



UNIVERSITAS INDONESIA

**IDENTIFIKASI ISOLAT-ISOLAT KHAMIR DARI SALURAN
PENCERNAAN *Apis cerana* (FABRICIUS, 1793) DI APIARI
BERDASARKAN DATA *SEQUENCE* DAERAH ITS rDNA**

SKRIPSI

**IRVAN MAULANA
0305040412**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JULI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**IDENTIFIKASI ISOLAT-ISOLAT KHAMIR DARI SALURAN
PENCERNAAN *Apis cerana* (FABRICIUS, 1793) DI APIARI
BERDASARKAN DATA *SEQUENCE* DAERAH ITS rDNA**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**IRVAN MAULANA
0305040412**

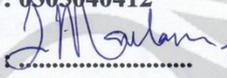
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JULI 2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : Irvan Maulana

NPM : 0305040412

Tanda Tangan 

Tanggal : 13 Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Irvan Maulana
NPM : 0305040412
Program Studi : Biologi
Judul Skripsi : Identifikasi Isolat-isolat Khamir dari Saluran
Pencernaan *Apis cerana* (Fabricius, 1793)
di Apiari Berdasarkan Data *Sequence* Daerah ITS
rDNA

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D (.....)

Pembimbing II: Dr. Adi Basukriadi, M.Sc. (.....)

Penguji I : Ariyanti Oetari, Ph.D (.....)

Penguji II : Dr. Andi Salamah (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 13 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT Tuhan semesta alam, karena dengan segala nikmat dan karunia-Nya akhirnya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains Jurusan Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Banyak kendala muncul dalam penelitian dan penulisan skripsi ini. Tanpa bantuan, bimbingan serta petunjuk dari berbagai pihak dari masa perkuliahan sampai pada saat penulisan skripsi ini, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan penulisan skripsi ini. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini penulis mengucapkan banyak terima kasih dan penghargaan kepada:

1. Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D dan Dr. Adi Basukriadi, M.Sc selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini;
2. Hibah Strategis Nasional Dikti T.A. 2010 atas nama Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D yang telah membiayai penelitian ini;
3. Ariyanti Oetari, Ph.D dan Dr. Andi Salamah selaku penguji, Drs. Iman Santoso, M.Phil selaku penasehat akademik, Dr. rer. nat. Mufti P. Patria, M.Sc selaku ketua Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Titi Soedjarti, SU serta Dra. Noverita Dian Takarina, M.Sc atas saran dan bekal yang berharga bagi penulis;
4. Karyawan Departemen Biologi FMIPA-UI, khususnya Pak Pri, Pak Taryono, Pak Taryana dan Mba Asri yang senantiasa membantu selama penelitian berjalan;
5. Keluarga tercinta, Ibu, Bapak, Haviz, Ucha dan Dinda. Terima kasih atas doa, ksaih sayang dan semangatnya selama ini;
6. Teman-teman Bee05phere, khususnya Geng MACAN (Bojes, Rendyp dan Pandu), juga teman-teman seperjuangan Ryujin, Kurnia, Haikal dan Giri.
7. Lulu Moulfia Tursina, yang telah memberi semangat tanpa bosan kepada penulis;

8. Teman-teman di Laboratorium CoE, Davina, Mba Dalia, Mba Reno, Novia dan Bangga. Keluarga besar Biologi, teman-teman dan adik-adik Biologi angkatan '06, '07, '08, '09 dan '10 serta semua pihak yang membantu selama penelitian dan penulisan, yang tidak dapat disebutkan satu persatu, penulis ucapkan terima kasih.

Penulis tidak mampu membalas semua kebaikan yang telah semua pihak berikan. Penulis berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Penulis juga menyadari bahwa masih terdapat banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini oleh karena itu kritik dan saran yang membangun akan sangat membantu bagi perbaikan skripsi ini. Akhir kata, semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Depok, 2011

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR
UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Irvan Maulana
NPM : 0305040412
Program Studi : S1
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

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

Identifikasi Isolat-isolat Khamir dari Saluran Pencernaan *Apis cerana* (Fabricius, 1793) di Apiari Berdasarkan Data *Sequence* Daerah ITS rDNA

Beserta perangkat yang ada. Dengan Hak Bebas Royalti Noneklusif ini, Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari 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 : 13 Juli 2011

Yang menyatakan



(Irvan Maulana)

ABSTRAK

Nama : Irvan Maulana
Program Studi : S1 Biologi
Judul Skripsi : Identifikasi Isolat-isolat Khamir dari Saluran Pencernaan *Apis cerana* (Fabricius, 1793) di Apiari Berdasarkan Data *Sequence* Daerah ITS rDNA

Penelitian bertujuan mengetahui keragaman spesies khamir dari saluran pencernaan lebah madu *Apis cerana* di apiari Desa Ciburial, Bandung. Sebanyak 48 isolat khamir dari saluran pencernaan *Pollen-collecting bee* (PCB) (27 isolat) dan *Nectar-collecting bee* (NCB) (21 isolat) diidentifikasi berdasarkan data *sequence* daerah *internal transcribed spacer* (ITS) rDNA dan dikarakterisasi secara morfologi untuk melengkapi hasil identifikasi. Hasil identifikasi molekuler menunjukkan bahwa 48 isolat khamir tersebut terdiri atas delapan genus dan 16 spesies. Sebanyak 12 spesies khamir ditemukan pada PCB dan sembilan spesies khamir ditemukan pada NCB. *Candida cf. apicola*, *C. etchellsii*, *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula mucilaginosa* dan *Zygosaccharomyces rouxii* ditemukan pada PCB maupun NCB. Spesies-spesies khamir yang diperoleh secara taksonomi heterogen, yaitu termasuk ke dalam *class Hemiascomycetes* dari *phylum Ascomycota* (13 spesies) dan *class Urediniomycetes* dari *phylum Basidiomycota* (3 spesies).

Kata kunci : Apiari, *Apis cerana*, identifikasi, ITS, khamir, lebah madu, saluran pencernaan.

ABSTRACT

Name : Irvan Maulana
Study Programme : Biology
Title : Identification of Yeast Isolated from Digestive Tract of *Apis cerana* (Fabricius, 1793) in Apiary Based on ITS region rDNA Data Sequence

The aim of this study was to study the diversity of yeast species isolated from the digestive tract of honey bee *Apis cerana* in apiary in Ciburial, Bandung. A total of 48 yeast isolates from the digestive tract of pollen-collecting bees (27 isolates) and Nectar-collecting bee (21 isolates) were identified based on sequence data of internal transcribed spacers regions of ribosomal DNA (ITS rDNA). In addition of their sequence data, yeasts were also characterized morphologically. The results showed that those yeasts comprised of eight genera and 16 species. Twelve yeast species were found from PCB and nine yeast species were found from NCB. *Candida* cf. *apicola*, *C. cf. azyma*, *C. etchellsii*, *C. naeodendra*, *C. orthopsilosis*, *Cryptococcus heveanensis*, *Debaryomyces hansanii*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Zygosaccharomyces rouxii* were found both in PCB and NCB. Our molecular analysis showed that *A. cerana* harbors taxonomically diverse yeasts. They consisted of species belong to the class *Hemiascomycetes* of the phylum *Ascomycota* (13 species) and class *Urediniomycetes* of the phylum *Basidiomycota* (3 species).

Keywords: Apiary, *Apis cerana*, digestive tract, honey bee, identification, ITS, yeast.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xi
1. PENDAHULUAN.....	1
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Khamir.....	4
2.1.1 Ciri-ciri Umum.....	4
2.1.2 Taksonomi Khamir.....	4
2.1.2.1 <i>Phylum Ascomycota</i>	5
2.1.2.2 <i>Phylum Basidiomycota</i>	6
2.2 <i>Apis cerana</i> (Fabricius, 1793)	7
2.3 Khamir yang Berasosiasi dengan <i>A. cerana</i>	8
2.4 Khamir-khamir yang Terdapat pada Serbuk Sari (<i>pollen</i>) dan Madu Bunga (<i>nectar</i>)	10
2.5 Identifikasi Khamir.....	11
2.6 Analisis <i>Sequence</i> Daerah ITS Khamir	13
3. METODE PENELITIAN.....	15
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	15
3.2 Peralatan	15
3.3 Bahan.....	16
3.3.1 Khamir	16
3.3.2 Medium.....	16
3.3.3 Bahan Kimia	16
3.4 Cara Kerja.....	17
3.4.1 Pembuatan Medium	17
3.4.1.1 <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA).....	17
3.4.1.2 <i>Yeast extract-Malt extract Agar</i> (YMA).....	17
3.4.1.3 <i>Yeast extract-Malt Broth</i> (YMB)	18
3.4.1.4 <i>Yeast extract Agar + Sucrose 50%</i> (YESA 50%)	18
3.4.2 Pemurnian Isolat Khamir dan Pembuatan <i>Stock</i> dan <i>Working</i> <i>Culture</i>	18
3.4.3 Pengamatan Morfologi Secara Mikroskopik	19
3.4.4 Pengamatan Morfologi Koloni.....	19

3.4.5	Isolasi DNA Genom dari Isolat Khamir.....	19
3.4.6	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	20
3.4.7	Elektroforesis Gel Agarosa	20
3.4.8	Pemurnian Produk PCR	21
3.4.9	Pengukuran Kuantitas dan Kualitas Produk PCR.....	21
3.4.10	PCR <i>cycle-sequencing</i>	22
3.4.11	Pemurnian Produk PCR <i>cycle-sequencing</i>	22
3.4.12	Denaturasi Produk PCR <i>cycle-sequencing</i>	23
3.4.13	<i>Sequencing</i> Menggunakan ABI 310 Automated Sequencer	23
3.4.14	Pengolahan dan Analisis Data.....	23
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	24
4.1	Isolasi DNA dan Amplifikasi Daerah ITS rDNA.....	24
4.2	Identifikasi Isolat-isolat Khamir dari Saluran Pencernaan <i>A. cerana</i>	28
4.2.1	Spesies-spesies Khamir yang Berasal dari Saluran Pencernaan PCB (<i>pollen-collecting bee</i>).....	29
4.2.2	Spesies-spesies Khamir yang Berasal dari Saluran Pencernaan NCB (<i>nectar-collecting bee</i>).....	32
4.2.3	Isolat-isolat Khamir dengan Homologi <i>Sequence</i> Daerah ITS rDNA yang Rendah	35
4.3	Deskripsi 16 Spesies Khamir dalam Penelitian.....	36
4.3.1	<i>Candida cf. apicola</i> (Hajsig) S.A. Meyer & Yarrow	36
4.3.2	<i>Candida cf. azyma</i> (van der Walt, E. Johansen & Yarrow) S.A. Meyer & Yarrow	37
4.3.3	<i>Candida etchellsii</i> (Lodder & Kreger-van Rij) S.A. Meyer & Yarrow (Yarrow and Meyer 1978).....	38
4.3.4	<i>Candida multigemmis</i> (Buhagiar) S.A. Meyer & Yarrow (Yarrow and Meyer 1978).....	39
4.3.5	<i>Candida naeodendra</i> van der Walt, E. Johanssen & Nakase (1973)	39
4.3.6	<i>Candida orthopsilosis</i> (Ashford) (Tavanti, Davidson, Gow, Maiden, et Odds, sp. nov.) (2005).....	40
4.3.7	<i>Candida parapsilosis</i> (Ashford) Langeron & Talice (1932)	41
4.3.8	<i>Cryptococcus flavescens</i> (Saito) C.E. Skinner (1947b).....	41
4.3.9	<i>Cryptococcus heveanensis</i> (Groenewege) Baptist & Kurtzman (1976)	42
4.3.10	<i>Debaryomyces hansenii</i> (Zopf) Lodder & Kreger-van Rij (1952) .	43
4.3.11	<i>Kodamaea ohmeri</i> (Etchells & T.A. Bell) Y. Yamada, Suzuki, Matsuda & Mikata.....	44
4.3.12	<i>Pichia burtonii</i> Boidin, Pignat, Lehodey, Vey & Abadie (1964)...	44
4.3.13	<i>Pichia farinosa</i> (Lindner) E.C. Hansen (1904)	45
4.3.14	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (Jorgensen) F.C. Harrison (1928)	46
4.3.15	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (E.C. Hansen) Kurtzman (2011)	46
4.3.16	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (Boutroux) Yarrow (von Arx et al. 1977).....	47

5. KESIMPULAN DAN SARAN	49
5.1 Kesimpulan	49
5.2 Saran.....	49
 DAFTAR REFERENSI	 51



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.2.1	Tiga kasta lebah madu <i>Apis mellifera</i>	8
Gambar 3.5.1	Daerah ribosomal DNA.....	12
Gambar 4.1.1	Isolat-isolat khamir dari saluran pencernaan <i>Apis cerana</i> pada medium YMA atau YESA 50% berumur satu minggu.....	25
Gambar 4.1.2	Hasil elektroforesis produk PCR daerah ITS rDNA beberapa isolat khamir dari saluran pencernaan <i>Apis cerana</i>	27
Gambar 4.3.1	Pengamatan askospora isolat khamir dari saluran pencernaan <i>Apis cerana</i> di Apiari Desa Ciburial, dalam medium YMB 7 hari pada suhu ruang.....	48

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1.1	Hasil pengukuran kualitas dan kuantitas DNA isolat-isolat khamir dari saluran pencernaan <i>A. cerana</i>	28
Tabel 4.2.1	Spesies-spesies khamir yang diperoleh dari saluran pencernaan <i>A. cerana</i> di Apiari Desa Ciburial, Kabupaten Bandung	29
Tabel 4.2.1.1	Hasil identifikasi khamir dari saluran pencernaan <i>A. cerana</i> (PCB) di Apiari Desa Ciburial, Kabupaten Bandung.....	30
Tabel 4.2.2.1	Hasil identifikasi khamir dari saluran pencernaan <i>A. cerana</i> (NCB) di Apiari Desa Ciburial, Kabupaten Bandung.....	33

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Skema kerja penelitian	59
Lampiran 2	Tahapan kerja identifikasi molekuler.....	60

BAB 1 PENDAHULUAN

Saluran pencernaan serangga merupakan salah satu habitat sumber keanekaragaman mikroorganisme yang belum banyak dieksplorasi (Mrázek *dkk.* 2008: 229). Menurut Spencer dan Spencer (1997a: 49), khamir dapat diisolasi dari saluran pencernaan lebah madu pengumpul serbuk sari (*pollen*) (*pollen-collecting bee*)/(PCB) dan lebah madu pengumpul madu bunga (*nectar*) (*nectar-collecting bee*)/(NCB). Khamir-khamir yang diisolasi dari saluran pencernaan lebah diketahui sebagai spesies yang berasal dari madu bunga (*nectar-inhabiting species*) dan dari serbuk sari/*bee pollen* (Gilliam 1979: 43; Spencer dan Spencer 1997a: 49; Ganter 2006: 340). Khamir-khamir yang hidup pada saluran pencernaan serangga menunjukkan ciri-ciri fisiologis yang mirip, yaitu umumnya bersifat fermentatif dan memanfaatkan golongan kecil dari senyawa karbon yang terdapat di dalam saluran pencernaan (Rosa dan Lachance 1998: 1414).

