Y-462	Dago Pojok, Bandung	+	Oval	2,88-5,66	3,5-6,31	Multipolar	Tunggal, berpasangan
9	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Y-453	Dago Pojok, Bandung	+	Bulat hingga oval	2,29-4,92	3,89-5,72	Multipolar	Tunggal, berpasangan, berantai
10	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Y-455	Dago Pojok, Bandung	+	Bulat hingga oval	2,53--5,9	3,91-6,72	Multipolar	Tunggal, berpasangan, berantai
11	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Y-460	Dago Pojok, Bandung	+	Bulat hingga oval	3,25-4,69	4,27-6,13	Multipolar	Tunggal, berpasangan, berantai

No.	Nama Spesies	Kode UICC	Asal daerah sampling	Askospora	Bentuk sel	Kisaran ukuran sel (µm)		Tipe pertunasan	Susunan sel
						Lebar (µm)	Panjang (µm)		
12	<i>Cryptococcus luteolus</i>	Y-461	Dago Pojok, Bandung	-	Oval	3,21-4,42	4,73-6,02	Multipolar	Tunggal, berpasangan
13	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	Y-458	Dago Pojok, Bandung	-	Oval	3,17-4,07	4,18-6,94	Multipolar	Tunggal, berpasangan
14	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	Y-467	Dago Pojok, Bandung	-	Oval	5,84-9,64	6,73-12,83	Multipolar	Tunggal, berpasangan
15	<i>Hannaella zeae</i>	Y-463	Dago Pojok, Bandung	-	Oval	3,62-5,04	4,87-7,26	Multipolar	Tunggal, berpasangan
16	<i>Hannaella zeae</i>	Y-464	Dago Pojok, Bandung	-	Oval	3,81-5,22	4,92-7,64	Multipolar	Tunggal, berpasangan
17	<i>Pseudozyma aphidis</i>	Y-459	Dago Pojok, Bandung	-	Oval, silindris	4,12-9,82	11,87-32,24	Multipolar	Tunggal, berpasangan, berantai
18	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	Y-457	Dago Pojok, Bandung	-	Oval	7,32-12,14	8,39-18,76	Multipolar	Tunggal, berpasangan
19	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Y-454	Dago Pojok, Bandung	-	Oval	6,32-11,95	10,05-16,08	Multipolar	Tunggal, berpasangan
20	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Y-466	Dago Pojok, Bandung	-	Oval	7,6-12,57	9,07-15,89	Multipolar	Tunggal, berpasangan
21	<i>Candida metapsilosis</i>	Y-473	Sukadanu, Garut	-	Bulat hingga oval	2,88-4,51	3,38-5,76	Multipolar	Tunggal, berpasangan
22	<i>Candida metapsilosis</i>	Y-474	Sukadanu, Garut	-	Bulat hingga oval	3,88-5,05	3,75-6,49	Multipolar	Tunggal, berpasangan
23	<i>Candida pseudojiufengensis</i>	Y-475	Sukadanu, Garut	-	Oval	3,89-6,9	3,72-7,08	Multipolar	Tunggal, berpasangan

No.	Nama Spesies	Kode UICC	Asal daerah sampling	Askospora	Bentuk sel	Kisaran ukuran sel (µm)		Tipe pertunasan	Susunan sel
						Lebar (µm)	Panjang (µm)		
24	<i>Candida saopaulonensis</i>	Y-494	Sukadanu, Garut	-	Oval	3,23-4,39	3,52-5,99	Multipolar	Tunggal, berpasangan
25	<i>Candida saopaulonensis</i>	Y-487	Sukadanu, Garut	-	Oval	3,13-4,69	2,82-4,69	Multipolar	Tunggal, berpasangan
26	<i>Candida saopaulonensis</i>	Y-492	Sukadanu, Garut	-	Oval	3,13-4,69	2,82-4,69	Multipolar	Tunggal, berpasangan
27	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Y-488	Sukadanu, Garut	+	Bulat hingga oval	2,48-3,1	2,21-3,98	Multipolar	Tunggal, berpasangan
28	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Y-484	Sukadanu, Garut	-	Lemon	3,63-5,14	3,72-5,69	Multipolar	Tunggal, berpasangan
29	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Y-485	Sukadanu, Garut	-	Lemon	3,13-4,69	3,62-5,78	Multipolar	Tunggal, berpasangan
30	<i>Pichia veronae</i>	Y-490	Sukadanu, Garut	-	Oval	2,74-3,29	3,1-6,24	Multipolar	Tunggal, berpasangan
31	<i>Cryptococcus</i> sp.	Y-479	Sukadanu, Garut	-	Oval	3,64-4,87	4,01-5,88	Multipolar	Tunggal, berpasangan
32	<i>Cryptococcus luteolus</i>	Y-477	Sukadanu, Garut	-	Oval	2,88-4,87	3,31-6,55	Multipolar	Tunggal, berpasangan
33	<i>Cryptococcus luteolus</i>	Y-486	Sukadanu, Garut	-	Oval	3,81-4,72	5,05-6,62	Multipolar	Tunggal, berpasangan
34	<i>Cryptococcus luteolus</i>	Y-493	Sukadanu, Garut	-	Oval	3,86-4,85	4,54-5,63	Multipolar	Tunggal, berpasangan
35	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	Y-491	Sukadanu, Garut	-	Oval	3,95-4,07	4,26-6,51	Multipolar	Tunggal, berpasangan

No.	Nama Spesies	Kode UICC	Asal daerah sampling	Askospora	Bentuk sel	Kisaran ukuran sel (µm)		Tipe pertunasan	Susunan sel
						Lebar (µm)	Panjang (µm)		
36	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	Y-482	Sukadanu, Garut	-	Oval	3,98-5,58	3,72-6,46	Multipolar	Tunggal, berpasangan
37	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	Y-489	Sukadanu, Garut	-	Oval	2,38-3,14	4,07-5,39	Multipolar	Tunggal, berpasangan
38	<i>Hannaella zeae</i>	Y-478	Sukadanu, Garut	-	Oval	3,42-5,24	5,77-6,26	Multipolar	Tunggal, berpasangan
39	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Y-476	Sukadanu, Garut	-	Oval	3,89-11,68	4,12-5,25	Multipolar	Tunggal, berpasangan
40	<i>Trichosporon asahii</i>	Y-483	Sukadanu, Garut	-	Silindris	2,83-3,39	3,45-7,07	Multipolar	Tunggal, berpasangan, berantai
41	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	Y-503	Tunggilis, Garut	+	Oval	3,47-4,26	2,78-4,51	Multipolar	Tunggal, berpasangan
42	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Y-514	Tunggilis, Garut	+	Bulat semi bulat	3,14-4,12	3,88-5,15	Multipolar	Tunggal, berpasangan
43	<i>Geotrichum candidum</i>	Y-495	Tunggilis, Garut	-	Silindris	9,56-16,55	11,51-25,66	Multipolar	Tunggal, berpasangan, berantai
44	<i>Hyphopichia burtonii</i>	Y-496	Tunggilis, Garut	+	Oval	3,54-5,84	3,63-5,97	Multipolar	Tunggal, berpasangan, berantai
45	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Y-497	Tunggilis, Garut	+	Bulat hingga oval	3,76-6,13	4,13-6,88	Multipolar	Tunggal, berpasangan, berantai
46	<i>Bullera sinensis</i>	Y-509	Tunggilis, Garut	-	Oval	9,29-10,68	13,54-24,52	Multipolar	Tunggal, berpasangan, berantai
47	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	Y-502	Tunggilis, Garut	-	Oval	2,52-4,02	3,65-5,93	Multipolar	Tunggal, berpasangan

No.	Nama Spesies	Kode UICC	Asal daerah sampling	Askospora	Bentuk sel	Kisaran ukuran sel (µm)		Tipe pertunasan	Susunan sel
						Lebar (µm)	Panjang (µm)		
48	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	Y-498	Tunggilis, Garut	-	Oval	3,45-4,77	5,63-6,67	Multipolar	Tunggal, berpasangan
49	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	Y-504	Tunggilis, Garut	-	Oval	2,17-3,66	4,76-6,68	Multipolar	Tunggal, berpasangan
50	<i>Hannaella kunmingensis</i>	Y-508	Tunggilis, Garut	-	Oval	3,98-4,34	3,31-5,13	Multipolar	Tunggal, berpasangan
51	<i>Hannaella zeae</i>	Y-510	Tunggilis, Garut	-	Oval	4,76-5,13	5,32-7,7	Multipolar	Tunggal, berpasangan
52	<i>Hannaella zeae</i>	Y-511	Tunggilis, Garut	-	Oval	3,32-3,89	4,26-6,66	Multipolar	Tunggal, berpasangan
53	<i>Pseudozyma aphidis</i>	Y-501	Tunggilis, Garut	-	Oval, silindris	4,04-4,32	12,59-20,93	Multipolar	Tunggal, berpasangan, berantai
54	<i>Pseudozyma aphidis</i>	Y-512	Tunggilis, Garut	-	Oval, silindris	3,54-6,03	11,2-20,6	Multipolar	Tunggal, berpasangan, berantai
55	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	Y-500	Tunggilis, Garut	-	Oval	2,32-3,77	4,12-5,81	Multipolar	Tunggal, berpasangan
56	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Y-499	Tunggilis, Garut	-	Oval	2,94-5,04	3,9-6,11	Multipolar	Tunggal, berpasangan
57	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Y-513	Tunggilis, Garut	-	Oval	2,79-4,29	4,35-5,93	Multipolar	Tunggal, berpasangan
58	<i>Trichosporon asahii</i>	Y-506	Tunggilis, Garut	-	Silindris	2,14-5,36	11,42-19,91	Multipolar	Tunggal, berpasangan, berantai
59	<i>Trichosporon asahii</i>	Y-505	Tunggilis, Garut	-	Silindris	6,83-8,94	9,19-14,14	Multipolar	Tunggal, berpasangan, berantai

No.	Nama Spesies	Kode UICC	Asal daerah sampling	Askospora	Bentuk sel	Kisaran ukuran sel (µm)		Tipe pertunasan	Susunan sel
						Lebar (µm)	Panjang (µm)		
60	<i>Trichosporon asahii</i>	Y-507	Tunggilis, Garut	-	Silindris	2,58- 4,67	6,89-13,67	Multipolar	Tunggal, berpasangan, berantai
61	<i>Aureobasidium</i> sp.	Y-516	Trowulan, Mojokerto	-	Oval	4,72-8,56	4,64-9,65	Multipolar	Tunggal
62	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Y-527	Trowulan, Mojokerto	-	Oval	3,72-9,56	4,84-11,65	Multipolar	Tunggal
63	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Y-528	Trowulan, Mojokerto	-	Oval	6,29-28,28	16,22-37,19	Multipolar	Tunggal
64	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Y-519	Trowulan, Mojokerto	-	Oval	12,57-15,49	15,59-25,84	Multipolar	Tunggal
65	<i>Candida orthopsilosis</i>	Y-533	Trowulan, Mojokerto	-	Bulat hingga oval	3,13-5,74	4,8-6,66	Multipolar	Tunggal atau berkelompok
66	<i>Meyerozyma caribbica</i>	Y-517	Trowulan, Mojokerto	-	Bulat hingga oval	3,27-4,25	3,98-5,58	Multipolar	Tunggal, berantai, atau berkelompok
67	<i>Meyerozyma caribbica</i>	Y-518	Trowulan, Mojokerto	-	Bulat hingga oval	3,02-5,03	4,89-5,62	Multipolar	Tunggal, berantai, atau berkelompok
68	<i>Meyerozyma caribbica</i>	Y-529	Trowulan, Mojokerto	-	Bulat hingga oval	2,58-3,84	4,17-5,95	Multipolar	Tunggal, berantai, atau berkelompok
69	<i>Cryptococcus flavescens</i>	Y-524	Trowulan, Mojokerto	-	Oval	3,26-4,95	4,38-5,49	Multipolar	Tunggal dan berpasangan
70	<i>Cryptococcus flavescens</i>	Y-525	Trowulan, Mojokerto	-	Oval	3,63-5,66	4,26-6,37	Multipolar	Tunggal dan berpasangan
71	<i>Cryptococcus flavescens</i>	Y-526	Trowulan, Mojokerto	-	Oval	3,35-4,71	4,56-5,76	Multipolar	Tunggal dan berpasangan

No.	Nama Spesies	Kode UICC	Asal daerah sampling	Askospora	Bentuk sel	Kisaran ukuran sel (µm)		Tipe pertunasan	Susunan sel
						Lebar (µm)	Panjang (µm)		
72	<i>Cryptococcus flavescens</i>	Y-515	Trowulan, Mojokerto	-	Oval	3,38-3,98	3,89-5,22	Multipolar	Tunggal dan berpasangan
73	<i>Cryptococcus flavescens</i>	Y-523	Trowulan, Mojokerto	-	Oval	3,56-4,89	3,89-5,74	Multipolar	Tunggal dan berpasangan
74	<i>Cryptococcus flavus</i>	Y-534	Trowulan, Mojokerto	-	Oval	3,25-5,49	3,92-5,7	Multipolar	Tunggal dan berpasangan
75	<i>Pseudozyma thailandica</i>	Y-530	Trowulan, Mojokerto	-	Oval, silindris	4,54-6,33	10,2-15,6	Multipolar	Tunggal dan berpasangan
76	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Y-520	Trowulan, Mojokerto	-	Oval	3,41-4,34	4,14-5,77	Multipolar	Tunggal, berpasangan
77	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Y-522	Trowulan, Mojokerto	-	Oval	2,14-3,09	4,17-5,86	Multipolar	Tunggal, berpasangan
78	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Y-521	Trowulan, Mojokerto	-	Oval	3,45-4,34	3,72-5,4	Multipolar	Tunggal, berpasangan
79	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Y-531	Trowulan, Mojokerto	-	Oval	3,32-7,08	4,25-7,26	Multipolar	Tunggal, berpasangan
80	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Y-532	Trowulan, Mojokerto	-	Oval	3,55-6,24	3,62-5,45	Multipolar	Tunggal, berpasangan

MAKALAH II

KEMAMPUAN ANTAGONISTIK KHAMIR ASAL TUMBUHAN SAEH (*Broussonetia papyrifera* (L.) L' Her. ex Vent.) DARI JAWA BARAT, TERHADAP KAPANG PADA BUAH TOMAT (*Lycopersicon esculentum* Mill.) PASCAPANEN DAN POTENSINYA SEBAGAI AGENS BIOKONTROL

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF YEASTS FROM PAPER MULBERRY OR SAEH PLANT (*Broussonetia papyrifera* (L.) L' Her. ex Vent.) FROM WEST JAVA AND THEIR POTENTIAL AS BIOCONTROL AGENTS AGAINST MOULDS FROM POST-HARVEST TOMATO (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Dalia Sukmawati

ABSTRACT

One of the most commonly found diseases in tomato (*Lycopersicon esculentum*) is fruit rot. This study was aimed to isolate and identify moulds from rotten post-harvest tomatoes, and to investigate the phylloplane yeasts from paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) to antagonize moulds which cause tomato fruit rot. A total of 46 mould isolates were obtained. After the pathogenicity test, three representative mould isolates were selected and identified based on the sequence analyses of internal transcribed spacer (ITS) regions of rDNA. The moulds were identified as: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., and *Syncephalastrum racemosum* Cohn. Growth and sporulation of the moulds were inhibited for 15 days by six antagonistic yeasts, i.e. *Candida saopaulonensis* UICC Y-492, *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475, *Debaryomyces hansenii* UICC Y-488, *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-476, *Geotrichum candidum* UICC Y-495, and *Hyphopichia burtonii* UICC Y-496. The antagonistic yeasts were tested for their abilities to inhibit growth of *A. alternata* and *L. theobromae* which cause fruit rot on post-harvest tomatoes at 26--28 °C for 15 days. *Candida pseudojiufengensis* UICC Y-475 was able to inhibit growth of *A. alternata* and reduce fruit rot symptoms in tomato fruit (100%). *Candida saopaulonensis* UICC Y-492 and *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 were able to reduce growth of *L. theobromae* and reduce fruit rot symptoms in tomato fruit (67%).

Keywords: Antagonism, pathogenicity, fruit rot, tomato, yeast

PENDAHULUAN

Khamir dapat ditemukan di berbagai habitat di alam. Salah satu habitat khamir adalah permukaan daun. Kelompok khamir yang mempunyai habitat di permukaan daun disebut khamir *phylloplane* (Fonseca & Inacio, 2006). Daun menyediakan nutrisi berupa eksudat dan hasil gutasi yang mengandung gula, asam amino, hormon tumbuhan, vitamin, dan mineral (Deak, 2008).

Di alam, khamir memiliki kemampuan melakukan interaksi antagonisme (Batzing, 2002). Menurut Lima dkk. (1999) kemampuan melakukan interaksi dalam menghambat atau membunuh mikroorganisme lain disebut sebagai kemampuan antagonistik. Khamir yang memiliki kemampuan antagonistik disebut sebagai khamir antagonis (Golubev, 2006).

Mekanisme antagonisme pada khamir dapat terjadi secara antibiosis, parasitisme, kompetisi nutrisi, dan kompetisi ruang (Spadaro & Gulliano, 2004). Beberapa peneliti telah melaporkan mengenai khamir antagonis yang diisolasi dari permukaan buah dan tanaman. Tian dkk. (2006) melaporkan *C. laurentii* yang diisolasi dari permukaan buah apel memiliki kemampuan menghambat germinasi spora dan pertumbuhan *germ tube* kapang patogen *Penicillium expansum* dan *A. alternata* selama inkubasi 12 jam pada medium *potato dextrose broth*. Nallya dkk. (2012) melaporkan khamir *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulasporea*, dan *Schizosaccharomyces* yang diisolasi dari permukaan tanaman anggur menghasilkan senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan miselium *Botrytis cinerea*. Jijakli dan Lepoivre (1997) melaporkan *P. anomala* menghasilkan β -1,3-glukanase yang dapat merusak dinding sel kapang *Bot. cinerea*. Alamri dan Hashem (2009) melaporkan khamir *P. anomala* Moh. 93 menempel pada hifa kapang *Botryodiplodia theobromae* (Lat.) (*L. theobromae*) kemudian menghasilkan enzim selulase dan pectinase untuk mendegradasi dinding sel kapang. Pelekatan sel khamir pada hifa kapang dapat menyebabkan terhambatnya pertumbuhan hifa dan sporulasi pada kapang.

Khamir antagonis berpotensi sebagai agens biokontrol (Marri & Guizzardi, 1997; Druvefors, 2004). Menurut Druvefors dkk. (2005) biokontrol adalah penggunaan mikroorganisme antagonis yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme lainnya yang diaplikasikan pada substrat seperti buah pascapanen.

Potensi khamir sebagai agens biokontrol dapat diketahui dengan melakukan pengujian secara *in vivo* pada produk pascapanen. Chanchaichaovivat dkk. (2007) melaporkan kemampuan *P. guilliermondii* strain R13 sebagai agens biokontrol pada buah cabai yang terserang *Colletotrichum capsici*. *Pichia guilliermondii* strain R13 dapat mengurangi pertumbuhan miselium kapang *Col. capsici* di buah cabai sebesar 6,5% dibandingkan dengan buah cabai yang tidak diinokulasikan dengan suspensi sel khamir. Kalogiannis dkk. (2006) melaporkan kemampuan *Rhodotorula glutinis* Y-44 sebagai agens biokontrol *Bot. cinerea* pada tomat. *Rhodotorula glutinis* Y-44 dapat mereduksi perluasan luka sebesar 50% pada buah tomat yang telah direndam dengan suspensi sel khamir *Rh. glutinis* Y-44, dibandingkan dengan buah tomat yang tidak direndam dengan suspensi sel khamir.

Tomat segar merupakan salah satu jenis buah yang baik bagi kesehatan manusia (Andersen & Frisvad, 2004; Arie, dkk., 2007). Charli dkk. (2011) melaporkan bahwa buah tomat mengandung vitamin A, vitamin C, karbohidrat, protein, dan lemak. Buah tomat juga mengandung pigmen karotenoid, yaitu *lycopene* yang berkhasiat mencegah kanker leher rahim, prostat, pankreas, kandung kemih, dan kulit (Mahovic dkk., 2004). Saat ini, konsumsi buah tomat semakin tinggi seiring meningkatnya kesadaran masyarakat terhadap kesehatan.

Tingginya permintaan dan kebutuhan masyarakat Indonesia terhadap tomat mengakibatkan sentra penanaman tomat menyebar hampir di seluruh pelosok Nusantara. Beberapa sentra tomat antara lain Lembang (Jawa Barat), Malang (Jawa Timur), dan Lampung. Sentra penanaman tomat antara lain menghasilkan 293.988 ton/tahun (Jawa Barat), 61.838 ton/tahun (Jawa Timur), 65.313 ton/tahun (Sumatera Barat) (Direktorat Jenderal Bina Produksi Hortikultura Departemen Pertanian, 2002; Badan Pusat Statistik dan Direktorat Jenderal Hortikultura, 2011).

Salah satu penyebab penurunan kualitas tomat saat pascapanen, terutama pada saat pemilahan dan pengemasan. Sonoda dkk. (1981) melaporkan pengemasan dan penyimpanan menyebabkan kerusakan berupa luka pada kulit buah tomat, dan menyebabkan kapang patogen dapat tumbuh pada tomat. Saeed dan Khan (2010) melaporkan kerusakan buah saat pemilahan dapat mencapai hingga 30%.

Kapang patogen dari tomat pascapanen di Ohio telah diidentifikasi sebagai *Col. acutatum*, *Col. dematium*, *Col. coccodes*, *Fusarium culmorum*, *Fus. oxysporum*, *Fus. sporotrichioides*, *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, dan *A. infectoria* menggunakan daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) pada daerah *noncoding ribosomal DNA*. Primer yang digunakan untuk amplifikasi daerah ITS rDNA adalah ITS5 (*forward*) dan ITS4 (*reverse*) (Laura dkk. 2006). *Colletotrichum coccodes*, *Col. dermatum*, dan *Col. gloeosporioides* yang tumbuh pada luka di buah tomat dapat menyebabkan kebusukan. Gejala kebusukan diperlihatkan dengan adanya lingkaran berbentuk cekung, berwarna hitam karena pertumbuhan kapang, dan sebagian miselium berwarna merah muda (Wani, 2011). *Colletotrichum coccodes* menyebabkan luka pada permukaan tomat menjadi berwarna hitam disertai lingkaran cekung (Kutama & Mohammed, 2007). *Colletotrichum gloeosporioides*, *L. theobromae*, *A. alternata*, dan *Aspergillus niger* menyebabkan kebusukan pada buah mangga di pasar tradisional Punjab. Pada permukaan kulit buah mangga yang busuk menunjukkan adanya luka berwarna hitam dengan lingkaran cekung (Merr dkk. 2013).

Penanggulangan kapang patogen pada tanaman dan buah tomat dapat dilakukan dengan penggunaan fungisida sintetis. Akan tetapi, penggunaan fungisida dapat menyebabkan kapang menjadi resisten, menimbulkan kerusakan pada lingkungan, dan mengganggu kesehatan manusia dan hewan (Zhao dkk., 2008). Oleh karena itu, diperlukan alternatif penanggulangan kapang yang aman bagi kesehatan manusia dan lingkungan. Salah satu cara yang dapat dilakukan adalah dengan memanfaatkan khamir yang memiliki kemampuan antagonistik (Druvefors, 2004).

Khamir asal daun *B. papyrifera* belum diketahui kemampuannya sebagai antagonis terhadap kapang penyebab kebusukan pada buah tomat pascapanen, dan belum diketahui potensinya sebagai agens biokontrol kapang penyebab kebusukan pada buah tomat pascapanen.

Penelitian bertujuan mengisolasi dan mengidentifikasi kapang penyebab kebusukan pada buah tomat pascapanen, memperoleh khamir asal daun *B. papyrifera* yang memiliki kemampuan antagonistik dan memperoleh khamir yang berpotensi sebagai agens biokontrol kapang penyebab kebusukan pada buah tomat pascapanen.

LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium mikrobiologi, Departemen Biologi FMIPA-UI Depok; Laboratorium *Center of Excellence for Indigenous Biological Resources-Genome Studies* (CoE IBR-GS), FMIPA UI, Depok; dan Laboratorium Mikrobiologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong. Penelitian berlangsung selama 10 bulan (Januari --November, 2012).

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

1. Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan dari Merck yaitu gliserol, glukosa, dan trehalosa. Bahan kimia dari Promega adalah agarosa, EDTA, *pellet paint*, DNA ladder 100 pb, *loading dye*, *nuclease free water* (NFW), dan *tris-acetate* EDTA (TAE) *buffer* 10x. Primer yang digunakan adalah primer *forward* ITS5 (10 µM) (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') dan primer *reverse* ITS4 (10 µM) (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). DNA Extraction Kit PHYTOPURE (GE Healthcare). Medium yang digunakan untuk pemeliharaan isolasi dan pemurnian khamir adalah *yeast malt agar* (YMA, Difco). Medium untuk isolasi,

pemurnian, dan pemeliharaan kapang adalah *potato dextrose agar* (PDA, Difco), *potato dextrose broth* (PDB, Difco).

2. Sampel buah tomat

Penelitian menggunakan buah tomat busuk dan buah tomat segar. Tomat busuk digunakan untuk memperoleh isolat-isolat kapang yang berpotensi menyebabkan kebusukan pada buah tomat. Tomat segar digunakan untuk pengujian patogenitas dan pengujian biokontrol.

3. Khamir

Khamir yang digunakan untuk pengujian antagonisme dan biokontrol adalah khamir-khamir koleksi Universitas Indonesia *Culture Collection* (UICC), Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia yang merupakan hasil isolasi dari permukaan daun *B. papyrifera* asal Desa Sukadanu, Garut (Jawa Barat) dan Desa Tunggilis, Garut (Jawa Barat) (Tabel II.1.). Khamir-khamir dari Bandung dan Trowulan tidak diujikan pada penelitian ini karena telah digunakan oleh peneliti lain.

Tabel II.1. Spesies khamir yang digunakan untuk uji antagonisme

No	Species	Kode UICC	Lokasi pengambilan sampel
1	<i>Bullera sinensis</i>	Y-509	Tunggilis, Garut, Jawa Barat
2	<i>Candida metapsilosis</i>	Y-473, Y-474	Sukadanu, Garut, Jawa Barat
3	<i>Candida pseudojiufengensis</i>	Y-475	Sukadanu, Garut, Jawa Barat
4	<i>Candida saopaulonensis</i>	Y-487, Y-492, Y-494,	Sukadanu, Garut, Jawa Barat
5	<i>Cryptococcus luteolus</i>	Y-477, Y-486, Y-493	Sukadanu, Garut, Jawa Barat
6	<i>Cryptococcus</i> sp.	Y-479	Sukadanu, Garut Jawa Barat
7	<i>Cryptococcus</i> sp.	Y-508	Tunggilis, Garut, Jawa Barat
8	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	Y-482, Y-489, Y-491	Sukadanu, Garut, Jawa Barat
9	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	Y-498, Y-502, Y-504	Tunggilis, Garut, Jawa Barat
10	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Y-488	Sukadanu, Garut, Jawa Barat
11	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Y-514	Tunggilis, Garut, Jawa Barat
12	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	Y-503	Tunggilis, Garut, Jawa Barat
13	<i>Geotrichum candidum</i>	Y-495	Tunggilis, Garut, Jawa Barat
14	<i>Hanseniaspora thailandica</i>	Y-480, Y-481	Sukadanu, Garut, Jawa Barat
15	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Y-484, Y-485	Sukadanu, Garut, Jawa Barat
16	<i>Hannaella zeae</i>	Y-478	Sukadanu, Garut, Jawa Barat
17	<i>Hannaella zeae</i>	Y-510, Y-511	Tunggilis, Garut, Jawa Barat
18	<i>Hypopichia burtonii</i>	Y-496	Tunggilis, Garut, Jawa Barat

19	<i>Pichia veronae</i>	Y-490	Sukadanu, Garut, Jawa Barat
20	<i>Pseudozyma aphidis</i>	Y-501	Tunggilis, Garut, Jawa Barat
21	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	Y-500	Tunggilis, Garut, Jawa Barat
22	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Y-476	Sukadanu, Garut, Jawa Barat
23	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Y-499, Y-513	Tunggilis, Garut, Jawa Barat
24	<i>Trichosporon asahii</i>	Y-483	Sukadanu, Garut, Jawa Barat
25	<i>Trichosporon asahii</i>	Y-505, Y-506, Y-507	Tunggilis, Garut, Jawa Barat
26	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Y-497	Tunggilis, Garut, Jawa Barat

4. Kapang-kapang uji

Kapang yang digunakan untuk pengujian antagonisme dan biokontrol adalah kapang hasil isolasi dari tomat busuk. Selanjutnya tiga isolat kapang patogen representatif digunakan untuk pengujian antagonisme dan biokontrol.

D. Cara kerja

1. Pembuatan medium

Pembuatan medium YMA, PDA dan PDB berdasarkan cara yang tertera pada kemasan (Difco).

2. Pemilihan sampel buah tomat busuk

Sampel buah tomat yang diambil untuk proses isolasi adalah tomat yang memiliki ciri-ciri terdapat lingkaran cekung dan berwarna hitam, di sekitar luka pada kulit buah tomat kulit buah mengkerut dan lembek (Delahaut & Stevenson, 2004; Laura dkk., 2006). Sebanyak delapan tomat busuk diambil secara acak dari Pasar Baru, Bekasi. Sampel tersebut selanjutnya dibawa ke laboratorium untuk dilakukan proses isolasi.

3. Isolasi kapang dari buah tomat busuk

Isolasi kapang dari buah tomat busuk dilakukan berdasarkan Sun dkk. (2011). Langkah-langkah isolasi yang dilakukan sebagai berikut:

3.1. Isolasi kapang

Buah tomat busuk terlebih dahulu dibilas dengan akuades steril, kemudian permukaan buah disterilkan secara bertahap. Buah tomat direndam dalam larutan sodium hipoklorit 0,5% (NaOCl) selama satu menit, dilanjutkan dalam alkohol 70% selama satu menit, dan terakhir dibilas dua kali dengan akuades steril selama satu menit. Tomat dipotong berukuran ± 1 cm dengan gunting steril, kemudian diletakkan di atas kertas saring steril dan dikeringkan selama dua jam. Potongan buah yang sudah kering diletakkan di atas PDA di cawan petri. Inkubasi dilakukan selama 2--4 hari pada suhu ruang ($26\text{--}28^{\circ}\text{C}$).

3.2. Purifikasi isolat kapang

Purifikasi isolat kapang dilakukan menggunakan jarum *Tungstam* dan mikroskop stereo (Carl-ZEISS), dengan perbesaran 400x. Purifikasi dilakukan dengan memotong medium agar berukuran 0,1 mm x 0,1 mm x 0,1 mm yang berisi daerah tepi koloni (*growing zone*) kapang. Potongan agar tersebut kemudian diletakkan di atas PDA dalam cawan petri dan diinkubasi selama 3-4 hari pada suhu ruang ($26\text{--}28^{\circ}\text{C}$). Kapang yang tumbuh kemudian dipurifikasi sebanyak 3 pengulangan menggunakan *quadrant streak* berdasarkan Cappuccino dan Sherman (2001). Inkubasi dilakukan selama 5 hari pada suhu ruang ($26\text{--}28^{\circ}\text{C}$). Isolat kapang yang sudah murni kemudian disimpan di medium PDA miring pada suhu ruang ($26\text{--}28^{\circ}\text{C}$).

3.3. Pengamatan makroskopik dan mikroskopik isolat-isolat kapang

Pengamatan dilakukan berdasarkan Barnett dan Hunter (1987). Isolat kapang diinokulasikan pada medium PDA di cawan petri kemudian diinkubasi selama 5 hari pada suhu ruang ($26\text{--}28^{\circ}\text{C}$). Pengamatan makromorfologi kapang dilakukan setiap hari, meliputi warna koloni dan sebalik koloni, tekstur, tepi koloni, ada/tidaknya zonasi, ada/tidaknya *growing zone*, ada/tidaknya *radial furrow*, ada/tidaknya *exudate drop*, sporulasi, dan pengukuran diameter koloni.

Data karakter mikromorfologi meliputi ada/tidaknya spora seksual yang dihasilkan, bentuk spora seksual, dan bentuk konidia.

4. Pemilihan buah tomat untuk pengujian patogenitas dan biokontrol

Tomat segar digunakan untuk pengujian patogenitas dan biokontrol. Sampel buah tomat dipilih dengan tingkat kematangan yang sama berdasarkan tekstur, warna, dan kisaran bobot per buah. Tekstur buah tidak mengerut dan tidak lunak, buah berwarna merah merata, dan kisaran bobot per buah 80–100 g. Varietas buah yang digunakan adalah varietas Ratna.

5. Uji patogenitas kapang asal buah tomat busuk dengan metode suspensi spora

Kapang-kapang hasil isolasi dari tomat busuk kemudian diujikan kembali pada buah tomat segar, untuk membuktikan patogenitasnya (kemampuan menyebabkan gejala penyakit yang sama) berdasarkan *Postulate Koch*. Pengujian patogenitas isolat kapang pada tomat dilakukan dengan metode suspensi spora berdasarkan Peever dkk. (2005) yang dimodifikasi. Modifikasi yang dilakukan adalah variasi perlakuan, banyaknya suspensi spora kapang, diameter luka pada tomat, lama perlakuan, dan frekuensi pengamatan. Sebagai kontrol, digunakan tomat yang dilukai, tetapi tidak diinokulasikan dengan suspensi spora kapang. Kemampuan patogenitas kapang-kapang hasil isolasi pada tomat, diamati berdasarkan adanya lingkaran menghitam di sekitar luka kemudian tomat menjadi berair, lembek, dan berbau busuk.

Tomat yang akan digunakan untuk pengujian kemampuan kapang patogen pada buah tomat, terlebih dahulu disterilkan permukaannya. Buah tomat dicuci menggunakan akuades steril, kemudian direndam dalam larutan sodium hipoklorit 0,5% (NaOCl) selama satu menit, selanjutnya dalam alkohol 70% selama satu menit, dan terakhir dibilas dua kali dengan akuades steril selama satu menit. Pada kedua sisi atas dan bawah permukaan tomat steril dilubangi menggunakan sedotan

steril berdiameter 3 mm kedalaman luka 5 mm. Buah tomat tersebut disimpan selama 24 jam sebelum digunakan untuk pengujian patogenitas.

Pengujian patogenitas diawali dengan memasukkan 20 μ l suspensi spora kapang berumur 5 hari dengan kepadatan spora 10^5 spora/ml ke dalam luka pada buah tomat perlakuan. Inkubasi dilakukan di dalam wadah steril yang berisi tisu basah steril agar kelembapan di dalam wadah tetap terjaga. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 5 hari pada suhu ruang ($26\text{--}28^\circ\text{C}$). Tingkat patogenitas yang digunakan dapat dilihat pada Tabel II.2.

Tabel II.2. Tingkat patogenitas kapang pada tomat

Tingkat	Keterangan
0	Tidak ada pertumbuhan kapang
1	Buah masih segar, miselium kapang tumbuh sedikit
2	Buah masih segar, miselium kapang tumbuh sangat melebar dan menyebar
3	Buah masih segar, miselium kapang bergerminasi sedikit disertai lingkaran berwarna kehitaman di sekitar luka
4	Buah masih segar, miselium kapang tumbuh sangat melebar dan menyebar disertai lingkaran berwarna kehitaman di sekitar luka
5	Buah membusuk, miselium kapang tumbuh sangat melebar dan menyebar disertai lingkaran berwarna kehitaman di sekitar luka

6. Identifikasi kapang penyebab kebusukan pada tomat

Identifikasi molekuler dilakukan pada kapang penyebab kebusukan yang memperoleh tingkat 5 pada pengujian patogenitas. Identifikasi dilakukan dengan cara sebagai berikut:

6.1. Ekstraksi DNA kapang

Kapang ditumbuhkan pada medium PDB selama 3-5 hari pada suhu ruang ($26\text{--}28^\circ\text{C}$). Miselium yang tumbuh pada permukaan medium diambil untuk ekstraksi DNA menggunakan tusuk sate steril kemudian dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 ml yang telah berisi 500 μ l *miliQ water*. *Microtube* berisi miselium kapang disentrifugasi dengan kecepatan 14.500 rpm menggunakan *Centrifuge*

MiniSpin (Eppendorf) selama 10 menit. Supernatan dibuang menggunakan mikropipet, kemudian pelet berisi miselium digerus menggunakan *pestle*.

Ekstraksi DNA kapang menggunakan tiga reagen yang berbeda dari Phytopure Kit. Reagen 1 (Phytopure, 300 μ l) ditambahkan pada miselium kapang, kemudian ditambahkan RNAase (3 μ l) yang telah diaktivasi dengan pemanasan pada suhu 37°C di dalam *waterbath* selama 10–30 menit. Selanjutnya ditambahkan reagen 2 (Phytopure, 200 μ l), kemudian kloroform dan fenol (masing-masing 250 μ l), dan isopropanol (dengan volume setengah dari volume larutan DNA total).

Koloid miselium ditambahkan reagen 1 kemudian dihomogenisasi menggunakan tip yang ujungnya telah dipotong. Selanjutnya ditambahkan RNAase (3 μ l) dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit di *waterbath shaker*. Suspensi DNA ditambahkan reagen 3 (Sodium Dodecyl Sulphate, SDS, 200 μ l), kemudian dihomogenisasi selama 10 menit pada suhu ruang. Koloid DNA disimpan dalam es selama 20 menit. Selanjutnya koloid DNA ditambahkan kloroform dan fenol (masing-masing 250 μ l), dan dihomogenasi selama 3 menit. Koloid DNA disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit hingga terbentuk tiga lapisan. Lapisan yang terbentuk paling atas diambil secara hati-hati kemudian dipindahkan ke tabung *microtube*. DNA ekstrak ditambahkan isopropanol sebanyak setengah dari volume DNA ekstrak, kemudian disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, kemudian pada pelet ditambahkan etanol 99% (100 μ l) dan disentrifugasi kembali pada 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet pada *microtube* dikering anginkan di atas kertas tisu selama 30 menit. Pelet ditambahkan *nuclease free water* (50 μ l). DNA ekstrak (berupa pelet) disimpan dalam *freezer* sebelum digunakan untuk tahap selanjutnya.

6.2. Amplifikasi daerah ITS rDNA dengan metode *Polymerase Chain*

Reaction (PCR)

Amplifikasi daerah ITS rDNA menggunakan primer *forward* ITS5 (10 μ M) (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACA AGG-3') dan primer *reverse* ITS4 (10

μM) (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') berdasarkan White dkk. (1990). Reaksi PCR menggunakan *Go TaqGreen Mastermix* (Promega) dengan volume akhir 25 μl yang terdiri dari 10 μl *nuclease free water* (NFW), 12,5 μl *Go TaqGreen Mastermix* (Promega), 0,5 μl masing-masing primer (ITS5 dan primer ITS4) dan 2 μl *template* DNA. Kondisi PCR (Takara *thermocycler*) sebagai berikut: 95 °C selama 90 detik, diikuti oleh 35 siklus untuk tahap denaturasi pada suhu 95 °C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 55 °C selama 30 detik, dan *elongation* pada suhu 72 °C selama 90 detik.