Menurut Sandhu dan Waraich (1985: 51), khamir-khamir yang paling umum ditemukan pada tembolok beberapa spesies lebah yang berbeda termasuk *A. cerana* adalah khamir dari genus *Candida* Berkhout dan *Dekkera* van der Walt. Khamir-khamir yang pernah diisolasi dari lebah yaitu *Candida bombicola* (J.F.T. Spencer, Gorin dan Tulloch) S.A. Meyer dan Yarrow; *Sporobolomyces roseus* Kluver dan van Niel; dan *Pichia guillermondii* Wickerham (Zacchi dan Vaughan-Martini 2002: 242), serta khamir-khamir osmotoleran dari *A. mellifera* Linnaeus adalah *Candida rancensis* C. Ramirez dan A. Gonzalez; *Debaryomyces hansenii* Lodder dan Kreger-van Rij; *D. maramus* di Menna; *Metschnikowia pulcherrima* Pitt dan M.W. Miller; dan *Zygosaccharomyces rouxii* (Boutroux) Yarrow (Ganter 2006: 340).

Penelitian mengenai spesies-spesies khamir yang berasal dari saluran pencernaan lebah madu *A. cerana* Fabr. di negara tropis khususnya di Indonesia, masih sangat terbatas. Spesies-spesies khamir yang berasal dari saluran pencernaan lebah madu pekerja *A. cerana* dan adanya asosiasi antara khamir (*Candida* cf. *apicola* (Hajsig) S.A. Meyer dan Yarrow dan *C. cellae* Pimentel, Lachance dan Rosa) dengan *A. cerana* yang hidup liar (*wild*) di Kampus UI Depok telah dilaporkan oleh Basukriadi *dkk.* pada tahun 2010. Basukriadi *dkk.* (2010: 47) melaporkan

adanya perbedaan antara spesies-spesies khamir yang berasal dari saluran pencernaan PCB dan NCB *A. cerana* yang hidup liar. Menurut Ganter (2006: 339), perbedaan jumlah isolat khamir pada lebah madu PCB dan NCB kemungkinan mencerminkan perbedaan tipe bunga dan kelimpahan bunga yang dikunjungi oleh lebah tersebut. Putra (2010: 42) mengisolasi dan mengidentifikasi khamir-khamir yang berasal dari saluran pencernaan *A. cerana* yang hidup liar di kawasan kampus UI Depok. Spesies-spesies khamir tersebut terdiri atas enam genus dan sembilan spesies, yaitu *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud; *Aureobasidium* sp. Viala dan Boyer; *Candida cellae*; *Candida* cf. *apicola*; *Candida* cf. *azyma* (van der Walt, E. Johansen dan Yarrow) S.A. Meyer dan Yarrow; *Dothioraceae* sp. Theissen dan H. Sydow; *Kodamaea ohmeri* (Etchells dan T.A. Bell) Y. Yamada, Suzuki, Matsuda dan Mikata; *Metschnikowia* sp. Kamienski; dan *Yarrowia lipolytica* (Wickerham, Kurtzman dan Herman) van der Walt dan von Arx.

Asosiasi antara lebah dengan khamir bersifat mutualistik. Lebah berperan sebagai vektor bagi khamir ke habitat yang baru, sedangkan khamir berperan sebagai makanan lebah (Ganter 2006: 340; Teixeira *dkk.* 2003: 341). Khamir-khamir yang ditemukan pada saluran pencernaan lebah dapat menghasilkan asam amino (Zacchi dan Vaughan-Martini 2002: 240) dan vitamin esensial yang dibutuhkan lebah (Mankowski dan Morrel 2004: 226). Khamir berperan dalam proses fermentasi serbuk sari menjadi *bee bread* yang merupakan makanan bagi lebah (Gilliam 1979: 44), khamir juga berperan dalam proses pematangan madu bunga (*nectar*) menjadi madu pada *honeycomb* (sisir madu) (Spencer dan Spencer 1997a: 49).

Identifikasi khamir dapat dilakukan dengan teknik molekuler. Identitas khamir dapat diketahui berdasarkan data *sequence* daerah *internal transcribed spacers* (ITS) dari ribosomal DNA (rDNA). Data *sequence* daerah ITS memiliki variabilitas yang tinggi antarspesies sehingga dapat digunakan untuk identifikasi khamir pada tingkat spesies (James *dkk.* 1996: 189; Hall 2001: 9--10). *Sequence* daerah ITS untuk semua spesies khamir yang diketahui tersedia pada *database* DNA internasional (GenBank) pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Data *sequence* daerah ITS yang diperoleh dari suatu isolat khamir dapat dikirim melalui program pencarian homologi *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> sehingga dapat diketahui identitas isolat tersebut

berdasarkan tingkat homologinya terhadap spesies khamir terdekat yang ada di *database* DNA (Genbank). Isolat-isolat khamir dari spesies yang sama memiliki homologi *sequence* daerah ITS rDNA $\geq 99\%$ (Sugita *dkk.* 1999: 90).

Basukriadi *dkk.* pada tahun 2009 telah mengisolasi khamir-khamir dari saluran pencernaan lebah pekerja *A. cerana* (PCB dan NCB) di Apiari (peternakan lebah) Desa Ciburial, Kabupaten Bandung, akan tetapi identitas khamir-khamir tersebut masih belum diketahui. Penelitian bertujuan untuk memperoleh informasi keanekaragaman spesies khamir yang terdapat di saluran pencernaan lebah madu *A. cerana* di Apiari Desa Ciburial, Kabupaten Bandung, baik dari PCB maupun NCB berdasarkan data *sequence* daerah ITS rDNA. Selain data *sequence* daerah ITS rDNA, dilakukan karakterisasi morfologi makroskopik dan mikroskopik dari isolat-isolat khamir untuk melengkapi data hasil identifikasi molekuler. Informasi yang diperoleh dapat memberi gambaran keanekaragaman spesies khamir pada lebah madu pekerja (PCB dan NCB). Pada penelitian ini terdapat kemungkinan ditemukannya spesies khamir yang baru sehingga dapat menambah wawasan pengetahuan kita mengenai spesies khamir di dunia, khususnya spesies khamir yang terdapat pada lebah madu *Apis cerana*.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Khamir

2.1.1 Ciri-ciri Umum

Khamir merupakan fungi uniseluler yang bereproduksi secara seksual dan aseksual. Reproduksi seksual khamir dilakukan dengan cara menghasilkan askospora dan basidiospora. Alat reproduksi seksual khamir tidak ditutupi badan buah (*fruiting bodies*) (Boekhout dan Phaff 2003: 1). Reproduksi aseksual khamir dilakukan dengan cara *fission* (pembelahan), *budding* (pertunasan) (Boekhout dan Phaff 2003: 1), menghasilkan konidia pada sterigma, balistokonidia, blastokonidia, klamidokonia dan arthrokonidia (Spencer dan Spencer 1997b: 80). Beberapa spesies khamir bersifat *dimorphic* (memiliki dua fase dalam hidupnya), yaitu dapat membentuk fase uniseluler (*yeast-phase*) dan fase hifa (*mycelium-phase*) dalam siklus hidupnya. Khamir yang *dimorphic* disebut juga *yeast-like fungi* (Phaff 1990: 54).

2.1.2 Taksonomi Khamir

Berdasarkan taksonominya, khamir termasuk ke dalam *Kingdom Eumycota* yang terdiri atas *Phylum Ascomycota* dan *Basidiomycota*. *Phylum Ascomycota* terbagi menjadi tiga *Class*, yaitu *Archiascomycetes*, *Euascomycetes* dan *Hemiascomycetes* (Hamamoto dan Nakase: 2000: 60). Kelompok khamir *Ascomycetes* membentuk spora seksual dalam struktur seperti kantung yang disebut askospora (Barr 2001: 161). Dinding sel kelompok khamir *Ascomycetes* terdiri atas dua lapis (*bilayer*) (Kurtzman dan Sugiyama 2001: 188--189) dan reproduksi aseksualnya dengan cara pembentukan tunas secara holoblastik (Boekhout dan Kurtzman 1996: 4). Menurut Choudhary dan Johri (2009: 20) terdapat tiga *class* dalam *phylum Basidiomycota*, yaitu *Urediniomycetes*, *Hymenomycetes*, dan *Ustilaginomycetes*. Kelompok khamir *Basidiomycetes* menghasilkan spora seksual basidiospora pada struktur berbentuk gada yang disebut *basidium* (Kurtzman dan

Fell 2006: 21). Dinding sel kelompok khamir *Basidiomycetes* terdiri atas banyak lapis (*multilayer*) dan reproduksi aseksual dengan cara pembentukan tunas secara enteroblastik (Fell *dkk.* 2001: 6 dan 13). Beberapa genus dari kelompok khamir *Basidiomycetes* juga dapat menghasilkan teliospora. Teliospora merupakan spora seksual kelompok khamir *Basidiomycetes* yang memiliki dinding tebal tempat berlangsungnya kariogami yang akan menghasilkan basidiospora (Alexopoulos *dkk.* 1996: 613; Yarrow 1998: 88).

Kelompok khamir yang belum diketahui fase reproduksi seksualnya disebut khamir anamorfik. Kelompok khamir anamorfik dapat diklasifikasikan ke dalam kelompok *Ascomycetes* anamorfik dan kelompok *Basidiomycetes* anamorfik. Kelompok khamir *Ascomycetes* anamorfik contohnya genus *Candida*. Kelompok khamir *Basidiomycetes* anamorfik contohnya *Rhodotorula* F.C. Harrison. Kelompok khamir yang telah diketahui fase reproduksi seksualnya disebut khamir teleomorfik. Kelompok khamir teleomorfik dapat diklasifikasikan ke dalam kelompok *Ascomycetes* teleomorfik dan kelompok *Basidiomycetes* teleomorfik. Kelompok khamir *Ascomycetes* teleomorfik contohnya genus *Debaryomyces* Lodder dan Kreger-van Rij *Nom. Cons.* dan *Pichia* E.C. Hansen *emend. Kurtzman*. Kelompok khamir *Basidiomycetes* teleomorfik contohnya *Filobasidium* Olive (Yarrow 1998: 84).

2.1.2.1 Phylum Ascomycota

a. Class Hemiascomycetes

Ciri-ciri khamir dari *class Hemiascomycetes* adalah memiliki askus yang tidak ditutupi oleh tubuh buah (askokarp), memiliki dua lapis dinding sel, dan bereproduksi aseksual dengan cara pembentukan tunas secara holoblastik atau pembentukan arthrokonidia (Hamamoto dan Nakase 2000: 60; Kurtzman dan Sugiyama 2001: 189). Contoh khamir *class Hemiascomycetes* anamorfik yaitu genus *Candida* dan *Trigonopsis* Schachner. Contoh khamir dari *class Hemiascomycetes* teleomorfik yaitu genus *Pichia* dan *Debaryomyces*. Genus *Pichia* memiliki ciri askospora berbentuk *hat-shaped*, *hemispheroidal*, atau *spheroidal* (Kurtzman 1998a:

273) dan genus *Debaryomyces* memiliki ciri askospora berbentuk *spheroidal*, *globose*, *ovoidal*, atau *lenticular* (Nakase dkk. 1998: 157).

a. *Class Euascomycetes*

Khamir dari *Class Euascomycetes* memiliki askus yang ditutupi oleh tubuh buah (askokarp). Khamir yang termasuk ke dalam *Class Euascomycetes* umumnya merupakan *yeast-like fungi* (Hamamoto dan Nakase 2001: 61). Contoh khamir *class Euascomycetes* anamorfik adalah genus *Aureobasidium*.

b. *Class Archiascomycetes*

Ciri-ciri khamir dari *Class Archiascomycetes* adalah memiliki askus yang tidak ditutupi oleh tubuh buah (askokarp), memiliki dua lapis dinding sel, dan bereproduksi aseksual dengan cara pembentukan tunas secara enteroblastik atau pembelahan sel (*fission*) (Hamamoto dan Nakase 2000: 62; Kurtzman dan Sugiyama 2001: 191). Contoh khamir *class Archiascomycetes* anamorfik adalah genus *Lalaria* R.T. Moore. Contoh khamir *class Archiascomycetes* teleomorfik adalah genus *Schizosaccharomyces* Lindner dan *Protomyces* Unger. Genus *Protomyces* memiliki ciri askospora berbentuk *ellipsoidal* dan genus *Schizosaccharomyces* memiliki ciri askospora berbentuk *spheroidal*, *ellipsoidal*, atau *reniform* (Kurtzman 1998c: 116 dan 117).

2.1.2.2 *Phylum Basidiomycota*

a. *Class Urediniomycetes*

Khamir dari *Class Urediniomycetes* secara morfologi dan ekologi merupakan kelompok yang beragam, dapat berperan sebagai saprofit dan parasit (Hamamoto dan Nakase 2000: 65). Contoh khamir *Class Urediniomycetes* anamorfik adalah genus *Cryptococcus* Vuillemin dan *Rhodotorula*. Contoh khamir *Class Urediniomycetes*

teleomorfik adalah genus *Filobasidium* dan *Rhodosporidium* Banno. Genus *Filobasidium* memiliki ciri basidiospora sesil pada basidium (Boekhout 1998: 628).

b. *Class Hymenomyces*

Khamir dari *Class Hymenomyces* memiliki septa tipe *dolipore* dan komposisi gula dari dinding selnya terdiri dari glukosa, mannososa, dan xylosa (Sjamsuridzal 2006: 85). Contoh khamir *Class Hymenomyces* anamorfik adalah genus *Bullera* Derx dan *Trichosporon* Behrend. Contoh khamir *Class Hymenomyces* teleomorfik adalah genus *Bulleromyces* Boekhout dan A. Fonseca.

c. *Class Ustilaginomyces*

Khamir dari *Class Ustilaginomyces* memiliki komposisi gula dari dinding sel yang didominasi oleh glukosa, galaktosa, dan mannososa (Sjamsuridzal 2006: 85--86). Contoh khamir *Class Ustilaginomyces* anamorfik adalah genus *Pseudozyma* Bandoni emend. Boekhout dan *Tilletiopsis* Derx ex Derx. Contoh khamir *Class Ustilaginomyces* teleomorfik adalah genus *Ustilago* (De Candolle) Corda.

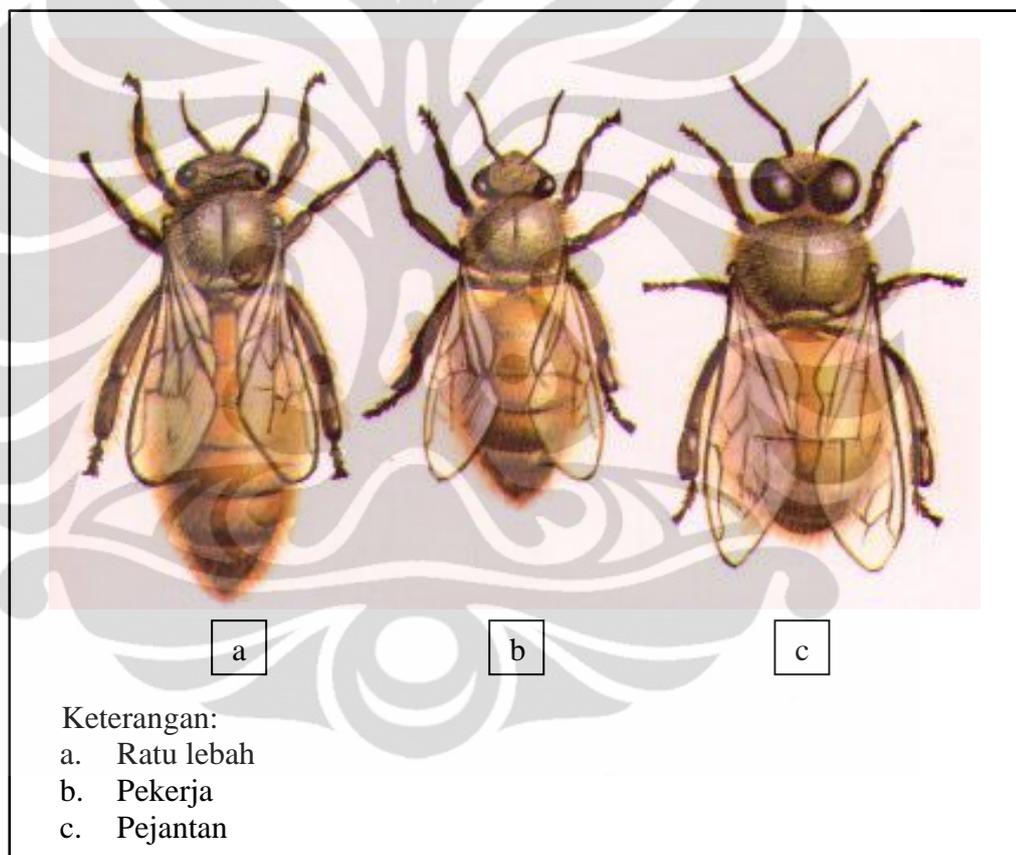
2.2 *Apis cerana* (Fabricius, 1793)

Dua spesies lebah madu yang paling banyak dibudidayakan di Indonesia adalah *Apis cerana* (*Eastern Honeybee/Asiatic Honeybee*) dan *A. mellifera* (*Western Honeybee*). *Apis cerana* merupakan lebah madu yang dikenal tersebar luas di kawasan Asia Tenggara (Oldroyd dan Wongsiri 2006: 33), termasuk di Indonesia (Basukriadi *dkk.* 2010: 44).