6.3. Visualisasi produk PCR

Visualisasi produk PCR menggunakan elektroforesis dengan gel agarosa 2% dan buffer TAE 1x (*Tris Acetate* EDTA) berdasarkan Sambrook dan Russell (2001). Setiap produk PCR (5 μl) ditambahkan *loading dye* (1 μl), dan digunakan DNA marker 100 bp (5 μl). Alat elektroforesis (Optima®: Mupid®-2 plus) digunakan pada tegangan 100 volt selama 25 menit. Perendaman gel agarosa dalam eidium bromida 1% selama 20 menit. Visualisasi fragmen DNA menggunakan sinar ultraviolet dengan *gel documentation* (BioRad).

6.4. Purifikasi produk PCR, *cycle sequencing*, dan sekuensing

Produk amplifikasi dari hasil PCR digunakan untuk proses sekuensing. Purifikasi produk PCR, *cycle sequencing*, dan sekuensing dikirim ke jasa pelayanan servis sekuensing (1st BASE, Malaysia) melalui PT. Genetika Science, Indonesia.

7. Pembuatan suspensi sel khamir dan kapang, serta penghitungan sel yang akan digunakan pada pengujian antagonisme dan biokontrol

Kapang penyebab busukan pada buah tomat pascapanen ditumbuhkan pada medium PDA dalam cawan petri, kemudian diinkubasi pada suhu ruang (26-28 °C) selama 5 hari sampai bersporulasi. Satu ose biakan kapang diinokulasikan

ke dalam medium PDA miring sebanyak 15 gores, kemudian diinkubasi selama 5 hari pada suhu ruang ($26\text{--}28\text{ }^{\circ}\text{C}$). Akuades steril (5 ml) ditambahkan ke dalam tabung, kemudian biakan dikerik dengan ose dan dihomogenkan menggunakan vorteks. Suspensi sel kapang diencerkan menggunakan akuades steril hingga faktor pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , dan 10^{-4} secara aseptik.

Prosedur yang sama dilakukan pada biakan khamir di dalam YMA miring berumur dua hari. Selanjutnya suspensi sel khamir diencerkan menggunakan akuades steril hingga faktor pengenceran 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7} secara aseptik.

Penentuan jumlah sel khamir dan kapang menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) berdasarkan Madigan dkk. (2012). Selanjutnya digunakan kapang (10^5 spora/ml), dan khamir (10^8 sel/ml).

8. Pengujian antagonisme khamir dari daun *B. papyrifera* terhadap kapang penyebab kebusukan pada buah tomat

Pengujian antagonisme dilakukan dalam dua tahap. Pengujian antagonisme tahap pertama dilakukan menggunakan *co-culture method* berdasarkan Oetari dkk. (2007). Pada pengujian tahap pertama menggunakan 40 spesies khamir asal Desa Sukadanu dan Desa Tunggilis, Garut, Jawa Barat, dan tiga isolat kapang representatif dengan tingkat patogenitas 5. Sebanyak 1 ml (10^8 sel/ml) suspensi sel khamir berumur 48 jam dimasukkan ke dalam 18 ml medium *potato dextrose broth* (PDB) dalam Erlenmeyer 50 ml, kemudian diinkubasi pada suhu $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, dengan pengocokan 110 rpm selama 8 jam. Selanjutnya ditambahkan 1 ml (10^5 spora/ml) suspensi hifa/spora kapang berumur 5 hari ke dalam medium PDB tersebut. Inkubasi dilakukan pada suhu $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, tanpa pengocokan, selama tiga hari. Kemampuan khamir dalam menghambat pertumbuhan kapang ditunjukkan dengan terhambatnya pertumbuhan miselium dan sporulasi kapang.

Pengujian antagonisme tahap kedua dilakukan berdasarkan Zheng dkk. (2004) yang dimodifikasi. Modifikasi dilakukan pada waktu inkubasi dan medium yang digunakan untuk pengujian. Pengujian dilakukan di dalam *assay plate* (Costar) berisi 96 lubang. Prosedur pembuatan suspensi kapang dan khamir sama seperti persiapan sebelumnya.

Setiap lubang pada *assay plate* diisi dengan 200 µl medium PDB. Suspensi sel khamir (50 µl) dan suspensi konidia/hifa kapang patogen (50 µl) dimasukkan ke dalam PDB dalam *assay plate*, kemudian diinkubasi pada suhu ruang (26--28 °C) selama 7 jam. Sebagai kontrol adalah suspensi sel khamir (50 µl) tanpa kapang, dan sebagai kontrol kapang (50 µl) tanpa khamir. Pengamatan mikroskopik pada hifa kapang dilakukan dengan mengukur diameter hifa kapang setiap jam pengamatan selama 7 jam inkubasi. Pengujian antagonisme secara kualitatif dilakukan dengan menggunakan kategori sebagai berikut (Tabel II.3).

Tabel II.3. Kategori pengujian antagonisme di dalam *assay plate* (Costar)

Kategori	Keterangan
(-)	Belum terjadi antagonisme
(+)	Sebagian hifa kapang dilekati oleh sel khamir
(++)	Beberapa hifa kapang dilekati oleh sel khamir
(+++)	Seluruh hifa kapang dilekati oleh sel khamir

Kemampuan khamir dalam menghambat pertumbuhan kapang ditunjukkan dengan reduksi diameter hifa kapang yang dilekati oleh sel khamir setelah dibandingkan dengan diameter hifa kapang yang tidak diinokulasikan oleh sel khamir selama 7 jam pengamatan.

9. Pengujian biokontrol khamir asal daun *B. papyrifera*

Pengujian biokontrol khamir dari *B. papyrifera* menggunakan metode berdasarkan Oetari dkk. (2007). Pengujian biokontrol dilakukan dengan 4 variasi perlakuan, yaitu: 1) tomat dilukai, disiram suspensi sel khamir, dan diinokulasikan suspensi spora kapang; 2) tomat dilukai, disiram suspensi sel khamir, dan diberikan akuades steril; 3) tomat dilukai, disiram fungisida Dithane M-45 0,08%, dan diinokulasikan spora kapang; 4) tomat dilukai dan diinokulasikan suspensi spora kapang. Sebagai kontrol adalah tomat yang dilukai dan tidak disiram dengan suspensi sel khamir. Setiap perlakuan dilakukan empat ulangan, dan setiap ulangan menggunakan 3 tomat.

Tomat untuk pengujian biokontrol terlebih dahulu disterilkan permukaannya. Tomat dicuci menggunakan akuades steril, kemudian direndam dalam larutan sodium hipoklorit 0,5% (NaOCl) selama satu menit, direndam dalam alkohol 70% selama satu menit, dan terakhir dibilas dua kali dengan akuades steril selama satu menit. Tomat selanjutnya dilukai pada kedua sisi permukaan menggunakan sedotan steril (diameter 3 mm) dengan kedalaman luka 5 mm. Selanjutnya tomat dikering-anginkan di dalam wadah steril pada suhu ruang ($26\text{--}28^{\circ}\text{C}$) selama 24 jam sebelum digunakan untuk pengujian.

Pengujian biokontrol menggunakan khamir berumur 48 jam (10^8 sel/ml), dan kapang berumur 5 hari (10^5 spora/ml). Buah tomat diletakkan dalam *beaker glass* steril kemudian disiram dengan suspensi sel khamir (50 ml) hingga merata ke seluruh permukaan. Tomat dikering-anginkan selama 24 jam pada suhu ruang ($26\text{--}28^{\circ}\text{C}$) dalam wadah steril. Selanjutnya luka pada tomat diinokulasikan suspensi spora kapang (25 μl). Tomat diinkubasi pada suhu ruang ($26\text{--}28^{\circ}\text{C}$) dan pengamatan dilakukan setiap 3 hari selama 15 hari. Kemampuan khamir sebagai agens biokontrol ditunjukkan dengan membandingkan jumlah tomat yang menunjukkan gejala kebusukan dengan kontrol, dan ada/tidaknya diameter lingkaran hitam pada tomat.

10. Pengujian suhu

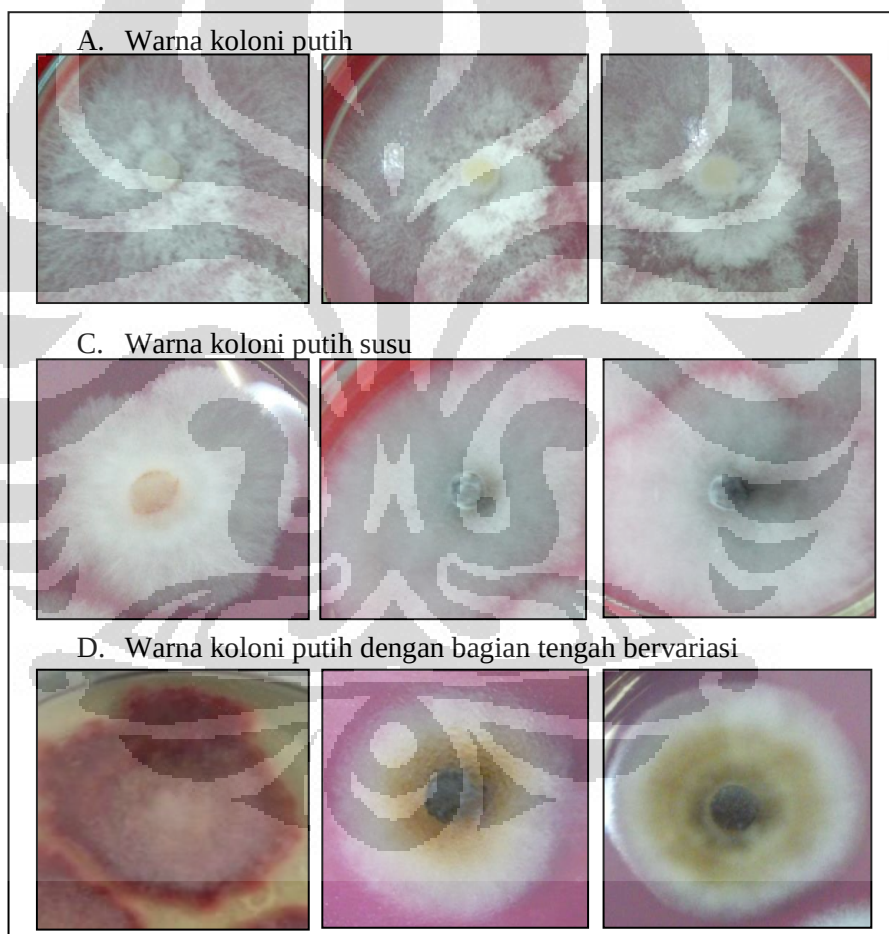
Pengujian pertumbuhan khamir pada 37°C menggunakan medium YMA pada cawan petri, dan pengamatan selama 3 hari. Sebagai kontrol adalah pertumbuhan khamir dalam medium YMA pada suhu 27°C (suhu ruang).

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi kapang pada buah tomat busuk

Buah tomat busuk yang digunakan untuk isolasi kapang memiliki bercak luka kehitaman di permukaan kulit dengan bagian tengah sedikit cekung, kulit buah berkerut, dan lembek (Lampiran II.1).

Beberapa peneliti melaporkan bahwa tomat yang busuk memiliki ciri pada permukaan kulit buah terdapat luka kecil, di sekitar luka terdapat lingkaran cekung berwarna hitam, buah lembek, dan berair (Watkins, 1999; Delahaut & Stevenson, 2004; Kavanagh, 2005; Laura dkk. 2006). Tomat pascapanen yang memperlihatkan gejala kebusukan memiliki lingkaran cekung berwarna kehitaman di sekitar luka selama inkubasi 4--7 hari (Chuku dkk. 2010). Laporan lain menyatakan tomat busuk memiliki ciri di sekitar luka berwarna gelap, terdapat lingkaran berwarna kehitaman kemudian cenderung menjadi cekung setelah inkubasi hari ke 5 (Zivkovic dkk. 2010).

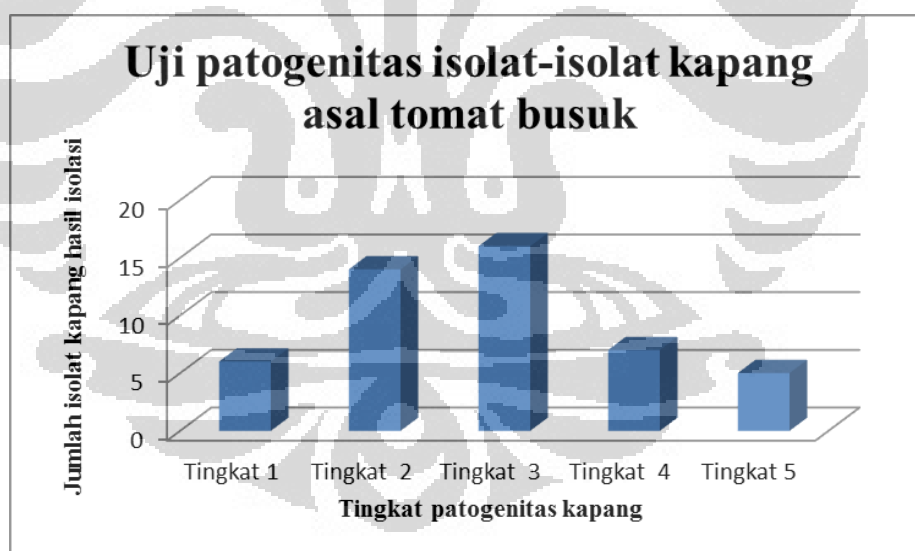


Gambar II.1. Warna koloni isolat-isolat kapang setelah diinkubasi selama 4 hari, di medium PDA pada suhu ruang (26--28 °C)

Isolasi kapang dari sampel tomat busuk menghasilkan 46 isolat (Lampiran II.2). Isolat kapang yang diperoleh memperlihatkan koloni berwarna putih (14 isolat), putih susu (21 isolat), putih dengan bagian tengah bervariasi (11 isolat) yaitu putih susu, merah muda, kecokelatan, dan putih susu keabu-abuan (Gambar II.1). Isolat-isolat kapang tersebut memiliki tekstur koloni *wooly* dan pertumbuhan miselium yang telah memenuhi seluruh permukaan cawan petri setelah inkubasi 4 hari.

B. Uji patogenitas isolat-isolat kapang asal tomat busuk

Hasil pengujian patogenitas menunjukkan isolat-isolat kapang asal tomat busuk merupakan patogen dan dapat menyebabkan gejala kebusukan pada buah (Gambar II.2--II.3; Lampiran II.3). Ciri-ciri terjadinya busuk pada tomat ditunjukkan dengan nilai tingkat patogenitas 1 sampai 5. Nilai tingkat patogenitas rendah adalah 1, sedangkan nilai tingkat patogenitas tinggi adalah 5.



Gambar II.2. Hasil pengujian patogenitas isolat kapang dari tomat busuk, inkubasi 5 hari pada suhu ruang (26--28 °C)

Hasil pengujian patogenitas menunjukkan tidak semua isolat kapang mampu menyebabkan tomat menjadi busuk (Lampiran II.3). Sebanyak 19 isolat kapang tidak menyebabkan tomat menjadi busuk dan memperoleh nilai tingkat 1--

2. Kapang-kapang tersebut memperlihatkan pertumbuhan miselium sedikit disertai lingkaran berwarna putih keabu-abuan di sekitar luka. Sebanyak 16 isolat menyebabkan tomat menjadi busuk dan memperoleh nilai tingkat 3, 7 isolat dengan nilai tingkat 4, 5 isolat dengan nilai tingkat 5. Kapang-kapang tersebut memperlihatkan pertumbuhan miselium cepat disertai adanya lingkaran berwarna kehitaman di sekitar luka. Sebanyak lima isolat (T8.U3.K2; T4.U1.K4; T4.U1.K1; T3.U3.K2; dan T4.U1.K2) menyebabkan tomat busuk dengan nilai tingkat 5. Kapang-kapang tersebut memperlihatkan pertumbuhan miselium sangat melebar dan menyebar, menyebabkan lingkaran konsentris berwarna kehitaman, dan buah membusuk di sekitar luka pada inkubasi hari ke 2--5.

Berdasarkan uji patogenitas dengan tingkat nilai 5 dan pertumbuhan miselium paling cepat (dua hari) dipilih tiga isolat kapang representatif (T8.U3.K2; T4.U1.K4; dan T4.U1.K1). Ketiga isolat kapang tersebut memperlihatkan pertumbuhan miselium berwarna abu-abu menyebar di permukaan buah, menyebabkan buah busuk dengan kulit berkerut dan mengeluarkan air (Gambar II.3; Lampiran II.3).



Gambar II.3. Kondisi tomat setelah dilakukan pengujian patogenitas; A. Buah tomat tidak busuk; B. Buah tomat ditumbuhi kapang T4.U1.K1; C. Buah tomat ditumbuhi kapang T4.U1.K4; D. Buah tomat ditumbuhi kapang T8.U3.K2, inkubasi 3 hari pada suhu ruang (26--28 °C)

Beberapa peneliti telah melakukan pengujian patogenitas kapang yang diisolasi dari buah busuk. Meer dkk. (2013) melaporkan isolat kapang dari buah mangga busuk dapat menyebabkan gejala patogenitas setelah 2--3 hari inkubasi, dan memperlihatkan lingkaran konsentris cekung berwarna hitam melebar pada permukaan buah mangga. Parey dkk. (2013) melakukan pengujian patogenitas isolat-isolat kapang hasil isolasi dari cabai (*Capsicum annum* L.) asal Vijaypur, India. Pengujian patogenitas dilakukan secara *in vivo* pada buah cabai yang diinfeksi spora kapang patogen. Tiga isolat kapang menyebabkan gejala buah busuk dengan ciri pada permukaan buah terdapat luka berwarna kehitaman, miselium kapang di sekitar luka berwarna abu-abu hingga kehitaman. Hasil identifikasi menunjukkan tiga isolat kapang dari cabai adalah *Col. capsici*, *A. alternata*, dan *Asp. flavus*.

Pengujian patogenisitas membuktikan bahwa ketiga isolat kapang representatif ((T8.U3.K2; T4.U1.K4; dan T4.U1.K1) asal tomat busuk merupakan kapang penyebab kebusukan pada buah dengan patogenitas tinggi dan memenuhi kriteria sesuai *Koch's postulates*. Menurut Doohan (2005), penentuan patogenitas suatu isolat kapang dapat dilakukan menggunakan *Koch's postulates*. Berdasarkan prinsip tersebut, suatu isolat dapat menyebabkan penyakit apabila memenuhi tiga syarat yaitu 1) isolat dapat diisolasi dari inang yang sakit, 2) isolat tersebut dapat ditumbuhkan di laboratorium, 3) isolat hasil isolasi akan memberikan gejala penyakit yang sama dengan pertama kali diisolasi ketika diinokulasikan pada inang yang sehat, 4) isolat tersebut dapat diisolasi kembali dengan ciri morfologi yang sama.

C. Identifikasi kapang representatif berdasarkan analisis sekuens daerah ITS rDNA

Sebanyak tiga isolat kapang representatif berhasil diidentifikasi hingga tingkat spesies berdasarkan analisis sekuens daerah ITS rDNA (Tabel II.4.). Data spesies kapang yang memiliki nilai homologi terdekat dengan spesies yang telah diidentifikasi diperoleh berdasarkan pencarian homologi sekuens menggunakan program BLAST. Nilai homologi sekuens berdasarkan BLAST berkisar 99-

100%. Berdasarkan penelitian Sugita dkk. (1999) pada *Trichosporon*, isolat yang memiliki homologi pada sekuens daerah ITS rDNA $\geq 99\%$ dengan spesies terdekat dianggap sebagai spesies yang sama.

Hasil pencarian homologi sekuens daerah ITS rDNA menggunakan program BLAST menunjukkan, isolat T8.U3.K2 teridentifikasi sebagai *A. alternata* (Fr.) Keissl. dengan homologi sekuens daerah ITS sebesar 100% dengan spesies terdekatnya yaitu sebagai *A. alternata* strain IFM 58912. Isolat T4.U1.K4 teridentifikasi sebagai *L. theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. dengan homologi sekuens daerah ITS rDNA sebesar 100% dengan spesies terdekatnya yaitu *L. theobromae* strain EucN188. Isolat T4.U1.K1 teridentifikasi sebagai *Syn. racemosum* Cohn. dengan homologi sekuens daerah ITS rDNA sebesar 99% dengan spesies terdekatnya yaitu sebagai *Syn. racemosum* strain CNRMA 03.414.

Tabel II.4. Hasil identifikasi isolat kapang penyebab busukan pada tomat berdasarkan analisis sekuens daerah ITS rDNA

Kode isolat	Takson terdekat hasil BLAST di NCBI	Max score	Query (%)	E-value	Accession	Similarity (%)	Panjang basa (bp)
T8.U3.K2	<i>Alternaria alternata</i> strain IFM 58912	1094	99	0,0	GQ121322.2	100	593
T4.U1.K4	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> strain EucN188	1042	99	0,0	FJ904840.1	100	582
T4.U1.K1	<i>Syncephalastrum racemosum</i> strain CNRMA 03.414	972	100	0,0	DQ119016.1	99	621

Beberapa peneliti telah melakukan isolasi dan identifikasi kapang dari buah atau tanaman yang terinfeksi. Laura dkk. (2006) memperoleh 187 isolat kapang dari tomat pascapanen yang telah busuk, di Ohio. Beberapa kapang tersebut diidentifikasi secara molekuler menggunakan daerah ITS rDNA dan primer ITS4 dan ITS5. Kapang-kapang tersebut teridentifikasi sebagai *Col. acutatum*, *Col. dematium*, *Col. coccodes*, *Fusarium culmorum*, *Fus. oxysporum*, *Fus. sporotrichioides*, *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, dan *A. infectoria*. Ismail dkk. (2012) melaporkan hasil identifikasi kapang penyebab busukan

pada buah mangga secara molekuler menggunakan primer V9G dan ITS4 sebagai *Lasiodiplodia theobromae*.

D. Penggunaan sel khamir dan kapang

Hasil enumerasi sel khamir dan spora/hifa kapang menggunakan metode *Total Plate Count*, dapat dilihat pada Tabel II.5. dan Tabel II.6. Nilai enumerasi tersebut sebelum dilakukan pengenceran untuk pengujian antagonisme dengan *co-culture*. Pada pengujian antagonisme dengan metode *co-culture* digunakan jumlah sel khamir (10^8 CFU/ml), yaitu lebih banyak dibandingkan jumlah hifa/spora kapang (10^5 CFU/ml). Penggunaan jumlah sel khamir yang lebih banyak dibandingkan kapang, diharapkan memberikan keuntungan kompetitif pada khamir terhadap kapang, yaitu kompetisi untuk ruang dan nutrien. Pada substrat/habitat yang sama khamir dapat menggunakan nutrien lebih banyak, sehingga pertumbuhannya menjadi lebih cepat, dan berakibat memperoleh ruang lebih banyak. Shimon dkk. (2004) menggunakan jumlah sel khamir *C. oleophila* (10^6 -- 10^8 CFU/ml) lebih banyak dibandingkan kapang patogen *Pen. digitatum* (Pers. Fr.) Sacc. (10^4 CFU/ml) pada pengujian antagonisme pada buah jeruk. Tian dkk. (2006) menggunakan khamir *Cr. laurentii* (10^7 -- 10^8 CFU/ml), sedangkan kepadatan hifa/spora kapang patogen *A. alternata* dan *Pen. expansum* sebesar 10^5 CFU/ml pada pengujian antagonisme.

Tabel II.5. Hasil perhitungan jumlah hifa/spora kapang menggunakan metode TPC sebelum pengenceran untuk pengujian dengan *co-culture*

Spesies kapang	Jumlah kisaran sel/hifa (CFU/ml)x 10^5
<i>Alternaria alternata</i> T8.U3.K2	3,43--4,39
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> T4.U1.K4	3,82 --4,17
<i>Syncephalastrum racemosum</i> T4.U1.K1	3,62--4,22

Tabel II.6. Hasil perhitungan jumlah sel khamir menggunakan metode TPC sebelum pengenceran untuk pengujian dengan *co-culture*

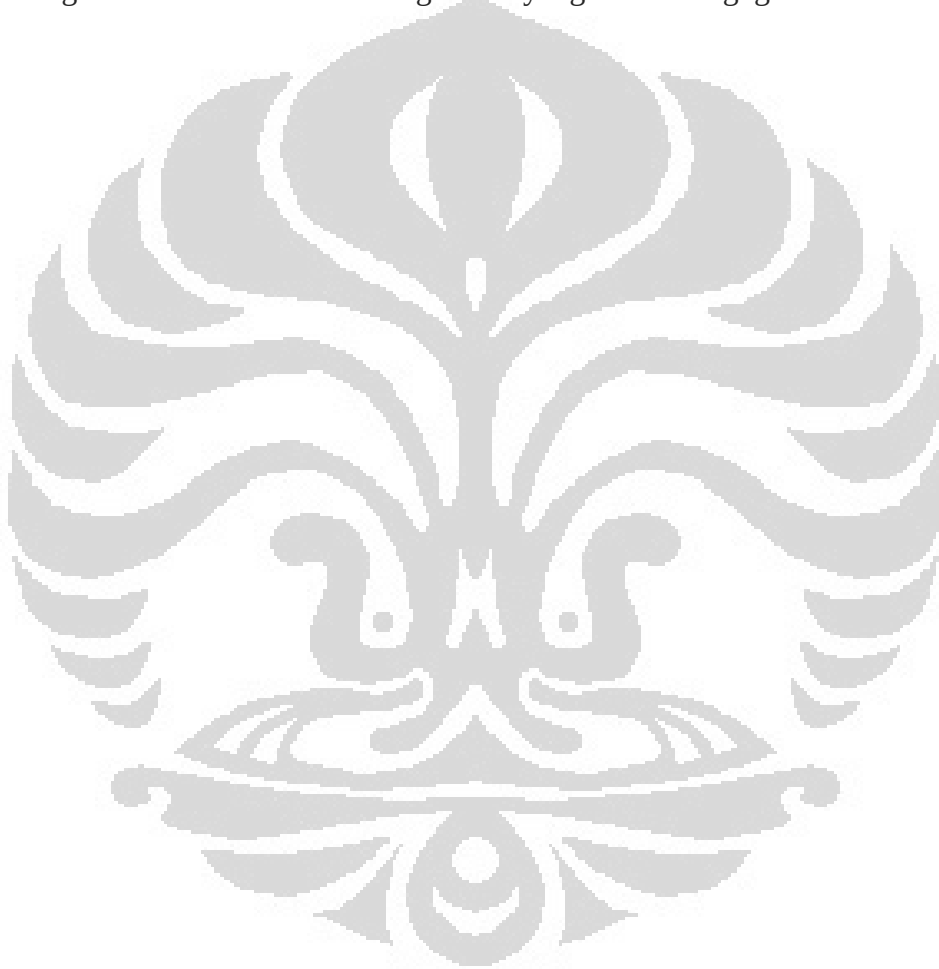
Spesies khamir	Jumlah kisaran sel (CFU/ml) x 10 ⁸
<i>Candida saopaulonensis</i> UICC Y-492	4,00--4,60
<i>Candida pseudojiutengensis</i> UICC Y-475	3,57--4,33
<i>Debaryomyces hansenii</i> UICC Y-488	3,57--4,00
<i>Hyphopichia burtonii</i> UICC Y-496	3,00--3,67
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UICC Y-476	3,63--6,33
<i>Geotrichum candidum</i> UICC Y-495	2,00--4,87

E. Pengamatan pertumbuhan khamir dan kapang kontrol selama pengujian antagonisme

Pengamatan sel khamir kontrol (Tabel II.7) selama pengujian antagonisme pada medium PDB pH 4,6 inkubasi 4 hari pada suhu ruang (26--28 °C) memperlihatkan adanya pertumbuhan di dalam medium. Pertumbuhan ditunjukkan dengan kekeruhan pada medium, adanya endapan biomassa di bagian dasar medium sejak inkubasi hari kedua. Endapan biomassa khamir baik kontrol maupun perlakuan berwarna putih atau krem, kecuali khamir *Rh. mucilaginosa* UICC Y-476 berwarna merah, sedangkan *Cr. luteolus* UICC Y-493 tidak menghasilkan endapan biomassa. Yarrow (1998) melaporkan bahwa pertumbuhan khamir pada medium cair ditandai dengan kekeruhan pada medium, adanya endapan biomassa di bagian bawah medium, dan terbentuknya pelikel di permukaan medium.

Hasil pengamatan pertumbuhan kapang kontrol (Tabel II.8; Tabel II.9) pada medium PDB pH 4,6 menunjukkan adanya pertumbuhan miselium dan sporulasi hingga inkubasi hari keempat pada suhu ruang (26--28 °C). Pertumbuhan miselium ketiga kapang kontrol terlihat sangat lebat dan *wooly* dengan hifa aerial yang hampir memenuhi semua permukaan medium. Sporulasi kapang *A. alternata*, dan *L. theobromae* terlihat mulai inkubasi hari ketiga, sedangkan sporulasi kapang *Syn. racemosum* mulai inkubasi hari keempat. Carlile dkk. (2001) melaporkan pertumbuhan kapang pada medium cair ditandai dengan terlihatnya pertumbuhan miselium pada permukaan medium.

Khamir dan kapang kontrol dapat memanfaatkan nutrisi di dalam medium PDB dengan komposisi nutrisi yang terdiri atas karbohidrat, yaitu polisakarida dalam bentuk pati yang tersusun atas unit-unit glukosa, dan monosakarida dalam bentuk *dextrose* (glukosa). Karbohidrat tersebut dimanfaatkan khamir dan kapang untuk metabolisme, antara lain untuk sintesis komponen-komponen sel. Menurut Landecker (1996) fungi memiliki dinding sel dengan komponen polisakarida berupa glukukan, mannan dan khitin. Glukan terdiri atas unit-unit glukosa, sedangkan khitin terdiri atas unit glukosa yang terikat ke gugus amina.



Tabel II.7. Pengamatan pertumbuhan khamir kontrol asal Desa Sukadanu dan Tunggilis dalam pengujian antagonisme menggunakan metode *co-culture* dalam medium PDB inkubasi hari ke 4 pada suhu ruang (26--28 °C)

Pengamatan	<i>Bul. sinensis</i> UICC Y-509 hari ke-				<i>C. metapsilosis</i> UICC Y-473 hari ke-				<i>C. metapsilosis</i> UICC Y-474 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Endapan biomassa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih
pelikel	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Pengamatan	<i>C. pseudojiufengensis</i> UICC Y-475 hari ke-				<i>C. saopaulonensis</i> UICC Y-487 hari ke-				<i>C. saopaulonensis</i> UICC Y-492 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Endapan biomassa	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
pelikel	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Keterangan: Tanda (+)

Tanda (-)

: adanya endapan biomassa atau pelikel

: tidak ada endapan biomassa atau pelikel

Tabel II.7. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>C. saopaulonensis</i> UICC Y-494 hari ke-				<i>Cryp.luteolus</i> UICC Y-477 hari ke-				<i>Cryp. luteolus</i> UICC Y-486 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Endapan biomassa	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	Putih	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
pelikel	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
pH medium	4,0	4,0	4,0	4,0	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Pengamatan	<i>Cryp. luteolus</i> UICC Y-493 hari ke-				<i>Cryptococcus</i> sp.UICC Y-479 hari ke-				<i>Cryptococcus</i> sp.UICC Y-508 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Endapan biomassa	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	-	-	-	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
pelikel	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,7	5,3	5,3	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Keterangan:

Tanda (+) : adanya endapan biomassa atau pelikel
Tanda (-) : tidak ada endapan biomassa atau pelikel

Tabel II.7. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>Cryp. rajasthanensis</i> UICC Y-482 hari ke-				<i>Cryp.rajasthanensis</i> UICC Y-489 hari ke-				<i>Cryp. rajasthanensis</i> UICC Y-491 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Endapan biomassa	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih
pelikel	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Pengamatan	<i>Cryp. rajasthanensis</i> UICC Y-498 hari ke-				<i>Cryp. rajasthanensis</i> UICC Y-502 hari ke-				<i>Cryp. rajasthanensis</i> UICC Y-504 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Endapan biomassa	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	-	-	-	-
pelikel	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Keterangan: Tanda (+)

Tanda (-)

: adanya endapan biomassa atau pelikel

: tidak ada endapan biomassa atau pelikel

Tabel II.7. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>Deb. hansenii</i> UICC Y-488 hari ke-				<i>Deb. hansenii</i> UICC Y-514 hari ke-				<i>Deb. nepalensis</i> UICC Y-514 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Endapan biomassa	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
pelikel	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	5,8

Pengamatan	<i>Geo. candidum</i> UICC Y-495 hari ke-				<i>Han'spora thailandica</i> UICC Y-480 hari ke-				<i>Han'spora thailandica</i> UICC Y-481 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Endapan biomassa	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	Putih	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
pelikel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Keterangan: Tanda (+) : adanya endapan biomassa atau pelikel
Tanda (-) : tidak ada endapan biomassa atau pelikel

Tabel II.7. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>Han'spora uvarum</i> UICC Y-484 hari ke-				<i>Han'spora uvarum</i> UICC Y-485 hari ke-				<i>Han. zae</i> UICC Y-478 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Endapan biomassa	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
pelikel	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Pengamatan	<i>Han. zae</i> UICC Y-510 hari ke-				<i>Han. zae</i> UICC Y-511 hari ke-				<i>Hyp. burtonii</i> UICC Y-496 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Endapan biomassa	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Warna endapan	-	-	Putih	Putih	-	-	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih
pelikel	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	5,0

Keterangan: Tanda (+)

Tanda (-)

: adanya endapan biomassa atau pelikel

: tidak ada endapan biomassa atau pelikel

Tabel II.7. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>Pichia veronae</i> UICC Y-490 hari ke-				<i>Pseu. aphidis</i> UICC Y-501 hari ke-				<i>Rho. dairenensis</i> UICC Y-500 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Endapan biomassa	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	-	Merah muda	Merah muda	Merah muda
pelikel	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Pengamatan	<i>Rho. mucilaginosa</i> UICC Y-476 hari ke-				<i>Rho. mucilaginosa</i> UICC Y-499 hari ke-				<i>Rho. mucilaginosa</i> UICC Y-513 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Endapan biomassa	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Merah	Merah	Merah	-	-	Merah	Merah	-	Merah	Merah	Merah
pelikel	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Keterangan: Tanda (+)

Tanda (-)

: adanya endapan biomassa atau pelikel

: tidak ada endapan biomassa atau pelikel

Tabel II.7. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>Tr. asahii</i> UICC Y-483 hari ke-				<i>Tr. asahii</i> UICC Y-505 hari ke-				<i>Tr. asahii</i> UICC Y-506 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Endapan biomassa	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
pelikel	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

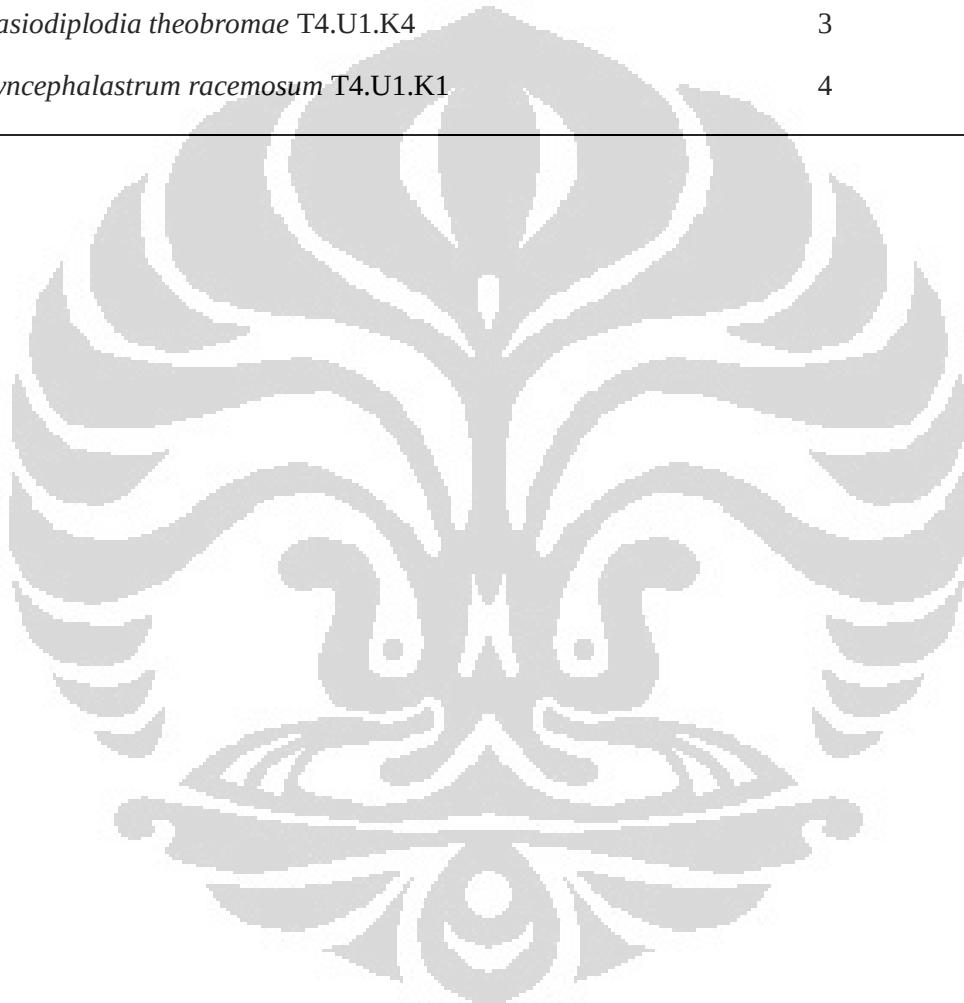
Pengamatan	<i>Tr. asahii</i> UICC Y-507 hari ke-				<i>Wic. anomalus</i> UICC Y-497 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Endapan biomassa	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
pelikel	-	+	+	+	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Keterangan:

Tanda (+) : adanya endapan biomassa atau pelikel
Tanda (-) : tidak ada endapan biomassa atau pelikel

Tabel II.8. Waktu sporulasi kapang kontrol dalam pengujian antagonisme menggunakan metode *co-culture* di medium PDB inkubasi empat hari pada suhu ruang (26--28 °C)

Spesies	Sporulasi mulai terlihat inkubasi hari ke-
<i>Alternaria alternata</i> T8.U3.K2	3
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> T4.U1.K4	3
<i>Syncephalastrum racemosum</i> T4.U1.K1	4



Tabel II.9. Pengamatan pertumbuhan kapang kontrol pada pengujian antagonisme menggunakan metode *co-culture* dalam medium PDB inkubasi hari ke 4 pada suhu ruang (26--28 °C)

Keterangan	<i>A. alternata</i> T8.U3.K2				<i>L. theobromae</i> T4.U1.K4				<i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1			
	Pengamatan hari ke-				Pengamatan hari ke-				Pengamatan hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Sporulasi	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+
Warna koloni	-	Putih	Putih abu-abu	Putih abu-abu	-	Putih	Putih abu-abu	Putih kehitaman	-	Putih	Putih	Putih seperti bludru
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6
Berat medium (gram)	71,06	71,08	7,14	71,25	74,71	73,82	73,71	73,69	70,41	70,34	70,21	70,02

Tanda (+)

Tanda (-)

: adanya pertumbuhan miselium atau sporulasi pada kapang

: tidak ada adanya pertumbuhan miselium atau sporulasi pada kapang

Hasil pengujian antagonisme diperlihatkan pada Lampiran II.5--Lampiran II.8. Khamir asal Desa Sukadanu dan Desa Tunggilis, Garut Jawa Barat dapat menghambat pertumbuhan miselium dan sporulasi kapang penyebab kebusukan pada tomat. Enam spesies khamir *C. saopaulonensis* UICC Y-492, *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475, *Deb. hansenii* UICC Y-488, *Rh. mucilaginosa* UICC Y-476, *Geo. candidum* UICC Y-495, dan *Hyp. burtonii* UICC Y-496 bersifat antagonistik terhadap *A. alternata* T8.U3.K2, *Syn. racemosum* T4.U1.K1, dan *L. theobromae* T4.U1.K4.