Keunggulan budidaya *A. cerana* dibandingkan dengan *A. mellifera* antara lain adalah biaya pemeliharaan yang murah sehingga cocok untuk peternak tradisional yang memiliki modal terbatas. Selain itu, *Apis mellifera* rentan terhadap hama tawon (*Varroa destructor* Anderson dan Trueman dan *Tropilaelaps clareae* T. Koenigerum) sedangkan *A. cerana* tahan terhadap hama tersebut sehingga budidaya

A. mellifera membutuhkan mitisida yang harganya cukup mahal (Oldroyd dan Wongsiri 2006: 229).

Apis cerana termasuk ke dalam *Class Insekta*, *Ordo Hymenoptera* dan Family *Apidae* (Tanaka dkk. 2001: 44). *Apis cerana* hidup dalam koloni yang terdiri atas tiga kasta yaitu ratu, pekerja dan pejantan (Michener 2007: 1). Ratu lebah berperan menghasilkan keturunan dengan cara bertelur dan merupakan induk dari suatu koloni. Lebah pejantan berperan mengawini ratu lebah. Lebah pekerja berperan membangun sisir madu (*honeycomb*), merawat larva, serta mengumpulkan serbuk sari dan madu bunga (NPCS Board of Consultants dan Engineers 2007: 29).



Gambar 2.2.1. Tiga kasta lebah madu *Apis mellifera*.

[Sumber: Canadian Honey Council 2011: 1.]

2.3 Khamir yang Berasosiasi dengan *Apis cerana*

Khamir merupakan mikroorganisme yang dapat ditemukan di berbagai habitat di alam. Khamir dapat ditemukan di tanah, udara, tumbuhan, permukaan

hewan, sampai dengan makanan berpengawet (Sandhu dan Waraich 1985: 51; Deak 2006: 155). Khamir juga berasosiasi dengan banyak spesies serangga, seperti *D. hansenii* dengan *Drosophila* sp. Fallen, *Aureobasidium pullulans* dengan *Andrena* sp. Fabr. (Zacchi dan Vaughan-Martini 2002: 241), *Metschnikowia chrysoperlae* Suh, Gibson *et* Blackwell dengan *lacewings* (Suh *dkk.* 2004: 1884) dan *Candida powellii* Lachance dengan *Trigona* sp. Jurine (Lachance *dkk.* 2001: 1202).

Asosiasi antara serangga dengan khamir dapat berupa ektosimbiosis, yaitu apabila khamir hidup pada permukaan eksoskeleton dari serangga dan dapat pula berupa endosimbiosis, yaitu apabila khamir hidup di dalam tubuh serangga (Zacchi dan Vaughan-Martini 2002: 237). Khamir-khamir yang ditemukan pada saluran pencernaan lebah dapat berperan menghasilkan asam amino (Zacchi dan Vaughan-Martini 2002: 240) dan vitamin esensial (Mankowski dan Morrel 2004: 226) yang dibutuhkan lebah.

Khamir dapat diisolasi dari saluran pencernaan dan permukaan tubuh lebah (Ganter 2006: 340--341). Khamir-khamir yang pernah ditemukan dari saluran pencernaan lebah antara lain *M. hawaiiensis* Lachance, Starmer dan Phaff, *M. pulcherrima* Pitt dan M.W. Mille, *M. reukaufii* Pitt dan M.W. Miller, *Torulopsis (Candida) apicola*, *Torulopsis (Candida) magnolia* (Lodder dan Kreger-van Rij) S.A. Meyer dan Yarrow (Spencer dan Spencer 1997a: 49). Menurut Sandhu dan Waraich (1985: 51), khamir yang sering ditemukan pada beberapa spesies lebah madu berbeda (*Apis cerana*, *A. dorsata* Fabr., *A. mellifera*, *A. florea* Fabr., *Halictus* sp. Latreille, dan *Xylocopa* sp. Linn.) adalah dari genus *Candida* dan *Dekkera*. Ganter (2006: 340) melaporkan bahwa sebagian besar merupakan khamir osmofilik dan atau osmotoleran yang berasal dari madu bunga (*nectar*).

Penelitian mengenai khamir-khamir yang berasosiasi dengan *A. cerana* masih sangat terbatas. Putra (2010: 41) menemukan khamir-khamir dari saluran pencernaan lebah pekerja PCB dan NCB dari *A. cerana* yang hidup liar di kawasan kampus UI Depok terdiri atas enam genus dan sembilan spesies, yaitu *Aureobasidium pullulans*, *Aureobasidium* sp., *Candida cellae*, *Candida cf. apicola*, *Candida cf. azyma*, *Dothioraceae* sp., *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia* sp., dan *Yarrowia lipolytica*. Basukriadi *dkk.* (2010: 45) melaporkan bahwa terdapat perbedaan spesies khamir yang diperoleh dari saluran pencernaan lebah madu

pekerja PCB dan NCB pada *A. cerana* liar (*wild*). Spesies khamir yang diperoleh dari PCB antara lain adalah, *Aureobasidium pullulans*, *Candida cf. apicola*, *Candida cf. azyma*, *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia sp.*, dan *Yarrowia lipolytica*. Spesies khamir yang diperoleh dari saluran pencernaan lebah madu pekerja NCB antara lain adalah, *Aureobasidium pullulans*, *Candida cellae* dan *Dothioraceae*.

3.4 Khamir-khamir yang Terdapat pada Serbuk Sari (*Pollen*) dan Madu Bunga (*Nectar*)

Serbuk sari, madu bunga dan air adalah sumber nutrisi bagi lebah madu. Madu bunga berperan sebagai sumber gula (energi) (Gilliam 1979: 43) dan juga merupakan bahan baku untuk pembuatan madu (Kathiresan dan Srinivasan 2005: 664). Serbuk sari merupakan sumber protein, lipid, vitamin serta mineral yang diperlukan oleh lebah madu (Gilliam 1979: 43). Selain merupakan nutrisi yang diperlukan oleh lebah madu, madu bunga juga merupakan habitat yang spesifik bagi khamir. Madu bunga merupakan habitat yang spesifik karena memiliki kadar gula yang tinggi. Khamir-khamir pada serbuk sari berperan penting pada proses fermentasi serbuk sari menjadi *bee bread* (Gilliam 1979: 43). Khamir-khamir yang dapat diisolasi dari saluran pencernaan lebah diketahui sebagai spesies yang berasal dari madu bunga (*nectar-inhabiting species*) (Spencer dan Spencer 1997a: 49) dan serbuk sari atau *bee bread* (Gilliam 1979: 43). Menurut Ganter (2006: 340) khamir-khamir yang dapat ditemukan pada madu bunga merupakan khamir-khamir osmofilik dan atau osmotoleran.

Rachmayanti (2010: 70) melakukan penelitian mengenai khamir yang berasosiasi dengan bunga *Jatropha integerrima* (Jacq.) yang dikunjungi lebah *A. cerana* yang hidup liar di kampus UI, Depok. Khamir-khamir yang ditemukan pada bunga jantan *Jatropha integerrima* di kampus Universitas Indonesia, Depok antara lain adalah *Cryptococcus heveanensis* (Groenewege) Baptist dan Kurtzman, *Cr. Rajasthanensis* P. Saluja et G. S. Prasad, *Pichia hubeiensis* *Pseudozyma sp.*, *Ustilago esculenta* Hennings, *U. sparsa* Underwood, dan *U. tragana* Zundel. Khamir-khamir yang ditemukan pada bunga betina *J. integerrima* antara lain adalah *Bullera sp.*, *Candida orthopsilosis* (Lodder dan Kreger-van Rij) Tavanti,

A. Davidson, Gow, M. Maiden dan Odds, *Candida* sp., *Cr. rajasthanensis*, *P. hubeiensis*, *Pseudozyma* sp., *Sporidiobolus ruineniae* Holzschu, Tredick dan Phaff dan *Ustilago esculanta*. Spencer dan Spencer (1997a: 49) melaporkan spesies-spesies khamir yang dapat ditemukan pada madu bunga (*nectar*) umumnya berasal dari *phylum Ascomycota* antara lain adalah *Candida pulcherrima* (Lindner) Windisch, *C. reukaufii* (Grüss) Diddens dan Lodder, *Metschnikowia hawaiiensis* Lachance, Starmer dan Phaff, dan *M. lunata* Golubev (Spencer dan Spencer 1997a: 49). Gilliam (1979: 47) melaporkan spesies-spesies yang dapat ditemukan pada serbuk sari terdiri atas *phylum Basidiomycota* dan *Ascomycota*, antara lain adalah *Candida guillermondii*, *C. parapsilosis* (Ashford) Langeron dan Talice, *Cryptococcus albidus* var. *albidus* (Saito) C.E. Skinner, *Cr. laurentii* (Kuff.) C.E. Skinner, dan *Rhodotorula rubra* (Demme) Lodder.

Menurut Basukriadi *dkk.* (2010: 47), spesies-spesies khamir yang ditemukan pada saluran pencernaan lebah madu pekerja PCB berbeda dengan yang ditemukan di NCB pada *Apis cerana* yang hidup liar (*wild*). Adanya perbedaan spesies-spesies khamir tersebut kemungkinan disebabkan oleh perbedaan makanan dan tugas dari PCB dan NCB *A. cerana* tersebut.

3.5 Identifikasi Khamir

Identifikasi adalah proses membandingkan organisme yang belum diketahui identitasnya dengan organisme yang telah diketahui identitasnya (Barnett *dkk.* 2000: 15). Identifikasi khamir dapat dilakukan secara konvensional dan molekuler. Identifikasi khamir secara konvensional yaitu berdasarkan karakter fenotipik. Karakter fenotipik tersebut terdiri atas karakter morfologi khamir (makroskopik dan mikroskopik), fase reproduksi seksual dan aseksual khamir serta karakter fisiologi biokimia (Barnett *dkk.* 2000: 16--17).

Menurut Barnett *dkk.* (2000: 17), karakter morfologi khamir secara mikroskopik yang diamati untuk identifikasi antara lain adalah ukuran dan bentuk sel serta tipe reproduksi aseksual (*budding*, *fission*, blastokonidia, balistokonidia, sterigmatokonidia, atau membentuk *hyphae*). Karakter morfologi khamir secara

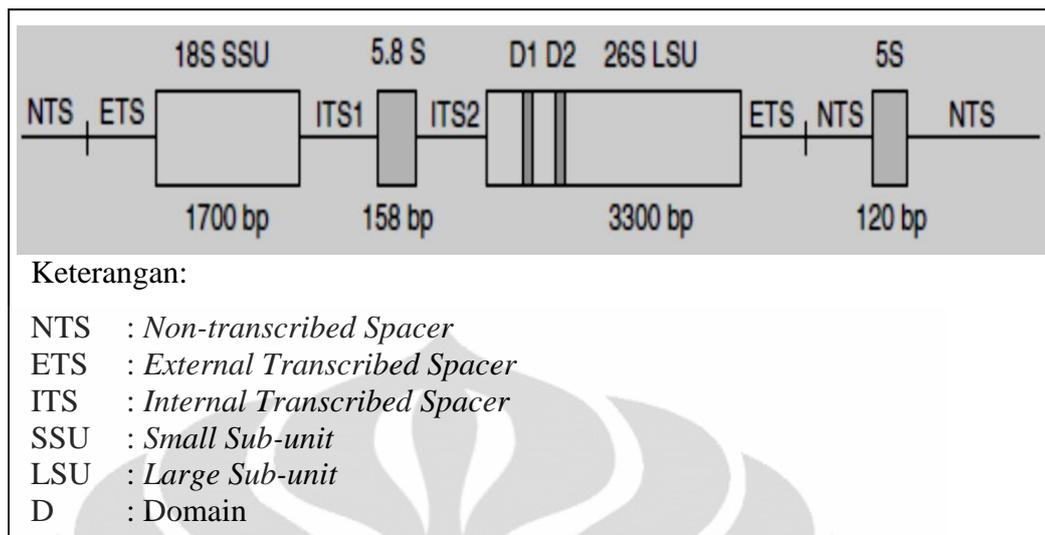
makroskopik yang diamati adalah warna koloni, profil koloni, tekstur koloni, tepi koloni dan permukaan koloni khamir.

Karakter fisiologi biokimia yang diamati untuk identifikasi khamir antara lain, kemampuan memfermentasi gula tertentu, kemampuan asimilasi unsur karbon dan nitrogen, kemampuan tumbuh tanpa keberadaan vitamin tertentu, kemampuan tumbuh pada substrat yang memiliki kandungan gula atau garam yang tinggi, kemampuan tumbuh pada suhu 37°C, serta kemampuan tumbuh dengan keberadaan *cycloheximide* (*actidione*) (Barnett *dkk.* 2000: 18).

Penggunaan karakter fenotipik khamir sebagai dasar identifikasi memiliki beberapa kekurangan (Daniel dan Meyer 2003: 61) dan seringkali tidak dapat digunakan untuk membedakan spesies-spesies khamir (Geiser 2004: 89). Khamir umumnya memiliki morfologi yang sederhana dengan bentuk yang mirip antarspesies (Daniel dan Meyer 2003: 61). Identifikasi khamir secara konvensional memakan waktu yang lebih lama, kerja yang cukup intensif dan biasanya membutuhkan interpretasi yang subjektif (Montero *dkk.* 2008: 821).

Identifikasi khamir saat ini dilakukan secara molekuler dengan menggunakan data *sequence* gen (Kurtzman dan Fell 2006: 11). Berdasarkan Montero *dkk.* (2008: 822), identifikasi secara molekuler memiliki keuntungan yaitu lebih akurat dan prosesnya lebih cepat. Menurut Kurtzman *dkk.* (2003: 88), kelompok gen yang umumnya digunakan untuk mengidentifikasi khamir dengan cepat dan akurat adalah gen-gen yang terdapat pada ribosomal DNA (rDNA). Keuntungan penggunaan gen pengkode rDNA antara lain adalah terdapat pada semua makhluk hidup, berasal dari nenek moyang yang sama dan mudah disequense karena menggunakan primer yang bersifat universal (dapat digunakan pada semua makhluk hidup) (Kurtzman dan Fell 2006: 13--14).