Interaksi antagonisme antara khamir antagonis dan kapang penyebab kebusukan pada buah diduga melalui mekanisme kompetisi nutrisi dan ruang. Pada awal interaksi, khamir dengan jumlah sel lebih banyak memiliki peluang lebih besar untuk memanfaatkan nutrisi dan ruang, dan melakukan pertumbuhan dengan lebih cepat. Hal tersebut ditunjukkan dengan pertumbuhan khamir yang baik (ditandai oleh kekeruhan medium) dan tidak adanya pertumbuhan miselium atau sporulasi kapang dalam medium. Sharma dkk. (2009) melaporkan khamir melakukan mekanisme kompetisi nutrisi dan ruang pada pengujian interaksi antagonisme yang ditandai dengan tingginya jumlah kepadatan sel pada khamir potensial sebagai agen antagonis dan rendahnya kepadatan sel pada kapang patogen. Zhao, dkk. (2007) melaporkan interaksi antagonisme antara khamir *P. guilliermondii* dengan kapang patogen *Rhizopus nigricans* pada tomat melalui kompetisi nutrisi dan ruang. Khamir *P. guilliermondii* bersifat antagonis pada *R. nigricans* dan ditunjukkan dengan adanya penurunan kepadatan jumlah sel *R. nigricans* sebesar 41,67%. Zhang dkk. (2007), melaporkan kapang *Bot. cinerea* tidak memperlihatkan adanya pertumbuhan pada *co-culture* dengan khamir *Rh. glutinis* hingga inkubasi hari ke-5.

Pada pengamatan mikroskopik *co-culture*, terlihat adanya pelekatan sel khamir pada dinding hifa kapang. Pelekatan sel khamir paling cepat pada hifa kapang dilakukan oleh *C. saopaulonensis* UICC Y-492, yaitu pada hifa *A. alternata*, *Syn. racemosum*, dan *L. theobromae* (Lampiran II.9). Pelekatan sel khamir pada hifa kapang dimulai pada inkubasi jam ke-1. Diduga khamir tersebut melakukan mekanisme antibiosis yang dapat dijelaskan berdasarkan penelitian oleh Chan dan

Tian (2005). Menurut Chan dan Tian (2005), khamir *P. membranefaciens* melakukan interaksi antagonisme dengan kapang patogen *Mon. fructicola* dan *R. stolonifer* melalui pelekatan sel khamir pada hifa kapang patogen. Pada inkubasi 48 jam terlihat dinding hifa kapang yang dilekati oleh sel khamir menjadi cekung dibandingkan hifa kapang kontrol. Sel khamir kemungkinan melakukan mekanisme antibiosis, yaitu dengan memproduksi enzim β -1,3 glukonase dan kitinase untuk mendegradasi glukon dan kitin yang terdapat pada hifa kapang.

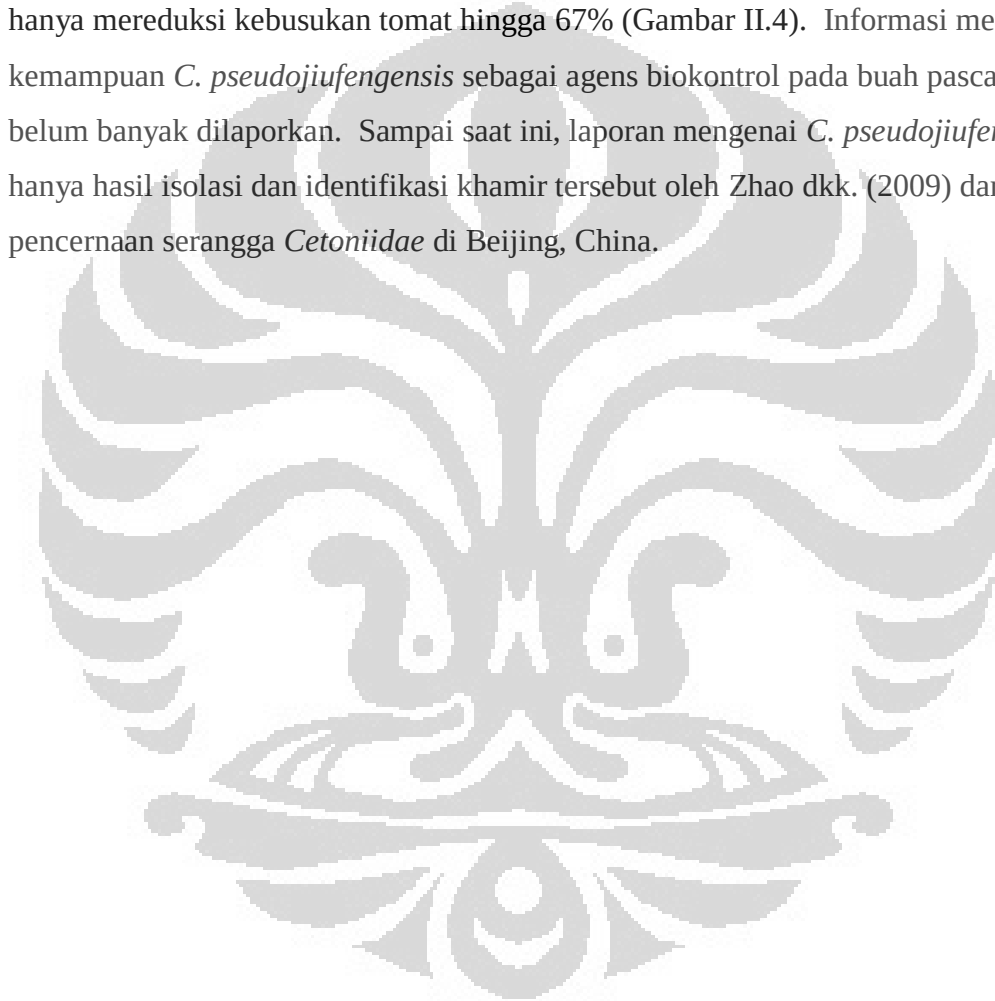
F. Pengujian khamir antagonis asal *B. papyrifera* sebagai agens biokontrol kapang *A. alternata* T8.U3.K2 dan *L. theobromae* T4.U1.K4 pada tomat

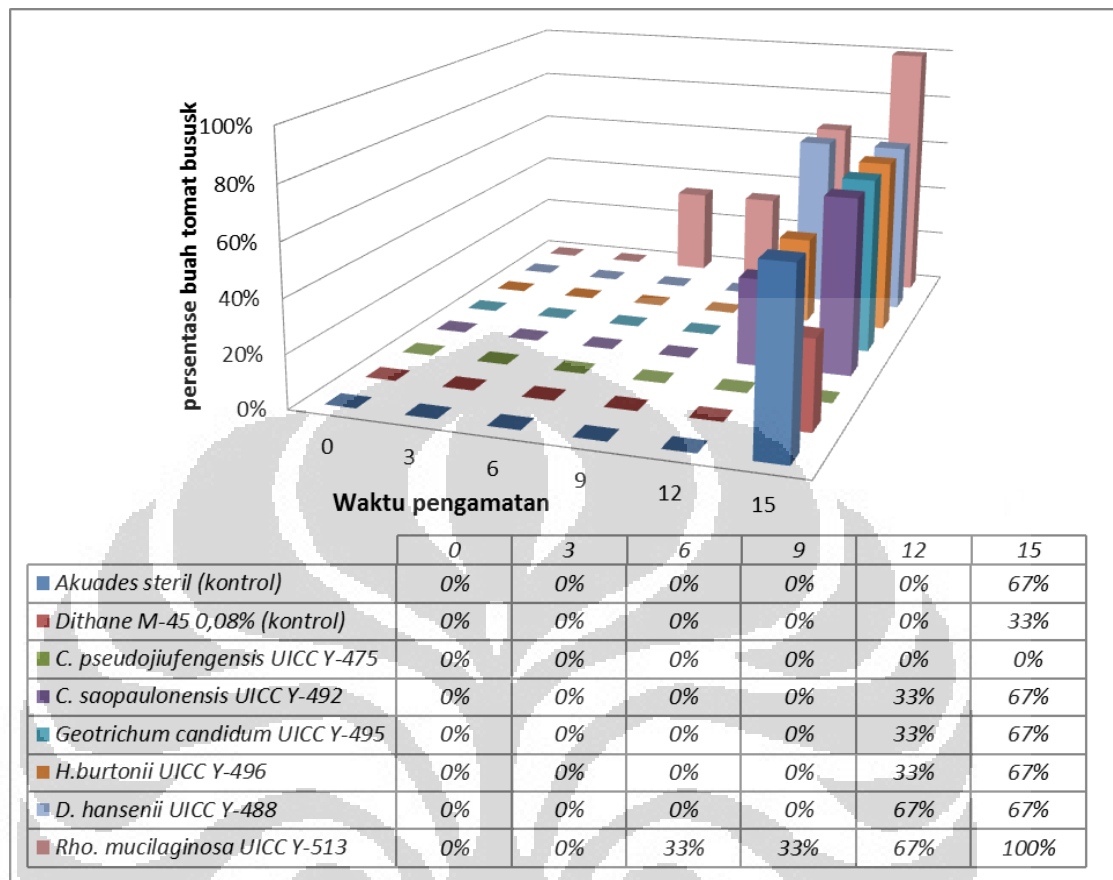
Khamir *C. saopaulonensis* UICC Y-492, *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475, *Deb. hansenii* UICC Y-488, *Rh. mucilaginosa* UICC Y-476, *Geo. candidum* UICC Y-495, dan *Hyp. burtonii* UICC Y-496 memiliki potensi sebagai agens biokontrol kapang *A. alternata* T8.U3.K2 dan *L. theobromae* T4.U1.K4. Khamir-khamir tersebut menunjukkan kemampuan yang berbeda antara satu dengan lainnya (Lampiran II.10--II.15, Gambar II.4, dan Gambar II.5). Beberapa penelitian telah dilaporkan mengenai kemampuan khamir sebagai agens biokontrol kapang pada buah pascapanen. Khamir *Rh. mucilaginosa* memiliki kemampuan sebagai agens biokontrol kapang pada buah apel (Gholamnejad dkk. 2009; Fard dkk. 2011), pepaya (Andalon dkk. 2012); jeruk (Gosh dkk. 2012). *Debaryomyces hansenii*, memiliki kemampuan sebagai agens biokontrol kapang pada buah pepaya (Sharma & Srivastava 2012); jeruk (Gosh dkk. 2012). *Hyphopichia burtonii* memiliki kemampuan sebagai agens biokontrol kapang pada biji gandum (Druvefors dkk. 2005).

Pengujian biokontrol khamir antagonis terhadap kapang memperlihatkan hasil persentase tomat busuk yang bervariasi. *Candida pseudojiufengensis* UICC Y-475 dapat mereduksi pertumbuhan *A. alternata* T8.U3.K2, sehingga tomat tidak menunjukkan gejala kebusukan (0%) (Gambar II.4). Aplikasi *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475 menyebabkan *A. alternata* T8.U3.K2 hanya memperlihatkan

pertumbuhan miselium berwarna putih dengan diameter kecil, sedangkan sporulasi kapang tersebut terhambat oleh khamir.

Kemampuan *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475 dalam mereduksi pertumbuhan *A. alternata* T8.U3.K2 sehingga mengurangi kebusukan tomat sangat baik dibandingkan dengan fungisida sintetik Dithane M-45. Fungisida Dithane M-45 0,08% hanya mengurangi pertumbuhan *A. alternata* T8.U3.K2 sampai 15 hari dan hanya mereduksi kebusukan tomat hingga 67% (Gambar II.4). Informasi mengenai kemampuan *C. pseudojiufengensis* sebagai agens biokontrol pada buah pascapanen belum banyak dilaporkan. Sampai saat ini, laporan mengenai *C. pseudojiufengensis* hanya hasil isolasi dan identifikasi khamir tersebut oleh Zhao dkk. (2009) dari saluran pencernaan serangga *Cetoniidae* di Beijing, China.





Gambar II.4. Persentase tomat busuk pada pengujian biokontrol antara enam spesies khamir antagonis dan *A. alternata* T8.U3.K2 inkubasi 15 hari pada suhu ruang (26--28 °C)

Aplikasi *C. saopaulonensis* UICC Y-492 dan *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 dapat mereduksi pertumbuhan *L. theobromae* T4.U1.K4 dan mengurangi kebusukan tomat hingga 67%. Kemampuan *C. saopaulonensis* UICC Y-492 dan *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 setara dengan fungisida Dithane M-45 dalam mereduksi pertumbuhan *L. theobromae* T4.U1.K4 (Gambar II.5) dan mengurangi kebusukan tomat. Hasil pengamatan memperlihatkan permukaan kulit tomat ditumbuhi miselium kapang berwarna putih, kulit buah lembek dan berair. Kisaran diameter pertumbuhan miselium di tomat sebesar 6,92--36,62 mm (aplikasi *C. saopaulonensis* UICC Y-492) dan 15,57--18,57 mm (aplikasi *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513). Kalogiannis dkk. (2006) melaporkan aplikasi *Rh. glutinis* Y-44 pada tomat yang

diinokulasikan spora *Bot. cinerea* dapat mereduksi infeksi *Bot. cinerea* hingga 52%. Chanchaichaovivat dkk. (2007) melaporkan aplikasi khamir *P. guilliermondii* strain R13 dapat mereduksi sporulasi kapang *Col. capsici* pada permukaan buah cabai sebesar 6,5% dibandingkan dengan buah cabai yang tidak diaplikasikan khamir.

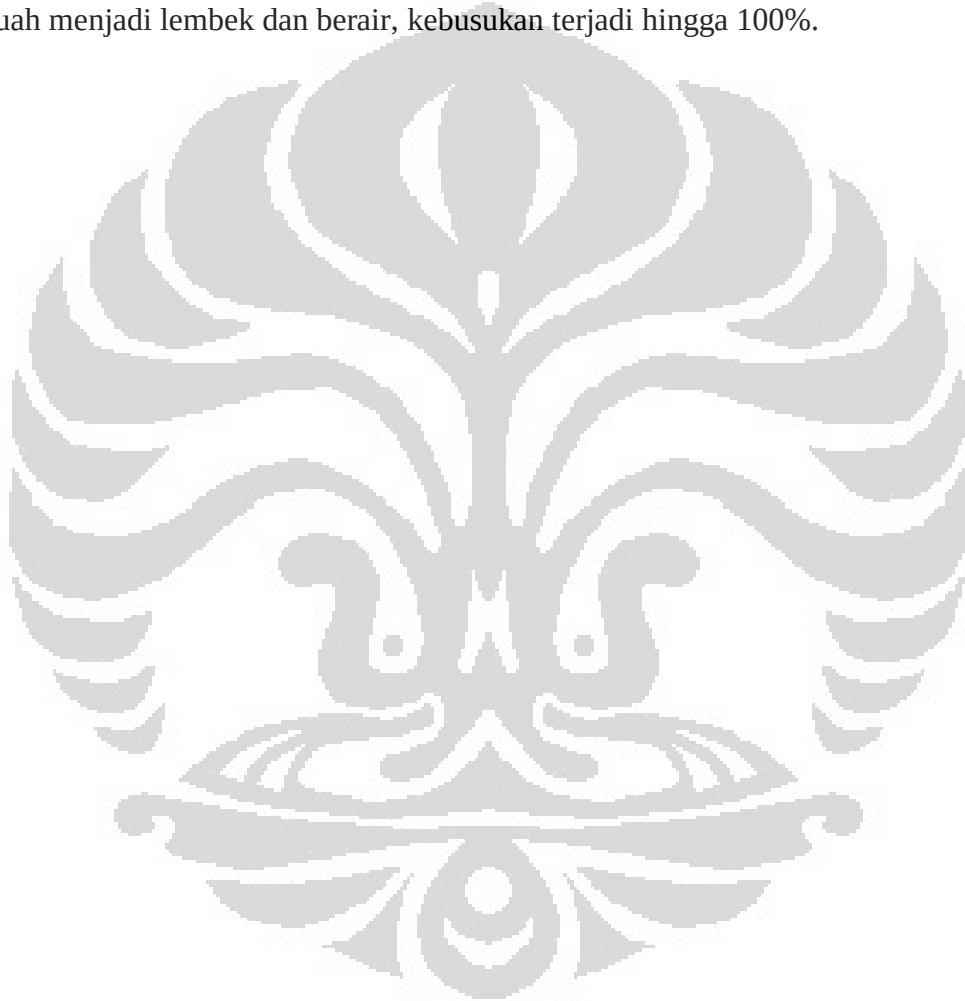
Khamir *C. saopaulonensis* dan *Rhodotorula* dapat ditemukan di habitat daun dan bunga. Kanti dkk. (2013) mengisolasi *C. saopaulonensis* dari daun tanaman *Piper nigrum* dan *Pi. betle*. Ruivo dkk. (2006) mengisolasi khamir *C. saopaulonensis* dari bunga *Heliconia velloziana* L. Emig. (*Heliconiaceae*) di hutan hujan tropis, Brazil. *Rhodotorula* merupakan kelompok khamir yang memiliki kemampuan sebagai agens biokontrol. Khamir *Rh. mucilaginosa*, *Rh. glutinis*, dan *Rh. minuta* merupakan spesies khamir yang memiliki habitat di tanah, hidup pada kulit, paru-paru, dan feses manusia (Seifi dkk., 2013).

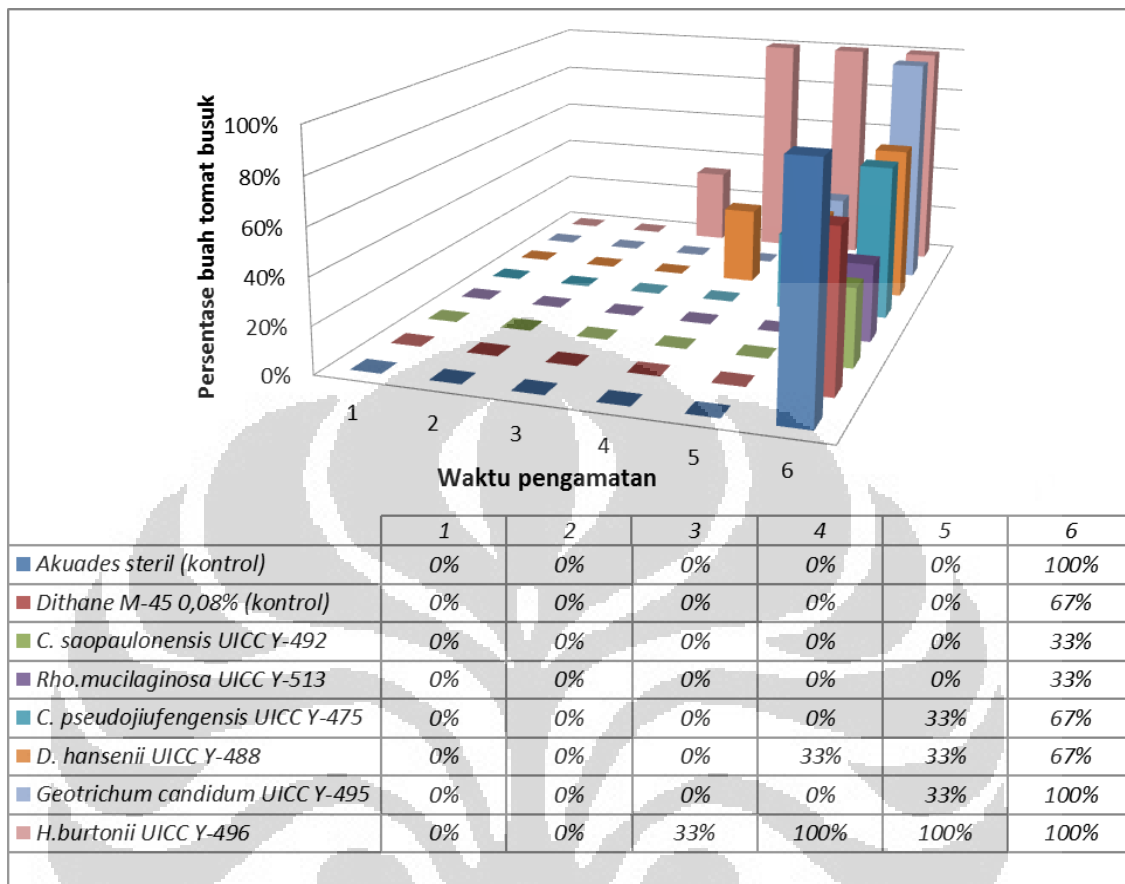
Beberapa penelitian mengenai kemampuan *Rhodotorula* sebagai agens biokontrol pada buah pascapanen telah dilakukan. Gholamnejad dkk. (2009) mengisolasi khamir *C. membranifaciens* dan *Rh. mucilaginosa* dari permukaan buah apel. Khamir tersebut dapat mencegah pertumbuhan miselium kapang patogen *Pen. expansum* pada buah apel pascapanen sebesar 185,07--1738,037 mm² inkubasi 15 hari pada suhu 20 °C. Andalon dkk., (2012) melaporkan khamir *P. guilliermondii* dan *Rh. mucilaginosa* dapat menghambat pertumbuhan kapang *Pen. expansum* sebesar 57,62% dan 34,51% berturut-turut selama inkubasi 15 hari pada suhu 20 °C.

Khamir *Geo. candidum* UICC Y-495 dan *Hyp. burtonii* UICC Y-496 tidak dapat menghambat pertumbuhan *L. theobromae* T4.U1.K4, sehingga terjadi kebusukan tomat 100%. Gejala kebusukan yang ditimbulkan mulai terlihat pada inkubasi ke-6 sampai hari ke-15, berupa permukaan kulit buah ditumbuhi miselium kapang berwarna abu-abu kehitaman dengan terdapat lingkaran cekung, kulit tomat lembek, kisut, berair kemudian busuk. Kisaran diameter pertumbuhan miselium kapang pada kulit tomat antara 4,13--34,14 mm (Lampiran II.10.--II.15).

Khamir *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 tidak dapat mencegah pertumbuhan *A. alternata* T8.U3.K2, sehingga terjadi kebusukan pada tomat 100%. Hal yang sama juga berlangsung pada *Geo. candidum* UICC Y-495 dan *Hyp. burtonii* UICC Y-496

terhadap kapang *L. theobromae* T4.U1.K4. Diduga khamir-khamir tersebut tidak dapat berkompetisi dengan kapang untuk ruang dan nutrisi pada tomat. Kapang *A. alternata* T8.U3.K2 dan *L. theobromae* T4.U1.K4 dapat memanfaatkan nutrisi pada tomat dan tumbuh dengan cepat sehingga pertumbuhan miselium kapang berlangsung cepat, diikuti dengan sporulasi berwarna abu-abu kehitaman sehingga menyebabkan adanya lingkaran cekung. Pertumbuhan kapang yang cepat pada tomat menyebabkan buah menjadi lembek dan berair, kebusukan terjadi hingga 100%.





Gambar II.5. Persentase tomat busuk pada pengujian biokontrol antara enam spesies khamir antagonis dan *L. theobromae* T4.U1.K4 inkubasi 15 hari pada suhu ruang (26--28 °C)

Hasil penelitian menunjukkan *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475 merupakan agens biokontrol yang dapat menghambat pertumbuhan kapang patogen *A. alternata* T8.U3.K2, sehingga tidak terjadi kebusukan tomat hingga 100%. Khamir *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475 adalah khamir hasil isolasi dari *phylloplane* tumbuhan *B. papyrifera*. Kemampuan khamir tersebut memberikan indikasi bahwa khamir antagonistik yang diperoleh dari habitat yang berbeda dengan kapang kompetitor dari tomat akan menyebabkan khamir antagonistik berkompetisi dengan lebih kuat untuk ruang dan nutrien yang sama. Berdasarkan Golubev (2006) khamir yang diisolasi dari habitat *phylloplane* memiliki kemampuan interaksi antagonisme

yang lebih besar jika diaplikasikan pada pengujian biokontrol pada mikroorganisme lain yang berasal dari habitat berbeda.

G. Pengujian suhu pertumbuhan

Hasil pengujian suhu pertumbuhan pada khamir antagonis dapat dilihat pada Lampiran II.16.--II.19. Hasil pengujian menunjukkan semua spesies khamir dapat tumbuh pada suhu 27 °C (suhu ruang), sedangkan hanya dua spesies khamir yang dapat tumbuh pada suhu 37 °C. Spesies khamir yang dapat tumbuh pada suhu 37 °C adalah *Saccharomycetales* sp. UICC Y 462 (asal Desa Dago Pojok Bandung) dan *C. metapsilosis* UICC Y 473, UICC Y 474 (asal Desa Sukadanu, Garut). Adanya pertumbuhan khamir tersebut pada suhu 37 °C mengindikasikan kemampuan dapat hidup pada tubuh manusia dan hewan. Khamir yang dapat tumbuh pada suhu 37 °C diduga dapat menyebabkan penyakit pada manusia. Dengan demikian, khamir dari daun *B. papyrifera* yang dapat tumbuh pada suhu 37 °C tidak dapat digunakan untuk aplikasi sebagai agens biokontrol.

Kesimpulan

Hasil pengujian interaksi antagonisme dengan *co-culture* menunjukkan *C. saopaulonensis* UICC Y-492, *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475, *Deb. hansenii* UICC Y-488, *Rh. mucilaginosa* UICC Y-476, *Geo. candidum* UICC Y-495, dan *Hyp. burtonii* UICC Y-496 merupakan khamir antagonis dan dapat menghambat pertumbuhan miselium dan menunda waktu sporulasi *A. alternata* T8.U3.K2, *Syn. racemosum* T4.U1.K1, dan *L. theobromae* T4.U1.K4 setelah inkubasi selama empat hari.

Hasil pengujian biokontrol menunjukkan *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475 merupakan khamir potensial sebagai agens biokontrol karena dapat menghambat pertumbuhan *A. alternata* T8.U3.K2 dan mencegah kebusukan tomat hingga 100%.

Khamir *C. saopaulonensis* UICC Y-492 dan *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 potensial dalam mereduksi pertumbuhan *L. theobromae* T4.U1.K4 dan mereduksi kebusukan tomat hingga 67% setelah inkubasi selama 15 hari.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ariyanti Oetari, Ph.D, yang telah membiayai penelitian ini melalui Hibah Penelitian *Indigenous Studies* UI 2009 dan 2010. Terima kasih penulis ucapkan kepada *Center of Excellence for Indigenous Biological Resources-Genome Studies* (CoE IBR-GS) FMIPA UI, atas dukungan semua fasilitas yang diberikan. Terima kasih juga ditujukan pada Bapak Iman Hidayat, Ph.D. dari LIPI, Cibinong dalam membantu memberi pengarahan dalam melakukan isolasi kapang dari tomat busuk.

DAFTAR ACUAN

- Alamri, S. & M. Hashen. 2009. The biocontrol of postharvest disease (*Botrydiplodia theobromae*) of guava (*Psidium guajava* L.) by application of yeast strain. *Postharvest Biology and Technology*. **53**: 123--130.
- Andersen, B. & J.C. Frisvad. 2004. Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52**: 7507--7513.
- Andalon, M., S. Luna & J.A Ragazzo-Sanchez. 2012. Parasitism and Substrate Competitions Effect of Antagonistic Yeasts for Biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* in papaya (*Carica papaya* L.) var Maradol. *Mexican Journal of Scientific Research*. **1**: 2--9.
- Arie, T., H. Takahashi, M. Kodama & T. Teraoka. 2007. Tomato as a model plant-pathogen interactions. *Plant Biotechnology*. **24**: 135--147.
- Badan Pusat Statistik dan Direktorat Jenderal Hortikultura. 2011. Produksi Tomat Menurut Provinsi, 2007-- 2011. Departemen Pertanian Jakarta: 48 hlm.

- Barnett, H.L. & B.B. Hunter. 1987. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4th ed. Macmillan Publishing Company, New York: 218 hlm.
- Batzing, B.L. 2002. *Microbiology: An introduction*. Brooks/Cole Thomson Learning Inc., London: xx + 780 hlm.
- Carlile, M.J., S.C. Watkinson & G.W. Gooday. 2001. *The fungi*. 2nd ed. Academic Press. California: xix + 588 hlm.
- Chan, Z. & S. Tian. 2005. Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. *Postharvest Biology and Biotechnology*. **36**: 215--223.
- Chanchaichaovivat, A.P. Ruenwongso & B. Pannijpan. 2007. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). *Biological Control*. **42**: 326--335.
- Charli, P., G. Caruso, V. Fogliano, D. Carputo, L. Frusciante & M.R. Ercolano. 2011. Development of a methodology to forecast the nutritional value of new tomato hybrids. *Euphytica*. **180**: 291--300.
- Chuku, E.C., J.A. Osakwe & W.C. Daddy. 2010. Fungal spoilage of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) using garlic and ginger. *Scientia Africana*. **9**: 41--50.
- Deak, T. 2008. *Handbook of food spoilage yeast*. 2nd ed. CRC Press, New York: xxi + 321 hlm.
- Delahaut, K. & W. Stevenson. 2004. Tomato disorder: Post-harvest fruit diseases. *Extension Factsheet*, Plant Pathology Lake St. Rm. 103, Madison. pp. 67--70.
- Direktorat Jendral Bina Produksi Hortikultura. 2002. Budidaya tomat. Direktorat Tanaman Hias, Sayuran, dan Aneka Tanaman. Departemen Pertanian Jakarta: 50 hlm.
- Doohan, F. 2006. Fungal pathogens of plants. *Dalam*: Kavanagh, K., *Fungi Biology and Applications*. John Wiley & Sons, England: 119--220.

- Druvefors, U.A. 2004. Yeast biocontrol of Grain Spoilage Moulds. Mode action of *Pichia anomala*. Thesis Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala: 44--58 hlm.
- Druvefors, U.A. & J. Schnrer. 2005. Mold-inhibitory activity of different yeast species during airtight storage of wheat grain. *FEMS Yeast*. **5**: 373--378.
- Druvefors, U.A, V. Passoth & J. Schnurer. 2005. Nutrient Effects on Biocontrol of *Penicillium roqueforti* by *Pichia anomala* J121 during Airtight Storage of Wheat. *Applied and Environmental Microbiology*. pp. 1865--1869.
- Fard, F.A., H.R. Etebarian & N. Sahebani. 2011. Biological control of gray mold of apple by *Candida membranifaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa*, and *Pichia guilliermondii*. *J. Plant. Path.* **48**: 17--26.
- Fonseca, Á. & J. Inácio. 2006. Phylloplane yeasts. *Dalam*: G. Peter & C. Rosa, *The Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 263--301.
- Gholamnejad, J., H.R. Etebarian, N.A. Sahebani & A. Roustae. 2009. Characterization of Biocontrol Activity of Two Yeast Strains from Iran against Blue Mould of Apple in Order to Reduce the Environmental Pollution. *J. Int. Environmental Application & Science*. **4**: 28--36.
- Ghosh, S.Kr., T. Santra & A. Chakravarty. 2012. Study of antagonistic yeasts isolated from some natural sources of West Bengal. *Agric. Biol. J. N. Am.* **4**: 33--40.
- Golubev, W.I. 2006. Antagonistic interactions among yeast. *Dalam*: Rosa, C. & G. Peter. 2006. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeast*. Springer-Verlag, Heidelberg: x + 579 hlm.
- Goulart, B.L., P.E. Hammer, K.B. Evensen, W. Janisiewicz & F. Takeda. 1992. Pyrrolnitrin, captan + benomyl, and high CO₂ enhance raspberry shelf life at 0 or 18 °C. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. **117**: 265--270.
- Haggag, W.M. & H.A.A. Mohamed. 2007. Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*. **1**: 7--12.

- Ismail A. M., G. Cirvilleri, G. Polizzi, P. W. Crous, J. Z. Groenewald & L. Lombard. 2012. *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. *Australasian Plant Pathol.* **41**:649--660.
- Jijakli, M.H. & P. Lepoivre. 1997. Characterization of an Exo-b-1,3-Glucanase Produced by *Pichia anomala* Strain K, Antagonist of *Botrytis cinerea* on Apples. *The American Phytopathological.* **4**: 335--341.
- Kalogiannis, S., S.E. Tjamos, A. Stergiou, P.P. Antoniou, B.N. Ziogas & E.C. Tjamos. 2006. Selection and evaluation of phyllosphere yeast as biocontrol agents against grey mould of tomato. *Eur. J. Plant. Pathol.* **116**: 69--76.
- Kanti, A., E. Sukara, K. Latifah, N. Sukarno & K. Boundy-Mills. 2013. Indonesian oleaginous yeasts isolated from *Piper betle* and *P. nigrum*. *Mycosphere.* **4**: 1015--1026.
- Kavanagh, K. 2005. *Fungi: Biology and applications*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex: xii + 267 hlm.
- Kutama, B., S. Aliyu & I. Mohammed. 2007. Fungal pathogens associated with tomatoes grown in Ohio. *The American Phytopath. Society.* **90**: 397--403.
- Laura, J., G. Chapin, Y. Wang, E. Lutton & B.M. Gardener. 2006. Distribution and fungicide sensitivity of fungal pathogens causing anthracnose-like lesions on tomatoes grown in Ohio. *The American Phytopathological Society.* **90**: 397--403.
- Landecker, E.M. 1996. *Fundamental of the fungi*. Prentice-Hall. Inc. New Jersey. 16—17.
- Lima, G., F. De Curtis, R. Castoria & V. De Cicco. 1999. Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against post-harvest rots on different fruits. *Biocontrol. Sci. Technol.* **8**: 257--267.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko., D.A. Stahl & D.P. Clark. 2012. *Brock biology of microorganisms*. 13th^{ed}. Pearson education, Inc., Boston: I-4 hlm.
- Mahovic, M., S.S. Sargent & J.A. Bartz. 2004. Identifying and controlling postharvest tomato diseases in Florida. University of Florida:1--15.

- Marri, M. & M. Guizzardi. 1997. The postharvest phase emerging technologies for the control of fungal diseases. *Phytoparasitica*. **26**: 59--66.
- Meer, H., S. Iram, I. Ahmad, F.S. Fateh & M.R. Kazmi. 2013. Identification and characterization of post harvest fungal pathogens of mango from domestic markets of Punjab. *International Journal of Agronomy and Plant Production*. **4**: 650--658.
- Nallya, M.C., V.M. Pescea, Y.P. Maturanoa, C.J. Mu~noze, M. Combinab, M.E. Toroa, L.I. Castellanos de Figueroac & F. Vazqueza. 2012. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. *Postharvest Biology and Technology*. **64**: 40--48.
- Oetari, A. & W. Sjamsuridzal. 2009. Penggunaan khamir indigenous Indonesia sebagai alternatif penanggulangan *Aspergillus* penghasil aflatoksin pada bahan pangan. Dana Riset DRPM UI. Dengan Kontrak nomor: 747N/DRPM-UI/A/N1.4/2009. Universitas Indonesia.
- Oetari, A., A. Salamah & W. Sjamsuridzal. 2007. *Laporan akhir Riset Unggulan Universitas Indonesia Tahun 2007 :Bioprospek mikosin dari khamir indigenous Indonesia (asal Kebun Raya Cibodas) sebagai biokontrol jamur patogen pada tumbuhan pangan*. FMIPA-UI. Universitas Indonesia. 1-2 hlm.
- Parey, M.A., V.K. Razdan & T.A. Sofi. 2013. Comparative study of different fungi associated with fruit rot of chilli and screening of chilli germplasm against *Colletotrichum capsici*. *Intl. J. Agri. Crop. Sci.* **5**: 723--730.
- Peever, T.L., L. Carpenter, L.W. Timner, L.M. Carris & A. Bhatia. 2005. Citrus black rot is caused by phylogenetically distinct lineages of *Alternaria alternata*. *The American Phytopathological Society*. **95**: 512--518.
- Permadi, T. 1998. Daluang kertas tradisional Jawa Barat. Saga Olah Citra, Bandung: 44 hlm.
- Ruivo, C.C.,¹ M. Lachance, C.A. Rosa, M. Bacci & F.C. Pagnocca. 2006. *Candida heliconiae* sp. nov., *Candida pinguabensis* sp. nov. and *Candida saopaulonensis* sp. nov., three ascomycetous yeasts from *Heliconia velloziana*

- (*Heliconiaceae*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **6**: 1147--1151.
- Saeed, A.F.H. & S.N. Khan. 2010. Post harvest losses of tomato in markets of district Lahore. *Mycopath*. **8**: 97--99.
- Seifi, Z., A.Z. Mahmoudabadi & S. Hydrinia. 2013. Isolation, Identification and Susceptibility Profile of *Rhodotorula* Species Isolated From Two Educational Hospitals in Ahvaz. *Jundishapur Journal of Microbiology*. **6**: 8765--8786.
- Sharma, N. & M. P. Srivastava. 2012. Antagonistic Activity of Fructoplane Yeast Against *Ulocladium* Rot of Papaya. *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*. **2**: 169--182.
- Shimon, M.B., H. Yehuda, L. Cohen, B. Weiss, A. Kobeshnikov, A. Daus, M. Goldway, M. Wisniewski & S. Droby. 2004. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agents *Candida oleophila*. *Curr. Genet*. **45**: 140--148.
- Sonoda, R.M., N.C. Hayslip & P.J. Stoffella. 1981. Tomato fruit rot infection cycle in a freash market packing operation. *Agricultural Experiment Station Journal Series*. **94**: 281--282.
- Spadaro, D. & M.L. Gullino. 2004. Biological control of postharvest diseases of pome fruit using yeast antagonists. *International Journal of Food Microbiology*. pp. 78--98.
- Sugita, T., A. Nishikawa, R. Ikeda & T. Shinoda. 1999. Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. *J. Clin. Microbiol*. **37**: 1985--1993.
- Sun, X., L. Guo & K. D. Hyde. 2011. Composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. *Fungal Diversity*. **47**: 85---95.
- Tian, S.P., J. Yao, X. Deng, B. Xiang, B. Xu, Z. Qin & Z.L., Chan. 2006. Characterization and expression of β -1-3- glucanase genes in Jujube fruit induced by microbial biocontrol agents *Cryptococcus laurentii*. *The American Phytopathological Society*. **3**: 260--267.

- Wani, A.H. 2011. An overview of fungal rot of tomato. *Mycopath.* **9**: 33--38.
- Watkins, J.E. 1999. Diseases of home garden tomatoes.
<http://digitalcommons.unl.edu/extensionhist/1265>. University of Nebraska-Lincoln. West Sussex: xi + 267 hlm.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee & J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Dalam*: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White, *PCR Protocols: Guide to Methods and Applications*. Academic Press Incorporation, New York: 315--322.
- Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintance & identification. *Dalam*: Kurtzman, C. P. & J. W. Fell. 1998. *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4th Ed. Elsevier, Amsterdam: 77--100.
- Zhang, H., L. Wang, X. Zheng & Y. Dong. 2007. Effect of yeast antagonist in combination with heat treatment on postharvest blue mold decay and *Rhizopus* decay of peaches. *Inter. Journal of Food Microbiol.* **115**: 53--58.
- Zhao, Y., K. Tu, X. Shao, W. Jing & Z. Su. 2007. Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology.* **49**:113--120.
- Zhao, H., J.J. Hua Jia, & F. Yan Bai. 2009. Four novel *Candida* species in the *Candida albicans*/*Lodderomyces elongisporus* clade isolated from the gut of flower beetles. *Antonie van Leeuwenhoek.* **95**: 23--32.
- Zhao, Y., K. Tu, X. Shao, W. Jing & Z. su. 2008. Effect of the yeast *Pichia guilliermondii* againts *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. *Postharvest Biol Technol.* **49**: 113--120.
- Zheng, X., H. Zhang & Y. Xi. 2004. Effect of *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner on biocontrol of postharvest decay of arbutus berries. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **45**: 55--60.
- Zivkovic, S., S. Stojanovic, Z. Ivanovic, N. Trkulja, N. Dolovac & J. Balaz. 2010. Morphological and molecular identification of *Collecototrichum acutatum* from tomato fruit. *Pestic. Phytomed.* **25**: 231--239.