Gen pengkode rDNA terdiri atas daerah *coding* dan *non-coding*. Daerah *coding* rDNA terdiri atas *small sub-unit* (SSU rDNA 18S), gen 5.8S, gen 5S dan *large sub-unit* (LSU rDNA 28S). Daerah *non-coding* terdiri atas *internal transcribed spacer* (ITS1 dan ITS2) dan *intergenic spacer* (IGS) (Gambar 3.1) (James dan Stratford 2003: 182--183).



Gambar 3.5.1. Daerah ribosomal DNA

[Sumber: Deak 2008: 15]

Menurut Guarro *dkk.* (1999: 459), gen 5.8S hanya dapat digunakan untuk identifikasi pada tingkat *Phylum* dan *Class*. Gen LSU rDNA 28S memiliki variasi nukleotida yang lebih tinggi daripada gen SSU rDNA 18S dan 5.8S, sehingga gen tersebut dapat digunakan untuk identifikasi sampai tingkat genus dan spesies (Guarro *dkk.* 1999: 459--450). Daerah ITS rDNA yang merupakan daerah *non-coding* memiliki laju mutasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan daerah *coding* (SSU, 5,8S dan LSU) (James dan Stratford 2003: 189), sehingga memiliki variasi urutan nukleotida yang tinggi antarspesies (Ciardo *dkk.* 2006: 77). Menurut James dan Stratford (2003: 189), daerah ITS rDNA bahkan dapat digunakan untuk identifikasi spesies khamir yang berkerabat sangat dekat (*closely related species*).

3.6 Analisis Sequence Daerah ITS Khamir

Analisis *sequence* daerah ITS terdiri atas beberapa tahapan. Tahapan-tahapan tersebut adalah isolasi DNA genom, *polymerase chain reaction* (PCR), elektroforesis, purifikasi produk PCR, *cycle sequencing*, purifikasi produk *cycle sequencing* dan *sequencing* (Sjamsuridzal 2008: 32). Menurut Starr dan Taggart (2004: 58) *sequencing* adalah pembacaan urutan basa nukleotida DNA, dengan menggunakan metode Sanger *dideoxy-chain termination* (Sambrook dan Russel

2001: 12.51). DNA cetakan diamplifikasi menggunakan DNA oligonukleotida (sebagai primer), DNA polimerase, deoksinukleotida (dNTP) dan dideoksinukleotida (ddNTP). Setiap dideoksinukleotida diberi pewarna berfluoresensi yang bertindak sebagai label. Setiap fragmen DNA yang disintesis melekat pada ujung 3' dan hanya mengandung satu dideoksinukleotida. Fragmen-fragmen tersebut kemudian dipisahkan berdasarkan ukurannya melalui kapiler dan detektor laser akan membaca label yang berfluoresen dari setiap fragmen (Moat *dkk.* 2002: 172).

Hasil *sequence* yang diperoleh lalu diubah ke dalam format FASTA untuk proses selanjutnya. Urutan nukleotida dalam format FASTA merupakan input untuk *alignment* menggunakan program ClustalX 1.83. *Sequence* daerah ITS untuk semua spesies khamir yang sudah diketahui tersedia pada *database* DNA internasional Genbank pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Data *sequence* daerah ITS yang diperoleh dari suatu isolat khamir dapat dikirim melalui program pencarian homologi *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> sehingga diketahui tingkat homologinya terhadap spesies terdekat yang ada di *database* DNA Genbank. Menurut Sugita *dkk.* (1999: 90), suatu hasil *sequence* DNA khamir dianggap sebagai spesies yang sama apabila memiliki homologi $\geq 99\%$.

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi FMIPA-UI dan Laboratorium *Center of Excellence Indigenous Biological Resources Genome Studies* FMIPA-UI, Depok selama enam bulan (November 2010--April 2011).

3.2 Peralatan

Alat-alat yang digunakan adalah autoklaf [Hirayama HA 240 MIV], autoklaf [Hirayama HL 36 AE], kompor listrik [Sanyo], kompor listrik [Maspion], lemari pendingin [Sharp], mikropipet [Gilson], oven [Blue M], oven [Heraeus], pemanas air [Kenwood], sentrifugator Biofuge Primo [Heraeus], timbangan digital [And EW-300G], vorteks [Thermolyne tipe Maxi Mix II], mikropipet (P10, P20, P100, P1000) [Gilson], *spectrophotometer* [Thermo Scientific: Nanodrop 1000], *gel documentation* [BioRad], Mikroskop+Kamera [PrimoStar Zeiss+Infinity 2], Automated DNA Sequencer [ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer], PCR [BioRad: MyCycler™ .Thermal Cycler], *vacuum concentrator* [TOMY: MicroVac™ MV-100], *water ultrapurifier* [Thermo Scientific: Barnstead Easypure II], *electrophoresis* [Optima®: Mupid®-2plus], mesin sentrifugasi [Thermo Scientific.Sorvall: Legend micro 17], *mini centrifuge* [BioRad], vorteks [BioRad: BR-2000], kamera foto [Canon PowerShot A470] . Peralatan habis pakai yang digunakan adalah *aluminium foil*, kapas, tabung [Eppendorf], tip [Axygen], sarung tangan [Sensi gloves], *wrapping plastic* [Klin Pak], dan tisu. Peralatan gelas yang digunakan adalah batang pengaduk, *beaker glass*, cawan petri, gelas ukur, labu Erlenmeyer, tabung reaksi, dan peralatan gelas umum lainnya yang digunakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Genetika.

3.3 Bahan

3.3.1 Khamir

Isolat-isolat khamir yang digunakan berasal dari saluran pencernaan PCB dan NCB lebah madu *Apis cerana* yang telah diisolasi pada penelitian sebelumnya oleh Basukriadi *dkk.* pada tahun 2009. Lokasi pengambilan sampel lebah yaitu di peternakan lebah (Apiari) Desa Ciburial, Kabupaten Bandung, Jawa Barat. Jumlah isolat yang digunakan adalah sebanyak 48 isolat yang terdiri atas 27 isolat dari PCB dan 21 isolat dari NCB.

3.3.2 Medium

Medium yang digunakan untuk pemeliharaan khamir sebagai *stock culture* dan *working culture* adalah *potato dextrose agar* (PDA). Medium yang digunakan untuk pertumbuhan, pemurnian, pengamatan makroskopik dan pemeliharaan adalah *yeast extract-malt extract agar* (YMA), *yeast extract-malt broth* (YMB) dan *yeast extract agar + 50% glucose* (YESA 50 %).

3.3.3 Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia dari Difco yang digunakan adalah ekstrak khamir (*yeast extract*), ekstrak malt (*malt extract*), pepton, agar (*bacto agar*), dan PDA yang berasal dari Difco. Bahan-bahan kimia dari Promega yang digunakan adalah Et-Br, *buffer* TAE, *nuclease-free water*, DNA ladder 100 bp atau DNA marker 1 kb, *loading dye*, gel agarosa. Bahan kimia lainnya adalah tetrasiklin [Phaphros], sodium asetat (pH 5,5), ETOH 100%, ETOH 70%, Pure *Taq* Ready To-Go PCR beads [GE Healthcare], primer ITS5 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') dan ITS4 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') [Sigma Genosys], Big Dye Terminator Ready Reaction Mix V.3.1 [Applied Biosystem], alkohol teknis, spiritus teknis, dan aseton teknis.

3.4 Cara Kerja

Skema kerja dapat dilihat pada lampiran 1.

3.4.1 Pembuatan Medium

3.4.1.1 *Potato Dextrose Agar (PDA)*

Medium PDA dibuat mengikuti petunjuk kemasan [Difco]. Sebanyak 39 g bubuk PDA dilarutkan dengan akuades hingga volume akhir mencapai 1.000 ml. Campuran bubuk PDA dan akuades ditambahkan dengan antibiotik tetrasiklin 500 mgL^{-1} lalu dipanaskan sambil diaduk hingga homogen dan mendidih. Medium yang telah homogen dan mendidih dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 5 ml. Tabung reaksi yang berisi medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Tabung reaksi yang berisi medium steril diletakkan pada tempat miring dan dibiarkan hingga mengeras pada suhu ruang.

3.4.1.2 *Yeast extract-Malt extract Agar (YMA)*

Medium YMA dibuat mengikuti Yarrow (1998: 79). Sebanyak 3 g ekstrak khamir, 3 g ekstrak *malt*, 5 g pepton, 10 g glukosa, dan 20 g agar dilarutkan ke dalam akuades hingga volume akhir mencapai 1.000 ml. Campuran tersebut dipanaskan sambil diaduk hingga homogen dan mendidih. Medium yang telah homogen dan mendidih lalu disterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Medium YMA yang sudah steril ditambah antibiotik tetrasiklin sebanyak 500 mgL^{-1} pada saat suhu medium mencapai $40\text{--}50^\circ\text{C}$. Medium yang berisi tetrasiklin digoyang perlahan hingga tetrasiklin larut. Medium tersebut kemudian dituang ke beberapa cawan petri steril sebanyak 15--20 ml per petri dan dibiarkan hingga mengeras.

3.4.1.3 *Yeast extract-Malt Broth* (YMB)

Pembuatan medium YMB berdasarkan (Yarrow 1998: 79). Sebanyak 3 g ekstrak khamir, 3 g ekstrak *malt*, 5 g pepton, 10 g glukosa dan *chloramphenicol* sebanyak 100 mgL^{-1} dilarutkan ke dalam akuades hingga volume akhir mencapai 1.000 ml. Campuran tersebut dipanaskan sambil diaduk hingga homogen dan mendidih.

Medium YMB yang telah homogen dan mendidih dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 5 ml. Tabung reaksi yang berisi medium disterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

3.4.1.4 *Yeast Extract Agar + Sucrose 50%* (YESA 50%)

Medium YESA 50% dibuat dengan cara melarutkan 10 g ekstrak khamir dan 20 g agar dalam beberapa mililiter akuades sambil dipanaskan. Larutan tersebut kemudian ditambahkan 500 g sukrosa sedikit demi sedikit, dan *chloramphenicol* 100 mgL^{-1} . Medium tersebut kemudian ditambahkan akuades hingga volume akhir mencapai 1.000 ml. Medium yang telah homogen disterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

3.4.2 Pemurnian Isolat Khamir dan Pembuatan *Stock* dan *Working Culture*

Sebanyak $10 \mu\text{L}$ suspensi khamir dalam larutan gliserol 10% + trehalosa 5% digores pada medium YMA steril yang telah ditambahkan tetrasiklin di dalam cawan petri. Goresan dibuat dalam empat arah kuadran (Cappuccino dan Sherman 2002: 13--14). Medium yang telah digores, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam atau lebih hingga diperoleh koloni tunggal representatif. Pemurnian isolat khamir dilakukan minimal dua kali. Satu ose koloni tunggal representatif kemudian dipindahkan ke dalam dua tabung PDA miring steril. Medium yang telah digores kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam (Cappuccino dan Sherman 2002: 8). Berdasarkan Yarrow (1998: 78), biakan yang telah tumbuh kemudian

disimpan di dalam lemari pendingin pada suhu 4--12° C selama 6--8 bulan sebagai *stock culture* dan *working culture*. Biakan juga disimpan pada medium gliserol 10% + trehalosa 5% dan disimpan di dalam *freezer*.

3.4.3 Pengamatan Morfologi Secara Mikroskopik

Pengamatan morfologi secara mikroskopik dilakukan berdasarkan Yarrow (1998: 81). Ciri-ciri yang diamati adalah ukuran sel vegetatif, bentuk sel vegetatif, tipe pertunasan (*budding*), ada tidaknya miselium palsu atau miselium sejati dan ada tidaknya spora seksual khamir (askospora dan basidiospora/teliospora). Pengamatan dilakukan pada biakan yang berumur 72 jam pada medium YMB pada suhu ruang (20--25° C).

3.4.4 Pengamatan Morfologi Koloni

Pengamatan morfologi koloni dilakukan berdasarkan Yarrow (1998: 81--82) dengan ciri-ciri yang diamati yaitu warna, tekstur, dan permukaan koloni. Pengamatan dilakukan pada biakan berumur 72 jam atau lebih yang ditumbuhkan dalam medium YMA atau YESA 50% pada suhu ruang (20--25° C).

3.4.5 Isolasi DNA Genom dari Isolat Khamir

Isolasi DNA genom mengikuti metode yang dilakukan oleh Sjamsuridzal dan Oetari (2003: 122). Isolasi dilakukan terhadap biakan khamir yang berumur 48 jam atau seminggu jika biakan khamir termasuk yang *slow grower*. Langkah pertama yang dilakukan adalah mengambil sedikit biakan khamir dari cawan petri dengan menggunakan *tip* mikropipet atau tusuk gigi steril. Biakan khamir pada *tip* mikropipet tersebut kemudian disuspensikan ke dalam tabung *Eppendorf* (ukuran 1,5 ml) yang berisi 250 µl air milliQ. Suspensi biakan khamir tersebut kemudian dihomogenisasi menggunakan vorteks selama 1 menit. Penutup tabung *Eppendorf* yang berisi suspensi tersebut kemudian dilapisi dengan parafilm dan dipasang *lid lock*.

Tabung tersebut kemudian direbus dalam *beaker glass* berisi air selama 20 menit pada suhu 100°C. Setelah 20 menit, tabung diangkat lalu parafilm dan *lid lock* dilepas dan tabung tersebut disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 15 menit. Supernatan hasil sentrifugasi siap digunakan dalam reaksi PCR sebagai DNA cetakan.

3.4.6 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Pengerjaan reaksi PCR dilakukan menggunakan PuReTaq™ Ready-To-Go (RTG) PCR *beads* [GE Healthcare]. RTG *beads* ditambahkan dengan 15 µl *nuclease-free water* lalu disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 15 menit. RTG *beads* yang telah disentrifugasi kemudian ditambahkan dengan 0,5 µl primer ITS5 (10 pmol/µl), 0,5 µl primer ITS4 (10 pmol/µl), dan 9 µl DNA cetakan, sehingga volume akhir mencapai 25 µl.

Proses PCR diawali dengan denaturasi pada suhu 95° C selama 2 menit, kemudian dilanjutkan dengan 40 siklus yang meliputi denaturasi pada 95° C selama 15 detik; *annealing* pada 58° C selama 30 detik; dan ekstensi pada 68° C selama 1 menit. Proses ekstensi akhir berlangsung pada suhu 68° C selama 10 menit 40 detik. Produk PCR kemudian disimpan di dalam lemari es pada suhu 5--10° C.

3.4.7 Elektroforesis Gel Agarosa

Pembuatan gel agarosa berdasarkan Sambrook dan Russel (2001: 5.10--5.13). Produk PCR sebanyak 5 µl ditambahkan dengan 1 µl *loading dye* lalu dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 2%. Gel agarosa dalam keadaan terendam buffer TAE 1x (Tris Acetate EDTA) pH 8,3. Arus listrik 100 V selanjutnya dialirkan menuju katoda selama 25 menit. Gel kemudian direndam dalam larutan EtBr 1% (b/v) selama 20 menit. Gel kemudian dimasukkan ke dalam transluminator pada alat *gel documentation*. Sinar UV dari *gel documentation* akan memendarkan senyawa EtBr yang menyisip pada DNA produk PCR dan memperlihatkan pola pita berukuran tertentu. Produk PCR dapat diketahui ukuran fragmennya dengan cara dibandingkan dengan pita DNA *ladder* 100 pb atau 1 kb.