Lampiran II.1. Lokasi dan kondisi sampel buah tomat pascapanen

No.	Sampel buah tomat	Kondisi buah tomat	Lokasi dan waktu pengambilan sampel	Jumlah isolat kapang
1	Buah tomat 1	Buah tomat busuk, kulit buah mengkerut, dan terdapat bercak kehitaman	Pasar Baru Bekasi Barat, tanggal 16 Januari 2012 pukul 10 pagi WIB	5
2	Buah tomat 2	Buah tomat busuk, kulit buah mengkerut, dan terdapat bercak kehitaman	Pasar Baru Bekasi Barat, tanggal 16 Januari 2012 pukul 10 pagi WIB	3
3	Buah tomat 3	Buah tomat busuk, kulit buah mengkerut, terdapat bercak kehitaman, dan terdapat miselium berwarna putih	Pasar Baru Bekasi Barat, tanggal 16 Januari 2012 pukul 10 pagi WIB	6
4	Buah tomat 4	Buah tomat busuk, kulit buah mengkerut, mengeluarkan air, berlendir, dan terdapat bercak berwarna kehitaman	Pasar Baru Bekasi Barat, tanggal 16 Januari 2012 pukul 10 pagi WIB	6
5	Buah tomat 5	Buah tomat busuk, kulit buah mengkerut, lembek, berair, dan terdapat bercak kehitaman	Pasar Baru Bekasi Barat, tanggal 16 Januari 2012 pukul 10 pagi WIB	3
6	Buah tomat 6	Buah tomat busuk, di bagian tengah buah bolong serta terdapat bercak kehitaman	Pasar Baru Bekasi Barat, tanggal 16 Januari 2012 pukul 10 pagi WIB	7
7	Buah tomat 7	Buah tomat busuk, berbau, mengeluarkan lendir, dan terdapat bercak kehitaman	Pasar Baru Bekasi Barat, tanggal 16 Januari 2012 pukul 10 pagi WIB	8
8	Buah tomat 8	Buah tomat busuk, di bagian tengah buah bolong, dan terdapat bercak kehitaman	Pasar Baru Bekasi Barat, tanggal 16 Januari 2012 pukul 10 pagi WIB	8
Total				46

Lampiran II.2. Preliminer observasi morfologi secara makroskopik kapang hasil isolasi pada buah tomat busuk

No.	Kode isolat	Medium	Usia	Diameter koloni (cm)	Morfologi secara makroskopik					
					Warna	Tekstur	Zonasi	Jari-jari koloni	Tetes eksudat	Warna sebalik koloni
1	T1.U1.K2	PDA	4 hari	4,3- 3,3 4-3,5 4-4,1	Putih bening	Miselium putih	- - -	- - -	- - -	Putih bening
2	T1.U1.K1	PDA	4 hari	2,2-2,8 2,7-2,8 2,7-2,7	Hifa tebal berwarna putih	Miselium tebal seperti wool	- - -	- - -	- - -	Putih
3	T1.U1.K3	PDA	4 hari	1,4-1,5 1,2-1,3 1,8-1,9	Putih dengan bagian tengah berwarna merah	Miselium tebal dengan warna merah di tengah dan berbentuk bulatan melingkar	- - -	- - -	- - -	Merah di bagian tengah
4	T1.U2.K1	PDA	4 hari	1,2-1,1 1,1-1,3 1,1-1,2	Putih dengan bagian tengah berwarna kekuningan	Miselium tipis dengan bagian tengah kekuningan	- - -	- - -	- - -	Putih dengan bagian tengah berwarna kekuningan
5	T1.U3.K1	PDA	4 hari	1,2-1,1 1-1 1-1	Putih	Miselium putih di bagian tengah tebal	- - -	- - -	- - -	Putih dengan bagian tengah berwarna kekuningan
6	T2.U1.K1	PDA	4 hari	1,5-1,4 1,6-1,2 1,2-1,2	Putih keabu-abuan	Miselium tebal dengan warna putih keabu-abuan seperti wool	- - -	- - -	- - -	Putih dan di bagian tengah kehitaman
7	T2.U1.K3	PDA	4 hari	4,3-3,6 4,2-4 4,3-4,1	Putih bening sekali	Miselium sangat tipis dan melekat pada medium	- - -	- - -	- - -	Putih sangat bening

Lampiran II.2. (Lanjutan)

No.	Kode isolat	Medium	Usia	Diameter koloni (cm)	Morfologi secara makroskopik					
					Warna	Tekstur	Zonasi	Jari-jari koloni	Tetes eksudat	Warna sebalik koloni
8	T2.U1.K2	PDA	4 hari	3,5-3,5	Putih dengan bagian tengah kehijauan	Miselium putih tebal kehijauan seperti wool	-	-	-	Hijau kehitaman
				3,4-3,3			-	-	-	
				3,2-3,2			-	-	-	
9	T3.U1.K1	PDA	4 hari	8,5-5	Putih keabu-abuan	Miselium putih dengan terdapat hifa aerial	-	-	-	Putih
				8,6-6			-	-	-	
				8,5-6			-	-	-	
10	T3.U2.K4	PDA	4 hari	1,6-1,1	Putih	Miselium tipis	-	-	-	Putih bening dengan kuning di bagian tengah
				1,5-1,6			-	-	-	
11	T3.U2.K1	PDA	4 hari	5,5-4	Putih	Miselium agak tebal	-	-	-	Putih dengan terdapat bintik kehijauan
				4,1-5			-	-	-	
				6-5			-	-	-	
12	T3.U2.K2	PDA	4 hari	3,5-2,5	Putih susu	Miselium tebal	-	-	-	Putih susu
				2,7-2,6			-	-	-	
				2,6-2,6			-	-	-	
13	T3.U2.K3	PDA	4 hari	5-8	Putih	Miselium tebal	-	-	-	Putih
				5--7			-	-	-	
				5-8			-	-	-	
14	T3.U2.K4	PDA	4 hari	1,3-1,7	Putih	Miselium tebal	-	-	-	Putih
				1,3-1,5			-	-	-	
				1,3-1,6			-	-	-	

Lampiran II.2. (Lanjutan)

No.	Kode isolat	Medium	Usia	Diameter koloni (cm)	Morfologi secara makroskopik					
					Warna	Tekstur	Zonasi	Jari-jari koloni	Tetes eksudat	Warna sebalik koloni
15	T4.U1.K1	PDA	4 hari	5,5-6,5 7-4 4-5,5	Putih	Miselium tebal seperti kapas	- - -	- - -	- - -	Krem
16	T4.U2.K1	PDA	4 hari	1-1,2 1-1 1-1	Putih bagian tengah kuning	Miselium putih tipis	- - -	- - -	- - -	Krem
17	T4.U2.K2	PDA	4 hari	3,4-3,5 3,5-3,3 3-3,1	Putih kecoklatan di bagian tengah	Miselium putih tipis	- - -	- - -	- - -	Abu-abu kekuningan
18	T4.U2.K3	PDA	4 hari	1,4-1,3 1,2-1,3 1,3-1,3	Putih	Miselium putih tipis	- - -	- - -	- - -	Putih
19	T4.U1.K2	PDA	4 hari	1,5-1,4 1,3-1,4 1,6-1,7	Putih	Miselium putih seperti kapas	- - -	- - -	- - -	Putih
20	T4.U1.K3	PDA	4 hari	1,2-1,4 1,2-1,3 1,3-1,4	Putih susu	Miselium tebal berwarna putih	- - -	- - -	- - -	Krem
21	T5.U2.K1	PDA	4 hari	1,2-1,4 1,2-1,3 1,3-1,4	Putih susu	Miselium tebal berwarna putih	- - -	- - -	- - -	Krem
22	T5.U2.K2	PDA	4 hari	2,2-2 2,1-2	Putih susu seperti serbuk	Miselium tebal berwarna putih seperti serbuk	- - -	- - -	- - -	Putih susu

Lampiran II.2. (Lanjutan)

No.	Kode isolat	Medium	Usia	Diameter koloni (cm)	Morfologi secara makroskopik					
					Warna	Tekstur	Zonasi	Jari-jari koloni	Tetes eksudat	Warna sebalik koloni
23	T5.U2.K3	PDA	4 hari	1,9-1,8 1,9-1,9	Putih susu dengan bagian tengah ungu	Miselium strilia	-	-	-	Putih
24	T6.U1.K2	PDA	4 hari	4,6-2,3 4,7-2,8	Putih susu dengan miselium di pinggir tipis	Miselium strilia	-	-	-	Putih bening
25	T6.U2.K1	PDA	4 hari	2,5-2,3 2,5-2,2	Putih susu	Miselium putih tebal	-	-	-	Putih susu
26	T6.U2.K2	PDA	4 hari	3,2-2,3 2,4-3	Putih dengan bagian tengah berwarna merah muda	Miselium tebal	-	-	-	Krem
27	T6.U2.K3	PDA	4 hari	3,2-2,5 3-2,5	Putih	Miselium menyebar	-	-	-	Putih kecoklatan
28	T6.U3.K3	PDA	4 hari	2,9-2,5 2,5-2,2	Putih susu	Miselium sterilia	-	-	-	Putih
29	T6.U3.K4	PDA	4 hari	3-2,5 2,4-2,4	Putih susu	Miselium sterilia	-	-	-	Putih
30	T6.U2.K5	PDA	4 hari	2,2-2,2 2,3-2,2	Putih susu keabu-abuan	Miselium sterilia	-	-	-	Putih kehitaman
31	T7.U2.K2	PDA	4 hari	2,2-1,7 2,3-1,6	Putih susu seperti bludru	Miselium sterilia	-	-	-	Putih

Lampiran II.2. (Lanjutan)

No.	Kode isolat	Medium	Usia	Diameter koloni (cm)	Morfologi secara makroskopik					
					Warna	Tekstur	Zonasi	Jari-jari koloni	Tetes eksudat	Warna sebalik koloni
32	T7.U3.K3	PDA	4 hari	1,6-1,3 2-1,7 2-1,8	Putih susu padat bagian tengah dengan tepi gelombang	Miselium sterilia	- - -	- - -	- - -	Putih susu
33	T7.U2.K1	PDA	4 hari	1,9-1,7 1,8-1,7	Putih susu seperti bludru	Miselium sterilia	- - -	- - -	- - -	Putih krem
34	T7.U3.K2	PDA	4 hari	2,1-2,2 2,2-2,2	Putih susu seperti bludru	Miselium sterilia	- - -	- - -	- - -	Putih krem
35	T7.U3.K2	PDA	4 hari	1,1-1 1,1-1	Putih susu	Miselium sterilia	- - -	- - -	- - -	Putih
36	T7.U3.K2	PDA	4 hari	2,3-1,8 2,3-1,7	Putih susu seperti bludru	Miselium sterilia	- - -	- - -	- - -	Putih
37	T7.U3.K3	PDA	4 hari	2,3-1,7 2,3-1,7	Putih susu seperti bludru	Miselium sterilia	- - -	- - -	- - -	Putih
38	T7.U2.K4	PDA	4 hari	1,1- 1 0,5-0,8 1,2-0,8	Putih susu	Miselium sterilia	- - -	- - -	- - -	Putih
39	T8.U2.K1	PDA	4 hari	1,5-0,8 1,2-0,9 1,3-0,8	Putih bagian tengah merah	Miselium sterilia	- - -	- - -	- - -	Putih bagian tengah kecoklatan

Lampiran II.2. (Lanjutan)

No.	Kode isolat	Medium	Usia	Diameter koloni (cm)	Morfologi secara makroskopik					
					Warna	Tekstur	Zonasi	Jari-jari koloni	Tetes eksudat	Warna sebalik koloni
40	T8.U2.K2	PDA	4 hari	1,5-1,6 1,4-1,3 1,5-1,3	Putih susu seperti bludru	Miselium sterilia	- - -	- - -	- - -	Putih bagian tengah kehijauan
41	T8.U3.K1	PDA	4 hari	2,2-2,3 2,3-2,2	Putih bagian tengah merah bata	Miselium sterilia	- - -	- - -	- - -	Kuning kecoklatan
42	T8.U3.K2	PDA	4 hari	1,8-1,8 1,9-1,8	Putih susu	Miselium sterilia	- - -	- - -	- - -	Putih
43	T8.U3.K3	PDA	4 hari	3-2,8 2,2-2,8	Putih bagian tengah abu-abu	Miselium sterilia	- - -	- - -	- - -	Putih bagian tengah kehitaman
44	T8.U1.K1	PDA	4 hari	1,7-1,6 1,7-1,5	Putih susu	Miselium sterilia	- - -	- - -	- - -	Putih
45	T8.U2.K6	PDA	4 hari	2,6-2,8 2,3-1,8	Putih susu	Miselium sterilia	- - -	- - -	- - -	Putih
46	T8.U2.K7	PDA	4 hari	2,5-2 2,5-2	Putih susu	Miselium sterilia	- - -	- - -	- - -	Putih susu

Lampiran II.3. Penapisan patogenisitas kapang-kapang penyebab buah busuk pada tomat inkubasi pada suhu ruang (26--28⁰C) selama 5 hari

No.	Kode isolat	Uji patogenisitas metode suspensi spora							
		H-2		H-3		H-4		H-5	
		Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)
1	T8.U3.K2	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar lukaterdapat lingkaran hitam sedikit	-	Buah masih segar, miselium kapang tumbuh sangat melebar dan menyebar disertai lingkaran berwarna kehitaman di sekitar luka, tampak gejala antraknose	14,17 17,51 18,34 17,31	4	14,02 19,59 25,99 21,23	5	17,89 20,27 27,99 24,83
2	T4.U1.K4	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka terdapat lingkaran hitam sedikit	-	Buah tomat masih segar, miselium putih abu-abu sudah tumbuh sedikit di sekitar luka	5,80 6,64 5,03 5,33	3	9,85 8,64 7,53 6,33	5	13,10 10,08 12,69 9,77
3	T4.U1.K1	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih terdapat lingkaran hitam sedikit	-	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh sangat cepat di sekitar luka berwarna abu-abu kehitaman	7,77 8,81 8,89 7,74	3	9,97 8,95 9,69 10,74	5	15,64 10,94 11,23 16,08
4	T3.U3.K2	Miselium sudah tumbuh di sekitar luka	-	Miselium berwarna putih abu-abu, pertumbuhannya sangat cepat, tumbuh di sekitar luka	10,34 8,54 7,51 7,59	4	16,95 11,63 11,75 10,75	5	25,21 30,28 25,75 20,54
5	T4.U1.K2	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka	-	Buah tomat masih segar, miselium berwarna abu-abu terdapat lingkaran berwarna hitam di sekitar luka	9,07 7,51 8,34 7,31	4	11,10 9,59 13,32 9,53	5	15,24 10,18 15,24 12,96

Lampiran II.3. (Lanjutan)

No.	Kode isolat	Uji patogenisitas metode suspensi spora							
		H-2		H-3		H-4		H-5	
		Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)
6	T1.U2.K1	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	-	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	6,34 7,24 9,24 6,69	4	11,01 9,46 9,85 12,37	4	11,65 13,76 13,85 17,59
7	T3.U2.K5	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	-	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih abu-abu	5,34 7,54 7,28 5,69	4	7,46 8,85 8,47 7,25	4	11,73 10,23 9,69 11,59
8	T3.U2.K3	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	-	Buah tomat masih segar, miselium berwarna putih abu-abu tumbuh cepat di sekitar luka	12,81 15,79 8,24 6,69	3	10,71 9,89 9,84 8,59	4	12,95 10,94 12,31 10,67
9	T6.U1.K2	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	-	Buah tomat masih segar, miselium berwarna coklat muda di bagian pinggir berwarna putih	4,57 5,06 5,55 5,34	3	7,50 8,57 6,91 6,38	4	9,20 9,75 8,02 10,58
10	T8.U3.K3	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	-	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh menyebar di sekitar luka dengan terdapat warna hitam di sekitar luka	8,77 8,79 7,25 8,34	4	10,23 9,49 8,37 9,95	4	11,56 13,25 9,02 10,88

Lampiran II.3. (Lanjutan)

No.	Kode isolat	Uji patogenisitas metode suspensi spora							
		H-2		H-3		H-4		H-5	
		Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)
11	T7.U3.K3	Buah tomat masih segar, miselium belum tumbuh bergerminasi	-	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih abu-abu	7,38 5,26 7,21 6,46	4	9,45 7,75 8,96 9,69	4	10,03 11,38 14,17 15,01
12	<i>Aspergillus parasthicus</i> UICC	Buah tomat masih segar, miselium belum tumbuh bergerminasi	-	Buah tomat masih segar, miselium berwarna hijau keputihan	6,38 5,26 6,71 6,56	3	7,45 11,85 13,96 10,69	4	9,58 13,86 16,70 15,02
13	T2.U1.K2	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	-	Buah tomat masih segar, miselium putih krem bagian tengah coklat, pertumbuhannya sangat cepat	5,71 6,55 7,47 7,45	2	6,76 6,98 7,53 7,67	3	7,53 7,05 8,53 8,76
14	T3.U1.K1	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	-	Buah tomat masih segar, miselium berwarna abu-abu dengan bagian tengah hitam, pertumbuhannya sangat cepat	6,38 5,26 6,71 6,56	2	9,28 7,66 8,71 7,56	3	10,49 9,98 9,71 8,59
15	T3.U2.K4	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	-	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	6,58 5,03 7,37 5,63	3	7,58 5,73 7,67 6,63	3	9,25 6,85 11,06 10,63

Lampiran II.3. (Lanjutan)

No.	Kode isolat	Uji patogenisitas metode suspensi spora							
		H-2		H-3		H-4		H-5	
		Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)
16	T3.U2.K1	Buah tomat masih segar, miselium belum tumbuh bergerminasi	-	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	8,44 7,94 6,41 6,47	2	8,48 8,57 7,41 7,47	3	10,21 12,81 7,67 8,73
17	T2.U1.K3	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	-	Buah tomat masih segar, miselium putih krem bagian tengah coklat, pertumbuhannya sangat cepat	5,51 5,05 6,47 6,45	2	6,53 6,85 8,53 7,28	3	7,03 7,85 9,73 8,55
18	T3.U2.K2	Buah tomat masih segar, miselium belum tumbuh bergerminasi	-	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	8,44 7,94 6,41 6,47	2	8,48 8,57 7,41 7,47	3	10,21 12,81 7,67 8,73
19	T3.U2.K4	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	-	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	6,58 5,03 7,37 5,63	3	7,58 5,73 7,67 6,63	3	9,25 6,85 11,06 10,63
20	T4.U2.K2	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka terdapat lingkaran hitam sedikit	-	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	6,80 5,72 5,03 5,33	2	7,82 6,72 6,43 6,73	3	9,21 6,52 8,73 7,76

Lampiran II.3. (Lanjutan)

No.	Kode isolat	Uji patogenisitas metode suspensi spora							
		H-2		H-3		H-4		H-5	
		Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)
21	T4.U2.K1	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	-	Buah tomat masih segar, miselium berwarna kuning di bagian pinggir berwarna putih	5,61 6,05 6,47 5,48	2	6,73 7,85 7,53 6,28	3	8,83 8,75 9,53 8,65
22	T6.U2.K1	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka terdapat lingkaran hitam sedikit	-	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih terdapat warna hitam di sekitar luka	10,34 9,54 6,51 9,13	3	16,67 9,54 11,00 13,44	3	18,03 10,20 12,30 16,54
23	T6.U2.K2	Buah tomat masih segar, miselium belum tumbuh bergerminasi	-	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	10,25 7,26 7,01 8,46	2	11,25 12,38 10,25 9,46	3	13,51 13,98 15,51 14,56
24	T6.U2.K3	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	-	Buah tomat masih segar, miselium berwarna putih tumbuh menyebar di sekitar luka, tidak ada gejala antraknose	7,77 8,89 7,55 6,34	3	13,49 9,17 5,91 7,38	3	14,20 13,25 11,02 10,38
25	T6.U3.K4	Buah tomat masih segar, miselium belum tumbuh bergerminasi	-	Buah tomat masih segar, miselium tumbuh bergerminasi berwarna putih	6,41 6,85 6,47 6,38	2	7,41 7,85 7,47 7,25	3	7,58 8,45 8,02 8,25

Lampiran II.3. (Lanjutan)

No.	Kode isolat	Uji patogenisitas metode suspensi spora							
		H-2		H-3		H-4		H-5	
		Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)
26	T7.U3.K2	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	-	Buah tomat masih segar, miselium tumbuh menyebar di sekitar luka dengan tidak terdapat warna hitam di sekitar luka	7,96 8,78 7,82 6,48	3	8,11 8,98 8,98 7,49	3	8,21 9,79 8,98 8,59
27	T7.U3.K2	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	-	Buah tomat masih segar, miselium tumbuh menyebar di sekitar luka dengan tidak terdapat warna hitam di sekitar luka	7,96 8,78 7,82 6,48	3	8,11 8,98 8,98 7,49	3	8,21 9,79 8,98 8,59
28	T8.U2.K2	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	-	Buah tomat masih segar, miselium tumbuh menyebar di sekitar luka dengan tidak terdapat warna hitam di sekitar luka	5,56 5,48 5,82 4,48	3	6,71 6,98 7,58 6,49	3	7,21 8,79 7,98 7,59
29	T1.U1.K2	Buah tomat masih segar, miselium belum bergerminasi	-	Buah tomat masih segar, Miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	4,06 3,54 3,00 3,93	2	5,32 3,65 3,48 4,96	2	6,15 4,65 3,76 6,86
30	T1.U1.K1	Buah tomat masih segar, miselium belum tumbuh bergerminasi	-	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	4,06 3,54 3,00 3,93	2	5,32 3,65 3,48 4,96	2	6,15 4,65 3,76 6,86

Lampiran II.3. (Lanjutan)

No.	Kode isolat	Uji patogenisitas metode suspensi spora							
		H-2		H-3		H-4		H-5	
		Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)
31	T1.U3.K1	Buah tomat masih segar, miselium belum tumbuh bergerminasi	-	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	4,06 3,54 3,00 3,93	2	5,32 3,65 3,48 4,96	2	6,15 4,65 3,76 6,86
32	T2.U1.K1	Buah tomat masih segar, miselium belum tumbuh bergerminasi	-	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	5,19 5,64 5,03 5,21	1	5,19 5,74 6,03 5,58	2	5,40 5,86 6,03 5,67
33	T4.U1.K3	Buah tomat masih segar, miselium belum tumbuh bergerminasi	-	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	2	5,48 4,03 4,57 5,53	2	5,63 5,61 5,01 6,01
34	T5.U2.K1	Buah tomat masih segar, miselium belum tumbuh bergerminasi	-	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	2	5,48 4,03 4,57 5,53	2	5,48 4,03 4,57 5,53
35	T5.U2.K2	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	-	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	2	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	2	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih

Lampiran II.3. (Lanjutan)

No.	Kode isolat	Uji patogenisitas metode suspensi spora							
		H-2		H-3		H-4		H-5	
		Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)
36	T5.U2.K3	Buah tomat masih segar, miselium belum tumbuh bergerminasi	-	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	2	5,48 4,03 4,57 5,53	2	5,48 4,03 4,57 5,53
37	T7.U2.K1	Buah tomat masih segar, miselium belum tumbuh bergerminasi	-	Buah tomat masih segar, miselium tumbuh bergerminasi berwarna putih	-	1	Buah tomat masih segar, miselium tumbuh bergerminasi berwarna putih	2	Buah tomat masih segar, miselium tumbuh bergerminasi berwarna putih
38	T7.U2.K4	Buah tomat masih segar, miselium belum tumbuh bergerminasi	-	Buah tomat masih segar, miselium tumbuh bergerminasi berwarna putih	-	1	Buah tomat masih segar, miselium tumbuh bergerminasi berwarna putih	2	Buah tomat masih segar, miselium tumbuh bergerminasi berwarna putih
39	T8.U2.K6	Buah tomat masih segar, miselium belum tumbuh bergerminasi	-	Buah tomat masih segar, miselium tumbuh bergerminasi berwarna putih	-	1	Buah tomat masih segar, miselium tumbuh bergerminasi berwarna putih	2	Buah tomat masih segar, miselium tumbuh bergerminasi berwarna putih
40	T8.U2.K7	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	-	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	2	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	2	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih

Lampiran II.3. (Lanjutan)

No.	Kode isolat	Uji patogenisitas metode suspensi spora							
		H-2		H-3		H-4		H-5	
		Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)
41	T8.U2.K1	Buah tomat masih segar, miselium belum tumbuh bergerminasi	-	Buah tomat masih segar, miselium tumbuh bergerminasi berwarna putih	-	1	Buah tomat masih segar, miselium tumbuh bergerminasi berwarna putih	2	Buah tomat masih segar, miselium tumbuh bergerminasi berwarna putih
42	<i>Aspergillus niger</i> UICC	Buah tomat masih segar, miselium belum tumbuh bergerminasi	-	Buah tomat masih segar, miselium berwarna hitam bagian pinggir putih	5,41 5,85 5,47 5,38	2	6,53 6,75 7,23 6,25	2	8,53 7,55 9,23 8,25
43	T6.U3.K3	Buah tomat masih segar, miselium belum tumbuh bergerminasi	-	Buah tomat masih segar, miselium tumbuh bergerminasi berwarna putih	-	1	Buah tomat masih segar, miselium tumbuh bergerminasi berwarna putih	1	Buah tomat masih segar, miselium tumbuh bergerminasi berwarna putih
44	T1.U1.K3	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	-	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	1	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	1	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih
45	T7.U2.K2	Buah tomat masih segar, miselium belum tumbuh bergerminasi	-	Buah tomat masih segar, miselium tumbuh bergerminasi berwarna putih	-	1	Buah tomat masih segar, miselium tumbuh bergerminasi berwarna putih	1	Buah tomat masih segar, miselium tumbuh bergerminasi berwarna putih

Lampiran II.3. (Lanjutan)

No.	Kode isolat	Uji patogenisitas metode suspensi spora							
		H-2		H-3		H-4		H-5	
		Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)	Gejala kebusukan	Diameter luka (cm)
46	T8.U3.K1	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	-	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	1	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	1	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih
47	T8.U1.K1	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	-	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	1	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih	1	Buah tomat masih segar, miselium sudah tumbuh di sekitar luka berwarna putih
48	T4.U2.K3	Buah tomat masih segar, miselium belum tumbuh bergerminasi	-	Seperti khamir	-	-	-	-	-

Keterangan parameter:

- 1: Tidak ada pertumbuhan kapang
- 2: Buah masih segar, miselium kapang tumbuh sedikit
- 3: Buah masih segar, miselium kapang bergerminasi sedikit disertai lingkaran berwarna kehitaman di sekitar luka
- 4: Buah masih segar, miselium kapang tumbuh sangat melebar dan menyebar disertai lingkaran berwarna kehitaman di sekitar luka
- 5: Buah membusuk, miselium kapang tumbuh sangat melebar dan menyebar disertai lingkaran berwarna kehitaman di sekitar luka

Lampiran II.4. Pengamatan makroskopik kapang penyebab buah tomat busuk dengan parameter 5 pada medium PDA selama 5 hari inkubasi pada suhu ruang (26--28 °C)

No.	Kode isolat	Pengamatan secara makroskopik selama 6 hari inkubasi								
		Permukaan atas koloni						Sebalik koloni		
		Warna	Tekstur	Zonasi	Radial Furrow	Growing Zone	Sporulasi	Warna	Zonasi	Radial Furrow
1	T4.U1.K1	Koloni berwarna <i>warm grey</i> II	Miselium sangat tebal seperti kapas	-	-	Ada	-	Koloni putih bagian tengah krem	-	-
2	T4.U1.K4	Koloni berwarna <i>cold grey</i> III	Miselium sangat tebal dan halus, seperti bludru	Ada	-	Ada	-	Koloni abu-abu bagian tengah hitam	Ada	-
3	T8.U3.K2	Koloni berwarna <i>warm grey</i> II	Miselium halus seperti bludru	Ada sangat jelas	-	Ada	-	Warna koloni di bagian tengah kehitaman pinggir koloni abu-abu kecoklatan	-	-
4	T4.U1.K2	Koloni berwarna <i>warm grey</i> I	Miselium halus seperti bludru	Ada	-	Ada	Ada	Warna koloni coklat di bagian pinggir putih kekuningan	-	-
5	T3.U3.K2	Koloni berwarna <i>warm grey</i> I	Miselium halus seperti bludru	-	-	Ada	-	<i>Cold grey</i> I bagian tengah hitam	-	-

Lampiran II.5. Pertumbuhan khamir asal Desa Sukadanu dan Desa Tunggilis pada perlakuan kapang *A. alternata* T8.U3.K2. dalam pengujian antagonisme menggunakan metode *co-culture*, inkubasi hari ke 4 pada suhu ruang (26--28 °C)

Pengamatan	<i>Bul.sinensis</i> UICC Y-509 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>C. metapsilosis</i> UICC Y-473 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>C. metapsilosis</i> UICC Y-474 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Warna endapan	-	-	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH medium	4,6	-	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Pengamatan	<i>C. pseudojiufengensis</i> UICC Y-475 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>C. saopaulonensis</i> UICC Y-487 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>C. saopaulonensis</i> UICC Y-492 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Lampiran II.5. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>C. saopaulonensis</i> UICC Y-494 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>Cryp. luteolus</i> UICC Y-477 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>Cryp. luteolus</i> UICC Y-486 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Pengamatan	<i>Cryp. luteolus</i> UICC Y-493 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>Cryptococcus</i> sp. UICC Y-479 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>Cryptococcus</i> sp. UICC Y-508 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	-	-	-	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,7	5,3	5,3	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Lampiran II.5. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>Cryp. rajasthanensis</i> UICC Y-482 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>Cryp. rajasthanensis</i> UICC Y-489 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>Cryp. rajasthanensis</i> UICC Y-493 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Warna endapan	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Pengamatan	<i>Cryp. rajasthanensis</i> UICC Y-498 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>Cryp. rajasthanensis</i> UICC Y-502 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>Cryp. rajasthanensis</i> UICC Y-504 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Warna endapan	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	-	-	-	-	-
Pembentukan pelikel	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Lampiran II.5. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>Deb. hansenii</i> UICC Y-488 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>Deb.hansenii</i> UICC Y-514 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>Deb. nepalensis</i> UICC Y-503 vs <i>Alternaria alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	5,8

Pengamatan	<i>Geo. candidum</i> UICC Y-495 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>Han'spora thailandica</i> UICC Y-480 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>Han'spora thailandica</i> UICC Y-481 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	-	-	Putih	Putih	-
Pembentukan pelikel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Lampiran II.5. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>Han'spora uvarum</i> UICC Y-484 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>Han'spora uvarum</i> UICC Y-485 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>Han. zeae</i> UICC Y-478 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Pengamatan	<i>Han. zeae</i> UICC Y-510 vs <i>A.alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>Han. zeae</i> UICC Y-511 vs <i>A.alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>Hyp. burtonii</i> UICC Y-496 vs <i>Alternaria alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	5,8	4,6	4,6	4,6	5,8	4,6	4,6	4,6	5,0

Lampiran II.5. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>Pichia veronae</i> UICC Y-490 vs <i>A.alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>Pseu. aphidis</i> UICC Y-501 vs <i>A.alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>Rho. dairenensis</i> UICC Y-500 vs <i>A.alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	Merah	Merah	Merah	Merah	-	Merah	Merah	Merah
Pembentukan pelikel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Pengamatan	<i>Rho.mucilaginosa</i> UICC Y-476 vs <i>A.alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>Rho. mucilaginosa</i> UICC Y-499 vs <i>A.alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>Rho. mucilaginosa</i> UICC Y-513 vs <i>A.alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Merah	Merah	Merah	-	Merah	Merah	Merah	-	Merah	Merah	Merah
Pembentukan pelikel	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Lampiran II.5. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>Tr. asahii</i> UICC Y-483 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>Tr. asahii</i> UICC Y-505 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>Tr. asahii</i> UICC Y-506 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Pengamatan	<i>Tr. asahii</i> UICC Y-506 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-				<i>Wic. anomalus</i> UICC Y-497 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	+	+	+	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Lampiran II.6. Pertumbuhan khamir asal Desa Sukadanu dan Desa Tunggilis pada perlakuan kapang *L. theobromae* dalam pengujian antagonisme menggunakan metode *co-culture*, inkubasi hari ke 4 pada suhu ruang (26--28⁰ C)

Pengamatan	<i>Bul.sinensis</i> UICC Y-509 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>C. metapsilosis</i> UICC Y-473 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>C. metapsilosis</i> UICC Y-474 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Warna endapan	-	-	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH medium	4,6	-	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Pengamatan	<i>C. pseudojiufengensis</i> UICC Y-475 vs <i>Lasiodiplodia theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>C. saopaulonensis</i> UICC Y-487 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>C. saopaulonensis</i> UICC Y-492 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
pH medium	-	+	+	+	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Lampiran II.6. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>Cryp. luteolus</i> UICC Y-477 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>Cryp. luteolus</i> UICC Y-486 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>Cryp. luteolus</i> UICC Y-493 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	-
Pembentukan pelikel	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	5,3

Pengamatan	<i>Cryptococcus</i> sp.UICC Y-479 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>Cryptococcus</i> sp.UICC Y-508 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>Cryp. rajasthanensis</i> UICC Y-482 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Warna endapan	-	Putih	Putih	-	-	Putih	Putih	Putih	-	-	-	-
Pembentukan pelikel	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	5,3	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	5,3

Lampiran II.6. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>Cryp. rajasthanensis</i> UICC Y-489 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>Cryp. rajasthanensis</i> UICC Y-491 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>Cryp. rajasthanensis</i> UICC Y-502 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Warna endapan	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	-	-	-	-
Pembentukan pelikel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	5,3

Pengamatan	<i>Cryp. rajasthanensis</i> UICC Y-504 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>Deb. hansenii</i> UICC Y-488 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>Deb. hansenii</i> UICC Y-514 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Warna endapan	-	-	-	-	-	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
pH medium	4,6	4,6	4,6	5	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Lampiran II.6. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>Deb. nepalensis</i> UICC Y-503 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>Geo. candidum</i> UICC Y-495 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>Han'spora thailandica</i> UICC Y-480 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	-
Pembentukan pelikel	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
pH medium	4,6	4,6	4,6	5,8	4,6	4,6	4,6	5,8	4,6	4,6	4,6	5,3

Pengamatan	<i>Han'spora thailandica</i> UICC Y-481 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>Han'spora uvarum</i> UICC Y-485 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>Han'spora uvarum</i> UICC Y-485 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	-	-	-	-
Pembentukan pelikel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH medium	4,6	4,6	4,6	5,3	4,6	4,6	4,6	5,3	4,6	4,6	4,6	4,6

Lampiran II.6. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>Han. zae</i> UICC Y-478 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>Han. zae</i> UICC Y-510 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>Han. zae</i> UICC Y-511 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Warna endapan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pembentukan pelikel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	5,3	4,6	4,6	4,6	5,3

Pengamatan	<i>Hyp. burtonii</i> UICC Y-496 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>Pichia veronae</i> UICC Y-490 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>Pseu. aphidis</i> UICC Y-501 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Warna endapan	Putih	Putih	Putih	Putih	-	-	-	-	Putih	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
pH medium	4,6	4,6	4,6	5,0	4,6	4,6	5,3	5,3	4,6	4,6	4,6	4,6

Lampiran II.6. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>Rho. dairenensis</i> UICC Y-500 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>Rho. mucilaginosa</i> UICC Y-476 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>Rho. mucilaginosa</i> UICC Y-499 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Merah	Merah	Merah	-	Merah	Merah	Merah	-	Merah	Merah	Merah
Pembentukan pelikel	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Pengamatan	<i>Rho. mucilaginosa</i> UICC Y-513 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>Tr. asahii</i> UICC Y-483 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>Tr. asahii</i> UICC Y-505 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Warna endapan	-	Merah	Merah	Merah	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Lampiran II.6. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>Tr. asahii</i> UICC Y-506 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>Tr. asahii</i> UICC Y-507 vs <i>L. theobromae</i> T4.U1.K4 hari ke-				<i>Wic. anomalus</i> UICC Y-497 vs <i>A. alternata</i> T8.U3.K2 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Lampiran II.7. Pertumbuhan khamir asal Desa Sukadanu dan Desa Tunggilis pada perlakuan kapang patogen *Syn. racemosum* dalam pengujian antagonisme menggunakan metode *co-culture*, inkubasi hari ke 4 pada suhu ruang (26--28⁰ C)

Pengamatan	<i>Bul.sinensis</i> UICC Y-509 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>C. metapsilosis</i> UICC Y-473 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>C. metapsilosis</i> UICC Y-474 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Warna endapan	-	-	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH medium	4,6	-	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Pengamatan	<i>C. pseudojiufengensis</i> UICC Y-475 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>C. saopaulonensis</i> UICC Y-487 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>C. saopaulonensis</i> UICC Y-492 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Lampiran II.7. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>C. saopaulonensis</i> UICC Y-494 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>Cryp. luteolus</i> UICC Y-477 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>Cryp. luteolus</i> UICC Y-486 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Pengamatan	<i>Cryp. luteolus</i> UICC Y-493 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>Cryptococcus</i> sp. UICC Y-479 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>Cryptococcus</i> sp. UICC Y-508 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	-	-	-	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,7	5,3	5,3	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Lampiran II.7. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>Cryp. rajasthanensis</i> UICC Y-482 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>Cryp. rajasthanensis</i> UICC Y-489 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>Cryp. rajasthanensis</i> UICC Y-493 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Warna endapan	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Pengamatan	<i>Cryp. rajasthanensis</i> UICC Y-498 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>Cryp. rajasthanensis</i> UICC Y-502 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>Cryp. rajasthanensis</i> UICC Y-504 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Warna endapan	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	-	-	-	-	-
Pembentukan pelikel	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Lampiran II.7. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>Deb. hansenii</i> UICC Y-488 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>Deb. hansenii</i> UICC Y-514 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>Deb. nepalensis</i> UICC Y-503 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	5,8

Pengamatan	<i>Geo. candidum</i> UICC Y-495 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>Han'spora thailandica</i> UICC Y-480 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>Han'spora thailandica</i> UICC Y-481 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	-	-	Putih	Putih	-
Pembentukan pelikel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Lampiran II.7. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>Han'spora uvarum</i> UICC Y-484 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>Han'spora uvarum</i> UICC Y-485 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>Han. zae</i> UICC Y-478 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Pengamatan	<i>Han. zae</i> UICC Y-510 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>Han. zae</i> UICC Y-511 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>Hyp. burtonii</i> UICC Y-496 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	5,8	4,6	4,6	4,6	5,8	4,6	4,6	4,6	5,0