3.4.8 Pemurnian Produk PCR

Tahap awal dari pemurnian produk PCR adalah dengan memindahkan produk PCR ke dalam tabung Eppendorf baru yang steril (berukuran 1,5 ml). Selanjutnya produk tersebut ditambahkan dengan 2 µl sodium asetat 3 M dengan pH 5,5. Produk PCR kemudian ditambahkan 50 µl ETOH 100% (persediaan dari *freezer*), dan diaduk perlahan. Produk PCR disimpan pada suhu -20° C selama 20 menit atau di dalam *freezer* selama 30 menit. Setelah 30 menit, produk PCR kemudian disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk kemudian dibuang secara hati-hati dengan menggunakan mikropipet. Pelet yang tersisa ditambahkan 70 µl ETOH 70% (persediaan dari *freezer*), lalu diaduk perlahan. Campuran tersebut kemudian disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk kemudian dibuang secara hati-hati dengan menggunakan mikropipet. Pelet yang ada kemudian dikeringkan menggunakan *vacuum concentrator* selama 30 menit. Setelah 30 menit, tabung *Eppendorf* tersebut lalu ditambahkan 15 µl *nuclease-free water* (NFW).

3.4.9 Pengukuran Kuantitas dan Kualitas Produk PCR

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

Sampel produk PCR sebanyak 1,5 µl diteteskan pada tempat peneteskan kemudian diukur. Pengukuran konsentrasi DNA dilakukan secara otomatis menggunakan *software* dari spektrofotometer Thermo Scientific Nanodrop 1000 dan hasilnya ditampilkan pada monitor di komputer. Pengukuran kemurnian produk PCR dilakukan juga secara otomatis dan merupakan perbandingan antara konsentrasi

DNA dan protein. Pengukuran tersebut dilakukan pada setiap sampel produk PCR lainnya.

3.4.10 PCR *cycle-sequencing*

Proses PCR *cycle-sequencing* dilakukan dengan cara menambahkan 1 μl Big Dye Terminator Ready Reaction Mix V.3.1 [Applied Biosystem], 0,5 μl primer ITS5 (10 pmol/ μl) atau ITS4 (10 pmol/ μl), 3 μl DNA cetakan hasil pemurnian produk PCR (dengan konsentrasi ≥ 60 ng per μl), 5 μl sequencing *buffer* dan 0,5 μl NFW sehingga volume akhir mencapai 10 μl .

Proses PCR *cycle-sequencing* diawali dengan denaturasi sampel pada suhu 96° C selama satu menit, dilanjutkan dengan 30 siklus yang meliputi denaturasi pada 96° C selama 10 detik; *annealing* pada 50° C selama 5 detik; dan diakhiri dengan ekstensi pada 60° C selama 30 detik. Setelah tahapan *cycle-sequencing* selesai, produk *cycle-sequencing* disimpan pada suhu 25° C dan kemudian disimpan di dalam *freezer*.

3.4.11 Pemurnian Produk PCR *cycle-sequencing*

Pemurnian produk *cycle-sequencing* diawali dengan memindahkan produk PCR *cycle-sequencing* ke dalam tabung *Eppendorf* (ukuran 1,5 ml) steril yang baru. Produk tersebut lalu ditambahkan dengan 10 μl NFW, 2 μl EDTA 125 mM, 50 μl ETOH 100% (persediaan dari *freezer*), lalu diaduk secara perlahan. Tabung tersebut kemudian disimpan pada suhu ruang selama 15 menit. Tabung lalu disentrifugasi pada 5000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang dengan mikropipet secara hati-hati. ETOH 70% sebanyak 70 μl ditambahkan ke dalam tabung berisi supernatan tersebut, lalu diaduk perlahan. Tabung disentrifugasi kembali pada 5000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang dengan mikropipet secara hati-hati. Sampel tersebut kemudian dikeringkan menggunakan *vacuum concentrator* selama 30 menit.

3.4.12 Denaturasi Produk PCR *cycle-sequencing*

Produk pemurnian PCR *cycle-sequencing* ditambahkan 15 µl Hi-Di Formamide lalu diaduk menggunakan mikropipet. Sampel tersebut kemudian dilakukan *spindown* menggunakan mesin sentrifugasi. Sampel dipindahkan ke dalam tabung PCR (ukuran 0,2 ml) steril yang baru. Sampel lalu didenaturasi pada suhu 95° C selama 5 menit menggunakan mesin PCR. Setelah 5 menit, tabung PCR tersebut lalu dipindahkan ke dalam es secepat mungkin. Sampel kemudian disimpan dalam *freezer* maksimum 3 hari sampai saat digunakan.

3.4.13 Sequencing Menggunakan ABI 310 Automated Sequencer

Sampel yang telah didenaturasi lalu dipindahkan sebanyak 13 µl ke dalam tabung *sequencing* berukuran 0,5 ml. Tabung kemudian ditutup dengan septa dan diberi label. Tabung tersebut lalu dimuat pada *sample tray* dalam ABI 310 Automated DNA Sequencer. Mesin *sequencer* tersebut lalu dioperasikan berdasarkan petunjuk dalam buku manual ABI 310 Automated DNA Sequencer.

3.4.14 Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh disusun dalam bentuk tabel dan gambar. Analisis data dilakukan secara deskriptif. Analisis data secara deskriptif meliputi data pengamatan makroskopik dan mikroskopik, daftar isolat khamir pada lebah madu, analisis hasil *sequence* dan data komposisi spesies khamir pada PCB dan NCB.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

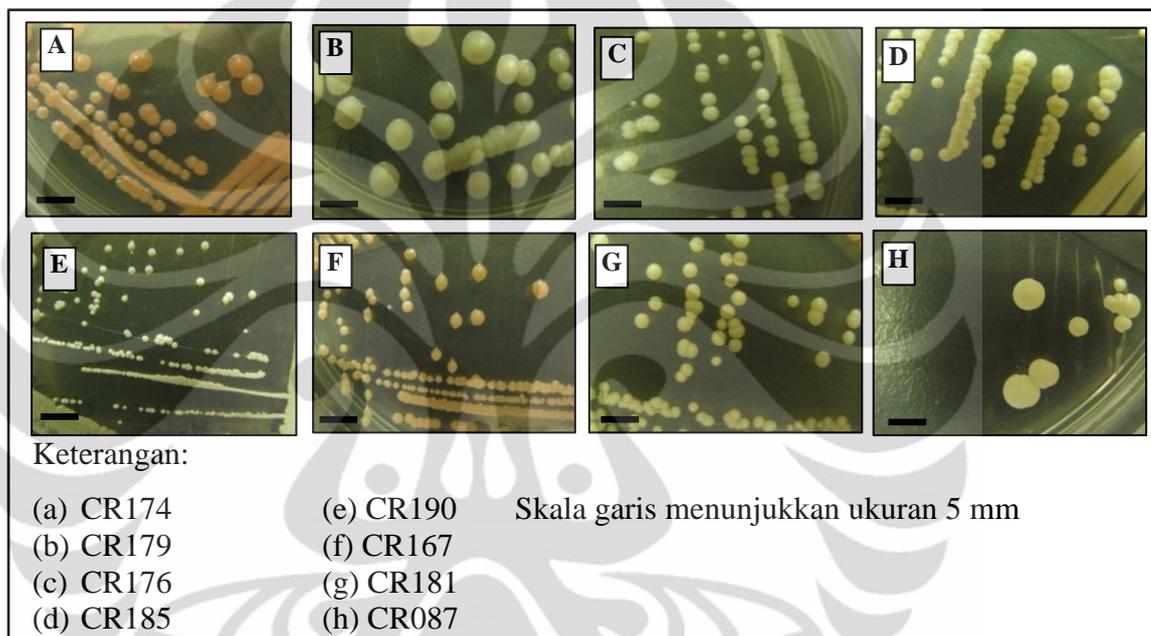
4.1 Isolasi DNA dan Amplifikasi Daerah ITS rDNA

Isolasi DNA telah berhasil dilakukan terhadap 48 isolat khamir yang berasal dari saluran pencernaan PCB dan NCB. Isolasi DNA khamir dilakukan pada saat pertumbuhan khamir diperkirakan mencapai akhir fase log, pada penelitian ini digunakan biakan berumur tujuh hari. Menurut Black (1999: 139), fase log merupakan fase pertumbuhan populasi mikroorganisme secara eksponensial. Oleh karena itu, puncak pertumbuhan populasi terjadi pada akhir fase log. Kandungan DNA mikroorganisme tertinggi terdapat pada fase log karena berbanding lurus dengan jumlah penambahan sel mikroorganisme.

Warna koloni dari isolat-isolat yang digunakan pada penelitian ini bervariasi, yaitu putih, krem dan jingga (Gambar 4.1.1). Hal tersebut menunjukkan bahwa kemungkinan khamir-khamir dari saluran pencernaan *A. cerana* yang hidup di Apiari Desa Ciburial termasuk ke dalam kelompok khamir *Ascomycetes* dan *Basidiomycetes*. Menurut Fell dkk. (1998: 267), kelompok khamir *Basidiomycetes* umumnya berpigmen seperti merah muda, jingga, dan merah, sedangkan kelompok khamir *Ascomycetes* umumnya tidak berpigmen (putih atau krem).

Isolat-isolat yang berasal dari PCB dan NCB pada penelitian ini umumnya merupakan khamir yang tumbuh lambat (*slow grower*) dibandingkan dengan spesies-spesies khamir pada umumnya yang dapat tumbuh dalam waktu tiga hari. Oleh karena itu, isolasi DNA dilakukan setelah biakan khamir berumur satu minggu. Pertumbuhan khamir yang lambat diduga disebabkan karena perbedaan kandungan nutrisi yang terdapat pada saluran pencernaan lebah madu *Apis cerana* dengan medium buatan yang digunakan pada penelitian. Kandungan nutrisi yang terdapat pada saluran pencernaan pencernaan *A. cerana* diduga sangat spesifik, seperti asam amino yang berasal dari serbuk sari, sehingga sulit untuk mendapatkan komposisi medium buatan yang cocok untuk pertumbuhan khamir yang berasal dari saluran pencernaan lebah madu tersebut. Putra (2010: 38) menyatakan bahwa isolat-isolat

khamir yang berasal dari PCB dan NCB *Apis cerana* di Kampus UI Depok tumbuh lambat dibandingkan dengan spesies-spesies khamir pada umumnya. Menurut Ganter (2006: 340), khamir-khamir yang berasal dari saluran pencernaan lebah madu merupakan khamir-khamir yang bersifat osmotoleran. Menurut Demain *dkk.* (1998: 19), khamir yang berasal dari substrat yang memiliki kandungan gula tinggi umumnya tumbuh lambat (*slow grower*). Daftar isolat-isolat khamir yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 4.2.1.1 dan 4.2.2.1.



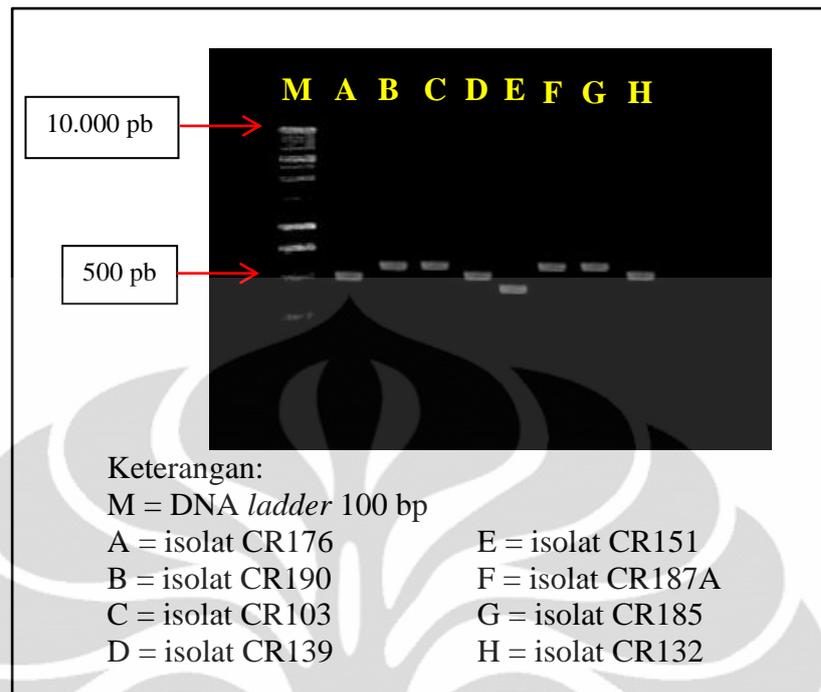
Gambar 4.1.1. Isolat-isolat khamir dari saluran pencernaan *Apis cerana* pada medium YMA atau YESA 50% berumur satu minggu

Isolasi DNA khamir dilakukan dengan metode *boiling* berdasarkan Sjamsuridzal dan Oetari (2003: 122). Akan tetapi, isolasi DNA isolat-isolat khamir pada penelitian ini membutuhkan waktu yang bervariasi antara 5--15 menit. Perbedaan waktu perebusan kemungkinan disebabkan karena variasi ketebalan dinding sel yang berbeda-beda dari isolat-isolat khamir. Isolat-isolat khamir yang digunakan pada penelitian ini diduga termasuk ke dalam kelompok khamir *Ascomycetes* dan *Basidiomycetes*. Menurut Sjamsuridzal dan Oetari (2003: 124), ketebalan dinding sel merupakan salah satu faktor yang memengaruhi keberhasilan isolasi DNA khamir. Menurut Moore (1998: 33), khamir memiliki ketebalan dinding

sel berbeda-beda, dinding sel kelompok khamir *Ascomycetes* terdiri atas dua lapis, sedangkan kelompok khamir *Basidiomycetes* terdiri atas banyak lapis (*multilayer*). Selain ketebalan dinding sel yang berbeda-beda, kepadatan sel pada suspensi kemungkinan juga dapat memengaruhi keberhasilan isolasi DNA.

Keberhasilan mengisolasi DNA sebagai cetakan (*template*) untuk reaksi PCR ditunjukkan oleh hasil elektroforesis dari produk PCR daerah ITS rDNA. Hasil elektroforesis menunjukkan adanya pita tunggal yang tebal untuk semua sampel khamir (Gambar 4.1.2). Hal tersebut menunjukkan bahwa daerah ITS rDNA dari seluruh isolat berhasil diamplifikasi menggunakan primer ITS4 dan ITS5 dengan kondisi PCR yang tepat dan konsentrasi *template* DNA yang cukup. Menurut Abliz *dkk.* (2004: 404), primer ITS4 dan ITS5 merupakan primer universal untuk fungi yang dapat digunakan untuk mengamplifikasi seluruh daerah ITS rDNA pada fungi. Berdasarkan Sambrook dan Russell (2001: 8.6), konsentrasi *template* DNA dari khamir yang dibutuhkan dalam reaksi PCR minimal sebesar 10 ng. Ahmed (2006: 113) melaporkan bahwa selain penggunaan primer yang tepat dan konsentrasi *template* yang cukup, kondisi PCR juga sangat memengaruhi keberhasilan amplifikasi DNA.

Hasil gel elektroforesis produk PCR (Gambar 4.1.2) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan ukuran daerah ITS rDNA dari isolat-isolat khamir. Ukuran pita produk PCR dari daerah ITS rDNA semua isolat berkisar 350--600 pb. Hal tersebut menunjukkan bahwa kemungkinan isolat-isolat khamir yang digunakan pada penelitian ini terdiri atas spesies-spesies yang berbeda. Menurut Katsu *dkk.* (2003: 9), daerah ITS rDNA khamir sangat bervariasi antarspesies dengan ukuran 300--900 pb.