Lampiran II.7. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>Pichia veronae</i> UICC Y-490 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>Pseu. aphidis</i> UICC Y-501 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>Rho. dairenensis</i> UICC Y-500 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	Merah	Merah	Merah	Merah	-	Merah	Merah	Merah
Pembentukan pelikel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Pengamatan	<i>Rho. mucilaginosa</i> UICC Y-476 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>Rho. mucilaginosa</i> UICC Y-499 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>Rho. mucilaginosa</i> UICC Y-513 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Merah	Merah	Merah	-	Merah	Merah	Merah	-	Merah	Merah	Merah
Pembentukan pelikel	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Lampiran II.7. (Lanjutan)

Pengamatan	<i>Tr. asahii</i> UICC Y-483 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>Tr. asahii</i> UICC Y-505 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>Tr. asahii</i> UICC Y-506 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Pengamatan	<i>Tr. asahii</i> UICC Y-506 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-				<i>Wic. anomalus</i> UICC Y-497 vs <i>Syn. racemosum</i> T4.U1.K1 hari ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Pertumbuhan miselium kapang	-	+	+	+	-	+	+	+
Sporulasi kapang	-	-	-	-	-	-	-	-
Endapan biomassa khamir	-	+	+	+	-	+	+	+
Warna endapan	-	Putih	Putih	Putih	-	Putih	Putih	Putih
Pembentukan pelikel	-	+	+	+	-	+	+	+
pH medium	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

Lampiran II.8. Penapisan kemampuan antagonisme khamir-khamir asal *B.papyrifera* dari Desa Sukadanu dan DesaTunggilis, Garut terhadap kapang penyebab buah busuk pada tomat

No.	Isolat	Kode UICC	Asal tumbuhan	<i>Alternaria alternata</i> (T8. U3. K2)	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (T4.U1.K4)	<i>Syncephalastrum racemosum</i> (T4.U1.K1)
1	<i>Candida saopaulonensis</i>	Y-492	Sukadanu, Garut Jawa Barat	+	+	+
2	<i>Candida pseudojiufengensis</i>	Y-475	Sukadanu, Garut Jawa Barat	+	+	+
3	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Y-488	Sukadanu, Garut Jawa Barat	+	+	+
4	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Y-476	Sukadanu, Garut Jawa Barat	+	+	+
5	<i>Geotrichum candidum</i>	Y-495	Toenggilis, Garut Jawa Barat	+	+	+
6	<i>Hyphopichia burtonii</i>	Y-496	Toenggilis, Garut Jawa Barat	+	+	+
7	<i>Candida metapsilosis</i>	Y-473	Sukadanu, Garut Jawa Barat	-	+	+
8	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	Y-489	Sukadanu, Garut Jawa Barat	-	+	+
9	<i>Pseudozyma aphidis</i>	Y-501	Toenggilis, Garut Jawa Barat	-	+	+
10	<i>Trichosporon asahii</i>	Y-483	Sukadanu, Garut Jawa Barat	+	-	+
11	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Y-514	Toenggilis, Garut Jawa Barat	+	-	+
12	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	Y-503	Toenggilis, Garut Jawa Barat	+	-	+
13	<i>Cryptococcus</i> sp.	Y-479	Sukadanu, Garut Jawa Barat	-	-	+
14	<i>Cryptococcus luteolus</i>	Y-486	Sukadanu, Garut Jawa Barat	-	+	-
15	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Y-485	Sukadanu, Garut Jawa Barat	-	-	+

Keterangan:

- + : Terjadi interaksi antagonisme dimana tidak terdapat pertumbuhan miselium kapang uji di atas permukaan medium PDB yang dinokulasikan dengan spesies khamir
- : Tidak terjadi interaksi antagonisme dimana terdapat pertumbuhan miselium kapang uji di atas permukaan medium PDB yang dinokulasikan dengan spesies khamir

Lampiran II.8. (Lanjutan)

No.	Isolat	Kode UICC	Asal tumbuhan	<i>Alternaria alternata</i> (T8. U3. K2)	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (T4.U1.K4)	<i>Syncephalastrum racemosum</i> (T4.U1.K1)
16	<i>Hannaella zeae</i>	Y-478	Sukadanu, Garut Jawa Barat	+	-	-
17	<i>Pichia veronae</i>	Y-490	Sukadanu, Garut Jawa Barat	+	-	-
18	<i>Bullera sinensis</i>	Y-509	Toenggilis, Garut Jawa Barat	-	-	+
19	<i>Pseudozyma aphidis</i>	Y-512	Toenggilis, Garut Jawa Barat	-	+	-
20	<i>Hannaella zeae</i>	Y-510	Toenggilis, Garut Jawa Barat	+	-	-
21	<i>Hanseniaspora thailandica</i>	Y-480	Sukadanu, Garut Jawa Barat	-	-	-
22	<i>Hanseniaspora thailandica</i>	Y-481	Sukadanu, Garut Jawa Barat	-	-	-
23	<i>Cryptococcus luteolus</i>	Y-477	Sukadanu, Garut Jawa Barat	-	-	-
24	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	Y-504	Toenggilis, Garut Jawa Barat	-	-	-
25	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	Y-502	Toenggilis, Garut Jawa Barat	-	-	-

Keterangan:

- + : Terjadi interaksi antagonisme dimana tidak terdapat pertumbuhan miselium kapang uji di atas permukaan medium PDB yang dinokulasikan dengan spesies khamir
- : Tidak terjadi interaksi antagonisme dimana terdapat pertumbuhan miselium kapang uji di atas permukaan medium PDB yang dinokulasikan dengan spesies khamir

Lampiran II.9. Parameter kualitatif pengujian antagonisme khamir dari tumbuhan *B. papyrifera* terhadap kapang penyebab buah tomat busuk inkubasi selama 7 jam suhu 25⁰C, dalam medium PDB di *assay plate* (Costar)

No.	Spesies khamir	<i>Alternaria alternata</i>							<i>Lasiodiplodia theobromae</i>							<i>Syncephalastrum racemosum</i>						
		Jam							Jam							Jam						
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
1	<i>Candida saopaulonensis</i> UICC Y-492	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	++	++	++	+++	-	-	+	+	++	+++	+++
2	<i>Hyphopichia burtonii</i> UICC Y-496	-	-	-	-	+	++	+++	-	-	-	-	+	++	+++	-	-	+	++	++	++	++
3	<i>Geotrichum candidum</i> UICC Y-495	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	++	-	-	+	+	+	++	++
4	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UICC Y-513	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	++	++	++
5	<i>Debaryomyces hansenii</i> UICC Y-488	-	-	-	-	+	+	++	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
6	<i>Candida pseudojiufengensis</i> UICC Y-475	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	++

Keterangan kategori:

- (-) Belum terjadi antagonisme
- (+) Sebagian hifa kapang dilekati oleh sel khamir
- (++) Beberapa hifa kapang dilekati oleh sel khamir
- (+++) Seluruh hifa kapang dilekati oleh sel khamir

Lampiran II.10. Jumlah buah tomat busuk pada pengujian khamir *B. papyrifera* sebagai agen biokontrol pada kapang *A. alternata* (T8.U3.K2) inkubasi 15 hari pada suhu ruang (26--28°C)

No.	Khamir potensial	<i>Alternaria alternata</i> (T8.U3.K2)	
		Gejala kebusukan	Jumlah buah tomat busuk
1	<i>Candida pseudojiutengensis</i> UICC Y-475	Buah tomat masih segar, di sekitar luka tumbuh miselium berwarna putih	0
2	<i>Candida saopoulenensis</i> UICC Y-492	Buah sudah membusuk, berair dan bau, kulit buah lembek serta mengkerut. di sekitar luka tumbuh miselium berwarna abu-abu kehitaman, terdapat lingkaran kehitaman di sekitar luka.	2
3	<i>Debaryomyces hansenii</i> UICC Y-488	Buah tomat sudah membusuk mengeluarkan air, buah kisut, dan berbau, di sekitar luka tumbuh miselium berwarna putih	2
4	<i>Geotrichum candidum</i> UICC Y-495	Buah tomat sudah membusuk, berbau, kulit buah lembek dan berair, di sekitar luka tumbuh miselium berwarna putih	2
5	<i>Hyphopichia burtonii</i> UICC Y-496	Buah tomat sudah membusuk, berair dan, kulit buah lembek agak sedikit bau, di sekitar luka tumbuh miselium berwarna abu-abu kehitaman, dengan terdapat lingkaran berwarna hitam menunjukkan gejala kerusakan pada buah	2
6	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UICCY-513	Buah sudah membusuk, berair dan bau, kulit buah lembek serta mengkerut. di sekitar luka tumbuh miselium berwarna abu-abu kehitaman, terdapat lingkaran kehitaman di sekitar luka. Menunjukkan gejala kerusakan pada buah	3

Lampiran II.11. Jumlah buah tomat busuk setelah penggunaan Diathane 45%, akuades steril, dan tanpa perlakuan pada buah tomat terhadap kapang *A. alternata* (T8.U3.K2) inkubasi 15 hari pada suhu ruang (26--28⁰C)

No.	Perlakuan	<i>Alternaria alternata</i> (T8.U3.K2)	
		Gejala kebusukan	Jumlah buah tomat busuk
1	Diathane 45%	Buah sudah membusuk, berair dan bau, kulit buah lembek dan mengkerut. di sekitar luka tumbuh miselium berwarna abu-abu kehitaman, terdapat lingkaran kehitaman di sekitar luka.	1
2	Akuades steril	Buah tomat sudah membusuk, di sekitar luka tumbuh miselium berwarna kehitaman, terdapat lingkaran berwarna kehitaman.	2
3	Tanpa perlakuan	Buah tomat sudah membusuk, berair, dan bau, di sekitar luka tumbuh miselium kapang berwarna putih menutupi setengah permukaan buah.	1

Lampiran II.12. Jumlah buah tomat busuk pada pada pengujian khamir *B. papyrifera* sebagai agen biokontrol pada buah tomat pascapanen pada kapang *L. theobromae* (T4.U1.K4) inkubasi 15 hari pada suhu ruang (26--28°C)

<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (T4.U1.K4)			
No.	Khamir potensial	Gejala kebusukan	Jumlah buah tomat busuk
1	<i>Candida saopoulenensis</i> UICC Y-492	Buah tomat membusuk dan berair, di sekitar luka tumbuh miselium berwarna putih	1
2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UICC Y-513	Buah tomat mulai membusuk, di sekitar luka tumbuh miselium berwarna abu-abu kehitaman, terdapat lingkaran kehitaman di sekitar luka.	1
3	<i>Candida pseudojiutengensis</i> UICC Y-475	Buah tomat sudah busuk, kulit berkerut dan mengeluarkan air, di sekitar luka di tumbuh miselium berwarna putih	2
4	<i>Debaryomyces hansenii</i> UICC Y-488	Buah tomat membusuk, kulit buah mengkerut, dan berair, di sekitar luka tumbuh miselium berwarna abu-abu kehitaman, terdapat lingkaran kehitaman di sekitar luka.	2
5	<i>Hyphopichia burtonii</i> UICC Y-496	Buah tomat membusuk, berair dan bau, di sekitar luka tumbuh miselium berwarna putih	3
6	<i>Geotrichum candidum</i> UICC Y-495	Buah sudah membusuk, berair dan bau, kulit buah lembek dan mengkerut. di sekitar luka tumbuh miselium berwarna abu-abu kehitaman, terdapat lingkaran kehitaman di sekitar luka.	3

Lampiran II.13. Jumlah buah tomat busuk setelah penggunaan Diathane 45%, akuades steril, dan tanpa perlakuan pada buah tomat terhadap kapang *L. theobromae* (T4.U1.K4) inkubasi 15 hari pada suhu ruang (26--28°C)

No.	Perlakuan	<i>Lasioidiplodia theobromae</i> (T4.U1.K4)	
		Gejala kebusukan	Jumlah buah tomat busuk
1	Diathane 45%	Buah tomat mulai membusuk, di sekitar luka tumbuh miselium kapang berwarna putih.	2
2	Akuades steril	Buah tomat sudah membusuk, di sekitar luka tumbuh miselium berwarna kehitaman, terdapat lingkaran berwarna kehitaman.	3
3	Tanpa perlakuan	Buah tomat sudah membusuk, berair, dan bau, di sekitar luka tumbuh miselium kapang berwarna putih.	1

Lampiran II.14. Diameter sampel buah tomat busuk pada pengujian khamir dari *B. papyrifera* sebagai agen biokontrol pada buah tomat pascapanen pada kapang *Alternaria alternata* (T8.U3.K2)

Variasi pengujian : Buah tomat dilukai, disiram suspensi sel *Candida pseudojiutegensis* UICC Y-475, diinokulasi suspensi spora *Alternaria alternata* (T8.U3.K2)

Ulangan	Diameter kerusakan di sekitar luka "a" (mm)						Diameter kerusakan di sekitar luka "b" (mm)					
	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Variasi pengujian : Buah tomat dilukai, disiram suspensi sel *Debaryomyces hansenii* UICC Y-488, diinokulasi suspensi spora *Alternaria alternata* (T8.U3.K2)

Ulangan	Diameter kerusakan di sekitar luka "a" (mm)						Diameter kerusakan di sekitar luka "b" (mm)					
	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15
1	0	0	0	0	(6,31) busuk	busuk	0	0	0	busuk	(5,86) busuk	busuk
2	0	0	0	0	(6,66) busuk	busuk	0	0	0	0	(7,30) busuk	busuk
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Lampiran II.14. (Lanjutan)

Variasi pengujian : Buah tomat dilukai, disiram suspensi sel *Hypopichia burtonii* UICC Y-496, diinokulasi suspensi spora *Alternaria alternata* (T8.U3.K2)

Ulangan	Diameter kerusakan di sekitar luka "a" (mm)						Diameter kerusakan di sekitar luka "b" (mm)					
	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15
1	0	0	0	0	(5,24) busuk	busuk	0	0	0	busuk	(5,47) busuk	busuk
2	0	0	0	0	0	(8,63) busuk	0	0	0	0	0	(11,22) busuk
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Variasi pengujian : Buah tomat dilukai, disiram suspensi sel *Geotrichum candidum* UICC Y-495, diinokulasi suspensi spora *Alternaria alternata* (T8.U3.K2)

Ulangan	Diameter kerusakan di sekitar luka "a" (mm)						Diameter kerusakan di sekitar luka "b" (mm)					
	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15
1	0	0	0	0	(18,76) busuk	busuk	0	0	0	0	(7,29) busuk	busuk
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	(7,64) busuk	0	0	0	0	0	(10,02) busuk

Lampiran II.14. (Lanjutan)

Variasi pengujian : Buah tomat dilukai, disiram suspensi sel *Candida saopaulonensis* UICC Y-492, diinokulasi suspensi spora *Alternaria alternata* (T8.U3.K2)

Ulangan	Diameter kerusakan di sekitar luka "a" (mm)						Diameter kerusakan di sekitar luka "b" (mm)					
	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15
1	0	0	0	0	(17,42) busuk	busuk	0	0	0	busuk	(8,76) busuk	busuk
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	(7,32) busuk	0	0	0	0	0	(8,08) busuk

Variasi pengujian : Buah tomat dilukai, disiram suspensi sel *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-513, diinokulasi suspensi spora *Alternaria alternata* (T8.U3.K2)

Ulangan	Diameter kerusakan di sekitar luka "a" (mm)						Diameter kerusakan di sekitar luka "b" (mm)					
	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15
1	0	0	(4,13) busuk	busuk	busuk	busuk	0	0	(5,95) busuk	busuk	busuk	busuk
2	0	0	0	0	(7,91) busuk	busuk	0	0	0	0	(9,78) busuk	busuk
3	0	0	0	0	0	(13,80) busuk	0	0	0	0	0	(13,39) busuk

Lampiran II.14. (Lanjutan)

Variasi pengujian : Buah tomat dilukai, disiram akuades steril, diinokulasi suspensi spora *Alternaria alternata* (T8.U3.K2)

Ulangan	Diameter kerusakan di sekitar luka "a" (mm)						Diameter kerusakan di sekitar luka "b" (mm)					
	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15
1	0	0	0	0	0	(18,9) busuk	0	0	0	0	0	(22,0) busuk
2	0	0	0	0	0	(24,0) busuk	0	0	0	0	0	(27,80) busuk
3	0	0	0	0	0	busuk	0	0	0	0	busuk	busuk

Variasi pengujian : Buah tomat dilukai, disiram fungisida Dithane M-45 0,08%, diinokulasi suspensi *Alternaria alternata* (T8.U3.K2)

Ulangan	Diameter kerusakan di sekitar luka "a" (mm)						Diameter kerusakan di sekitar luka "b" (mm)					
	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	(20,82) busuk	0	0	0	0	0	(22,17) busuk
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Lampiran II.15. Diameter sampel buah tomat busuk pada pengujian khamir dari *B. papyrifera* sebagai agen biokontrol pada buah tomat pascapanen pada kapang *Lasiodiplodia theobromae* (T4.U1.K4)

Variasi pengujian : Buah tomat dilukai, disiram suspensi sel *Candida pseudojiutegensis* UICC Y-475, diinokulasi suspensi spora *Lasiodiplodia theobromae* (T4.U1.K4)

Ulangan	Diameter kerusakan di sekitar luka "a" (mm)						Diameter kerusakan di sekitar luka "b" (mm)					
	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15
1	0	0	0	0	0	(14,84) busuk	0	0	0	0	0	(5,14) busuk
2	0	0	0	0	(6,42) busuk	busuk	0	0	0	0	(3,09) busuk	busuk
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Variasi pengujian : Buah tomat dilukai, disiram suspensi sel *Debaryomyces hansenii* UICC Y-488, diinokulasi suspensi spora *Lasiodiplodia theobromae* (T4.U1.K4)

Ulangan	Diameter kerusakan di sekitar luka "a" (mm)						Diameter kerusakan di sekitar luka "b" (mm)					
	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15
1	0	0	0	(32,81) busuk	busuk	busuk	0	0	0	(7,43) busuk	busuk	busuk
2	0	0	0	0	0	(18,77) busuk	0	0	0	0	0	(25,58) busuk
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Lampiran II.15. (Lanjutan)

Variasi pengujian : Buah tomat dilukai, disiram suspensi sel *Hypopichia burtonii* UICC Y-496, diinokulasi suspensi spora *Lasiodiplodia theobromae* (T4.U1.K4)

Ulangan	Diameter kerusakan di sekitar luka "a" (mm)						Diameter kerusakan di sekitar luka "b" (mm)					
	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15
1	0	0	0	(12,63) busuk	busuk	busuk	0	0	0	(8,38) busuk	busuk	busuk
2	0	0	0	(32,95) busuk	busuk	busuk	0	0	0	(13,86) busuk	busuk	busuk
3	0	0	(3,83) busuk	busuk	busuk	busuk	0	0	(10,02) busuk	busuk	busuk	busuk

Variasi pengujian : Buah tomat dilukai, disiram suspensi sel *Geotrichum candidum* UICC Y-495, diinokulasi suspensi spora *Lasiodiplodia theobromae* (T4.U1.K4)

Ulangan	Diameter kerusakan di sekitar luka "a" (mm)						Diameter kerusakan di sekitar luka "b" (mm)					
	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15
1	0	0	0	0	(26,21) busuk	busuk	0	0	0	0	(12,53) busuk	busuk
2	0	0	0	0	0	(17,33) busuk	0	0	0	0	0	(8,67) busuk
3	0	0	0	0	0	(21,94) busuk	0	0	0	0	0	(34,14) busuk

Lampiran II.15. (Lanjutan)

Variasi pengujian : Buah tomat dilukai, disiram suspensi sel *Candida saopaulonensis* UICC Y-492, diinokulasi suspensi spora *Lasiodiplodia theobromae* (T4.U1.K4)

Ulangan	Diameter kerusakan di sekitar luka "a" (mm)						Diameter kerusakan di sekitar luka "b" (mm)					
	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	(36,62) busuk	0	0	0	0	0	(6,92) busuk
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Variasi pengujian : Buah tomat dilukai, disiram suspensi sel *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-513, diinokulasi suspensi spora *Lasiodiplodia theobromae* (T4.U1.K4)

Ulangan	Diameter kerusakan di sekitar luka "a" (mm)						Diameter kerusakan di sekitar luka "b" (mm)					
	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	(15,57) busuk	0	0	0	0	0	(18,57) busuk
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Lampiran II.15. (Lanjutan)

Variasi pengujian : Buah tomat dilukai, disiram akuades steril, diinokulasi suspensi spora *Lasiodiplodia theobromae* (T4.U1.K4)

Ulangan	Diameter kerusakan di sekitar luka "a" (mm)						Diameter kerusakan di sekitar luka "b" (mm)					
	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15
1	0	0	0	0	0	(22,45) busuk	0	0	0	0	0	(22,0) busuk
2	0	0	0	0	0	(18,0) busuk	0	0	0	0	0	(27,84) busuk
3	0	0	0	0	0	(33,40) busuk	0	0	0	0	0	(37,80) busuk

Variasi pengujian : Buah tomat dilukai, disiram fungisida Dithane M-45 0,08%, diinokulasi suspensi *Lasiodiplodia theobromae* (T4.U1.K4)

Ulangan	Diameter kerusakan di sekitar luka "a" (mm)						Diameter kerusakan di sekitar luka "b" (mm)					
	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15
1	0	0	0	0	0	(6,17) busuk	0	0	0	0	0	(3,42) busuk
2	0	0	0	0	0	(3,25) busuk	0	0	0	0	0	(2,87) busuk
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Lampiran II.16. Hasil pengujian kemampuan tumbuh khamir asal daun *B. papyrifera* Desa Dago Pojok, Bandung pada suhu 27 °C dan 37 °C medium YMA, selama 3 hari.

No.	Kode Isolat	Kode UICC	Spesies terdekat hasil Blast berdasarkan sekuens daerah ITS (Primer ITS5)	Uji suhu pertumbuhan	
				Suhu Ruang 27 °C	37 °C
1	BD2S1.MF1.3	Y-469	<i>Candida quercitrusa</i>	+	-
2	BD2S1.D.11	Y-470	<i>Candida quercitrusa</i>	+	-
3	BD1S1. WM 1.5	Y-456	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	+	-
4	BD2S2.WM1.20	Y-465	<i>Hyphopichia burtonii</i>	+	-
5	BD2S2.WM1.32	Y-468	<i>Hyphopichia burtonii</i>	+	-
6	BD2S2 D.12	Y-471	<i>Kodamaea ohmeri</i>	+	-
7	BD2S1. WM.34	Y-472	<i>Kodamaea ohmeri</i>	+	-
8	BD2S2.D1.15	Y-462	<i>Saccharomycetales sp.</i>	+	+
9	BD1S1. WM 1.7	Y-453	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	+	-
10	BD1S1. DM 5	Y-455	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	+	-
11	BD2S2 WM1.3	Y-460	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	+	-
12	BD2S2 WM 1.6	Y-461	<i>Cryptococcus luteolus</i>	+	-
13	BD1S2. WM 1.2	Y-458	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	+	-
14	BD2.D2.W.25	Y-467	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	+	-
15	BD2D1.1 W1.20	Y-463	<i>Hannaella zeae</i>	+	-
16	BD2D1.1.W2.15	Y-464	<i>Hannaella zeae</i>	+	-
17	BD1S2. WM 2.1	Y-459	<i>Pseudozyma aphidis</i>	+	-
18	BD1S1. WM 1.8	Y-457	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	+	-
19	BD1S1. DM 1	Y-454	<i>Rhodotorula glutinis</i>	+	-
20	BD2S2WM2.4	Y-466	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	-

Keterangan + : terjadi pertumbuhan koloni khamir

- : tidak terjadi pertumbuhan koloni khamir

Lampiran II.17. Hasil pengujian kemampuan tumbuh khamir asal daun *B. papyrifera* Desa Sukadanu, Garut pada suhu 27 °C dan 37 °C medium YMA, selama 3 hari.

No .	Kode Isolat	Kode UICC	Spesies terdekat hasil Blast berdasarkan sekuens daerah ITS (Primer ITS4 dan ITS5)	Uji suhu pertumbuhan	
				Suhu Ruang 27 °C	37 °C
1	SUK2S2. WM 1.1	Y-473	<i>Candida metapsilosis</i>	+	+
2	SUK2S1. WM 1.1	Y-474	<i>Candida metapsilosis</i>	+	+
3	SUK2S1. WM 1	Y-475	<i>Candida pseudojiufengensis</i>	+	-
4	SUK2D1.2.W1.81	Y-494	<i>Candida saopaulonensis</i>	+	-
5	SUK1 D1.2.W1.8	Y-487	<i>Candida saopaulonensis</i>	+	-
6	SUK1.D1.WM.8	Y-492	<i>Candida saopaulonensis</i>	+	-
7	SUK1D1.2.W1.16	Y-488	<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	-
8	SUK 2D2.2 W1.14	Y-480	<i>Hanseniaspora thailandica</i>	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh
9	SUK1.D2.2.W1.2	Y-481	<i>Hanseniaspora thailandica</i>	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh
10	SUK1 D2.2.W1.8	Y-484	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	+	-
11	SUK1 D1.2.W1.4	Y-485	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	+	-
12	SUK2S2.DM2	Y-490	<i>Pichia veronae</i>	+	-
13	SUK 2D2.1. W1.1	Y-479	<i>Cryptococcus</i> sp.	+	-
14	SUK 2D2.2 W1.13	Y-477	<i>Cryptococcus luteolus</i>	+	-
15	SUK1D2.1.W1.5	Y-486	<i>Cryptococcus luteolus</i>	+	-
16	SUK.1.D1.2.W1.20	Y-493	<i>Cryptococcus luteolus</i>	+	-
17	SUK1S2. DM.5	Y-491	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	+	-
18	SUK1D1.2.W1.12	Y-482	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	+	-
19	SUK1S2.DM1	Y-489	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	+	-
20	SUK2D2.2 W1. 15	Y-478	<i>Hannaella zeae</i>	+	-
21	SUK2S2. WM 2.4	Y-476	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	-
22	SUK1D2.2.W1.7	Y-483	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-

Keterangan + : terjadi pertumbuhan koloni khamir

- : tidak terjadi pertumbuhan koloni khamir

Lampiran II.18. Hasil pengujian kemampuan tumbuh khamir asal daun *B. papyrifera* Desa Tunggilis, Garut pada suhu 27 °C dan 37 °C medium YMA, selama 3 hari.

No.	Kode Isolat	Kode UICC	Spesies terdekat hasil Blast berdasarkan sekuens daerah ITS (Primer ITS5)	Uji suhu pertumbuhan	
				Suhu Ruang 27 °C	37 °C
1	T1S2. MF 4	Y-503	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	+	-
2	T.D1.2.W1.16	Y-514	<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	-
3	T2S2. MF 3	Y-495	<i>Geotrichum candidum</i>	+	-
4	T2S2.WM 1.4	Y-496	<i>Hyphopichia burtonii</i>	+	-
5	T2S1. MF 8	Y-497	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	+	-
6	T.D1.2.W1	Y-509	<i>Bullera sinensis</i>	+	-
7	T.D2.1.W1	Y-502	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	+	-
8	T2S2. WM 2.9	Y-498	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	+	-
9	T1S1. WM 1.3	Y-504	<i>Cryptococcus rajathanensis</i>	+	-
10	T.D2.1.W1.1	Y-508	<i>Cryptococcus rajathanensis</i>	+	-
11	T.D1.2.W1.2	Y-510	<i>Cryptococcus rajathanensis</i>	+	-
12	T.D.1 W1.4	Y-511	<i>Cryptococcus rajathanensis</i>	+	-
13	T2S2 WM 2.3	Y-501	<i>Cryptococcus rajathanensis</i>	+	-
14	T.D1.2.W1.12	Y-512	<i>Cryptococcus rajathanensis</i>	+	-
15	T1S2. MF 2.3	Y-500	<i>Cryptococcus rajathanensis</i>	+	-
16	T2S1. MF 6	Y-499	<i>Cryptococcus rajathanensis</i>	+	-
17	T.D1.2.W1.11	Y-513	<i>Cryptococcus rajathanensis</i>	+	-
18	T1S2. MF	Y-506	<i>Cryptococcus rajathanensis</i>	+	-
19	T1S1. MF 2	Y-505	<i>Cryptococcus rajathanensis</i>	+	-
20	T1S2. MF 2	Y-507	<i>Cryptococcus rajathanensis</i>	+	-

Keterangan + : terjadi pertumbuhan koloni khamir

- : tidak terjadi pertumbuhan koloni khamir

Lampiran II.19. Hasil pengujian kemampuan tumbuh khamir asal daun *B. papyrifera* Desa Trowulan, Mojokerto pada suhu 27 °C dan 37 °C medium YMA, selama 3 hari.

No.	Kode Isolat	Kode UICC	Spesies terdekat hasil Blast berdasarkan sekuens daerah ITS (Primer ITS5)	Uji suhu pertumbuhan	
				Suhu Ruang 27 °C	37 °C
1	TR1S1 WM 2.6	Y-516	<i>Aureobasidium</i> sp.	+	-
2	TR2S2 WM2.10	Y-527	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	-
3	TR2S2 WM 2.9	Y-528	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	-
4	TR1S2 MF3.5	Y-519	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	-
5	TR1.D1.D.30	Y-533	<i>Candida orthopsilosis</i>	+	-
6	TR1S2 WM 1.3	Y-517	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	-
7	TR1S2 WM 1.5	Y-518	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	-
8	TR2S1 WM 1.5	Y-529	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	-
9	TR2S1.WM1.11	Y-524	<i>Cryptococcus flavescens</i>	+	-
10	TR2S2. WM 1	Y-525	<i>Cryptococcus flavescens</i>	+	-
11	TR2S1. WM 1.3	Y-526	<i>Cryptococcus flavescens</i>	+	-
12	TR1S1 WM 2.3	Y-515	<i>Cryptococcus flavescens</i>	+	-
13	TR2S2. WM1.1	Y-523	<i>Cryptococcus flavescens</i>	+	-
14	TR2.D1.W1.11	Y-534	<i>Cryptococcus flavus</i>	+	-
15	TR2S1. WM 1.51	Y-530	<i>Pseudozyma thailandica</i>	+	-
16	TR1S2 MF6.9	Y-520	<i>Rhodotorula glutinis</i>	+	-
17	TR1S1 WM 2.1	Y-522	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	-
18	TR1S2 DW 1.3	Y-521	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	-
19	TR2S1.DW 1.1	Y-531	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	-
20	TR2S1.DW 1.2	Y-532	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	-

Keterangan + : terjadi pertumbuhan koloni khamir

- : tidak terjadi pertumbuhan koloni khamir

Lampiran II.20. Daftar singkatan genus pada tumbuhan, khamir, dan kapang yang dipergunakan dalam penulisan disertasi

No.	Keterangan	Singkatan
A.	Tumbuhan	
	<i>Broussonetia</i>	B.
	<i>Capsicum</i>	Cap.
	<i>Piper</i>	Pi.
B.	Khamir	
	<i>Bullera</i>	Bul.
	<i>Candida</i>	C.
	<i>Cryptococcus</i>	Cr.
	<i>Debaryomyces</i>	Deb.
	<i>Cyberlindnera</i>	Cyb.
	<i>Geotrichum</i>	Geo.
	<i>Hannaella</i>	Han.
	<i>Hanseniaspora</i>	H'spora.
	<i>Hypophichia</i>	Hyp.
	<i>Kluyveromyces</i>	K.
	<i>Pichia</i>	P.
	<i>Pseudozyma</i>	Pseu.
	<i>Rhodotorula</i>	Rh.
	<i>Saccharomyces</i>	Sacch.
	<i>Sporobolomyces</i>	Spo.
	<i>Trichosporon</i>	Tr.
	<i>Wickerhamomyces</i>	Wic.
	<i>Rhodospiridium</i>	Rho.
C.	Kapang	
	<i>Alternaria alternata</i>	A.
	<i>Aspergillus</i>	Asp.
	<i>Botrytis</i>	Bot.
	<i>Colletotrichum</i>	Col.
	<i>Fusarium</i>	Fus.
	<i>Lasiodiplodia</i>	L.
	<i>Monilinia</i>	Mon.
	<i>Penicillium</i>	Pen.
	<i>Rhizopus</i>	R.
	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Syn.

Makalah III

VIABILITAS KHAMIR ANTAGONIS TUMBUHAN SAEH (*Broussonetia papyrifera* (L.) L' Her. ex Vent.) YANG MEMILIKI KEMAMPUAN BIOKONTROL SETELAH DIPRESERVASI PADA SUHU -80° C

Viability of antagonistic yeasts from saeh (*Broussonetia papyrifera* (L.) L' Her. ex Vent.) with biocontrol ability after freezing at -80° C

Dalia Sukmawati

ABSTRACT

This study was aimed to investigate the viability of the antagonistic yeasts with biocontrol ability after being preserved at -80° C. Four yeast species (*Candida pseudojiufengensis* UICC Y-475, *Candida saopoulensis* UICC Y-492, *Hyphopichia burtonii* UICC Y-496, and *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-513) with biocontrol ability against fungal pathogen on tomato fruit were examined for their viability after preservation at -80° C. The viability of yeasts after preservation with addition of protectants (10% glycerol and 5% trehalose) and without protectant (aquadest, control) were compared. Yeast cells harvested at exponential phase of growth (48 h) were used as inoculum. The numbers of cells for each strain before freezing (H0) were as follows: *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475 (2.40×10^8 CFU/ml), *C. saopoulensis* UICC Y-492 (2.00×10^8 CFU/ml), *Hyp. burtonii* UICC Y-496 (2.70×10^8 CFU/ml), and *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 (2.77×10^8 CFU/ml). The cells were suspended in protectant solution. The yeast viability was observed after being preserved at -80° C on day-1 (H1), day-7 (H7), day-14 (H14), day-30 (H-30), and day-180 (H-180). The results showed that all strains did not lose their viability after freezing at -80° C for 180 days. The numbers of cells for each strain after revival from preservation after 180 days were as follows: *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475 (1.08×10^8 CFU/ml), *C. saopoulensis* UICC Y-492 (0.65×10^8 CFU/ml), *Hyp. burtonii* UICC Y-496 (1.76×10^8 CFU/ml), and *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 (2.13×10^8 CFU/ml). All strains showed a high viability ($\geq 1 \times 10^7$ CFU/ml) after preservation. The numbers of cells after preservation were stable (10^8 CFU/ml) or decrease 10^1 CFU/ml. The numbers of yeast cells with the addition of protectants were higher than control (without the addition of protectants), after preservation. Freezing method at -80° C is applicable for long-term preservation of yeasts.

Keywords: Freezing, preservation, protectant, viability, yeast

PENDAHULUAN

Upaya menjaga kelestarian plasma nutfah terutama mikroorganisme perlu dilakukan. Salah satu cara menjaga kelangsungan hidup mikroorganisme tanpa terjadi perubahan fisiologi dan genetik adalah menggunakan metode preservasi yang tepat (Nagai dkk., 2005). Preservasi adalah upaya penyimpanan dan pemeliharaan koleksi atau plasma nutfah mikroba dalam jangka waktu tertentu (Machmud, 2001).

Preservasi khamir merupakan upaya yang bertujuan mempertahankan viabilitas khamir dengan cara mereduksi metabolisme khamir selama proses penyimpanan (Robert dkk., 1990). Tujuan preservasi adalah menjaga viabilitas biakan dalam jangka waktu tertentu tanpa terjadi perubahan morfologi, fisiologi, dan genetik (Nakasone dkk., 2004; Smith & Onions, 1983). Penggunaan metode preservasi yang tepat akan menjaga viabilitas dan stabilitas karakter khamir selama jangka waktu lama. Metode preservasi dikatakan efektif apabila mikroorganisme yang dipreservasi memiliki tingkat viabilitas yang tinggi setelah proses preservasi (Nagai dkk., 2005).

Salah satu metode preservasi yang dapat digunakan untuk khamir adalah *freezing*. Prinsip dasar preservasi dengan *freezing* adalah membekukan sel pada suhu -70°C sampai -85°C (Obase dkk., 2011). Pembekuan sel menyebabkan metabolisme sel menjadi tidak aktif, namun viabilitas sel tetap terjaga (Mikata, 1999). Fungi yang dipreservasi pada suhu rendah (-20°C sampai -80°C) dapat memiliki viabilitas yang tinggi (Mueller dkk., 2004). Nagai dkk. (2005) melakukan preservasi fungi koleksi *National Institute Agrobiological Sciences* (NIAS), Japan menggunakan metode *freezing* pada -80°C. Preservasi fungi koleksi NIAS dilakukan selama 1 tahun. Fungi yang memiliki viabilitas tinggi setelah dipreservasi antara lain dari *Ascomycota* (96,1%), dan *Basidiomycota* (98%).

Preservasi yang tepat sangat penting bagi khamir yang merupakan agen biokontrol. Beberapa metode preservasi jangka panjang telah dilaporkan oleh peneliti untuk preservasi khamir yang merupakan agen biokontrol. *Candida sake* merupakan agens biokontrol terhadap kapang *Penicillium expansum* penyebab

kebusukan pada buah apel. Untuk memperoleh suatu agen biokontrol yang bernilai komersial, diperlukan agens biokontrol yang memiliki viabilitas tinggi, dan memiliki kemampuan yang stabil sebagai agens biokontrol pada produk pascapanen. *Candida sake* memiliki kemampuan hidup sebesar 85% setelah dipreservasi dengan metode *freeze-drying* (Torres dkk., 2003). Li dan Tian (2006) melakukan preservasi khamir *Cryptococcus laurentii* yang memiliki kemampuan biokontrol terhadap kapang *Penicillium expansum* penyebab kebusukan buah apel. Khamir tersebut dipreservasi dengan metode *freeze-drying* menggunakan gula sebagai *cryoprotectant* kemudian disimpan pada suhu 4°C, setelah 90 hari, khamir tersebut masih memiliki kemampuan sebagai agen biokontrol terhadap kapang *Penicillium expansum*. Nishida dkk. (2004) melaporkan khamir *Saccharomyces cerevisiae* ONY1 di preservasi pada suhu – 20°C selama dua minggu, khamir tersebut masih memiliki viabilitas tinggi dan kemampuan dalam memfermentasi glukosa sebesar 70,5%.

Keberhasilan kriopreservasi mikroorganisme dipengaruhi oleh banyak faktor, sebagai contoh: jenis spesies, strain ukuran sel dan bentuk, fase pertumbuhan dan kecepatan pertumbuhan, komposisi medium pertumbuhan, pH, osmolaritas dan aerasi, kandungan air sel, kandungan lipid, kepadatan sel pada saat *freezing*, komposisi medium *freezing*, cooling rate, suhu penyimpanan dan lama penyimpanan, kecepatan pemanasan, dan medium recovery. Salah satu faktor yang paling penting adalah komposisi medium yang digunakan untuk mensuspensikan organisme untuk *freezing* (Hubálek, 2003). Senyawa-senyawa protektan umumnya digunakan untuk melindungi sel selama proses *freezing*, biasanya digunakan sebagai medium untuk mensuspensikan mikroorganisme yang akan dipreservasi.

Protektan adalah senyawa kimia yang dapat mengurangi kerusakan membran sel selama proses preservasi sehingga viabilitas sel dapat terjaga (Liu dkk., 2009). Kelompok senyawa yang dapat berperan sebagai protektan adalah asam amino, sakarida, gula alkohol, dan makromolekul. Syarat protektan adalah dapat larut dalam air, dapat melakukan penetrasi ke dalam sel, dan tidak beracun (Pegg, 2007). Berdasarkan kemampuan dalam melindungi sel selama proses

preservasi, protektan terbagi menjadi dua jenis, yaitu protektan intraseluler dan protektan ekstraseluler (Morgan dkk., 2006).

Protektan intraseluler merupakan protektan yang dapat masuk ke dalam membran sel karena ukuran molekul yang relatif kecil, contohnya antara lain dimetilsulfoksida (DMSO) dan gliserol (Pegg, 2007). Gliserol (*glycerin* 1,2,3 propantiol) memiliki rumus molekul ($C_3H_8O_3$), dengan ukuran molekul 92,09 (Hubálek, 2003). Gliserol merupakan senyawa alkohol sederhana, tidak berbau dan tidak berwarna, dan pada suhu ruang berbentuk cair. Gliserol berfungsi menjaga dan melindungi sel dari dehidrasi selama proses pembekuan. Selama proses pembekuan, gliserol berperan dalam mencegah proses pembentukan kristal es. Gliserol dapat menyebabkan penurunan jumlah air bebas dalam suspensi sel, karena kemampuan gliserol membentuk ikatan hidrogen dengan air, dapat membentuk kristal es yang kecil (Doneva & Donev, 2005). Protektan ekstraseluler adalah protektan yang sulit masuk ke dalam sel karena memiliki ukuran molekul yang besar. Protektan ekstraseluler yang dapat digunakan adalah sukrosa, glukosa, galaktosa, dan trehalosa (Li & Tian, 2006). Salah satu protektan yang dapat digunakan untuk preservasi sel khamir adalah trehalosa (α -D-glucopyranosyl-1,1- α -D-glucopyranoside) yang merupakan disakarida, dengan ukuran molekul 378,33 (Hubálek, 2003). Zaragoza dkk. (2013) melaporkan trehalosa mampu melindungi membran sel dan protein dari kerusakan sel akibat kekeringan dan pembekuan.

Beberapa penelitian telah dilakukan menggunakan gliserol sebagai protektan pada metode *freezing*. Novik dkk. (2009) melaporkan bakteri *Bifidobacteria adolescentis* memiliki viabilitas tinggi (80--99%) setelah dipreservasi pada suhu -20°C menggunakan gliserol 10% sebagai protektan. Smith dan Ryan (2012) menggunakan *cryoprotectant* gliserol dan trehalosa untuk preservasi kapang *Basidiomycetes*, *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, dan *Chytridiomycetes*. Nagpal dkk. (2012) melaporkan fungi *Coelomyces* dapat dipreservasi pada suhu -70°C dengan protektan 10% gliserol.

Berdasarkan hasil penelitian pada makalah II, khamir *Candida saopoulensis* UICC Y-492, *Candida pseudojiutengensis* UICC Y-475, *Hyphopichia burtonii* UICC Y-496, dan *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-513

dari daun *Broussonetia papyrifera*, merupakan khamir antagonis dan berpotensi sebagai agens biokontrol pada kapang-kapang perusak buah tomat pascapanen. Penelitian mengenai viabilitas khamir-khamir asal *B. papyrifera* menggunakan metode *freezing* pada suhu -80°C belum pernah dilakukan. Penelitian bertujuan mengetahui viabilitas empat spesies khamir antagonis koleksi UICC yang berpotensi sebagai agens biokontrol pada kapang-kapang perusak buah tomat setelah dipreservasi dengan metode *freezing* pada suhu -80°C menggunakan protektan gliserol 10% dan trehalosa 5%. Hipotesis penelitian adalah khamir tetap memiliki viabilitas setelah dipreservasi pada suhu -80°C .

BAHAN DAN CARA KERJA

A. Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, FMIPA-UI, Depok dan Laboratorium *Center of Excellence for Indigenous Biological Resources-Genome Studies* (CoE IBR-GS), Universitas Indonesia, Depok, mulai bulan Oktober hingga April 2014 (6 bulan).

B. Bahan

1. Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian adalah empat strain khamir koleksi *Universitas Indonesia Culture Collection* (UICC) yang diisolasi dari daun tumbuhan saeh *B. papyrifera*. Khamir-khamir tersebut terdiri atas empat spesies, yaitu *C. pseudojiutengensis* UICC Y-475, *C. saopoulenensis* UICC Y-492, *Hyp. burtonii* UICC Y-496, dan *Rh. mucilaginosus* UICC Y-513.

2. Medium dan bahan kimia

Bahan-bahan medium yang digunakan dari Difco adalah *yeast extract*, *malt extract*, dan pepton. Bahan-bahan medium yang digunakan dari Liofilchem adalah glukosa, agar, dan *potato dextrose agar*. Bahan medium lain yang digunakan adalah antibiotik kloramfenikol (Wako). Medium YMA digunakan untuk peremajaan dan pemurnian khamir, pengamatan morfologi makroskopik dan mikroskopik khamir, serta medium untuk melakukan TPC. Medium PDA digunakan sebagai medium pemeliharaan *stock* dan *working culture*. Bahan-bahan kimia dari Merck yang digunakan dalam penelitian adalah gliserol, trehalosa, akuades, dan alkohol 70%.

C. Cara kerja

1. Pemurnian khamir

Pemurnian khamir untuk memperoleh koloni tunggal representatif dilakukan dengan metode gores empat kuadran berdasarkan Cappuccino dan Sherman (2001). Biakan khamir yang telah murni kemudian ditumbuhkan pada medium PDA miring sebagai *stock culture* dan pada medium YMA miring sebagai *working culture*. *Stock culture* dan *working culture* disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C.

2. Pembuatan larutan gliserol 10% dengan penambahan trehalosa 5%

Protektan yang digunakan untuk preservasi dengan metode *freezing* berdasarkan Mikata dan Banno (1987) adalah gliserol dan trehalosa sebagai pengganti laktosa. Protektan yang digunakan terdiri dari gliserol 10% dan trehalosa 5%. Sebanyak 10 ml gliserol dan 5 g trehalosa dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer ukuran 250 ml, kemudian ditambahkan akuades sampai volume total larutan mencapai larutan 100 ml. Larutan kemudian diaduk hingga homogen. Larutan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C.

3. Persiapan biakan khamir untuk preservasi dengan *freezing* pada suhu -80 °C

Preservasi khamir menggunakan metode *freezing* pada suhu -80°C berdasarkan Bozkurt dkk. (2005). Preservasi dengan metode *freezing* dilakukan menggunakan protektan gliserol 10% dan trehalosa 5%. Pembuatan suspensi khamir perlakuan dilakukan dengan menambahkan 5 ml larutan gliserol 10% dan trehalosa 5% ke dalam tabung YMA berisi khamir berumur 48 jam. Suspensi sel khamir dihomogenkan dengan vorteks. Sebanyak 1 ml suspensi khamir dimasukkan ke dalam *cryotube* kemudian disimpan dalam lemari pendingin (suhu 4°C) selama 24 jam. Hal tersebut bertujuan agar protektan dapat masuk ke dalam sel sehingga tercapai ekuilibriasi (keseimbangan) tekanan osmotik di luar dan di dalam sel. Tabung *cryotube* yang berisi suspensi sel khamir kemudian dimasukkan ke dalam *deep freezer* pada suhu -80°C. Untuk mengetahui pengaruh pemberian protektan, akuades digunakan sebagai kontrol. Pembuatan suspensi khamir dilakukan dengan memasukkan 5 ml akuades steril ke dalam tabung YMA miring berisi khamir berumur 48 jam. Suspensi sel khamir dihomogenkan dengan vorteks. Sebanyak 1 ml suspensi khamir dalam akuades dimasukkan ke dalam *cryotube* kemudian disimpan dalam lemari pendingin (suhu 4°C) selama 24 jam, kemudian dimasukkan ke dalam *deep freezer* pada suhu -80°C.

4. Pengujian viabilitas khamir

Pengujian viabilitas khamir dilakukan dengan menghitung jumlah koloni khamir menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) berdasarkan Madigan dkk. (2012). Penghitungan jumlah koloni khamir dilakukan pada saat sebelum dipreservasi atau hari ke-0 (H0), kemudian pada hari ke-1 (H1), ke-7 (H7), ke-14 (H14), ke-30 (H30), dan ke-180 (H180) setelah preservasi. Sebelum melakukan TPC, terlebih dahulu dilakukan *thawing* terhadap suspensi khamir yang baru dikeluarkan dari freezer -80°C dengan cara menginkubasi suspensi khamir dalam *water bath* pada suhu 37°C selama 3 menit. Selanjutnya, sebanyak 100 µl

suspensi khamir dimasukkan ke dalam tabung mikro steril berisi 900 µl akuades steril dan dilakukan pengenceran (*serial dilution*).

Sebanyak 0,1 ml suspensi khamir dari tabung mikro pada masing-masing pengenceran dimasukkan ke dalam cawan petri berisi medium YMA dan diratakan menggunakan spatel *drygalski*. Sebanyak tiga kali pengulangan (triplo) dilakukan untuk setiap pengenceran. Jumlah koloni khamir yang tumbuh setelah 48 jam dihitung. Penghitungan hasil TPC dilakukan dengan menggunakan rumus:

$$\Sigma \text{ CFU/ml} = \frac{\text{Jumlah koloni rata-rata yang tumbuh}}{\text{Volume inokulum} \times \text{faktor pengenceran}}$$

Penentuan viabilitas dilakukan berdasarkan Mikata (1999) ditentukan berdasarkan rerata jumlah koloni khamir yang tumbuh (CFU/ml) setelah preservasi. Menurut Mikata (1999, viabilitas khamir yang dipreservasi dapat dikategorikan menjadi tingkat viabilitas tinggi, sedang, rendah, dan sangat rendah. Kategori viabilitas tinggi apabila rerata CFU $\geq 1 \times 10^7$ /ml, kategori tingkat viabilitas sedang apabila rerata CFU $\geq 1 \times 10^6$ /ml, kategori tingkat viabilitas rendah apabila rerata CFU berkisar 1×10^5 /ml, dan kategori tingkat viabilitas sangat rendah apabila rerata CFU $\leq 1 \times 10^4$ /ml.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Viabilitas sel khamir setelah dipreservasi pada suhu -80° C

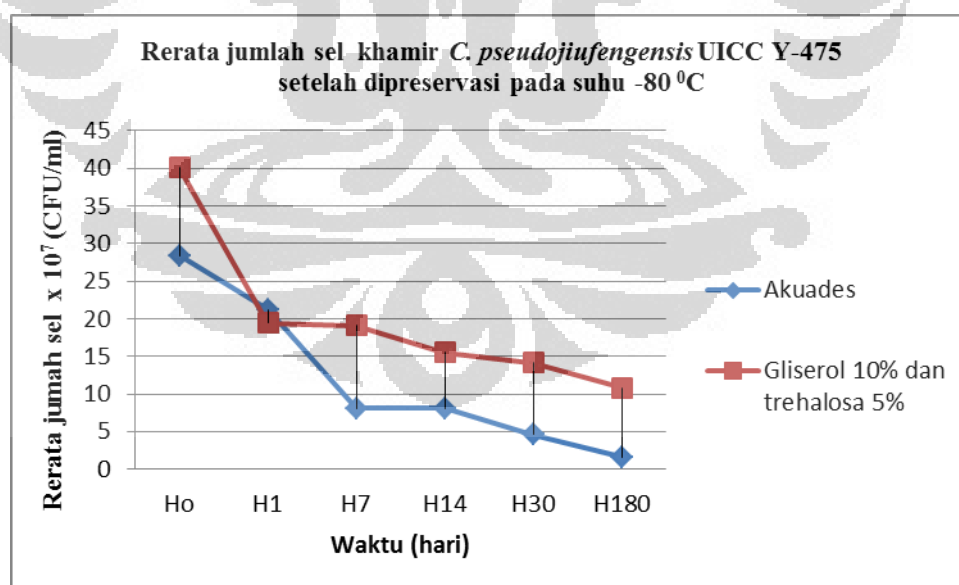
Preservasi suhu pada 80° C telah dilakukan pada *Candida pseudojiufengensis* UICC Y-475, *Candida saopoulensis* UICC Y-492, *Hyphopichia burtonii* UICC Y-496, dan *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-513. Penghitungan kerapatan sel khamir dilakukan sebelum dipreservasi atau hari ke-0 (H0) sebagai kontrol, dan setelah dipreservasi yang dilakukan pada hari ke-1 (H1), ke-7 (H7), ke-14 (H14), ke-30 (H30), dan hari ke-180 (H180).

Viabilitas khamir *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475 setelah dipreservasi pada suhu -80 °C menggunakan protektan (gliserol 10% dan trehalosa 5%) dan

tanpa protektan (akuades, kontrol) memiliki tingkat viabilitas tinggi dengan rerata CFU $\geq 1 \times 10^8$ /ml berdasarkan kategori Mikata (1999) (Tabel III.1; Gambar III.1). Walaupun sama-sama memiliki viabilitas tinggi, akan tetapi jumlah CFU khamir yang diberi protektan lebih tinggi dibandingkan pada khamir yang tidak diberi protektan (kontrol).

Tabel III.1. Rerata jumlah sel khamir *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475 menggunakan akuades (kontrol) dan protektan (gliserol 10% dan trehalosa 5%) pada suhu -80°C

Spesies	Perlakuan	Rerata jumlah sel $\times 10^8$ CFU/ml						Kategori viabilitas berdasarkan Mikata (1999)
		HO	H1	H7	H14	H30	H180	
<i>Candida pseudojiufengensis</i> UICC Y-475	Akuades	2,84	2,12	0,81	0,81	0,46	0,16	Tinggi
	Gliserol 10% dan trehalosa 5%	4,01	1,94	1,91	1,55	1,41	1,08	Tinggi

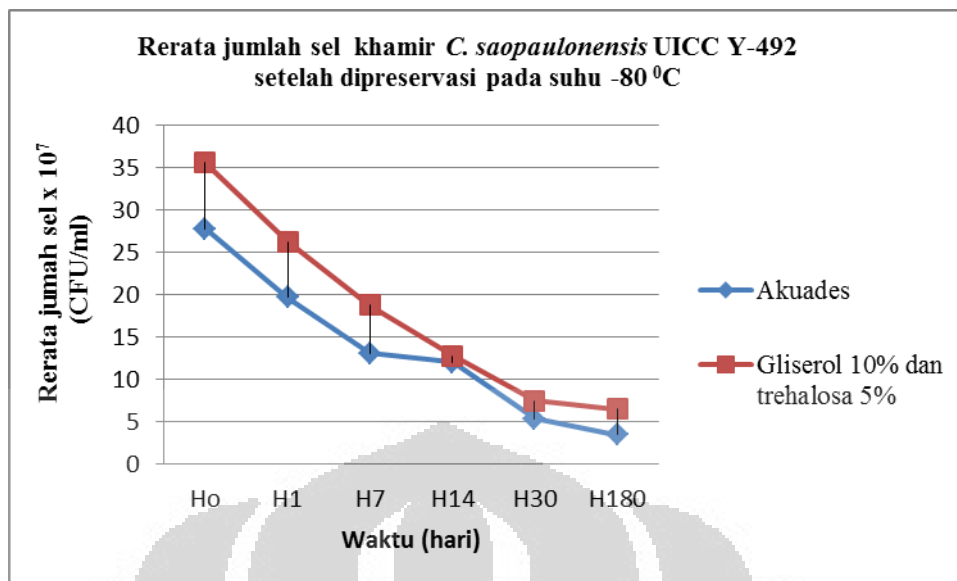


Gambar III.1. Rerata jumlah sel khamir *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475 setelah dipreservasi pada suhu -80°C dalam gliserol 10% dan trehalosa 5%, dan akuades sebagai kontrol

Viabilitas khamir *C. saopaulonensis* UICC Y-492 setelah dipreservasi pada suhu -80°C menggunakan protektan (gliserol 10% dan trehalosa 5%) dan tanpa protektan (akuades, kontrol) memiliki tingkat viabilitas tinggi dengan rerata $\text{CFU} \geq 1 \times 10^8/\text{ml}$ berdasarkan jumlah sel hidup kategori Mikata (1999) (Tabel III.2; Gambar III.2.). Walaupun sama-sama memiliki viabilitas tinggi, akan tetapi jumlah CFU khamir yang diberi protektan lebih tinggi dibandingkan pada khamir yang tidak diberi protektan (kontrol).

Tabel III.2. Rerata jumlah sel khamir *C. saopaulonensis* UICC Y-492 menggunakan akuades (kontrol) dan protektan (gliserol 10% dan trehalosa 5%) pada suhu -80°C

Spesies	Perlakuan	Rerata jumlah sel $\times 10^8$ CFU/ml						Kategori viabilitas berdasarkan Mikata (1999)
		HO	H1	H7	H14	H30	H180	
<i>Candida saopaulonensis</i> UICC Y-492	Akuades	2,78	1,97	1,31	1,20	0,54	0,35	Tinggi
	Gliserol 10% dan trehalosa 5%	3,56	2,63	1,88	1,28	0,75	0,65	Tinggi

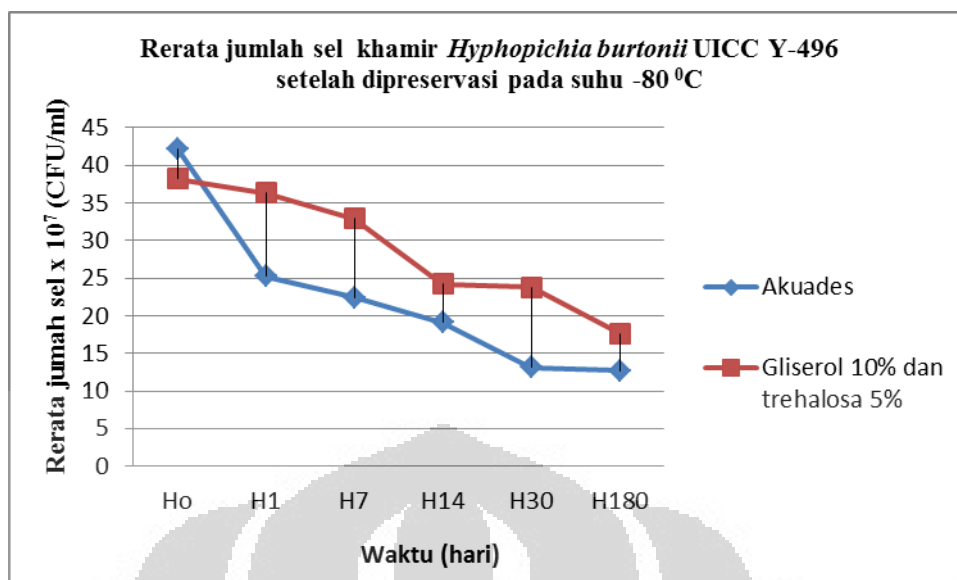


Gambar III.2. Rerata jumlah sel khamir *C. saopaulonensis* UICC Y-492 setelah dipreservasi pada suhu -80°C dalam gliserol 10% dan trehalosa 5%, dan akuades sebagai kontrol

Viabilitas khamir *Hyphopichia burtonii* UICC Y-496 setelah dipreservasi pada suhu -80°C menggunakan protektan (gliserol 10% dan trehalosa 5%) dan tanpa protektan (akuades, kontrol) memiliki tingkat viabilitas tinggi dengan rerata $\text{CFU} \geq 1 \times 10^8/\text{ml}$ berdasarkan jumlah sel hidup kategori Mikata (1999) (Tabel III.3; Gambar III.3.). Walaupun sama-sama memiliki viabilitas tinggi, akan tetapi jumlah CFU khamir yang diberi protektan lebih tinggi dibandingkan pada khamir yang tidak diberi protektan (kontrol).

Tabel III.3. Rerata jumlah sel khamir *Hyp. burtonii* UICC Y-496 menggunakan akuades (kontrol) dan protektan (gliserol 10% dan trehalosa 5%) pada suhu -80°C

Spesies	Perlakuan	Rerata jumlah sel x 10^8 CFU/ml						Kategori viabilitas berdasarkan Mikata (1999)
		HO	H1	H7	H14	H30	H180	
<i>Hyphopichia burtonii</i> UICC Y-496	Akuades	4,22	2,52	2,24	1,91	1,31	1,27	Tinggi
	Gliserol 10% dan trehalosa 5%	3,82	3,63	3,29	2,42	2,38	1,76	Tinggi

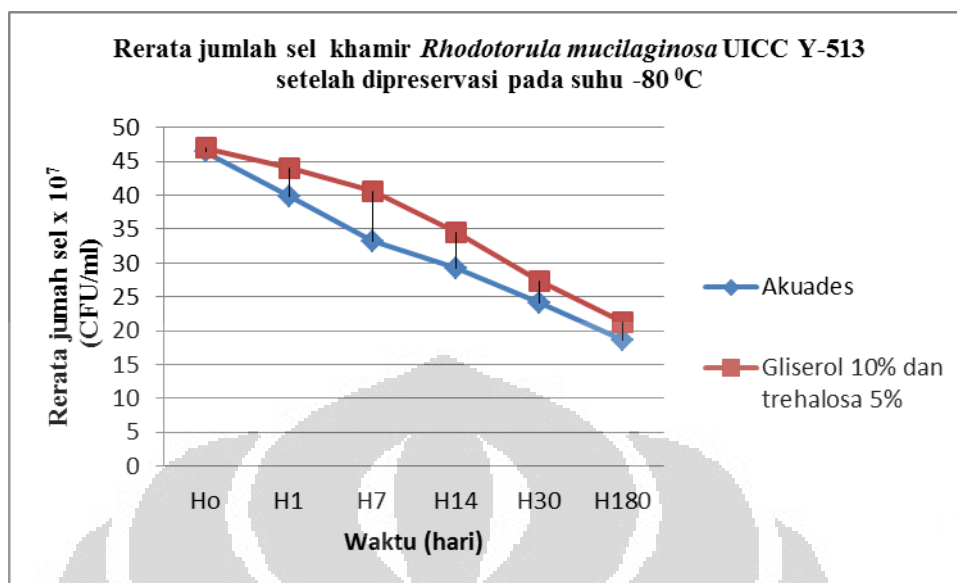


Gambar III.3 Rerata jumlah sel khamir *Hyp. burtonii* UICC Y-496 setelah dipreservasi pada suhu -80°C dalam gliserol 10% dan trehalosa 5%, dan akuades sebagai kontrol

Viabilitas khamir *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 setelah dipreservasi pada suhu -80° C menggunakan protektan (gliserol 10% dan trehalosa 5%) dan tanpa protektan (akuades, kontrol) memiliki tingkat viabilitas tinggi dengan rerata CFU $\geq 1 \times 10^8$ /ml berdasarkan jumlah sel hidup kategori Mikata (1999) (Tabel III.4; Gambar III.4). Walaupun sama-sama memiliki viabilitas tinggi, akan tetapi jumlah CFU khamir yang diberi protektan lebih tinggi dibandingkan pada khamir yang tidak diberi protektan (kontrol).

Tabel III.4. Rerata jumlah sel khamir *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 menggunakan akuades (kontrol) dan protektan (gliserol 10% dan trehalosa 5%) pada suhu -80° C

Spesies	Perlakuan	Rerata jumlah sel x 10 ⁸ CFU/ml						Kategori viabilitas berdasarkan Mikata (1999)
		HO	H1	H7	H14	H30	H180	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UICC Y-513	Akuades	4,64	3,99	3,32	2,93	2,41	1,86	Tinggi
	Gliserol 10% dan trehalosa 5%	4,70	4,40	4,06	3,46	2,74	2,13	Tinggi



Gambar III.4. Rerata jumlah sel khamir *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 setelah dipreservasi pada suhu -80°C dalam gliserol 10% dan trehalosa 5%, dan akuades sebagai kontrol

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa empat spesies khamir yang berpotensi sebagai agen biokontrol terhadap kapang penyebab kebusukan buah tomat dapat dipreservasi menggunakan metode *freezing* pada suhu -80°C . Empat spesies khamir tersebut memiliki kategori viabilitas tinggi berdasarkan rerata jumlah sel hidup setelah dipreservasi selama 180 hari (H180). Hal tersebut menunjukkan bahwa metode *freezing* pada suhu -80°C tepat diaplikasikan pada empat spesies khamir tersebut.

Hasil penghitungan jumlah sel hidup khamir paling tinggi setelah dipreservasi pada suhu -80°C selama 180 hari tanpa protektan (akuades, kontrol) dimiliki oleh khamir *Hyp. burtonii* UICC Y-496 ($1,27 \times 10^8$ CFU/ml) dan *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 ($1,86 \times 10^8$ CFU/ml). Jumlah sel hidup khamir paling tinggi setelah dipreservasi pada suhu -80°C selama 180 hari menggunakan protektan (gliserol 10% dan trehalosa 5%) dimiliki oleh khamir *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475 ($1,08 \times 10^8$ CFU/ml), *Hyp. burtonii* UICC Y-496 ($1,76 \times 10^8$ CFU/ml), dan *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 ($2,13 \times 10^8$ CFU/ml). *Candida saopoulensis* UICC Y-492 walaupun memiliki viabilitas tinggi akan tetapi mengalami penurunan jumlah sel sebesar 10^1 CFU/ml baik

tanpa protektan (akuades, kontrol) maupun dengan penggunaan protektan (gliserol 10% dan trehalosa 5%). Rerata sel hidup pada *C. saopoulenensis* UICC Y-492 menggunakan akuades pada H180 sebesar ($0,35 \times 10^8$ CFU/ml) dibandingkan dengan jumlah awal (H0) sebesar ($2,78 \times 10^8$ CFU/ml), sedangkan rerata sel hidup menggunakan protektan (gliserol 10% trehalosa 5%) pada pada H180 sebesar ($0,65 \times 10^8$ CFU/ml) dibandingkan dengan jumlah awal (H0) sebesar ($3,56 \times 10^8$ CFU/ml). Hasil setelah preservasi suhu -80°C dengan protektan (gliserol 10% trehalosa 5%) menunjukkan bahwa *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475, *C. saopoulenensis* UICC Y-492, *Hyp. burtonii* UICC Y-496, dan *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513, tetap viabel dengan kategori viabilitas tinggi. Menurut Mikata (1999) suatu spesies khamir memiliki viabilitas yang tinggi jika penurunan jumlah sel hidup khamir setelah preservasi hanya sebesar 10^1 CFU/ml dari jumlah sel hidup sebelum preservasi, sedangkan memiliki kategori viabilitas rendah apabila terjadi penurunan jumlah sel hidup sebesar 10^2 - 10^3 CFU/ml setelah preservasi.

Viabilitas empat spesies khamir yang berpotensi sebagai agen biokontrol asal *B. papyrifera* pada kapang penyebab kebusukan pada buah tomat pascapanen memiliki tingkat viabilitas tinggi dengan rerata CFU $\geq 1 \times 10^7$ /ml berdasarkan jumlah sel hidup kategori Mikata (1999). Viabilitas yang tinggi kemungkinan disebabkan oleh pemilihan protektan yang tepat. Pada penelitian ini digunakan kombinasi dua protektan, yaitu gliserol dan trehalosa. Hasil penelitian ini mendukung laporan beberapa peneliti yang juga menunjukkan viabilitas khamir yang tinggi pada penggunaan protektan gliserol dan atau trehalosa. Polomska dkk. (2012) melakukan preservasi khamir *Yarrowia lipolytica* PII6a, *C. famata* MI1a, *C. kefir* PII1b, *C. sphaerica* FII7a yang telah disimpan selama satu tahun pada suhu -38°C , -20°C dan -10°C menggunakan kombinasi tiga protektan *skimmed milk*, trehalosa dan sodium glutamat. Hasil penelitian menunjukkan khamir *C. famata* MI1a dipreservasi pada suhu -38°C , -20°C dan -10°C selama 6 bulan memiliki viabilitas tinggi dengan rerata CFU $\geq 1 \times 10^7$ /ml (viabilitas 70%) dengan menggunakan protektan trehalosa. Nagai dkk. (2005) melakukan preservasi khamir-khamir genera *Candida*, *Debaryomyces*, *Hypopichia*, *Pichia*, dan *Rhodotorula* pada suhu -70°C selama satu bulan dan satu tahun

menggunakan gliserol 10% sebagai protektan. Hasil penelitian mereka menunjukkan khamir-khamir tersebut memiliki viabilitas 99-100%. Harny dkk. (2011) melaporkan fungi *phylum Ascomycota* yang dipreservasi pada suhu -80°C menggunakan protektan gliserol 20% memiliki persentase viabilitas sebesar 72% setelah disimpan selama satu tahun. Nagpal dkk. (2012) melaporkan preservasi fungi *Coelomyces* sp. pada suhu -70°C menggunakan gliserol 10% selama 90 hari dapat mempertahankan viabilitas kapang tersebut.

Keempat spesies khamir potensial sebagai agens biokontrol yang dipreservasi pada suhu -80°C dengan menggunakan protektan gliserol 10% trehalosa 5% memiliki viabilitas yang tinggi. Protektan adalah senyawa kimia yang ditambahkan sebelum proses *freezing* berfungsi untuk meningkatkan viabilitas sel selama proses penyimpanan (Fuller, 2004). Mekanisme perlindungan protektan adalah dengan mengurangi ukuran, jumlah, dan kecepatan pembentukan kristal es, menurunkan titik beku sel, membantu berlangsungnya dehidrasi secara osmotik sebelum pembekuan, meningkatkan permeabilitas sel, bersifat sebagai buffer dalam mengimbangi perubahan pH selama pembekuan (Fuller, 2004; Nyanga, dkk. 2012).

Viabilitas khamir yang tinggi setelah dipreservasi dengan penggunaan protektan menunjukkan bahwa penambahan protektan dapat mengurangi kematian sel khamir. Protektan yang digunakan untuk preservasi metode *freezing* pada suhu -80°C gliserol 10% dan trehalosa 5%. Menurut Fuller (2004) protektan gliserol merupakan jenis protektan yang memiliki berat molekul yang rendah. Protektan yang memiliki berat molekul rendah, mudah masuk ke dalam sel dan memiliki daya larut dalam air yang sangat baik, sehingga dapat mencegah kerusakan akibat terbentuknya kristal es secara intraseluler. Penambahan gliserol sebagai protektan intraseluler berfungsi melindungi bagian dalam sel, sedangkan penambahan trehalosa sebagai protektan ekstraseluler yang berfungsi melindungi bagian luar sel. Menurut Savova dkk. (1997) trehalosa dapat mencegah kerusakan membran sel selama proses pembekuan dengan cara membentuk ikatan hydrogen pada membran fosfo lipid untuk menggantikan air yang hilang selama proses dehidrasi. Tulha dkk. (2010) melaporkan bahwa protektan trehalosa memiliki fungsi melindungi sel *Saccharomyces cerevisiae* dari

kerusakan akibat proses pengeringan dan pembekuan selama proses preservasi pada suhu -70°C . Li dan Tian (2006) melaporkan penggunaan protektan trehalosa dapat meningkatkan viabilitas dan menjaga kemampuan *Cryptococcus laurentii* sebagai agen biokontrol terhadap kapang patogen pada buah apel *Penicillium expansum* setelah dipreservasi dengan disimpan pada suhu 4°C selama 90 hari. Penambahan lebih dari satu protektan diduga dapat mengoptimalkan proteksi terhadap sel sehingga dapat meningkatkan viabilitas sel. Aurajo dkk. (2004) melakukan preservasi sel khamir *Torulaspora delbrueckii* PYCC5323 pada suhu -20°C selama 120 hari. Pemberian protektan berupa gliserol dan trehalosa sebelum dilakukan proses preservasi dapat menjaga rerata sel hidup khamir sebesar 60%. Trehalosa dapat menjaga membran sel dari kerusakan selama proses *freezing* berlangsung. Menurut Harny dkk. (2011) penambahan gliserol dan trehalosa diketahui dapat menjaga kestabilan protein dan integritas membran sel terhadap kondisi perubahan suhu (tinggi dan rendah) dan kekeringan.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa preservasi tanpa penambahan protektan (akuades) untuk ke empat spesies potensi biokontrol pada buah tomat tetap memiliki viabilitas yang tinggi, walaupun demikian preservasi dengan penambahan senyawa protektan menghasilkan kerapatan sel yang lebih tinggi. Hal tersebut menunjukkan bahwa preservasi pada suhu -80°C dengan menggunakan akuades memiliki viabilitas yang tinggi setelah dipreservasi selama 180 hari. Hal tersebut menunjukkan bahwa keempat spesies khamir yang dipreservasi mampu bertahan pada suhu -80°C tanpa penambahan protektan. Kemungkinan keempat strain tersebut menghasilkan senyawa-senyawa yang berfungsi sebagai protektan. Banyak peneliti yang melaporkan bahwa sel khamir mampu menghasilkan senyawa trehalosa dan gliserol secara alamiah. Menurut Pacheco dkk. (2009) trehalosa adalah salah satu senyawa yang paling efektif melindungi struktur sel dari kerusakan yang disebabkan oleh proses *freezing*. Gancedo dan Flores (2004) menyatakan bahwa sel khamir dapat menghasilkan trehalosa pada fase logaritmik, selanjutnya produksi trehalosa dapat meningkat jika sel dihadapkan dengan kondisi stress. Gancedo dan Flores (2004) melaporkan bahwa sintesis trehalosa pada khamir terjadi melalui jalur yang

dikemukakan oleh Cabib dan Leloir sekitar 50 tahun yang lalu. Sintesis dimulai dengan transfer sebuah residu *glucosyl* dari *uridine-diphospho-glucose* menjadi glukosa 6- fosfat selanjutnya menjadi trehalosa 6- fosfat, yang berikutnya mengalami defosforilasi menghasilkan trehalosa. Kemampuan trehalose sebagai *cryoprotectant* dibuktikan oleh De Virgillio dkk. 1994 (lihat Trott & Morani, 2003). Menurut Tamás dan Hohmann (2003), gliserol dihasilkan oleh khamir untuk melindungi sel terhadap stress suhu dan *oxidative stress*. Gliserol berperan penting pada khamir sebagai *compatible solute* dalam proses adaptasi tekanan osmotik. Pada khamir, gliserol diproduksi sebagai produk samping selama fermentasi gula menjadi etanol.

Namun demikian, tingginya viabilitas pada sel yang tidak diberi protektan belum tentu dapat menjamin kestabilan genetik sel khamir tersebut. Penelitian mengenai kestabilan genetik strain khamir yang berpotensi sebagai agen biokontrol perlu dilakukan.

Hasil uji viabilitas (Tabel III.1--III.4) menunjukkan strain khamir tidak kehilangan viabilitasnya setelah proses *freezing* pada suhu -80°C . Faktor lain yang mempengaruhi keberhasilan dalam proses preservasi *freezing* adalah faktor dilakukannya waktu adaptasi sel khamir dengan kondisi sebelum dilakukan proses *freezing*. Adaptasi bertujuan agar protektan intraseluler yang ditambahkan dapat masuk ke dalam sel dan tercapai ekuiliberasi (keseimbangan) antara tekanan osmotik di dalam sel dengan di luar sel selama proses preservasi. Menurut Hubálek (2003) senyawa protektan membutuhkan waktu untuk masuk ke dalam sel agar terjadi keseimbangan (ekuilibrisasi) solute intrasel sebelum proses *freezing*, sehingga protektan dapat berfungsi sebagai *cryoprotectant*. Oleh karena itu suspensi sel diinkubasi pada suhu $0-10^{\circ}\text{C}$ selama 10-60 menit sebelum dimasukkan ke dalam freezer -80°C . Suhu dan waktu yang dibutuhkan untuk ekuilibrisasi sangat tergantung pada sifat permeabilitas senyawa protektan dan karakter sel. Senyawa Me_2SO atau metanol, merupakan senyawa protektan yang cepat masuk ke dalam sel sehingga tidak membutuhkan waktu ekuilibrisasi yang lama, biasanya hanya 15 menit pada 4°C . Akan tetapi gliserol membutuhkan waktu ekuilibrisasi lebih lama (1-4 jam). Pada penelitian ini waktu adaptasi dilakukan dengan menyimpan sel khamir pada suhu -4°C selama 48 jam sebelum

proses *freezing*, sehingga seluruh gliserol dapat masuk ke dalam sel dan berfungsi sebagai *cryoprotectant* pada saat *freezing* pada suhu -80°C .

Empat strain khamir pada saat diinkubasi pada suhu 4°C diduga menghasilkan protektan. Todorova dkk. (2012) melakukan penyimpanan sel khamir *Saccharomyces cerevisiae* pada suhu 4°C selama 48 jam sebelum proses *freezing*. Hasil penelitian menunjukkan sel khamir dapat menghasilkan trehalosa sebanyak $41,02 \pm 4,41 \text{ nM}/\mu\text{g}$. Khamir *Sacc. cerevisiae* yang disimpan selama 48 jam sebelum perlakuan *freezing* memiliki kemampuan viabilitas yang tinggi dengan tingkat kerusakan DNA yang rendah.

Hasil penelitian menunjukkan setiap spesies khamir memberikan respon yang berbeda pada preservasi dengan suhu -80°C . Adanya variasi spesies akan mempengaruhi perbedaan karakter fisiologis dan morfologis, termasuk kemampuan viabilitas dan tingkat toleransi pada kondisi lingkungan. Rerata jumlah sel hidup setelah dipreservasi pada suhu -80°C berbeda antar spesies. Khamir *Hyp. burtonii* UICC Y-496 dan *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 menunjukkan rerata jumlah sel hidup yang lebih tinggi dibandingkan dua spesies lainnya (*C. pseudojiufengensis* UICC Y-475 dan *C. saopoulensis* UICC Y-492). Perbedaan tersebut diduga disebabkan perbedaan karakter morfologi dan fisiologi khamir antar spesies tersebut. *Hyphopichia burtonii* UICC Y-496 merupakan khamir teleomorfik dengan alat reproduksi seksual askospora, sedangkan khamir dari genus *Candida* merupakan khamir anamorfik dengan alat reproduksi aseksual. Khamir yang memiliki spora seksual memiliki ketahanan terhadap suhu yang lebih tinggi dibandingkan khamir yang tidak memiliki spora seksual. Trott dan Morano (2003) melaporkan bahwa produksi trehalosa paling banyak dihasilkan oleh sel pada spora.

Struktur dinding sel dan komponen ekstraseluler turut mempengaruhi kemampuan khamir dalam menghadapi kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan. *Rhodotrula mucilaginosa* memiliki dinding sel yang berlapis banyak dan menghasilkan polisakarida ekstraseluler yang berperan dalam melindungi sel pada suhu rendah. Kedua faktor tersebut menyebabkan spesies tersebut memiliki tingkat toleransi yang tinggi terhadap kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan, seperti pada suhu yang rendah dan pada kondisi

kekeringan. Menurut Hubalek (2003), polisakarida ekstraseluler yang dihasilkan khamir *S. cerevisiae* dan *Hansenula capsulata* (mannan dan glucomannan) dapat meningkatkan *survival* khamir yang dibekukan dalam nitrogen cair dengan 10% Me₂SO atau gliserol. Menurut Hubalek (2003), polisakarida ekstraseluler yang dihasilkan khamir *S. cerevisiae* dan *Hansenula capsulata* (mannan dan glucomannan) telah digunakan untuk meningkatkan *survival* khamir yang dibekukan pada nitrogen cair dengan 10% Me₂SO atau gliserol.

Pada penelitian ini terbukti bahwa metode preservasi pada -80° C dengan penambahan protektan memberikan viabilitas khamir yang lebih tinggi dibandingkan tanpa penambahan protektan. Penelitian ini juga membuktikan bahwa metode preservasi pada -80° C merupakan metode preservasi yang tepat dalam menjaga viabilitas strain. Walaupun tingkat viabilitas seluruh spesies yang potensial sebagai agens biokontrol pada penelitian ini telah terbukti tetap tinggi setelah dipreservasi pada suhu -80° C, namun demikian kemampuan antagonisnya terhadap kapang penyebab busukan buah tomat setelah preservasi belum diketahui.