Gambar 4.1.2. Hasil elektroforesis produk PCR daerah ITS rDNA beberapa isolat khamir dari saluran pencernaan *Apis cerana*

Hasil pengukuran kualitas dan kuantitas DNA dari produk PCR yang telah dipurifikasi dengan metode presipitasi ethanol menggunakan UV vis spektrofotometer [Nanodrop 1000] menunjukkan bahwa konsentrasi DNA yang telah dipurifikasi berkisar 158--280 ng/ μ l dengan tingkat kemurnian DNA berkisar 1,67--1,90 (Tabel 4.1.1). Hal tersebut menunjukkan bahwa berdasarkan nilai konsentrasi DNA yang diperoleh, sebagian besar dinilai cukup tinggi untuk digunakan sebagai *template* DNA pada reaksi PCR *cycle-sequencing* dengan tingkat kemurnian yang baik. Menurut Rosilawati *dkk.* (2002: 9), sampel DNA dinyatakan murni apabila nilai rasio absorbansi (260/280 nm) berkisar 1,80--1,90. Applied Biosystems (2001: 6-36) menyatakan bahwa konsentrasi *template* DNA yang cukup untuk *sequencing* adalah 50 ng--100 ng.

Hasil pengukuran kualitas DNA pada isolat CR174, CR160, dan CR179 menunjukkan nilai absorbansi <1,80. Hal tersebut menunjukkan bahwa DNA yang didapat tidak murni. Menurut Rosilawati *dkk.* (2002: 11), kontaminasi pada DNA dapat berupa protein, fenol, SDS ataupun polisakarida.

Tabel 4.1.1. Hasil pengukuran kualitas dan kuantitas DNA isolat-isolat khamir dari saluran pencernaan *A. cerana*

No	Kode Isolat	Konsentrasi DNA (ng/μl)	Rasio (Absorbansi _{260/280})
1	CR120	269,72	1,83
2	CR132	245,81	1,85
3	CR139	266,69	1,90
4	CR151	192,36	1,82
5	CR160	188,2	1,82
6	CR167	224,24	1,79
7	CR170	242,93	1,68
8	CR174	158,09	1,67
9	CR179	212,2	1,78
10	CR187A	229,5	1,83

4.2 Identifikasi Isolat-isolat Khamir dari Saluran Pencernaan *A. cerana*

Identifikasi 48 isolat khamir telah dilakukan berdasarkan data *sequence* daerah ITS rDNA. Berdasarkan hasil pencarian homologi daerah ITS rDNA melalui program BLAST diketahui bahwa 48 isolat khamir yang berasal dari saluran pencernaan *Apis cerana* di Apiari Desa Ciburial secara taksonomi termasuk ke dalam *Class Hemiascomycetes* dari *Phylum Ascomycota* dan *Class Urediniomycetes* dari *Phylum Basidiomycota* (Tabel 4.2.1). Spesies khamir yang termasuk ke dalam kelompok khamir *Ascomycetes* anamorfik yaitu dari genus *Candida*. Spesies-spesies khamir yang termasuk ke dalam kelompok khamir *Ascomycetes* teleomorfik yaitu dari genus *Debaryomyces*, *Kodamaea*, *Pichia*, *Wickerhamomyces*, dan *Zygosaccharomyces*. Spesies-spesies khamir yang termasuk ke dalam kelompok khamir *Basidiomycetes* anamorfik yaitu *Cryptococcus* dan *Rhodotorula*.

Tabel 4.2.1. Spesies-spesies khamir yang diperoleh dari saluran pencernaan *A. cerana* di Apiari Desa Ciburial, Kabupaten Bandung

No	Nama Spesies	Phylum	Jumlah Isolat	
			PCB	NCB
1	<i>Candida cf. apicola</i>	<i>Ascomycota</i>	3	4
2	<i>C. cf. azyma</i>	<i>Ascomycota</i>	-	1
3	<i>C. etchellsii</i>	<i>Ascomycota</i>	3	3
4	<i>C. multigemmis</i>	<i>Ascomycota</i>	1	-
5	<i>C. orthosilosis</i>	<i>Ascomycota</i>	-	1
6	<i>C. parapsilosis</i>	<i>Ascomycota</i>	3	-
7	<i>C. naeodendra</i>	<i>Ascomycota</i>	-	1
8	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Ascomycota</i>	5	5
9	<i>Kodamaea ohmeri</i>	<i>Ascomycota</i>	1	-
10	<i>Pichia farinosa</i>	<i>Ascomycota</i>	1	-
11	<i>P. burtonii</i>	<i>Ascomycota</i>	1	-
12	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Ascomycota</i>	1	-
13	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	<i>Ascomycota</i>	5	3
14	<i>Cryptococcus flavescens</i>	<i>Basidiomycota</i>	1	-
15	<i>Cr. heveanensis</i>	<i>Basidiomycota</i>	-	1
16	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	4	1

Pada penelitian ini spesies-spesies khamir yang berasal dari saluran pencernaan PCB *A. cerana* di Apiari Desa Ciburial didominasi oleh khamir *Class Hemiascomycetes* dari *Phylum Ascomycota*. Hal tersebut menunjukkan bahwa kemungkinan kelompok khamir *Ascomycetes* lebih tahan terhadap kondisi lingkungan yang memiliki konsentrasi gula tinggi dibandingkan dengan kelompok khamir *Basidiomycetes*. Menurut Brysch-Hetzberg (2004: 95--96), kelompok khamir *Ascomycetes* lebih tahan terhadap konsentrasi gula yang tinggi dibandingkan khamir *Basidiomycetes*.

4.2.1 Spesies-spesies Khamir yang Berasal dari Saluran Pencernaan PCB (*pollen-collecting bee*)

Sebanyak 27 isolat khamir diperoleh dari 10 individu PCB *A. cerana* yang berbeda. Spesies-spesies khamir tersebut terdiri atas delapan genus dan 12 spesies

(Tabel 4.2.1.1). Khamir-khamir yang berasal dari saluran pencernaan PCB *A. cerana* termasuk ke dalam *Phylum Ascomycota* dari *Class Hemiascomycetes* dan *Phylum Basidiomycota* dari *Class Urediniomycetes*. Khamir-khamir yang termasuk *Phylum Ascomycota* dari *Class Hemiascomycetes* yaitu *Candida cf. apicola* (3 isolat), *C. etchellsii* (3 isolat), *C. multigemmis* (1 isolat), *C. parapsilosis* (3 isolat), *Debaryomyces hansenii* (5 isolat), *Kodamaea ohmeri* (1 isolat), *Pichia farinosa* (1 isolat), *Pichia burtonii* (1 isolat), *Wickerhamomyces anomalus (Pichia anomala)* (1 isolat), dan *Zygosaccharomyces rouxii* (4 isolat). Spesies-spesies khamir yang termasuk ke dalam *Phylum Basidiomycota* dari *Class Urediniomycetes* yaitu *Cryptococcus flavescens* (1 isolat) dan *Rh. mucilaginosa* (4 isolat). Spesies-spesies khamir yang diperoleh dari PCB sebagian besar merupakan khamir yang termasuk ke dalam *Phylum Ascomycota* dari *Class Hemiascomycetes*. Berdasarkan Kurtzman & Sugiyama (2001: 189), ciri khamir dari *Class Hemiascomycetes* teleomorfik adalah memiliki askus yang tidak ditutupi tubuh buah (askokarp) dan ciri khamir dari *Class Hemiascomycetes* anamorfik adalah bereproduksi secara aseksual dengan melakukan *budding* (pertunasan) secara holoblastik serta memiliki dua lapis dinding sel. Menurut Hamamoto dan Nakase (2000: 65), khamir dari *Class Urediniomycetes* secara morfologi dan ekologi merupakan kelompok yang beragam serta dapat berperan sebagai saprofit dan parasit.

Tabel 4.2.1.1. Hasil identifikasi khamir dari saluran pencernaan *A. cerana* (PCB) di Apiari Desa Ciburial, Kabupaten Bandung

No	Kode Isolat	Kode Asal	Individu lebah	Hasil BLAST (Homologi)
1	CR086	Ciko.P1M.9	PCB1	<i>Candida cf. apicola</i> (89%)
2	CR087	Ciko.P1M.10	PCB1	<i>Candida etchellsii</i> (99%)
3	CR091	Ciko.P1M.27	PCB1	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (83%)
4	CR103	Ciko.P2M.I.26	PCB2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (99%)
5	CR096	Ciko.P2M.I.9.1	PCB2	<i>Candida etchellsii</i> (99%)
6	CR098	Ciko.P2MI.13	PCB2	<i>Candida cf. apicola</i> (98%)
7	CR117	Ciko.P3M.I.6	PCB3	<i>Candida multigemmis</i> (91%)
8	CR120	Ciko.P3MI.18	PCB3	<i>Candida parapsilopsis</i> (99%)
9	CR121	Ciko.P3MI.22	PCB3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (99%)
10	CR124	Ciko.P3MI.29.1	PCB3	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (93%)
11	CR166	Ciko.P4MII.II.2	PCB4	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (80%)

12	CR167	Ciko.P4MI.20	PCB4	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (99%)
13	CR171	Ciko.P4MII.27.2	PCB4	<i>Cryptococcus flavescens</i> (99%)
14	CR172	Ciko.P4MII.43	PCB4	<i>Candida cf. apicola</i> (97%)
15	CR173	Ciko.P4MI.10	PCB4	<i>Candida etchellsii</i> (99%)
16	CR174	Ciko.P5MI.10	PCB5	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (99%)
17	CR176	Ciko.P6MII.15	PCB6	<i>Candida parapsilopsis</i> (94%)
18	CR177	Ciko.P6MI.42	PCB6	<i>Kodamaea ohmeri</i> (96%)
19	CR178	Ciko.P7MII.19	PCB7	<i>Pichia burtonii</i> (95%)
20	CR179	Ciko.P7MI.35	PCB7	<i>Debaryomyces hansenii</i> (99%)
21	CR181	Ciko.P8MII.7	PCB8	<i>Candida parapsilopsis</i> (99%)
22	CR184	Ciko.P8MI.20.1	PCB8	<i>Debaryomyces hansenii</i> (99%)
23	CR185	Ciko.P9MI.13 besar	PCB9	<i>Debaryomyces hansenii</i> (99%)
24	CR186	Ciko.P9MII.26	PCB9	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (94%)
25	CR187A	Ciko.P9MI.39	PCB9	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (99%)
26	CR190	Ciko.P10MI.23	PCB10	<i>Pichia farinosa</i> (94%)
27	CR191	Ciko.P10MII.38	PCB10	<i>Debaryomyces hansenii</i> (99%)

Keterangan:

CR : Ciburial

Ciko : Ciburial koloni (koloni lebah di Apiari Desa Ciburial)

P : Individu lebah PCB; P1 berarti individu PCB I; P2 berarti individu PCB II.

M : Metode isolasi khamir.

PCB : Individu *pollen-collecting bee*; PCB1 berarti individu PCB I; PCB2 berarti individu PCB II.

Spesies-spesies khamir yang diperoleh dari penelitian ini lebih banyak daripada spesies-spesies khamir yang diperoleh Basukriadi *dkk.* (2010) dari *Apis cerana* yang hidup liar di Kampus UI Depok. Basukriadi *dkk.* (2010) mengisolasi 14 isolat khamir representatif yang diperoleh dari 30 individu lebah madu pekerja *A. cerana* (PCB dan NCB) yang hidup liar dan hanya hinggap pada bunga *Jatropha integerrima* di Kampus UI Depok. Hal tersebut diduga disebabkan karena perbedaan jenis dan jumlah individu bunga yang terdapat di daerah peternakan lebah madu di Desa Ciburial sekitarnya dengan jenis bunga pada penelitian Basukriadi *dkk.* (2010). *Apis cerana* yang hidup di Apiari Desa Ciburial kemungkinan menghinggapi bunga-bunga yang banyak ditemukan di daerah peternakan lebah madu di Desa Ciburial dan sekitarnya, yaitu bunga putri malu, kaliandra, kecubung, dan wedelia.

Walaupun terdapat perbedaan jenis dan jumlah bunga di Apiari Desa Ciburial dengan yang digunakan pada penelitian Basukriadi *dkk.* (2010), akan tetapi ada beberapa spesies yang dapat ditemukan baik pada penelitian ini maupun juga pada

penelitian Basukriadi *dkk.* (2010) antara lain, *Candida cf. apicola*, *C. cf. azyma*, dan *Kodamaea ohmeri*. Hal tersebut diduga karena ketiga spesies khamir tersebut memang lazim ditemukan pada saluran pencernaan *A. cerana* baik yang hidup liar maupun di Apiari.

Spesies-spesies khamir yang diperoleh pada penelitian ini juga berbeda dengan spesies-spesies khamir yang diperoleh pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Sandhu dan Waraich (1985). Hanya satu spesies khamir, yaitu *Candida parapsilosis*, yang dapat ditemukan baik pada penelitian ini maupun oleh Sandhu dan Waraich (1985) pada *Apis cerana* yang hidup liar di India. Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena perbedaan asal usul dari *A. cerana* tersebut, perbedaan letak geografis, dan atau perbedaan jenis bunga yang dikunjunginya.

4.2.2 Spesies-spesies Khamir yang Berasal dari Saluran Pencernaan NCB (*nectar-collecting bee*)

Sebanyak 21 isolat khamir diperoleh dari 10 individu NCB *A. cerana* yang berbeda. Spesies-spesies khamir tersebut terdiri atas lima genus dan sembilan spesies (Tabel 4.2.2.1). Khamir-khamir yang berasal dari saluran pencernaan NCB *A. cerana* termasuk ke dalam *Phylum Ascomycota* dari *Class Hemiascomycetes* dan *Phylum Basidiomycota* dari *Class Urediniomycetes*. Khamir-khamir yang termasuk *Phylum Ascomycota* dari *Class Hemiascomycetes* yaitu *C. cf. apicola* (4 isolat), *C. etchellsii* (3 isolat), *C. cf. azyma* (1 isolat), *C. orthopsilosis* (1 isolat), *D. hansenii* (5 isolat), dan *Z. rouxii* (4 isolat), sedangkan yang berasal dari *Phylum Basidiomycota* dari *Class Urediniomycetes* adalah *Cr. heveanensis* dan *Rh. mucilaginoso* masing-masing 1 isolat. Spesies-spesies khamir yang diperoleh dari NCB sebagian besar juga merupakan khamir yang termasuk ke dalam *Phylum Ascomycota* dari *Class Hemiascomycetes*.

Tabel 4.2.2.1. Hasil identifikasi khamir dari saluran pencernaan *A. cerana* (NCB) di Apiari Desa Ciburial, Kabupaten Bandung

No	Kode Isolat	Kode Asal	Individu Lebah	Hasil BLAST
1	CR132	Ciko.N1MII.15	NCB1	<i>Debaryomyces hansenii</i> (99%)
2	CR133	Ciko.N1M.22	NCB1	<i>Debaryomyces hansenii</i> (98%)
3	CR134	Ciko.N3M.6	NCB3	<i>Candida cf. azyma</i> (98%)
4	CR135	Ciko.N3M.14	NCB3	<i>Candida cf. apicola</i> (98%)
5	CR136	Ciko.N3M.15.3	NCB3	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (94%)
6	CR137	Ciko.N3M.42	NCB3	<i>Candida cf. apicola</i> (100%)
7	CR139	Ciko.N4M.10.1	NCB4	<i>Candida naeodendra</i> (99%)
8	CR140	Ciko.N4M.15.1	NCB4	<i>Candida etchellsii</i> (99%)
9	CR143	Ciko.N5M.27	NCB5	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (88%)
10	CR145	Ciko.N5M.43	NCB5	<i>Candida cf. apicola</i> (91%)
11	CR146	Ciko.N5M.45	NCB5	<i>Candida etchellsii</i> (98%)
12	CR149	Ciko.N7MI.26	NCB7	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (94%)
13	CR151	Ciko.N7MII.7	NCB7	<i>Candida orthopsilosis</i> (99%)
14	CR154	Ciko.N7MII.35	NCB7	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (97%)
15	CR155	Ciko.N8M.29	NCB8	<i>Cryptococcus heveanensis</i> (84%)
16	CR156	Ciko.N9M.18	NCB9	<i>Candida etchellsii</i> (98%)
17	CR159	Ciko.N9M.43	NCB9	<i>Candida cf. apicola</i> (97%)
18	CR160	Ciko.N10MII.15	NCB10	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (99%)
19	CR162	Ciko.N11M.7	NCB11	<i>Debaryomyces hansenii</i> (98%)
20	CR163	Ciko.N12M.22.2	NCB12	<i>Debaryomyces hansenii</i> (99%)
21	CR164	Ciko.N12M.36	NCB12	<i>Debaryomyces hansenii</i> (96%)

Keterangan:

CR : Ciburial

Ciko : Ciburial koloni (koloni lebah di Apiari Desa Ciburial)

N : Individu lebah NCB; N1 berarti individu NCB I; N2 berarti individu NCB II.

M : Metode isolasi khamir.

NCB : Individu *nectar-collecting bee*; NCB1 berarti individu NCB I; NCB2 berarti individu NCB II.

Berdasarkan hasil identifikasi isolat-isolat khamir (Tabel 4.2.1.1 dan 4.2.2.1) maka diketahui bahwa jumlah spesies yang diperoleh dari PCB (12 spesies) lebih banyak dibandingkan dengan spesies yang diperoleh dari NCB (9 spesies). Perbedaan jumlah khamir tersebut kemungkinan disebabkan karena perbedaan tugas dan makanan lebah pekerja PCB dan NCB. Madu bunga memiliki lingkungan yang

spesifik (mengandung konsentrasi gula yang tinggi) sehingga hanya spesies-spesies khamir osmofilik dan atau osmotoleran saja yang dapat hidup. Serbuk sari kemungkinan bukan merupakan habitat yang spesifik bagi khamir, sehingga spesies-spesies khamir mesofilik juga dapat hidup di dalamnya. Menurut Raspor dan Zupan (2006: 374), madu bunga merupakan habitat bagi khamir yang memiliki konsentrasi gula sangat tinggi dan kondisi tersebut menyebabkan hanya spesies-spesies khamir yang memiliki karakteristik osmofilik yang dapat hidup pada habitat tersebut. Menurut Ganter (2006: 339), perbedaan jumlah khamir pada lebah madu PCB dan NCB kemungkinan mencerminkan jenis bunga dan jumlah individu bunga yang dikunjungi oleh lebah tersebut.

Secara umum terdapat perbedaan spesies khamir antara PCB dan NCB, akan tetapi terdapat lima spesies khamir yang dapat ditemukan baik pada PCB dan NCB, yaitu *Candida cf. apicola*, *C. etchellsii*, *D. hansenii*, *Rh. mucilaginosa*, dan *Z. rouxii*. Beberapa khamir seperti *Candida cf. apicola*, *C. etchellsii*, dan *Zygosaccharomyces rouxii* bahkan sering ditemukan bersama baik pada individu PCB dan NCB *Apis cerana* di Apiari. Pada individu PCB1, PCB4, dan NCB5, ketiga spesies khamir tersebut ditemukan bersama, sedangkan pada PCB2 dan NCB9 spesies khamir *C. cf. apicola* dan *C. etchellsii* ditemukan bersama. Hal tersebut menunjukkan kemungkinan terdapat asosiasi antara spesies *C. cf. apicola*, *C. etchellsii*, dan *Z. rouxii* dengan lebah madu *A. cerana* dan kemungkinan ketiga spesies khamir tersebut memang dibutuhkan oleh lebah madu *A. cerana* serta juga ketiga spesies khamir dapat ditemukan baik pada serbuk sari maupun pada madu bunga yang merupakan makanan bagi lebah madu *A. cerana*. Lebah madu *A. cerana* diduga menjadi vektor bagi khamir menuju habitat yang baru. Menurut Zacchi dan Vaughan-Martini (2002: 240) khamir-khamir yang ditemukan pada saluran pencernaan lebah dapat berperan menghasilkan asam amino dan vitamin esensial (Mankowski & Morrel 2004: 226) yang dibutuhkan lebah. Menurut Lachance *dkk.* (2010: 159), *C. apicola* dapat ditemukan pada saluran pencernaan lebah di Kroasia. Basukriadi *dkk.* (2010: 46) juga menemukan *C. cf. apicola* pada saluran pencernaan lebah madu *A. cerana* di Depok, Indonesia. Mereka menduga bahwa khamir *C. apicola* berasosiasi dengan *Apis cerana*. Menurut Meyer *dkk.* (1998: 502) *Candida etchellsii* merupakan khamir yang osmotoleran karena dapat tumbuh baik pada medium yang mengandung konsentrasi

glukosa 50%. Sandhu dan Waraich (1985: 54) mengisolasi *Torulopsis (Candida) etchellsii* dari lebah madu *A. mellifera*. Menurut Egorova *dkk.* (1967) (lihat Brysch-Herzberg 2004: 98), *Debaryomyces hansenii* dapat ditemukan pada lebah madu *Apis mellifera*. Brysch-Herzberg (2004: 98) melaporkan bahwa *Z. rouxii* merupakan khamir yang bersifat osmofilik karena dapat tumbuh lebih baik pada medium yang mengandung glukosa 60% daripada medium yang mengandung glukosa 2%. Hal tersebut menunjukkan bahwa kemungkinan saluran pencernaan *A. cerana* memiliki konsentrasi gula yang tinggi karena lebah madu *A. cerana* menyimpan madu bunga dalam *crop* yang merupakan bagian dari saluran pencernaan *A. cerana* tersebut.

4.2.3 Isolat-isolat Khamir dengan Homologi *Sequence* Daerah ITS rDNA yang Rendah

Penelitian ini mendeteksi keberadaan beberapa spesies baru dari saluran pencernaan *A. cerana*. Berdasarkan hasil pencarian homologi *sequence* isolat-isolat khamir terhadap *sequence* spesies khamir yang terdapat di *database* DNA internasional (GenBank) dengan program BLAST, maka sebagian besar isolat khamir (28 isolat) menunjukkan homologi *sequence* $\geq 98\%$ dan sisanya (20 isolat) memiliki tingkat homologi *sequence* $< 98\%$ terhadap spesies terdekatnya (Tabel 4.2.1.1 & 4.2.2.1). Dalam penelitian ini, konsep spesies berdasarkan data *sequence* ITS dari Sugita *dkk.* (1999) digunakan sebagai *species guideline* untuk identifikasi isolat khamir hingga tingkat spesies. Suatu isolat diidentifikasi sebagai suatu spesies apabila homologi *sequence* daerah ITS rDNA isolat tersebut $\geq 99\%$ terhadap *sequence* spesies terdekat pada *database* GenBank.

Homologi *sequence* yang rendah terhadap spesies terdekat menunjukkan bahwa kemungkinan isolat-isolat khamir tersebut adalah taksa baru. Untuk membuktikan bahwa isolat-isolat tersebut merupakan taksa baru perlu dilakukan pengecekan *sequence* daerah ITS, melihat secara manual perbedaan *sequence* yang ada atau melakukan pengulangan *sequence*, baik menggunakan primer yang sama ataupun dengan menggunakan primer *reverse* (ITS4). Selain itu juga perlu dilakukan analisis *sequence* daerah D1/D2 LSU untuk melengkapi hasil *sequence* daerah ITS rDNA sehingga dapat meyakinkan identitas isolat tersebut sebagai taksa baru.

4.3 Deskripsi 16 Spesies Khamir dalam Penelitian

Terdapat tujuh spesies khamir yang mati pada penelitian ini sebelum diamati karakter morfologinya. Spesies-spesies khamir tersebut yaitu, *Candida cf. apicola*, *C. cf. azyma*, *Cryptococcus flavescens*, *Cr. heveanensis*, *Kodamaea ohmerii*, *Pichia burtonii*, dan *Wickerhamomyces anomalus*. Kematian ketujuh spesies khamir tersebut kemungkinan disebabkan karena pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Basukriadi *dkk.* (2009), isolat-isolat khamir dari saluran pencernaan *A. cerana* dipelihara menggunakan medium buatan (YESA 50%) sebelum dipreservasi dalam (gliserol 10% + trehalosa 5%). Medium YESA 50% kemungkinan memiliki komposisi nutrien yang berbeda dengan serbuk sari dan madu bunga yang merupakan substrat alami bagi khamir dan sumber makanan lebah madu *A. cerana*. Madu bunga mengandung macam-macam sumber gula (seperti fruktosa, glukosa, dan sukrosa) yang tidak terdapat pada medium YESA 50% yang hanya memiliki satu sumber gula yaitu sukrosa. Medium YESA 50% juga tidak mengandung asam-asam amino seperti yang terkandung dalam serbuk sari yang kemungkinan dibutuhkan oleh khamir.

4.3.1 *Candida cf. apicola* (Hajsig) S.A. Meyer & Yarrow

Hasil BLAST dari enam isolat, yaitu CR086, CR098, CR172, CR135, CR145, dan CR159 adalah *Candida cf. apicola*. Tidak ada isolat dari PCB maupun NCB yang menunjukkan homologi *sequence* daerah ITS rDNA $\geq 99\%$. Hasil homologi *sequence* daerah ITS rDNA isolat-isolat tersebut secara berturut-turut adalah 89%, 98%, 97%, 98%, 91%, dan 97%. *Candida cf. apicola* termasuk ke dalam kelompok khamir *Ascomycetes* anamorfik.

Pengamatan morfologi makroskopik dan mikroskopik isolat *Candida cf. apicola* tidak dilakukan karena isolat tersebut sudah terlebih dulu mati dan tidak bisa ditumbuhkan kembali. Hal tersebut kemungkinan disebabkan *Candida cf. apicola* sulit untuk dipelihara pada medium buatan. Meyer *dkk.* (1998: 481) menumbuhkan *C. apicola* di *corn meal agar* selama 14 hari pada suhu 25° C, ciri-cirinya adalah tidak memiliki *pseudohyphae*, koloni berwarna kekuning-kuningan sampai krem,

mengilap dan tepi koloni lurus. Pengamatan morfologi sel yang dilakukan Meyer *dkk.* (1998: 481) dilakukan pada medium *glucose-yeast extract-peptone broth* selama tiga hari pada suhu 25° C menunjukkan bentuk sel *spherical* sampai *ovoidal*, sel berukuran $(1,5--2,5) \times (3,0--4,0)$ μm , terdapat dalam bentuk sel tunggal dan berpasangan.

Meyer *dkk.* (1998: 482) melaporkan *Candida apicola* diisolasi dari saluran pencernaan lebah, acar mentimun, anggur busuk, dan gula. Basukriadi *dkk.* (2010: 46) melaporkan bahwa *C. apicola* berasosiasi dengan lebah madu *A. cerana* yang hidup liar di Kampus UI Depok. Menurut Lachance *dkk.* (2010: 159), *Candida apicola* dapat ditemukan pada saluran pencernaan lebah di Kroasia. Menurut Meyer *dkk.* (1998: 482) *Candida apicola* dapat tumbuh baik pada medium yang mengandung glukosa 50%. Hal tersebut menunjukkan bahwa saluran pencernaan *A. cerana* memiliki kadar gula yang tinggi dan merupakan habitat yang spesifik bagi khamir.

4.3.2 *Candida cf. azyma* (van der Walt, E. Johansen & Yarrow) S.A. Meyer & Yarrow

Hasil BLAST dari isolat CR134 adalah *Candida cf. azyma* dengan homologi sebesar 98%. Isolat tersebut berasal dari NCB. *Candida cf. azyma* termasuk ke dalam kelompok khamir *Ascomycetes* anamorfik.

Pengamatan morfologi makroskopik dan mikroskopik isolat CR134 tidak dilakukan karena isolat tersebut sudah terlebih dulu mati dan tidak bisa ditumbuhkan kembali. Meyer *dkk.* (1998: 485) menumbuhkan *C. azyma* di *corn meal agar* selama 14 hari pada suhu 25° C, ciri-cirinya adalah memiliki *pseudohyphae* yang terdiri atas sel oval yang membentuk rantai bercabang. Koloni berwarna krem sampai cokelat, mengilap, dan tepi koloni lurus hingga bergelombang. Pengamatan morfologi sel yang dilakukan Meyer *dkk.* (1998: 485) dilakukan pada medium *glucose-yeast extract-peptone broth* selama tiga hari pada suhu 25° C menunjukkan bentuk sel *ovoidal* hingga *long oval*, sel berukuran $(2,0--4,0) \times (5,0--9,0)$ μm , terdapat dalam bentuk sel tunggal, berpasangan atau membentuk rantai pendek.

Basukriadi *dkk.* (2010: 45) menemukan *C. azyma* pada saluran pencernaan

A. cerana yang hidup liar di Kampus UI, sedangkan Lachance *dkk.* (2010: 160) mengisolasi *Candida azyma* dari lalat buah *Drosophila* sp. di Malaysia. Meyer *dkk.* (1998: 485) melaporkan bahwa *Candida azyma* dapat tumbuh baik pada medium yang mengandung glukosa 50%.

4.3.3 *Candida etchellsii* (Lodder & Kreger-van Rij) S.A. Meyer & Yarrow (Yarrow and Meyer 1978)

Hasil BLAST dari enam isolat, yaitu CR087, CR096, CR173, CR140, CR146, dan CR156 adalah *Candida etchellsii*. Seluruh isolat yang berasal dari PCB (CR087, CR096, dan CR173) menunjukkan homologi *sequence* daerah ITS rDNA sebesar 99%, sedangkan isolat yang berasal dari NCB (CR140, CR146 dan CR156) menunjukkan homologi *sequence* daerah ITS rDNA sebesar 98%. *Candida etchellsii* termasuk ke dalam kelompok khamir *Ascomycetes* anamorfik.

Pengamatan morfologi isolat CR087 pada medium YMA 3 hari menunjukkan warna koloni krem, tekstur koloni *butyrous*, permukaan kusam, profil menggunung, dan tepi yang lurus. Meyer *dkk.* (1998: 502) menumbuhkan *C. etchellsii* di *corn meal agar* selama 14 hari pada suhu 25° C, ciri-cirinya adalah tidak memiliki *pseudohyphae*, koloni berwarna putih sampai krem, mengilap atau agak kusam, dan tepi koloni lurus. Pengamatan morfologi sel yang dilakukan Meyer *dkk.* (1998: 502) dilakukan pada medium *glucose-yeast extract-peptone broth* selama tiga hari pada suhu 25° C menunjukkan bentuk sel *subglobose* sampai *ovoidal*, sel berukuran (2,0--4,0) × (3,0--5,0) μm, terdapat dalam bentuk sel tunggal dan berpasangan.

Sampai saat ini belum ada yang melaporkan tentang keberadaan *C. etchellsii* pada lebah madu *Apis cerana*. Sandhu dan Waraich (1985: 54) mengisolasi *C. etchellsii* dari lebah madu *Apis mellifera* dan *Apis dorsata*. *Candida etchellsii* juga dapat ditemukan pada *stingless bee* (*Tetragonisca angustula*) dewasa (Rosa *dkk.* 2003: 272). Ridawati *dkk.* (2010: 115) mengisolasi *C. etchellsii* pada madu dari Palembang dan pada selai. Menurut Meyer *dkk.* (1998: 502), *Candida etchellsii* dapat tumbuh baik pada medium yang mengandung glukosa 50%.