KESIMPULAN

Preservasi pada suhu -80° C dapat diaplikasikan pada empat spesies khamir potensial agens biokontrol *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-513, *Hyphopichia burtonii* UICC Y-496, *Candida pseudojiutengensis* UICC Y-475 dan *Candida saopoulenensis* UICC Y-492 karena menjaga viabilitas. Seluruh strain menunjukkan viabilitas yang tinggi (rerata CFU $\geq 1 \times 10^8$ /ml) setelah disimpan pada suhu -80° C selama 180 hari. Strain khamir yang dipreservasi dengan penambahan protektan menunjukkan rerata sel hidup yang lebih tinggi setelah preservasi pada suhu -80° C dibandingkan strain khamir yang dipreservasi tanpa penambahan protektan (akuades, kontrol).

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh preservasi pada suhu -80° C terhadap viabilitas sel khamir dengan waktu preservasi yang lebih lama (1 tahun, 3 tahun dan seterusnya). Perlu dilakukan pengujian potensi

biokontrol spesies khamir koleksi UICC pada kapang-kapang perusak buah tomat setelah dilakukan preservasi suhu -80°C .

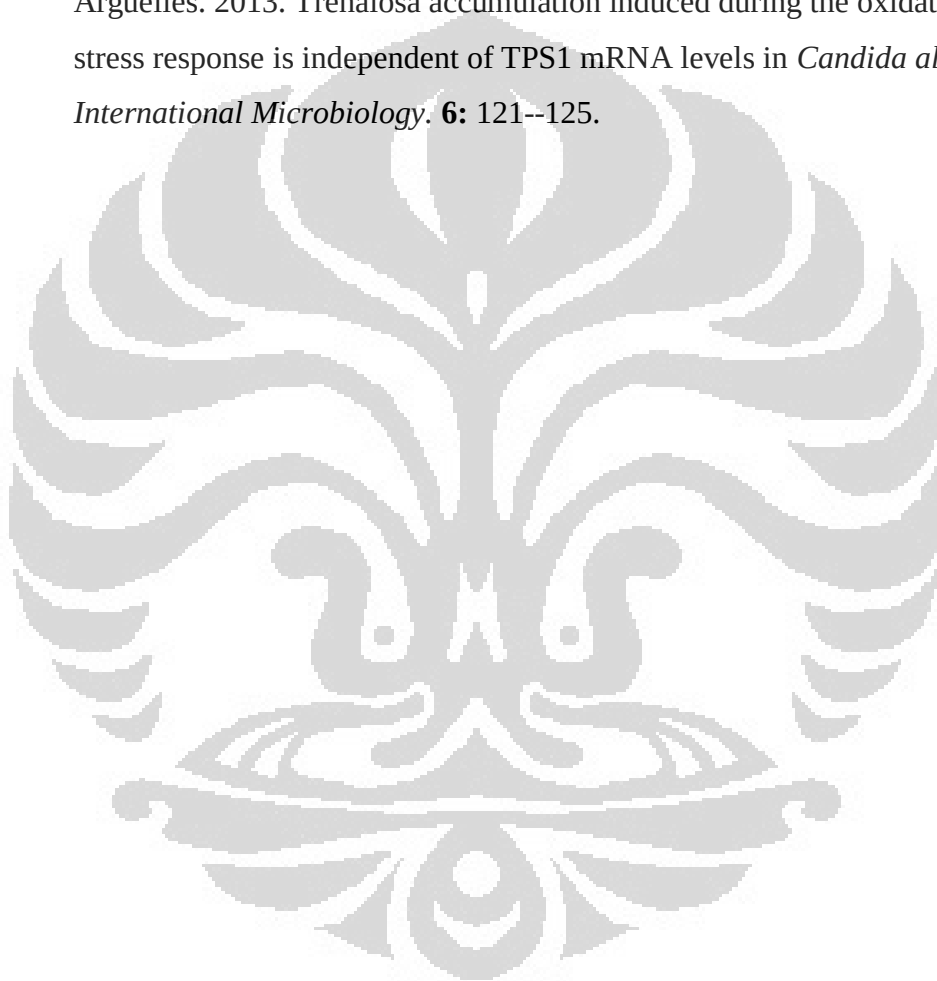
DAFTAR ACUAN

- Aurajo, C.A., M.J. Almeida, M.J. Sousa & C. Leao. 2004. Freeze tolerance of the yeast *Torulaspora delbrueckii*: cellular and biochemical basis. *Fems. Microbiology Letters*. **240**: 7—14.
- Bozkurt, Y., E. Akcay, N. Tekin & S. Secer. 2005. Effect of freezing techniques, extenders and cryoprotectants on the fertilization rate of frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm. *Israeli J. Aquaculture-Bamidgeh*. **57**: 125-130.
- Capuccino, J.G. & N. Sherman. 2001. *Microbiology: A laboratory manual*. Benjamin Cummings, San Francisco: xvi + 491 hlm.
- Doneva, T.U. & T. Donev. 2005. Anabiosis and conservation of microorganism. *Journal of culture collection*. **4**: 17--28.
- Fuller, B.J. 2004. Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryoletters*. **25**: 375-388.
- Harny, C.L. Ajuwin, L.T. Tan & T.C. Yeo. 2011. Methods and preserving of fungal culture to improve viability. Rehabilitation of tropical rainforest ecosystems, 24-25 October, Kuala Lumpur.pp. 45--48.
- Ilyas, M. 2007. Uji viabilitas koleksi kapang LIPI-MC dalam ampul penyimpanan kering-beku *L-drying* setelah satu tahun penyimpanan pada suhu 5°C . *Biodiversitas*.**8**: 20--22.
- Kurtzman, C.P. 2011. Discussion of teleomorphic and anamorphic *Ascomycetous* yeasts and yeast-like taxa, pp. 293--307. *Dalam*: C.P. Kurtzman, J.W. Fell and T. Boekhout, *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 5th Ed. Elsevier, Amsterdam.
- Li, B.Q & S.P. Tian. 2006. Effect of intracellular trehalosa in *Cryptococcus laurentii* and exogenous lyoprotectant on its viability and biocontrol efficacy on *Penicillium expansum* in apple fruit. *Letters in applied microbiology*. **44**: 437--442.

- Liu J. S., P. Tian., B.Q. Li & G.Z. Qin. 2009. Enhancing viability of two biocontrol yeast in liquid formulation by applying sugar protectant combined with antioxidant. *BioControl*. **54**: 817--824.
- Machmud, M. 2001. Teknik penyimpanan dan pemeliharaan mikroba. *Buletin agrobio*. **4**: 24--32.
- Madigan, M.T., J. M. Martinko., D.A. Stahl & D.P. Clark. 2012. *Brock biology of microorganisms*. 13th ed. Pearson education, Inc., Boston. **4**: I-4 hlm.
- Mikata, K. & I. Banno. 1987. Preservation of yeast cultures by freezing at -80 °C: I. Viability after 2 years storage and the effects of repeated thawingfreezing. *IFO Res. Comm*. **13**:59--68.
- Mikata, K. 1999. Preservation of yeast culture by L-drying: Viability after 15 years storage at 5° C. *IFO Research Communications* **19**: 71--82.
- Morgan, C.A., N. Herman, P.A. White & G. Vesey. 2006. Preservation of micro-organism by drying; A review. *J. Microbiol. Methods*. **66**: 183--193.
- Mueller, G.M., G.F. Bills & M.S. Foster. 2004. *Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods*. Elsevier academic press, Amsterdam: xviii + 777 hlm.
- Nagai, T., K. Tomioka, K. Takeuchi, M. Iida, M. Kawada & T. Sato. 2005. Evaluation of preservation techniques of microorganism resources in the MAFF genebank. *JARQ*. **39**:19--25.
- Nagpal, R., A. K. Puniya, J. P. Sehgal & K. Singh. 2012. Survival of anaerobic fungus *Coecomyces* sp. in various preservation methods: a comparative study. *Mycoscience*. **53**: 427--432.
- Nakasone, K. K., S. W. Peterson & S. Jong. 2004. *Preservation and distribution of fungal culture*. Elsevier, Inc., China. **8**: 37--47 hlm.
- Nishida, O., S. Kuwazaki, C. Suzuki & J. Shima. 2004. Superior molasses assimilation, stress tolerance, and trehalose accumulation of Baker's yeast isolated from dried sweet potatoes (hoshi-imo). *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **68**: 1442--1448.
- Novik G., A. Sidarenka, D. Rakhuba & E. Kolomiets. 2009. Cryopreservation of Bifidobacteria and bacteriophages in Belarussian collection of non-pathogenic microorganisms. *Journal of culture collections*. **6**: 76--84.

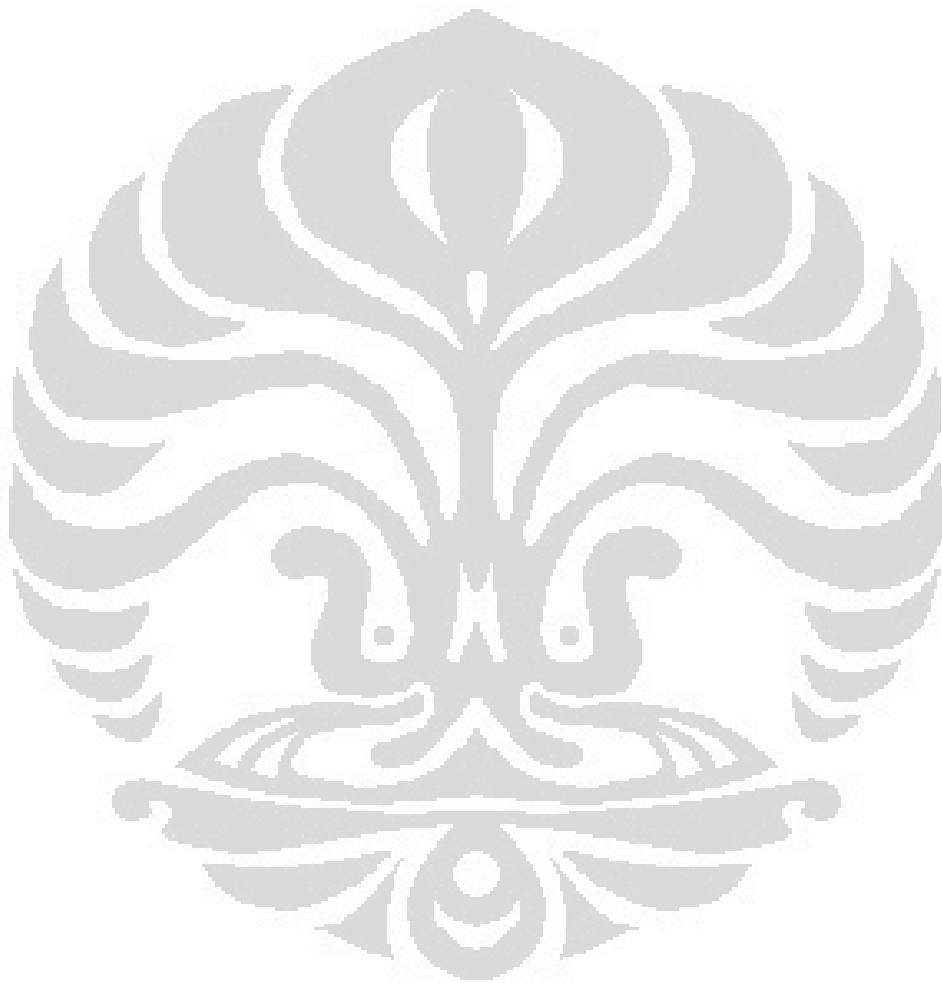
- Nyanga, L. K., M. J. R. Nout, E. J. Smid, T. Boekhout & M. H. Zwietering. 2012. Yeast preservation: Alternatives for lyophilization. *World J Microbiol Biotechnol.* **28**: 3239--3244.
- Obase, K., S.Y. Lee, K.W. Chun & J.K. Lee. 2011. Enzyme activity of *Cenococcum geophilum* isolates on enzyme-specific solid media. *Mycobiology.* **39**: 125--128.
- Pegg, D.E. 2007. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol.* **368**: 39--57.
- Połomska, X., M. Wojtatowicz, B. Zarowska, M. Szoltysik & J. Chrzanowska. 2012. Freeze-Drying Preservation of Yeast Adjunct Cultures for Cheese Production. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **62**: 143--150.
- Roberts, R.G. 1990. Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology.* **80**: 526--530.
- Savova, I., T. Donev, & Z. Sholeva. 1997. An investigation of trehalose accumulation dynamics by yeasts from genus *Saccharomyces*. *Journal of Culture Collections.* **2**: 40--43.
- Smith, D. & M. Ryan. 2012. Implementing Best Practices and Validation of Cryopreservation Techniques for Microorganisms. *The Scientific World Journal.* **9**: 1--9.
- Smith, D. & A.H.S. Onions. 1983. The Preservation and Maintenance of Living Fungi. *Commonwealth Mycological Institute.* **6**: 5--30.
- Tamás, M.J. & S. Hohmann. 2003. The osmotic stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. Topics in Current Genetics, Vol. 1. S. Hohmann/P.W.H. Mager (Eds.). Yeast Stress responses. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 121-200.
- Tulha, J., A. Lima, C. Lucas & C. Ferreira. 2010. *Saccharomyces cerevisiae* gliserol symporter Stl 1p is essential for cold/near-freeze and freeze stress adaptation. A simple recipe with high biotechnological potential given. *Microbial Cell Factories.* **9**: 2--7.
- Todorova, T., M. Pesheva, R. Stamenova, M. Dimitrov & P. Venkov. 2012. Mutagenic effect of freezing on nuclear DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **29**: 191--199.

- Torres, R., J. Usall., Teixido. M. Abadias & I. Vinas. 2003. Liquid formulation of the agent *Candida sake* by modifying water activity or adding protectants. *Journal of Applied Microbiology*. **94**: 330--339.
- Trott, A. & K.A. Morano. 2003. The yeast response to heat shock. Topics in Current Genetics, Vol. 1. S. Hohmann/P.W.H. Mager (Eds.). Yeast Stress responses. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 71-119.
- Zaragoza, O., P. Gonzalez-Parraga, Y. Pedreno, F.J. Alvarez-Peral & J.C. Arguelles. 2013. Trehalosa accumulation induced during the oxidative stress response is independent of TPS1 mRNA levels in *Candida albicans*. *International Microbiology*. **6**: 121--125.



Lampiran III.1. Hasil penghitungan jumlah sel hidup khamir menggunakan akuades (kontrol) dan protektan (gliserol 10% dan trehalosa 5%) pada suhu -80 °C

Spesies	Perlakuan	Jumlah sel (CFU/ml) x 10 ⁸											
		HO		H1		H7		H14		H30		H180	
		Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2
<i>Candida saopaulonensis</i>	Akuades	2.36	3.19	1.88	2.05	1.28	1.33	1.18	1.21	0.43	0.64	0.3	0.4
UICC Y-492	Gliserol 10% dan trehalosa 5%	3.44	3.68	2.16	3.1	1.59	2.17	1.19	1.36	0.7	0.8	0.6	0.7
<i>Candida pseudojiutengensis</i>	Akuades	3.35	2.32	2.61	1.63	1.01	0.6	0.96	0.65	0.52	0.4	0.15	0.16
UICC Y-475	Gliserol 10% dan trehalosa 5%	3.23	4.78	1.93	1.94	1.92	1.9	1.51	1.58	1.26	1.55	1.1	1.05
<i>Hyphopichia burtonii</i>	Akuades	5.36	3.08	2.95	2.08	2.47	2	2.26	1.55	1.16	1.45	1.25	1.28
UICC Y-496	Gliserol 10% dan trehalosa 5%	4.54	3.09	4.15	3.1	3.43	3.14	2.85	1.99	2.81	1.94	2.14	1.37
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Akuades	4.83	4.44	4.17	3.8	3.61	3.03	2.94	2.91	2.45	2.37	1.77	1.94
UICC Y-513	Gliserol 10% dan trehalosa 5%	4.83	4.56	4.48	4.31	4.09	4.02	3.44	3.47	2.63	2.85	2.16	2.09



DISKUSI PARIPURNA

Sebanyak 2.543 isolat khamir *phylloplane* tumbuhan saeh (*Broussonetia papyrifera* (L.) L'Hér. ex Vent.) dari empat lokasi pengambilan sampel di pulau Jawa, Indonesia, telah berhasil diperoleh. Pemilihan berdasarkan warna dan tekstur koloni menghasilkan 82 isolat khamir representatif dengan perincian sebagai berikut, yaitu Desa Dago Pojok, Bandung, (Jawa Barat) (20 isolat), Desa Sukadanu, Garut, (Jawa Barat) (22 isolat), Desa Tunggilis, Garut, (Jawa Barat) (20 isolat), dan Desa Bejijong, Trowulan, Mojokerto, (Jawa Timur) (20 isolat).

Delapan puluh dua isolat khamir representatif dari *phylloplane B. papyrifera* menunjukkan warna dan tekstur koloni yang bervariasi. Warna, tekstur, dan presentase koloni khamir *phylloplane B. papyrifera* yang ditumbuhkan pada medium YMA, selama 3 hari inkubasi pada suhu 27--28⁰ C adalah putih *butyrous* (26,8%), putih *mucoïd* (13,4%), krem *butyrous* (9,8%), krem *mucoïd* (29,3%), merah *butyrous* (2,4%), merah *mucoïd* (12,2%), dan merah muda kehitaman *butyrous* (6,1%). Berdasarkan pengamatan, khamir *phylloplane B. papyrifera* didominasi oleh khamir berpigmen (koloni berwarna krem, merah muda, dan merah) (59,8%). Banyak penelitian melaporkan bahwa mikroorganisme *phylloplane* didominasi oleh bakteri dan fungi yang menghasilkan pigmen (Azeredo dkk. 1998; Joshi dkk. 2003; Sampaio dkk. 2004; Fonseca & Inacio, 2006; dan Dufosse, 2006). Mikroorganisme *phylloplane* yang berpigmen mendominasi karena berhubungan dengan radiasi sinar ultraviolet. Khamir *phylloplane* menghasilkan pigmen dalam jumlah banyak karena merupakan upaya adaptasi terhadap radiasi sinar ultraviolet (Stout, 1960). Pigmen pada bakteri epifit diduga berperan dalam mencegah kerusakan akibat radiasi sinar ultraviolet (Lindow & Brandl, 2003).

Hasil pencarian homologi berdasarkan data *sequence* parsial daerah ITS rDNA yang diperoleh dengan menggunakan program BLAST di NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) menunjukkan 82 isolat khamir representatif termasuk ke dalam 17 genera dan 32 spesies. Sebanyak 36 isolat termasuk ke dalam *Ascomycota*, terdiri dari *Saccharomycotina* dan *Pezizomycotina*. Sebelas genera dari *Saccharomycotina*

terdiri atas *Candida* (9 isolat), *Debaryomyces* (4 isolat), *Geotrichum* (1 isolat), *Hanseniaspora* (4 isolat), *Kodamaea* (2 isolat), *Meyerozyma* (3 isolat), *Pichia* (1 isolat), *Hyphopichia* (3 isolat), *Saccharomycetales* (1 isolat), dan *Wickerhamomyces* (4 isolat); dan satu genus dari *Pezizomycotina* (*Hemiascomyces*) adalah *Aureobasidium* (4 isolat).

Sebanyak 46 isolat termasuk ke dalam *Basidiomycota*, terdiri atas *Agaricomycotina* (*Hymenomycetes*), *Pucciniomycotina* (*Urediniomycetes*), dan *Ustilaginomycotina* (*Ustilaginomycetes*). Sebanyak empat genera dari *Agaricomycotina* terdiri atas *Bullera* (1 isolat), *Cryptococcus* (22 isolat), *Hannaella* (3 isolat), *Trichosporon* (4 isolat); satu genus dari *Pucciniomycotina* (*Urediniomycetes*) adalah *Rhodotorula* (12 isolat), dan satu genus dari *Ustilaginomycotina* (*Ustilaginomycetes*) adalah *Pseudozyma* (4 isolat). Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa tiga genera dengan jumlah isolat terbanyak dari *phyloplane B. papyrifera* secara berurutan adalah *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, dan *Candida*.

Sebanyak 18 spesies termasuk ke dalam *Ascomycota* diidentifikasi sebagai *Aureobasidium* sp., *Aur. pullulans* (de Bary) G. Arnaud, *Cr. flavescens* (Saito) C.E. Skinner, *C. metapsilosis* Tavanti, A. Davidson Gow, M. Maiden & Odds, *C. pseudojiufengensis* F.Y. Bai & Z.H. Ji, Antonie van Leeuwenhoek, *C. quercitrusa* (van Uden & do Carmo-Sausa), *C. saopaulonensis* Ruivo, Pagnocca, Lachance & C.A. Rosa, *C. orthopsilosis* Tavanti, A. Davidson, Gow, M. Maiden & Odds, *Deb. hanseni* (Zopf) Lodder & Kreger-van Rij, *Deb. nepalensis* S. Goto & Sugiyama, *Geo. candidum* Link:Fries, *H'spora thailandica* Jindam., Ninomiya, Limtong, Kawasaki & Nakase, *H'spora uvarum* (Niehaus) Shehata, Mrak & Phaff ex M.Th. Smith, *Hyp. burtonii* Boidin, Pignal, Lehoudey, Vey & Abadie, *Kodamea ohmeri* (Etchells & T.A. Bell) Y. Yamada, Tom. Suzuki, M. Matsuda & Mikata, *Meyerozyma caribbica* Vaughan-Mart., Kurtzman, S.A. Mey. & E.B. O'Neill Kurtzman & M. Suzuki, *Pichia veronae* K. Kodama, *H'spora thailandica* Jindam., Ninomiya, Limtong, Kawasaki & Nakase, *Saccharomycetales* sp., dan *Wic. anomalus* (E.C. Hansen) Kurtzman, Robnett & Bas. Powers.

Sebanyak 14 spesies termasuk ke dalam *Basidiomycota* diidentifikasi sebagai *Bullera sinensis* M.X. Li, *Cr. flavus* (Saito) Phaff & Fell, *Cr.*

rajasthanensis Saluja & G.S. Prasad, *Cr. luteolus* (Saito) C.E. Skinner, *Cry. sp.*, *Cr. flavescens* (Saito) C.E. Skinner, *Han. zeae* (O. Molnár & Prillinger) F.Y. Bai & Q.M. Wang., *Han. kunmingensis* (F.Y. Bai, M. Takash. & Nakase) F.Y. Bai & Q.M. Wang, *Trichosporon asahii* Akagi ex Sugita, *Rh. glutinis*, *Rh. dairenensis* (T. Haseg. & Banno) Fell, Samp. & Gadanho, *Rh. mucilaginosa* (A. Jorgensen) F.C Harrison, *Pseu. aphidis* (Henninger & Windisch) Boekhout, dan *Pseu. thailandica* Sugita, M.Takashima, Mekha & Poonwan.

Khamir *phylloplane B. papyrifera* yang telah diidentifikasi menunjukkan nilai homologi 98--100% dengan spesies terdekatnya. Homologi data *sequence* pada daerah ITS rDNA dari 82 isolat khamir representatif terdiri atas 7 isolat (100%), 63 isolat (99%), dan 12 isolat (98%). Berdasarkan penelitian Sugita dkk. (1999) pada *Trichosporon*, kesamaan *sequence* DNA pada daerah ITS sebesar lebih dari atau sama dengan 99% dianggap spesies yang sama dengan spesies terdekatnya. Pada saat ini 12 isolat khamir yang memiliki nilai homologi 98% dianggap spesies yang sama dengan takson terdekatnya, meskipun perlu dilakukan pengulangan *sequence* daerah ITS rDNA dari isolat-isolat tersebut untuk memperjelas identitasnya.

Hubungan kekerabatan antara khamir *phylloplane B. papyrifera* dengan spesies terdekat dapat dilihat pada pohon filogenetik. Berdasarkan hasil analisis filogenetik data *sequence* daerah ITS rDNA, khamir *phylloplane B. papyrifera* secara taksonomi sangat heterogen. Berdasarkan publikasi Boekhout dkk. (2011) dan Kurtzman (2011) khamir dari *phyla Ascomycota* dan *Basidiomycota* terdistribusi ke dalam lima *subphylum* (*Agaricomycotina*, *Saccharomycotina*, *Pezizomycotina*, *Pucciniomycotina*, dan *Ustilaginomycotina*) dan lima *classes* (*Dothideomycetes*, *Saccharomycetes*, *Microbotryomycetes*, *Tremellomycetes*, dan *Ustilaginomycetes*). Pada penelitian ini, khamir *phylloplane B. papyrifera* dari *Saccharomycetes* dan *Tremellomycetes* ditemukan di empat lokasi sampel. Khamir dari *Microbotryomycetes* dan *Ustilaginomycetes* ditemukan di tiga lokasi sampel (Desa Dago Pojok, Bandung, Desa Tunggilis, Garut; Desa Bejijong, Trowulan). Khamir dari *Dothideomycetes* ditemukan di satu lokasi sampel (Desa Bejijong, Trowulan).

Penelitian ini menunjukkan cukup banyak spesies khamir yang ditemukan pada *phylloplane B. papyrifera*. Hal tersebut menunjukkan bahwa daun *B. papyrifera* sebagai habitat menyediakan nutrisi yang cukup bagi berbagai spesies khamir. Kuang dkk. (2012) melaporkan bahwa daun *B. papyrifera* memiliki kandungan nutrisi antara lain karbohidrat, asam amino, dan beberapa senyawa *phytohormones*. Menurut Redford dkk. (2010) selain faktor lingkungan, struktur komunitas *phyllosphere* juga dipengaruhi oleh beberapa faktor pada daun seperti struktur, umur, komposisi kimia, dan senyawa organik volatil yang dilepaskan.

Hasil isolasi khamir *phylloplane* dari *B. papyrifera* yang berusia enam bulan dan 1,5 tahun dari empat lokasi sampel, menunjukkan bahwa secara keseluruhan jumlah genera dan spesies khamir dari usia tumbuhan 1,5 tahun (14 genera 23 spesies) lebih banyak dibandingkan usia enam bulan (12 genera 21 spesies). Adanya perbedaan jumlah genera dan spesies khamir berdasarkan umur tumbuhan memberikan indikasi bahwa daun tua sebagai habitat khamir menyediakan lebih banyak nutrisi dibandingkan daun muda. Hal tersebut menyebabkan sampel daun tua menghasilkan jumlah genera dan spesies khamir lebih banyak dibandingkan daun muda. Menurut Glushakova dan Chernov (2004) daun yang muda menghasilkan eksudat dalam jumlah sedikit sehingga nutrisi yang tersedia tidak cukup untuk populasi mikroorganisme dalam jumlah besar.

Khamir-khamir *phylloplane B. papyrifera* diduga melakukan asosiasi, karena genera dan spesies yang sama telah ditemukan dari usia tumbuhan yang berbeda. Sembilan genera dan 12 spesies yang sama terdapat pada usia tumbuhan yang berbeda yaitu *Dothideomycetes* (*Aur. pullulans*), *Saccharomycetes* (*C. saopaulonensis*, *H'spora thailandica*, *Meyerozyma caribbica*, *Wic. anomalus*); *Microbotryomycetes* (*Rh. dairenensis* dan *Rh. mucilaginosus*), dan *Tremellomycetes* (*Cr. rajasthanensis*, *Cr. luteolus*, *Cr. flavescens*, *Han. zeae*), dan *Ustilaginomycetes* (*Pseu. aphidis*). Dugaan ini masih perlu diteliti lebih lanjut karena adanya keterbatasan jumlah sampel tumbuhan yang diperoleh. Menurut Ganter (2006), mikroorganisme yang melakukan suatu asosiasi dengan organisme lain sering ditemukan secara bersama secara permanen. Inácio dkk. (2010) melaporkan khamir *Cr. cistialbidi* hanya ditemukan pada spesies tumbuhan *Cistus albidus*. Untuk mengetahui adanya asosiasi antara spesies khamir tertentu dan

tumbuhan perlu dilakukan konfirmasi dengan penelitian menggunakan jumlah sampel lebih banyak.

Khamir merupakan mikroorganisme yang memiliki kemampuan melakukan interaksi antagonisme (Batzing, 2002). Biokontrol adalah penggunaan mikroorganisme antagonis yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme lainnya pada substrat (Druvefors dkk. 2005). Mikroorganisme antagonis tersebut dinamakan *biological control agents*, atau disingkat sebagai agens biokontrol (Spadaro & Gullino, 2004). Khamir antagonis sebagai biokontrol merupakan alternatif penanggulangan kapang yang berbahaya bagi kesehatan manusia dan lingkungan (Druvefors, 2004).

Kapang patogen pada buah tomat menyebabkan penurunan kualitas buah saat pascapanen, sehingga berakibat rendahnya produksi buah (Andersen & Frisvad, 2004). Diketahui bahwa tomat segar merupakan salah satu jenis buah yang baik bagi kesehatan manusia, sehingga saat ini konsumsi buah tomat semakin tinggi seiring meningkatnya kesadaran masyarakat terhadap kesehatan. Namun demikian, fungi dapat menyebabkan kebusukan pada buah. Saeed dan Khan (2010) melaporkan *Geo. candidum*, *A. alternata*, *Asp. niger*, *Asp. flavus*, *Fus. oxysporum*, *Rhizopus stolonifer*, dan *Asp. fumigatus* menyebabkan kebusukan buah tomat pascapanen. Oetari dan Sjamsuridzal (2009) melaporkan bahwa kapang *Aspergillus niger*, *Asp. oryzae*, *Asp. ochraceus*, dan *Asp. terreus* ditemukan pada daun tomat.

Khamir antagonis berpotensi sebagai agens biokontrol (Khan & Anwer, 2011). Khamir memiliki karakter dapat hidup pada kondisi yang lingkungan yang ekstrim, dapat berkolonisasi dengan cepat, dan dapat bertahan pada permukaan buah dalam jangka waktu lama. Karakter tersebut dapat digunakan oleh khamir untuk melakukan interaksi kompetisi dengan kapang patogen pada buah (Pimenta dkk. 2008). Kemampuan antagonistik khamir *phylloplane B. papyrifera* asal Desa Sukadanu dan Desa Tunggilis, Garut, dan potensinya sebagai agens biokontrol terhadap kapang penyebab kebusukan buah tomat belum diketahui. Khamir *phylloplane B. papyrifera* dari dua desa tersebut menunjukkan sangat beragam dan heterogen, ditambah berada dalam wilayah yang sama yaitu Garut, sehingga dipilih untuk pengujian antagonisme dan biokontrol.

Buah tomat busuk memiliki ciri pada permukaan kulit buah terdapat luka kecil, di sekitar luka terdapat lingkaran konsentris cekung berwarna hitam, buah lembek, dan berair (Watkins, 1999; Delahaut & Stevenson, 2004; Kavanagh, 2005; Laura dkk. 2005). Isolasi kapang dari sampel buah tomat busuk menghasilkan 46 isolat. Isolat kapang yang diperoleh memperlihatkan koloni berwarna putih (14 isolat), putih susu (21 isolat), putih dengan variasi di bagian tengah putih susu, merah muda, kecokelatan, dan putih susu keabu-abuan (11 isolat). Isolat kapang menunjukkan tekstur koloni *wooly* dan pertumbuhan miselium yang telah memenuhi seluruh permukaan petri setelah empat hari inkubasi.

Berdasarkan uji patogenitas diperoleh lima isolat kapang yang menyebabkan kebusukan buah tomat dengan nilai tingkat 5. Kelima isolat kapang memperlihatkan pertumbuhan miselium sangat melebar dan menyebar, terdapat lingkaran konsentris berwarna kehitaman, kemudian buah membusuk di sekitar luka pada inkubasi hari ke 2--5. Selanjutnya untuk pengujian biokontrol, dipilih tiga isolat kapang representatif (T8.U3.K2; T4.U1.K4; dan T4.U1.K1) berdasarkan nilai tingkat 5 dan waktu pertumbuhan paling cepat karena memperlihatkan pertumbuhan miselium berwarna abu-abu sejak hari ke dua inkubasi, kemudian miselium menyebar di permukaan buah. Selanjutnya buah menjadi busuk dengan kulit berkerut, dan mengeluarkan air hingga inkubasi hari kelima.

Identifikasi tiga isolat kapang representatif hingga tingkat spesies berdasarkan pencarian homologi sekuens daerah ITS rDNA menggunakan program BLAST, menunjukkan isolat T8.U3.K2 memiliki homologi sekuens daerah ITS sebesar 100% dengan spesies terdekatnya yaitu sebagai *A. alternata* strain: IFM 58912, isolat T4.U1.K4 memiliki homologi sekuens daerah ITS sebesar 100% dengan spesies terdekatnya yaitu sebagai *L. theobromae* strain EucN188. Isolat T4.U1.K1 memiliki homologi sekuens daerah ITS sebesar 99% dengan spesies terdekatnya yaitu sebagai *Syn. racemosum* strain CNRMA 03.414. Menurut Sugita dkk. (1999) isolat kapang yang memiliki homologi $\geq 99\%$ pada spesies terdekat dianggap sebagai spesies yang sama.

Hasil pengujian antagonisme menggunakan metode *co-culture* memperlihatkan enam spesies khamir *C. saopaulonensis* UICC Y-492, *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475, *Deb. hansenii* UICC Y-488, *Rh. mucilaginosa* UICC Y-476, *Geo. candidum* UICC Y-495, dan *Hyp. burtonii* UICC Y-496 bersifat antagonistik terhadap kapang *A. alternata* T8. U3. K2, *Syn. racemosum* T4.U1.K1, dan *L. theobromae* T4.U1.K4. Pada pengamatan mikroskopik, terlihat adanya pelekatan sel khamir pada dinding hifa kapang. Pelekatan sel khamir paling cepat pada hifa kapang dilakukan oleh *C. saopaulonensis* UICC Y-492, yaitu pada hifa *A. alternata*, *Syn. racemosum*, dan *L. theobromae*. Interaksi antagonisme antara khamir antagonis dan kapang penyebab kebusukan pada buah tomat diduga melalui mekanisme kompetisi nutrisi dan ruang, kemudian dilanjutkan dengan mekanisme antibiosis. Zhang dkk. (2007), melaporkan pengujian antagonisme menggunakan metode *co-culture* antara khamir *Rh. glutinis* terhadap kapang *B. cinerea* tidak memperlihatkan adanya pertumbuhan kapang *B. cinerea* hingga inkubasi hari ke-5. Jijakli dan Lepoivre (1997) melaporkan khamir *Pichia anomala* menghasilkan β -1,3-glukanase yang dapat merusak dinding sel kapang *B. cinerea*.

Hasil pengujian biokontrol pada tomat pascapanen menunjukkan khamir *C. saopaulonensis* UICC Y-492, *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475, *Deb. hansenii* UICC Y-488, *Rh. mucilaginosa* UICC Y-476, *Geo. candidum* UICC Y-495, dan *Hyp. burtonii* UICC Y-496 memiliki potensi sebagai agens biokontrol kapang *A. alternata* T8.U3.K2 dan *L. theobromae* T4.U1.K4. Khamir-khamir tersebut menunjukkan kemampuan yang berbeda antara satu dengan lainnya. Beberapa penelitian telah dilaporkan mengenai kemampuan khamir sebagai agens biokontrol kapang pada buah pascapanen. Khamir *Rh. mucilaginosa* memiliki kemampuan sebagai agens biokontrol kapang pada buah apel (Gholamnejad dkk. 2009; Fard dkk. 2011), pepaya (Andalon dkk. 2012); jeruk (Gosh dkk. 2012). *Debaryomyces hansenii*, memiliki kemampuan sebagai agens biokontrol kapang pada buah pepaya (Sharma & Srivastava 2012); jeruk (Gosh dkk. 2012). *Hyphopichia burtonii* memiliki kemampuan sebagai agens biokontrol kapang pada biji gandum (Druvefors dkk. 2005).

Pengujian biokontrol khamir antagonis terhadap kapang memperlihatkan hasil persentase tomat busuk yang bervariasi. *Candida pseudojiufengensis* UICC Y-475 dapat mereduksi pertumbuhan *A. alternata* T8.U3.K2, sehingga tomat tidak menunjukkan gejala kebusukan (0%). Aplikasi *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475 menyebabkan *A. alternata* T8.U3.K2 hanya memperlihatkan pertumbuhan miselium berwarna putih dengan diameter kecil, sedangkan sporulasi kapang tersebut terhambat oleh khamir.

Kemampuan *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475 dalam mereduksi pertumbuhan *A. alternata* T8.U3.K2 sehingga mengurangi kebusukan tomat sangat baik dibandingkan dengan fungisida sintetik Dithane M-45. Fungisida Dithane M-45 0,08% hanya mengurangi pertumbuhan *A. alternata* T8.U3.K2 sampai 15 hari dan hanya mereduksi kebusukan tomat hingga 67%. Informasi mengenai kemampuan *C. pseudojiufengensis* sebagai agens biokontrol pada buah pascapanen belum banyak dilaporkan. Sampai saat ini, laporan mengenai *C. pseudojiufengensis* hanya hasil isolasi dan identifikasi khamir tersebut oleh Zhao dkk. (2009) dari saluran pencernaan serangga *Cetoniidae* di Beijing, China.

Aplikasi *C. saopaulonensis* UICC Y-492 dan *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 dapat mereduksi pertumbuhan *L. theobromae* T4.U1.K4 dan mengurangi kebusukan tomat hingga 67%. Kemampuan *C. saopaulonensis* UICC Y-492 dan *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 setara dengan fungisida Dithane M-45 dalam mereduksi pertumbuhan *L. theobromae* T4.U1.K4 dan mengurangi kebusukan tomat.

Khamir *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 tidak dapat mencegah pertumbuhan *A. alternata* T8.U3.K2, sehingga terjadi kebusukan pada tomat 100%. Hal yang sama juga berlangsung pada *Geo. candidum* UICC Y-495 dan *Hyp. burtonii* UICC Y-496 terhadap kapang *L. theobromae* T4.U1.K4. Diduga khamir-khamir tersebut tidak dapat berkompetisi dengan kapang untuk ruang dan nutrisi pada tomat. Kapang *A. alternata* T8.U3.K2 dan *L. theobromae* T4.U1.K4 dapat memanfaatkan nutrisi pada tomat dan tumbuh dengan cepat sehingga pertumbuhan miselium kapang berlangsung cepat, diikuti dengan sporulasi berwarna abu-abu kehitaman sehingga menyebabkan adanya lingkaran cekung.

Candida pseudojiufengensis UICC Y-475 adalah *phylloplane* *B. papyrifera* merupakan agens biokontrol yang potensial terhadap *A. alternata*, sehingga tidak terjadi kebusukan tomat hingga 100%. Kemampuan khamir tersebut memberikan indikasi bahwa khamir antagonistik yang diperoleh dari habitat yang berbeda dengan kapang kompetitor dari tomat akan menyebabkan khamir antagonistik berkompetisi dengan lebih kuat untuk ruang dan nutrisi yang sama. Berdasarkan Golubev (2006) khamir yang diisolasi dari habitat *phylloplane* memiliki kemampuan interaksi antagonisme yang lebih besar jika diaplikasikan agen antagonis pada pengujian biokontrol pada mikroorganisme lain yang berasal dari habitat berbeda.

Untuk memperoleh suatu agens biokontrol yang bernilai komersial, diperlukan agens biokontrol yang *viabile*, dan masih dapat berperan sebagai agens biokontrol pada produk pascapanen (Torres dkk. 2003). Salah satu metode preservasi yang dapat digunakan untuk menjaga viabilitas dan kemampuan genetik suatu khamir potensial adalah dengan metode *freezing* pada suhu -80°C .

Preservasi khamir pada suhu -80°C dilakukan menggunakan khamir potensial agens biokontrol pada buah tomat yaitu *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475, *C. saopoulenensis* UICC Y-492, *Hyp. burtonii* UICC Y-496, dan *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513. Penentuan viabilitas (kemampuan sel hidup) dilakukan pada hari ke-1 (H1), ke-7 (H7), ke-14 (H14), ke-30 (H30), ke-180 (H180) dan H0 sebagai kontrol. Pengujian viabilitas sel khamir yang telah dipreservasi pada suhu -80°C menunjukkan hasil yang berbeda dari hari ke-1 (H1), ke-7 (H7), ke-14 (H14), ke-30 (H30), ke-180 (H180) dan H0 sebagai kontrol. Pengujian viabilitas menunjukkan rerata jumlah sel khamir: *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475 ($1,08 \times 10^8$ CFU/ml), *C. saopoulenensis* UICC Y-492 ($0,65 \times 10^8$ CFU/ml), *Hyp. burtonii* UICC Y-496 ($1,76 \times 10^8$ CFU/ml), dan *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 ($2,13 \times 10^8$ CFU/ml).

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa empat spesies khamir yang berpotensi sebagai agens biokontrol terhadap kapang penyebab kebusukan buah tomat dapat dipreservasi menggunakan metode *freezing* pada suhu -80°C . Empat spesies khamir tersebut memiliki kategori viabilitas tinggi berdasarkan rerata jumlah sel hidup setelah dipreservasi selama 180 hari (H180). Hal tersebut

menunjukkan bahwa metode *freezing* pada suhu -80°C tepat diaplikasikan pada empat spesies khamir tersebut.

Empat spesies khamir yang berpotensi sebagai agen biokontrol asal *B. papyrifera* pada kapang penyebab kebusukan pada buah tomat pascapanen memiliki tingkat viabilitas tinggi dengan rerata $\text{CFU} \geq 1 \times 10^7/\text{ml}$ berdasarkan jumlah sel hidup kategori Mikata (1999). Polomska dkk. (2012) melaporkan *Candida famata* MI1a pada suhu -38°C , -20°C dan -10°C yang dipreservasi selama enam bulan memiliki viabilitas tinggi dengan rerata $\text{CFU} \geq 1 \times 10^7/\text{ml}$ (viabilitas 70%) menggunakan protektan trehalosa. Nagai dkk. (2005) melakukan preservasi khamir-khamir genera *Candida*, *Debaryomyces*, *Hypopichia*, *Pichia*, dan *Rhodotorula* pada suhu -70°C selama satu bulan dan satu tahun menggunakan gliserol 10% sebagai protektan. Hasil penelitian menunjukkan khamir memiliki viabilitas 99-100% .

Pada penelitian ini metode preservasi pada -80°C dengan penambahan protektan (gliserol 10% dan trehalosa 5%) memberikan viabilitas khamir yang lebih tinggi dibandingkan tanpa penambahan protektan. Penelitian ini juga membuktikan bahwa metode preservasi pada -80°C merupakan metode preservasi yang tepat dalam menjaga viabilitas khamir yang memiliki potensi sebagai agens biokontrol.

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

1. Sebanyak 2.543 isolat khamir dari *phylloplane Broussonetia papyrifera* diperoleh dari empat wilayah sampling menggunakan metode *washing* dan *membrane filter method*. Delapan puluh dua isolat khamir representatif diperoleh berdasarkan kesamaan morfologi dan koloni. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa 82 isolat khamir tersebut terdiri atas 17 genera dan 32 spesies. Sebanyak 11 genera dan 18 spesies termasuk *Ascomycota*: *Saccharomycetes* yaitu *Candida* (5 spesies), *Debaryomyces* (2 spesies), *Geotrichum* (1 spesies), *Hanseniaspora* (2 spesies), *Kodamaea* (1 spesies), *Meyerozyma* (1 spesies), *Pichia* (1 spesies), *Hyphopichia* (1 spesies), *Saccharomycetales* (1 spesies), dan *Wickerhamomyces* (1 spesies) serta *Dothidiomycetes*, satu genus, *Aureobasidium* (2 spesies). Sebanyak 6 genera dan 14 spesies termasuk *Basidiomycota*: *Tremellomycetes* yaitu *Bullera* (1 spesies), *Cryptococcus* (5 spesies), *Hannaella* (2 spesies), *Trichosporon* (1 spesies); *Microbotryomycetes* satu genus *Rhodotorula* (3 spesies); dan *Ustilaginomycetes* satu genus *Pseudozyma* (2 spesies).
2. Tiga kapang representatif berdasarkan hasil isolasi dan uji patogenitas dapat menyebabkan kebusukan pada buah tomat pascapanen, yaitu *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., dan *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl dan *Syncephalastrum racemosum* Cohn.
3. Enam spesies khamir antagonis dapat menghambat pertumbuhan dan sporulasi kapang *A. alternata*, *L. theobromae*, dan *Syn. racemosum* yaitu *Candida saopaulonensis* UICC Y-492, *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475, *Debaryomyces hansenii* UICC Y-488, *Rhodotorula mucilaginosa* UICC Y-476, *Geotrichum candidum* UICC Y-495, dan *Hyphopichia burtonii* UICC Y-496. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475 merupakan agens biokontrol yang dapat menghambat pertumbuhan kapang patogen *A. alternata* T8.U3.K2 sehingga tidak terjadi kebusukan tomat hingga 100%. Khamir

C. saopaulonensis UICC Y-492 dan *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 dapat menghambat pertumbuhan kapang patogen *L. theobromae* T4.U1.K4 dan mengurangi kebusukan tomat hingga 67% .

4. Metode preservasi pada -80°C merupakan metode preservasi yang tepat dalam menjaga viabilitas strain. Seluruh strain menunjukkan viabilitas yang tinggi (rerata CFU $\geq 1 \times 10^8$ /ml) setelah disimpan pada suhu -80°C selama 180 hari. Viabilitas khamir setelah dipreservasi pada suhu -80°C antara lain: Jumlah sel khamir antara lain: *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475 ($1,08 \times 10^8$ CFU/ml), *C. saopoulenensis* UICC Y-492 ($0,65 \times 10^8$ CFU/ml), *Hyp. burtonii* UICC Y-496 ($1,76 \times 10^8$ CFU/ml), dan *Rh. mucilaginosa* UICC Y-513 ($2,13 \times 10^8$ CFU/ml).

SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan *scanning electron microscopy* (SEM) untuk melihat adanya perubahan morfologi kapang akibat interaksi antagonisme.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aplikasi sel khamir *C. pseudojiufengensis* UICC Y-475 pada tanaman sayuran lain yang terserang penyakit kebusukan yang disebabkan kapang *Alternaria alternata* dan *Lasiodiplodia theobromae*.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai viabilitas spesies khamir yang berpotensi sebagai agens biokontrol dipreservasi pada suhu -80°C dengan waktu penyimpanan yang lebih lama.
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aspek ekologi khamir *phylloplane Broussonetia papyrifera*, dengan menambah jumlah sampel daun dan jumlah lokasi sampling.

DAFTAR ACUAN

- Ahansal, L., A. Sassi, A. Martini, A. Vaughan, G. Walker & A. Boussaid. 2008. Biodiversity of yeasts isolated from the indigenous forest of Argan (*Argania spinosa*) in Morocco. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 777--782.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and psi-BLAST: A new generation of protein database search program. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389--3402.
- Alamri, S. & M. Hashen. 2009. The biocontrol of postharvest disease (*Botrydiploia theobromae*) of guava (*Psidium guajava* L.) by application of yeast strain. *Postharvest Biology and Technology.* **53**: 123--130.
- Atlas, R.M. & R. Bartha. 1993. *Microbial ecology fundamental and applications*. Cummings Publishing Company. Canada. pp. 83--84.
- Andersen, B. & J.C. Frisvad. 2004. Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **52**: 7507--7513.
- Andalon, M., S. Luna & J.A Ragazzo-Sanchez. 2012. Parasitism and Substrate Competitions Effect of Antagonistic Yeasts for Biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* in papaya (*Carica papaya* L.) var Maradol. *Mexican Journal of Scientific Research.* **1**: 2--9.
- Arie, T., H. Takahashi, M. Kodama & T. Teraoka. 2007. Tomato as a model plant-pathogen interactions. *Plant Biotechnology.* **24**: 135--147.
- Aurajo, C.A., M.J. Almeida, M.J. Sousa & C. Leao. 2004. Freeze tolerance of the yeast *Torulaspora delbrueckii*: cellular and biochemical basis. *Fems. Microbiology Letters.* **240**: 7—14.
- Azeredo, L.A.I., A.T. Gomes, L.M. Hagler & A.N. Hagler. 1998. Yeast community associated with sugarcane in compos Rio de Janeiro, Brazil. *International Microbiol.* **1**: 205--208.
- Bellager, R.R. & T.J. Avis. 2002. Ecological process and interaction occurring in leaf surface fungi. In: Lindow, S.E., E.I. Hecht-Poinar & V.j. Elliot (eds). *Phyllosphere Microbiology*. APS Press. St. Paul. pp. 193-- 207.

- Breeze, E.M. & N.j. Dix. 1981. Seasonal analysis of the fungal community on *Acer platanoides* leaves. *Trans. Mycol. Soc.* **77**: 321--328.
- Badan Pusat Statistik dan Direktorat Jenderal Hortikultura. 2011. Produksi Tomat Menurut Provinsi, 2007-- 2011. Departemen Pertanian Jakarta: 48 hlm.
- Barnett, H.L. & B.B. Hunter. 1987. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4rd ed. Macmillan Publishing Company, New York: 218 hlm.
- Batzing, B.L. 2002. *Microbiology: An introduction*. Brooks/Cole Thomson Learning Inc., London: xx + 780 hlm.
- Badan Pusat Statistik dan Direktorat Jenderal Hortikultura. 2011. Produksi Tomat Menurut Provinsi, 2007-- 2011. Departemen Pertanian Jakarta: 48 hlm.
- Bozkurt, Y., E. Akcay, N. Tekin & S. Secer. 2005. Effect of freezing techniques, extenders and cryoprotectants on the fertilization rate of frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm. *Israeli J. Aquaculture-Bamidgeh*. **57**: 125-130.
- Boekhout, T., Á. Fonseca, J.P. Sampaio, R.J. Bandoni, J.W. Fell & K.J. Kwon. 2011. Discussion of teleomorphic and anamorphic *Basidiomycetous* yeasts, pp. 1339--1372. Dalam: P. Kurtzman, J. W. Fell, & T. Boekhout, *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 5th Ed. Elsevier, Amsterdam: 1339--1475.
- Capuccino, J.G. & N. Sherman. 2001. *Microbiology: A laboratory manual*. Benjamin Cummings, San Francisco: xvi + 491 hlm.
- Cappuccino, J. G. & N. Sherman. 2002. *Microbiology: A laboratory manual*. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., San Francisco: xvi + 491 hlm.
- Carlile, M.J., S.C. Watkinson & G.W. Gooday. 2001. *The fungi*. 2nd ed. Academic Press. California: xix + 588 hlm.
- Carvajal, M.V., A. Querol & C. Belloch. 2006. Identification of species in the genus *Pichia* by restriction of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the 5.8S ribosomal DNA gene. *Antonie van Leeuwenhoek*. **90**: 171--181.
- Charlie, M. & S.C. Watkinson. 1995. *The fungi*. Academic press London: xiii+ 481 hlm.

- Crestani, J., M.F. Landell, J. Faganello, M.H. Vainstein, H.S. Vishniac & P. Valente. 2009. *Cryptococcus terrestris* sp. nov. Tremellaceous, anamorphic yeast phylogenetically related to *Cryptococcus flavescens*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 631--636.
- Chan, Z. & S. Tian. 2005. Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. *Postharvest Biology and Biotechnology.* **36**: 215--223.
- Chanchaichaovivat, A.P. Ruenwongso & B. Pannijpan. 2007. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). *Biological Control.* **42**: 326--335.
- Charli, P., G. Caruso, V. Fogliano, D. Carputo, L. Frusciante & M.R. Ercolano. 2011. Development of a methodology to forecast the nutritional value of new tomato hybrids. *Euphytica.* **180**: 291--300.
- Chuku, E.C., J.A. Osakwe & W.C. Daddy. 2010. Fungal spoilage of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) using garlic and ginger. *Scientia Africana.* **9**: 41--50.
- Deak, T. 2008. *Handbook of food spoilage yeast*. 2nd ed. CRC Press, New York: xxi + 321 hlm.
- Delahaut, K. & W. Stevenson. 2004. Tomato disorder: Post-harvest fruit diseases. *Extension Factsheet*, Plant Pathology Lake St. Rm. 103, Madison. pp. 67--70.
- Direktorat Jendral Bina Produksi Hortikultura. 2002. Budidaya tomat. Direktorat Tanaman Hias, Sayuran, dan Aneka Tanaman. Departemen Pertanian Jakarta: 50 hlm.
- Druvefors, U.A. 2004. Yeast biocontrol of Grain Spoilage Moulds. Mode action of *Pichia anomala*. Thesis Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala: 44--58 hlm.
- Druvefors, U.A. & J. Schnrer. 2005. Mold-inhibitory activity of different yeast species during airtight storage of wheat grain. *FEMS Yeast.* **5**: 373--378.
- Dufossé, L. 2006. Microbial production of food grade pigments. *Food Technol. Biotechnol.* **44**: 313--321.

- Doohan, F. 2006. Fungal pathogens of plants. *Dalam: Kavanagh, K., Fungi Biology and Applications*. John Wiley & Sons, England: 119--220.
- Doneva, T.U. & T. Donev. 2005. Anabiosis and conservation of microorganism. *Journal of culture collection*. **4**: 17--28.
- Errasti, A., C.C. Carmaran & V. Novas. 2010. Diversity and significance of fungal endophytes from living stems of naturalized trees from Argentina. *Fungal Diversity*. **41**: 29--40.
- Fard, F.A., H.R. Etebarian & N. Sahebani. 2011. Biological control of gray mold of apple by *Candida membranifaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa*, and *Pichia guilliermondii*. *J. Plant. Path.* **48**: 17--26.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. **39**: 783--791.
- Fuller, B.J. 2004. Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryoletters*. **25**: 375-388.
- Fonseca, Á. & J. Inácio. 2006. Phylloplane yeasts, pp. 263--301. *Dalam: G. Peter, and C. Rosa, The Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 263--405.
- Glushakova A M, Chernov I Yu. 2004. Seasonal dynamics in a yeast population on the common wood sorrel *Oxalis acetosella* L. leaves. *Microbiology Journal*. **2**: pp.532.
- Glushakova, A.M. & I.Yu Chernov. 2007. Seasonal Dynamic of the Numbers of Epiphytic Yeasts. *Mikrobiologiya*. **5**: 590--595.
- Gholamnejad, J., H.R. Etebarian, N.A. Sahebani & A. Roustaei. 2009. Characterization of Biocontrol Activity of Two Yeast Strains from Iran against Blue Mould of Apple in Order to Reduce the Environmental Pollution. *J. Int. Environmental Application & Science*. **4**: 28--36.
- Ghosh, S.Kr., T. Santra & A. Chakravarty. 2012. Study of antagonistic yeasts isolated from some natural sources of West Bengal. *Agric. Biol. J. N. Am.* **4**: 33--40.
- Golubev, W.I. 2006. Antagonistic interactions among yeast. *Dalam: Rosa, C. & G. Peter. 2006. Biodiversity and Ecophysiology of Yeast*. Springer-Verlag, Heidelberg: x + 579 hlm.

- Goulart, B.L., P.E. Hammer, K.B. Evensen, W. Janisiewicz & F. Takeda. 1992. Pyrrolnitrin, captan + benomyl, and high CO₂ enhance raspberry shelf life at 0 or 18 °C. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. **117**: 265--270.
- Herrera, C.M. & M. Pozo. 2014. Nectar yeasts warm the flowers of a winter-blooming plant *Proc. R. Soc. B.* doi:10.1098/rspb.2009.2252. 1-8.
- Hussain, K., A. Shahazad & S. Zia-ul-Hussnain. 2008. An Ethnobotanical Survey of Important Wild Medicinal Plants of Hattar District Haripur, Pakistan. *Ethnobotanical Leaflets*. **12**: 29--35.
- Haggag, W.M. & H.A.A. Mohamed. 2007. Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*. **1**: 7--12.
- Harny, C.L. Ajuwin, L.T. Tan & T.C. Yeo. 2011. Methods and preserving of fungal culture to improve viability. Rehabilitation of tropical rainforest ecosystems, 24-25 October, Kuala Lumpur.pp. 45--48.
- Hong, S.G., K.H. Lee & K.S. Bae. 2002. Diversity of yeasts associated with natural environments in Korea. *J. Microbiol.* **40**: 55--62.
- Ho-Yong S., K.C. Suk & S.K. Ho. 2010. Fungicidal effect of prenylated flavonol, papyriflavonol A, isolated from *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. against *Candida albicans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 1397--1402.
- Ilyas, M. 2007. Uji viabilitas koleksi kapang LIPI-MC dalam ampul penyimpanan kering-beku *L-drying* setelah satu tahun penyimpanan pada suhu 5 °C. *Biodiversitas*. **8**: 20--22.
- Inácio, J., P. Pierra, A. Fonseca, M.T. Amaral Collaco & I.S. Martini. 2002. Estimation and diversity of phylloplane mycobiota on selected plants in a Mediterranean type ecosystem Portugal. *Microb. Ecol.* **44**: 344--353.
- Inácio, J. 2003. Yeast occurrence and diversity on the phylloplane of selected plants from Arrabida Natural park. PhD thesis (in Portuguese). Universidade Nova de Lisboa Portugal. pp. 1261--1275.
- Inácio, J., P. Laura, M. Isabel & F. Alvaro. 2006. Phylloplane yeasts from Portugal: Seven novel anamorphic species in the *Tremellales* lineage of

- Hymenomycetes (Basidiomycota)* producing orange-coloured colonies. *FEMS Yeast Res.* **5**: 1167--1183.
- Jandhav, D.M. & D.U. Gawal. 2013. Isolation and characterization of *Aureobasidium pullulans* (De Barry) a phylloplane yeast of sandal and guava. *Bionano Frotier.* **6**: 0974--0979.
- Joshi, V.K., D. Attri, A. Bala & S. Bhushan. 2003. Microbial pigments. *Indian J. Biotechnol.* **2**: 363--369.
- Jijakli, M.H. & P. Lepoivre. 1997. Characterization of an Exo-b-1,3-Glucanase Produced by *Pichia anomala* Strain K, Antagonist of *Botrytis cinerea* on Apples. *The American Phytopathological.* **4**: 335--341.
- Kalogiannis, S., S.E. Tjamos, A. Stergiou, P.P. Antoniou, B.N. Ziogas & E.C. Tjamos. 2006. Selection and evaluation of phyllosphere yeast as biocontrol agents against grey mould of tomato. *Eur. J. Plant. Pathol.* **116**: 69--76.
- Kanti, A., E. Sukara, K. Latifah, N. Sukarno & K. Boundy-Mills. 2013. Indonesian oleaginous yeasts isolated from *Piper betle* and *P. nigrum*. *Mycosphere.* **4**: 1015--1026.
- Kavanagh, K. 2005. *Fungi: Biology and applications*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex: xii + 267 hlm.
- Kutama, B., S. Aliyu & I. Mohammed. 2007. Fungal pathogens associated with tomatoes grown in Ohio. *The American Phytopath. Society.* **90**: 397--403.
- Kuang, Y., D. Xi, J. X. Zhu & L. Zhang. 2012. Traffic pollution influences leaf biochemistries of *Broussonetia papyrifera*. *Sci.Res.* **2**: 71--76.
- Kumaresan, V. and Suryanarayanan, T.S. (2002). Endophyte assemblages in young, mature and senescent leaves of *Rhizophora apiculata*: evidence for the role of endophytes in mangrove litter degradation. *Fungal Diversity.* **9**: 81-91.
- Kurtzman, C.P. 2011. Discussion of teleomorphic and anamorphic *Ascomycetous* yeasts and yeast-like taxa, pp. 293--307. *Dalam*: C.P. Kurtzman, J.W. Fell and T. Boekhout, *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 5th Ed. Elsevier, Amsterdam.

- Ko H.H., Y.S. Meei, K.F. Nien, T.C. Ming & L.C. Nan. 1998. Bioactive constituents of *Morus australis* and *Broussonetia papyrifera*. *J. Nat. Prod.* **60**: 1008--1011.
- Laura, J., G. Chapin, Y. Wang, E. Lutton & B.M. Gardener. 2006. Distribution and fungicide sensitivity of fungal pathogens causing athracnose-like lesions on tomatoes grown in Ohio. *The American Phytopathological Society.* **90**: 397--403.
- Landecker, E.M. 1996. Fundamental of the fungi. Prentice-Hall. Inc. New Jersey. 16—17.
- Lee, D., P.L. Krishna, H.S. Harry, R.N. Farnsworth, P. John & A. D. Kinghorn. 2001. Aromatase inhibitors from *Broussonetia papyrifera*. *J. Nat. Prod.* **64**: 1286--1293.
- Lindow, S.E. & M.T. Brandl. 2003. Minireview microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1875--1883.
- Limtong S., R. Kaewwichian, W. Yongmanitchai, H. Kawasaki. 2014. Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid. *World J Microbiol Biotechnol.* DOI 10.1007/S11274-014-1602-7.
- Lima, G., F. De Curtis, R. Castoria & V. De Cicco. 1999. Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against post-harvest rots on different fruits. *Biocontrol. Sci. Technol.* **8**: 257--267.
- Li, B.Q & S.P. Tian. 2006. Effect of intracellular trehalosa in *Cryptococcus laurentii* and exogenous lyoprotectant on its viability and biocontrol efficacy on *Penicillium expansum* in apple fruit. *Letters in applied microbiology.* **44**: 437--442.
- Liu J. S., P. Tian., B.Q. Li & G.Z. Qin. 2009. Enhancing viability of two biocontrol yeast in liquid formulation by applying sugar protectant combined with antioxidant. *BioControl.* **54**: 817--824.
- McCormack, P.J., G. Howards, G. Wildman & P. Jeffries. 1994. Production of Antibacterial Compounds by Phylloplane-Inhabiting Yeasts and Yeastlike Fungi. *Applied. Microbiology.* **21**: 927-931

- Moliné, M., D. Libkind, M.C. Diéguez & M. van Broock. 2009. Photoprotective role of carotenoids in yeasts: Response to UV-B of pigmented and naturally-occurring albino strains. *J. Photochem Photobiol B.* **95**: 156- 161.
- Morgan, E.C. & W.A. Overholt. 2008. Wildland Weeds: Paper Mulberry, *Broussonetia papyrifera*. <http://edis.ifas.ufl.edu>. IFAS Invasive Plant Working Group. 2008. Accessed June, 2013, <http://plants.ifas.ufl.edu/assessment/>.
- Machmud, M. 2001. Teknik penyimpanan dan pemeliharaan mikroba. *Buletin agrobio.* **4**: 24--32.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko., D.A. Stahl & D.P. Clark. 2012. *Brock biology of microorganisms*. 13th^{ed}. Pearson education, Inc., Boston: I-4 hlm.
- Mahovic, M., S.S. Sargent & J.A. Bartz. 2004. Identifying and controlling postharvest tomato diseases in Florida. University of Florida:1--15.
- Marri, M. & M. Guizzardi. 1997. The postharvest phase emerging technologies for the control of fungal diseases. *Phytoparasitica.* **26**: 59--66.
- Meer, H., S. Iram, I. Ahmad, F.S. Fateh & M.R. Kazmi. 2013. Identification and characterization of post harvest fungal pathogens of mango from domestic markets of Punjab. *International Journal of Agronomy and Plant Production.* **4**: 650--658.
- Mikata, K. & I. Banno. 1987. Preservation of yeast cultures by freezing at -80 °C. *IFO Res. Comm.* **13**:59--68.
- Mikata, K. 1999. Preservation of yeast culture by L-drying: Viability after 15 years storage at 5° C. *IFO Research Communications* **19**: 71--82.
- Mueller, G.M., G.F. Bills & M.S. Foster. 2004. *Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods*. Elsevier academic press, Amsterdam: xviii + 777 hlm.
- Morgan, C.A., N. Herman, P.A. White & G. Vesey. 2006. Preservation of micro-organism by drying; A review. *J. Microbiol. Methods.* **66**: 183--193.
- Nallya, M.C., V.M. Pescea, Y.P. Maturanoa, C.J. Muñoz, M. Combinab, M.E. Toroa, L.I. Castellanos de Figueroa & F. Vazqueza. 2012. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous

- Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. *Postharvest Biology and Technology*. **64**: 40--48.
- Nagai, T., K. Tomioka, K. Takeuchi, M. Iida, M. Kawada & T. Sato. 2005. Evaluation of preservation techniques of microorganism resources in the MAFF genebank. *JARQ*. **39**:19--25.
- Nagpal, R., A. K. Puniya, J. P. Sehgal & K. Singh. 2012. Survival of anaerobic fungus *Coecomyces* sp. in various preservation methods: a comparative study. *Mycoscience*. **53**: 427--432.
- Nakasone, K. K., S. W. Peterson & S. Jong. 2004. *Preservation and distribution of fungal culture*. Elsevier, Inc., China. **8**: 37--47 hlm.
- Novik G., A. Sidarenka, D. Rakhuba & E. Kolomiets. 2009. Cryopreservation of Bifidobacteria and bacteriophages in Belarussian collection of non-pathogenic microorganisms. *Journal of culture collections*. **6**: 76--84.
- Nyanga, L. K., M. J. R. Nout, E. J. Smid, T. Boekhout & M. H. Zwiethering. 2012. Yeast preservation: Alternatives for lyophilization. *World J Microbiol Biotechnol*. **28**: 3239--3244.
- Obase, K., S.Y. Lee, K.W. Chun & J.K. Lee. 2011. Enzyme activity of *Cenococcum geophilum* isolates on enzyme-specific solid media. *Mycobiology*. **39**: 125--128.
- Oetari, A. & W. Sjamsuridzal. 2009. Penggunaan khamir indigenous Indonesia sebagai alternatif penanggulangan *Aspergillus* penghasil aflatoksin pada bahan pangan. Dana Riset DRPM UI. Dengan Kontrak nomor: 747N/DRPM-UI/A/N1.4/2009. Universitas Indonesia.
- Oetari, A., A. Salamah & W. Sjamsuridzal. 2007. *Laporan akhir Riset Unggulan Universitas Indonesia Tahun 2007 :Bioprospek mikosin dari khamir indigenous Indonesia (asal Kebun Raya Cibodas) sebagai biokontrol jamur patogen pada tumbuhan pangan*. FMIPA-UI. Universitas Indonesia. 1-2 hlm.
- Oetari, A., A. Akbar, A. Salamah, A. Soemiati, D. Hendrayanti, Katrin, M. Atria, N.S. Lestari, T. Susetyo-Salim, & W. Sjamsuridzal. 2009. *Kajian kekayaan tradisional Indonesia: daluang (dluwang) dari tanaman saeh (Broussonetia papyrifera Vent.) ditinjau dari aspek hayati dan budaya*.

- Laporan Akhir Hibah Riset Unggulan Bidang Prioritas Tahun 2010. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam serta Fakultas Ilmu Pengetahuan Budaya, Universitas Indonesia: x + 109 hlm.
- Parey, M.A., V.K. Razdan & T.A. Sofi. 2013. Comparative study of different fungi associated with fruit rot of chilli and screening of chilli germplasm against *Colletotrichum capsici*. *Intl. J. Agri. Crop. Sci.* **5**: 723--730.
- Peever, T.L., L. Carpenter, L.W. Timmer, L.M. Carris & A. Bhatia. 2005. Citrus black rot is caused by phylogenetically distinct lineages of *Alternaria alternata*. *The American Phytopathological Society*. **95**: 512--518.
- Permadi, T. 1998. Daluang kertas tradisional Jawa Barat. Saga Olah Citra, Bandung: 44 hlm.
- Pennycook, S.R. & F.J. Newhook. 1981. Seasonal changes in the apple phylloplane microflora. *New Zealand Journal of Botany*. **19**: 273--283.
- Permadi, T. 2005. Konservasi tradisi pembuatan daluang sebagai salah satu upaya penyelamatan teknologi tradisional Nusantara. Program Studi Bahasa dan Sastra Indonesia, Jurusan Pendidikan Bahasa dan Sastra Indonesia, Fakultas Pendidikan Bahasa dan Seni, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung: 1--19.
- Permadi, T. 2010. Asal-usul pemanfaatan dan karakteristik daluang: Bahan naskah dalam tradisi Nusantara. Bandung: 1--29.
- Pegg, D.E. 2007. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol.* **368**: 39--57.
- Połomska, X., M. Wojtatowicz, B. Zarowska, M. Szoltyś & J. Chrzanowska. 2012. Freeze-Drying Preservation of Yeast Adjunct Cultures for Cheese Production. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **62**: 143--150.
- Redford, A.J., R. Bowers, R. Knight, Y. Linhart & N. Fierer. 2010. The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environmental Microbiology*. **11**: 2885--2893.
- Ruivo, C.C.,¹ M. Lachance, C.A. Rosa, M. Bacci & F.C. Pagnocca. 2006. *Candida heliconiae* sp. nov., *Candida picinguabensis* sp. nov. and *Candida saopaulonensis* sp. nov., three ascomycetous yeasts from *Heliconia*

- velloziana (Heliconiaceae). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **6**: 1147--1151.
- Roberts, R.G. 1990. Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology*. **80**: 526--530.
- Saeed, A.F.H. & S.N. Khan. 2010. Post harvest losses of tomato in markets of district Lahore. *Mycopath*. **8**: 97--99.
- Saitou, N. & M. Nei. 1987. The neighbor joining method a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406--425.
- Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, pp. 8.17--8.98. 3th Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sampaio, A., R. Cortes & C. Leao. 2004. Yeast and macroinvertebrate communities associated with leaf litter decomposition in a second order stream. *Internat. Rev. hydrobiol.* **89**: 453--466.
- Savova, I., T. Donev, & Z. Sholeva. 1997. An investigation of trehalose accumulation dynamics by yeasts from genus *Saccharomyces*. *Journal of Culture Collections*. **2**: 40--43.
- Seifi, Z., A.Z. Mahmoudabadi & S. Hydrinia. 2013. Isolation, Identification and Susceptibility Profile of *Rhodotorula* Species Isolated From Two Educational Hospitals in Ahvaz. *Jundishapur Journal of Microbiology*. **6**: 8765--8786.
- Smith, D. & M. Ryan. 2012. Implementing Best Practices and Validation of Cryopreservation Techniques for Microorganisms. *The Scientific World Journal*. **9**: 1--9.
- Smith, D. & A.H.S. Onions. 1983. The Preservation and Maintenance of Living Fungi. *Commonwealth Mycological Institute*. **6** :5--30.
- Sharma, N. & M. P. Srivastava. 2012. Antagonistic Activity of Fructoplane Yeast Against *Ulocladium* Rot of Papaya. *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*. **2**: 169--182.
- Shimon, M.B., H. Yehuda, L. Cohen, B. Weiss, A. Kobeshnikov, A. Daus, M. Goldway, M. Wisniewski & S. Droby. 2004. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Curr. Genet.* **45**: 140--148.

- Spadaro, D. & M.L. Gullino. 2004. Biological control of postharvest diseases of pome fruit using yeast antagonists. *International Journal of Food Microbiology*. pp. 78--98.
- Sugita, T., A. Nishikawa, R. Ikeda & T. Shinoda. 1999. Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1985--1993.
- Sun, X., L. Guo & K. D. Hyde. 2011. Composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. *Fungal Diversity*. **47**: 85--95.
- Spencer, J.F.T. & D.M. Spencer. 1997. Ecology: Where yeasts live. *Dalam*: Spencer, J.F.T. & D.M. Spencer. (eds). 1997. *Yeasts in natural and artificial habitats*. Springer, Berlin. pp. 33--67.
- Sjamsuridzal, W. & A. Oetari. 2003. Rapid preparation of fungal and bacterial genomic DNA for PCR. *Hayati*. **10**: 122--124.
- Sjamsuridzal, W. 2007. *Yeast diversity and conservation Gunung Halimun National Park, Indonesia*. Nagao Natural Environment Foundation, Depok: iii + 254 hlm.
- Sjamsuridzal, W., A. Oetari, A. Kanti, R. Saraswati, C. Nakashima, Y. Widyastuti & K. Ando. 2010. Ecological and taxonomical perspective of yeasts in Indonesia. *Microbiol. Indonesia*. **4**: 60--67.
- Sjamsuridzal, W., A. Oetari, C. Nakashima, A. Kanti, R. Saraswati, Y. Widyastuti & K. Ando. 2013. New species of genus *Metschnikowia* isolated from flowers in Indonesia, *Metschnikowia cibodasensis* sp. nov. *J. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 1--8.
- Stout, J. D. 1960. Bacteria of soil and pasture leaves at Claudelands show-grounds. *N. Z. J. Agric. Res.* **3**: 413--430.
- Stohr, S. N., L. Leon & W.B. James. 2008. The influence of exogenous nutrients on the abundance of yeasts on the phylloplane of Turfgrass. Springer Science. DOI: 10.1007/s00248-007-9247-x. **55**: 15--20.
- Sundin, G.W. 2002. Ultraviolet radiation on leaves: its influences on microbial communities and their adaptations. *Phyllosphere Microbiology*. APS Press. St. Paul. pp. 27--42.

- Sugita, T., A. Nishikawa, R. Ikeda & T. Shinoda. 1999. Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1985--1993.
- Sun, J., L.S. Fang, Z. Chu, Y. Lina, B. Jie, Z. Fang & Y. Ging-li. 2012. Chemical composition and antioxidant activities of *Broussonetia papyrifera* fruits. *Plos One* 7: (2): e32021. Doi:10.1371/journal.pone.0032021.
- Soon G.H., K.H. Lee & K.S. Bae. 2002. Diversity of yeasts associated with natural environments in Korea. *J. Microbiol.* **40**: 55--62.
- Sonoda, R.M., N.C. Hayslip & P.J. Stoffella. 1981. Tomato fruit rot infection cycle in a freash market packing operation. *Agricultural Experiment Station Journal Series.* **94**: 281--282.
- Takashima, M., T. Sugita, B.H. Van, M. Nakamura, R. Endoh & M. Ohkuma. 2012. Taxonomic richness of yeasts in Japan within subtropical and cool temperate areas. *Plos One* 7(11): e50784. Doi: 10.1371/journal.pone.00050784.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar. 2007. Mega 4: Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 1596-1599.
- Tulha, J., A. Lima, C. Lucas & C. Ferreira. 2010. *Saccharomyces cerevisiae* gliserol symporter Stl 1p is essential for cold/near-freeze and freeze stress adaptation. A simple recipe with high biotechnological potential given. *Microbial Cell Factories.***9**: 2--7.
- Teijgeler, R. 1995. Dluwang, a Javanese/ Madurese tapa from paper mulberry tree. Writing material from Indonesia. International Institute for Asian Studies. Newsletter: 25.
- Teijgeler, R. 2000. Dluwang, a near-paper from Indonesia, pp. 134--145. In R. Teygeler, *International Association of Paper Historians*. Congress book, Marburg: 135--159.
- Tian, S.P., J. Yao, X. Deng, B. Xiang, B. Xu, Z. Qin & Z.L., Chan. 2006. Characterization and expression of β -1-3- glucanase genes in Jujube fruit

- induced by microbial biocontrol agent *Cryptococcus laurentii*. *The American Phytopathological Society*. **3**: 260--267.
- Todorova, T., M. Pesheva, R. Stamenova, M. Dimitrov & P. Venkov. 2012. Mutagenic effect of freezing on nuclear DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*: **29**: 191--199.
- Torres, R., J. Usall., Teixido. M. Abadias & I. Vinas. 2003. Liquid formulation of the agent *Candida sake* by modifying water activity or adding protectants. *Journal of Applied Microbiology*. **94**: 330--339.
- Veenendaal, H.Li., N.A. Ab Shukor, J.R. Cobbinah & C. Leifert. 1995. Yeast populations on the tropical timber tree species *Milica excelsa*. *Applied Microbiology*. **21**: 322--326.
- Wani, A.H. 2011. An overview of fungal rot of tomato. *Mycopath*. **9**: 33--38.
- Watkins, J.E. 1999. Diseases of home garden tomatoes. <http://digitalcommons.unl.edu/extensionhist/1265>. University of Nebraska-Lincoln. West Sussex: xi + 267 hlm.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee & J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Dalam*: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White, *PCR Protocols: Guide to Methods and Applications*. Academic Press Incorporation, New York: 315--322.
- Whistler, W.A. & C. R. Elevitch. 2006. *Broussonetia papyrifera* (paper mulberry), pp. 1--13. *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee & J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315--322. *Dalam*: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, *PCR Protocols: Guide to Methods and Applications*. Academic Press Incorporation, New York. pp. 315--450.
- Xu M.L, W. Lan, H. Jian, L.S. Ki & W.M. Hyeon. 2010. Antioxidant activities and related polyphenolic constituents of the methanol extract fractions from *Broussonetia papyrifera* stem bark and wood. *Food Sci. Biotechnol*. **19**: 677--682.

- Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance & identification, pp. 77--105. *Dalam* Kurtzman, C. P., and J. W. Fell. 1998. *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4th Ed. Elsevier, Amsterdam. pp. 78--120.
- Zafar, I., S. Mussarat, H. Farrakh, B. Sheraz, I. Mohammad, Z. Shahida & A. Bashir. 2002. Antifungal properties of some indigenous plants from Peshawar Valley. *Asian J. Plant Sci.* **6**: 708--709.
- Zak, J.C. 2002. Implications of leaf surface habitat for fungal community structure and function. *Phyllosphere Microbiology*. APS Press. St. Paul. pp. 299--315.
- Zaragoza, O., P. Gonzalez-Parraga, Y. Pedreno, F.J. Alvarez-Peral & J.C. Arguelles. 2013. Trehalose accumulation induced during the oxidative stress response is independent of TPS1 mRNA levels in *Candida albicans*. *International Microbiology*. **6**: 121--125.
- Zivkovic, S., S. Stojanovic, Z. Ivanovic, N. Trkulja, N. Dolovac & J. Balaz. 2010. Morphological and molecular identification of *Colletotrichum acutatum* from tomato fruit. *Pestic. Phytomed.* **25**: 231--239.
- Zhang, H., L. Wang, X. Zheng & Y. Dong. 2007. Effect of yeast antagonist in combination with heat treatment on postharvest blue mold decay and *Rhizopus* decay of peaches. *Inter. Journal of Food Microbiol.* **115**: 53--58.
- Zhao, Y., K. Tu, X. Shao, W. Jing & Z. Su. 2007. Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*. **49**: 113--120.
- Zhao, H., J.J. Hua Jia, & F. Yan Bai. 2009. Four novel *Candida* species in the *Candida albicans/Lodderomyces elongisporus* clade isolated from the gut of flower beetles. *Antonie van Leeuwenhoek*. **95**: 23--32.
- Zhao, Y., K. Tu, X. Shao, W. Jing & Z. su. 2008. Effect of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. *Postharvest Biol Technol.* **49**: 113--120.
- Zheng, X., H. Zhang & Y. Xi. 2004. Effect of *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner on biocontrol of postharvest decay of arbutus berries. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **45**: 55--60.