4.3.4 *Candida multigemmis* (Buhagiar) S.A. Meyer & Yarrow (Yarrow and Meyer 1978)

Hasil BLAST dari isolat CR117 adalah *Candida multigemmis*. Isolat berasal dari PCB dan menunjukkan homologi *sequence* daerah ITS rDNA sebesar 91%. *Candida multigemmis* termasuk ke dalam kelompok khamir *Ascomycetes* anamorfik.

Pengamatan morfologi isolat CR117 pada medium YMA tiga hari menunjukkan warna koloni krem, tekstur koloni *butyrous*, permukaan kusam, profil menggunung, dan tepi yang lurus. Meyer *dkk.* (1998: 528) menumbuhkan *C. multigemmis* di *corn meal agar* selama 14 hari pada suhu 25° C, ciri-cirinya adalah tidak memiliki *pseudohyphae*, terdapat rantai sel *budding*, koloni berwarna putih, berlendir, agak mengilap dan tepi koloni lurus. Pengamatan morfologi sel yang dilakukan Meyer *dkk.* (1998: 528) dilakukan pada medium *glucose-yeast extract-peptone broth* selama tiga hari pada suhu 25° C menunjukkan bentuk sel *spheroidal* sampai *ovoidal*, sel berukuran $(2,5--6,5) \times (3,0--6,5) \mu\text{m}$, terdapat sel tunggal dan berpasangan.

Sampai saat ini belum ada yang melaporkan keberadaan *C. multigemmis* pada saluran pencernaan *A. cerana*. Phaff and Starmer (1987) (*lihat* Ganter 2006: 333) mengisolasi *C. multigemmis* dari serangga *Chrysoperla* (*Neuroptera: Chrysopidae*).

4.3.5 *Candida naeodendra* van der Walt, E. Johannsen & Nakase (1973)

Hasil BLAST dari isolat CR139 adalah *Candida naeodendra*. Isolat berasal dari NCB dan menunjukkan homologi *sequence* daerah ITS rDNA sebesar 99%. *Candida naeodendra* termasuk ke dalam kelompok khamir *Ascomycetes* anamorfik.

Pengamatan morfologi isolat CR139 pada medium YESA 50% tiga hari menunjukkan warna koloni putih sampai krem, tekstur koloni *butyrous*, permukaan kusam, profil menggunung, dan tepi yang bergerigi. Meyer *dkk.* (1998: 529) menumbuhkan *C. naeodendra* di *corn meal agar* selama 14 hari pada suhu 25° C, ciri-cirinya adalah tidak memiliki *pseudohyphae*, koloni berwarna krem, dan tepi koloni lurus atau bergerigi. Pengamatan morfologi sel yang dilakukan Meyer *dkk.* (1998: 529) dilakukan pada medium *glucose-yeast extract-peptone broth* selama tiga

hari pada suhu 25° C menunjukkan bentuk sel *subglobose* sampai *ovoidal*, sel berukuran $(2,0\text{--}3,0) \times (2,0\text{--}5,0)$ μm , terdapat dalam bentuk sel tunggal dan berpasangan. Sampai saat ini belum ada yang melaporkan tentang keberadaan *C. naeodendra* pada *Apis cerana*. Berdasarkan Meyer *dkk.* (1998: 529), *C. naeodendra* dapat ditemukan pada saluran pencernaan larva serangga di Afrika Selatan. Menurut Meyer *dkk.* (1998: 529) *Candida naeodendra* dapat tumbuh baik pada medium yang mengandung glukosa 50%.

4.3.6 *Candida orthopsilosis* (Ashford) (Tavanti, Davidson, Gow, Maiden, et Odds, sp. nov.) (2005)

Hasil BLAST dari isolat CR151 adalah *Candida orthopsilosis*. Isolat tersebut berasal dari NCB. Homologi *sequence* daerah ITS rDNA isolat tersebut adalah sebesar 99%. *Candida orthopsilosis* termasuk ke dalam kelompok khamir *Ascomycetes* anamorfik.

Pengamatan morfologi isolat CR151 pada medium YMA 3 hari menunjukkan warna koloni krem, tekstur koloni *butyrous*, permukaan kusam, profil menggunung, dan tepi yang lurus. Menurut Tavanti *dkk.* (2005: 209), secara morfologi *C. orthopsilosis* tidak dapat dibedakan dengan *C. parapsilosis*. Meyer *dkk.* (1998: 537) menumbuhkan *C. parapsilosis* di *corn meal agar* selama tujuh hari pada suhu 25° C, ciri-cirinya adalah memiliki *pseudohyphae* yang terdiri atas rantai sel silindris yang bercabang dengan blastokonidia, koloni berwarna putih, *butyrous*, dan tepi koloni lurus.

Sampai saat ini belum ada yang melaporkan tentang keberadaan *C. orthopsilosis* pada *A. cerana*. Rachmayanti (2010: 70) melaporkan bahwa *C. orthopsilosis* dapat ditemukan pada bunga jantan *Jatropha integerrima*. Menurut Ridawati *dkk.* (2010: 115), *C. orthopsilosis* merupakan khamir osmofilik yang dapat ditemukan pada selai buah.

4.3.7 *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice (1932)

Hasil BLAST dari isolat CR120, CR176, dan CR181 adalah *Candida parapsilosis*. Seluruh isolat berasal dari PCB dan menunjukkan homologi *sequence* daerah ITS rDNA secara berurutan sebesar 99%, 94%, dan 99%. *Candida parapsilosis* termasuk ke dalam kelompok khamir *Ascomycetes* anamorfik.

Pengamatan morfologi isolat CR120 pada medium YMA tiga hari menunjukkan warna koloni krem, tekstur koloni *butyrous*, permukaan kusam, profil menggunung, dan tepi yang lurus. Meyer *dkk.* (1998: 537) menumbuhkan *C. parapsilosis* di *corn meal agar* selama tujuh hari pada suhu 25° C, ciri-cirinya adalah memiliki *pseudohyphae* yang terdiri atas rantai sel silindris yang bercabang dengan blastokonidia, koloni berwarna putih, *butyrous*, dan tepi koloni lurus. Pengamatan morfologi sel yang dilakukan Meyer *dkk.* (1998: 537) dilakukan pada medium *glucose-yeast extract-peptone broth* selama 3 hari pada suhu 25° C menunjukkan bentuk sel *ovoidal*, sel berukuran (3,0--4,0) × (5,0--8,0) µm, terdapat dalam bentuk sel tunggal dan berpasangan.

Sandhu dan Waraich (1985: 54) mengisolasi *C. parapsilosis* dari lebah madu *Apis cerana*, *Apis florea*, dan *Apis mellifera*. Menurut Ba *dkk.* (2000: 972) *C. parapsilosis* dapat ditemukan pada larva semut api (*Solenopsis invicta*) dan semut api dewasa di Texas, *C. parapsilosis* berkontribusi menghasilkan sterol, ergosterol, dan zymosterol bagi semut api. Ridawati *dkk.* (2010: 115) mengisolasi khamir *C. parapsilosis* pada madu dari Palembang dan selai buah. Menurut Meyer *dkk.* (1998: 529) *Candida parapsilosis* dapat tumbuh baik pada medium yang mengandung glukosa 50%.

4.3.8 *Cryptococcus flavescens* (Saito) C.E. Skinner (1947b)

Hasil BLAST dari isolat CR171 adalah *Cryptococcus flavescens*. Isolat tersebut berasal dari PCB. Homologi *sequence* daerah ITS rDNA isolat tersebut adalah sebesar 99%. *Cryptococcus flavescens* termasuk ke dalam kelompok khamir *Basidiomycetes* anamorfik.

Pengamatan morfologi makroskopik dan mikroskopik isolat CR171 tidak dilakukan karena isolat tersebut sudah terlebih dulu mati dan tidak bisa ditumbuhkan kembali. Fell dan Statzell-Tallman (1998: 759) menumbuhkan *Cr. flavescens* di 5% *malt agar* selama satu bulan pada suhu 20° C, ciri-cirinya adalah koloni berwarna krem, kekuning-kuningan, atau agak cokelat, permukaan mengilap, berlendir, dan tepi koloni lurus sampai berlekuk. Pengamatan morfologi sel yang dilakukan Fell dan Statzell-Tallman (1998: 759) dilakukan pada medium 5% *malt extract* selama tiga hari pada suhu 25° C menunjukkan bentuk sel dari *spheroidal*, *ovoidal* hingga *elongate*, sel berukuran $(2,0-5,5) \times (3,0-7,0)$ μm , terdapat dalam bentuk sel tunggal, berpasangan atau membentuk rantai pendek.

Keberadaan *Cr. flavescens* pada *Apis cerana* belum pernah dilaporkan. Fell & Statzell-Tallman (1998: 760) melaporkan *Cr. flavescens* dapat ditemukan pada kotoran serangga.

4.3.9 *Cryptococcus heveanensis* (Groenewege) Baptist & Kurtzman (1976)

Hasil BLAST dari isolat CR155 adalah *Cryptococcus heveanensis*. Isolat berasal dari PCB dan menunjukkan homologi *sequence* daerah ITS rDNA adalah sebesar 84%. *Cryptococcus heveanensis* termasuk ke dalam kelompok khamir *Ascomycetes* anamorfik.

Pengamatan morfologi makroskopik dan mikroskopik isolat CR155 tidak dilakukan karena isolat tersebut sudah terlebih dulu mati dan tidak bisa ditumbuhkan kembali. Fell dan Statzell-Tallman (1998: 756) menumbuhkan *Cr. heveanensis* di 5% *malt agar* selama satu bulan pada suhu 20° C, ciri-cirinya adalah koloni berwarna krem, mengilap, berlendir dan tepi koloni lurus. Pengamatan morfologi sel yang dilakukan Fell dan Statzell-Tallman (1998: 756) dilakukan pada medium 5% *malt extract* selama tiga hari pada suhu 25° C menunjukkan bentuk sel *ovoidal* hingga *elongate*, sel berukuran $(2,0-4,5) \times (3,0-7,0)$ μm , terdapat dalam bentuk sel tunggal, berpasangan atau membentuk rantai pendek.

Keberadaan *Cr. heveanensis* pada saluran pencernaan lebah madu *Apis cerana* belum pernah dilaporkan. Rachmayanti (2010: 70) melaporkan bahwa *Cr. heveanensis* ditemukan pada bunga jantan *Jatropha integerrima*.

4.3.10 *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder & Kreger-van Rij (1952)

Hasil BLAST dari enam isolat, yaitu CR179, CR191, CR132, CR133, CR162, dan CR164 adalah *D. hansenii*. Seluruh isolat yang berasal dari PCB (CR179 dan CR191) menunjukkan homologi *sequence* daerah ITS rDNA sebesar 99%, sedangkan isolat yang berasal dari NCB (CR133, CR162, dan CR164) menunjukkan homologi *sequence* daerah ITS rDNA secara berurutan sebesar 99%, 98%, dan 96%. *Debaryomyces hansenii* termasuk ke dalam kelompok khamir *Ascomycetes* teleomorfik.

Pengamatan morfologi isolat CR179 pada medium YMA 3 hari menunjukkan warna koloni krem, tekstur koloni *butyrous*, permukaan kusam, profil menggunung, dan tepi yang lurus. Nakase *dkk.* (1998: 162) menumbuhkan *D. hansenii* di *yeast-extract malt-extract agar* selama satu bulan pada suhu 17° C, ciri-cirinya adalah koloni berwarna putih keabu-abuan sampai kekuning-kuningan, mengilap atau kusam, dan tepi koloni lurus atau berkerut. Pengamatan morfologi sel yang dilakukan Nakase *dkk.* (1998: 1962) dilakukan pada medium YMB selama tiga hari pada suhu 25° C menunjukkan bentuk sel *spheroidal* sampai *ovoidal* pendek, sel berukuran $(2-2,2) \times (2,2-8,6) \mu\text{m}$, terdapat sel tunggal, berpasangan atau membentuk rantai.

Hasil pengamatan askospora isolat CR179 pada medium YMB selama tujuh hari menunjukkan bahwa askus terdiri atas satu askospora dengan bentuk bulat (*spheroidal*). Menurut Nakase *dkk.* (1998: 162), *Debaryomyces hansenii* memiliki spora yang bulat dan biasanya terdapat satu dan kadang-kadang dua askospora dalam satu askus. Keberadaan spora yang banyak dapat membuat warna koloni menjadi coklat.

Keberadaan *Debaryomyces hansenii* pada saluran pencernaan *Apis cerana* belum pernah dilaporkan. Ganter (2006: 232) mengisolasi *D. hansenii* dari saluran pencernaan kumbang *Cotinis nitida*. Menurut Raspor dan Zupan (2006: 381), *Debaryomyces hansenii* merupakan spesies khamir yang osmotoleran. Saluran pencernaan *A. cerana* memiliki kandungan gula yang tinggi dan merupakan habitat yang spesifik bagi khamir.

4.3.11 *Kodamaea ohmeri* (Etchells & T.A. Bell) Y. Yamada, Suzuki, Matsuda & Mikata

Hasil BLAST dari isolat CR177 adalah *Kodamaea ohmeri*. Isolat berasal dari PCB dan menunjukkan homologi *sequence* daerah ITS rDNA sebesar 96%.

Kodamaea ohmeri termasuk ke dalam kelompok khamir *Ascomycetes* teleomorfik.

Pengamatan morfologi makroskopik dan mikroskopik isolat CR177 tidak dilakukan karena isolat tersebut sudah terlebih dulu mati dan tidak bisa ditumbuhkan kembali. Menurut Kurtzman (1998a: 329), *K. ohmeri* yang berumur tujuh hari di suhu 25° C pada medium *morphology agar* memiliki koloni berwarna putih keabu-abuan, permukaan kusam, profil koloni halus hingga keriput, dan tepi koloni bergerigi.

Keberadaan *K. ohmeri* pada saluran pencernaan *Apis cerana* telah dilaporkan oleh Basukriadi *dkk.* (2010: 44). Basukriadi *dkk.* (2010: 44) mengisolasi *K. ohmeri* dari saluran pencernaan *A. cerana* yang hidup liar di Kampus UI Depok. Nguyen *dkk.* (2007: 846) melaporkan bahwa *Kodamaea ohmeri* dapat diisolasi dari saluran pencernaan *Corydalus cornutus* (*Neuroptera: Corydalidae*) betina.

4.3.12 *Pichia burtonii* Boidin, Pignat, Lehoucq, Vey & Abadie (1964)

Hasil BLAST dari isolat CR178 adalah *Pichia burtonii*. Isolat tersebut berasal dari PCB dan menunjukkan homologi *sequence* daerah ITS rDNA sebesar 95%.

Pichia burtonii termasuk ke dalam kelompok khamir *Ascomycetes* teleomorfik.

Pengamatan morfologi makroskopik dan mikroskopik isolat CR178 tidak dilakukan karena isolat tersebut sudah terlebih dulu mati dan tidak bisa ditumbuhkan kembali. Kurtzman (1998a: 293) menumbuhkan *P. burtonii* di *morphology agar* selama 7 hari pada suhu 25° C, ciri-cirinya adalah terdapat banyak *pseudohyphae* juga *true hyphae*, terdapat blastokonidia dan arthrokonidia, koloni berwarna putih sampai kecokelatan, permukaan kusam, dan memiliki aroma seperti ester.

Pengamatan morfologi sel yang dilakukan Kurtzman (1998a: 293) dilakukan pada medium 5% *malt extract agar* selama 3 hari pada suhu 25° C menunjukkan bentuk

sel *ovoidal* sampai *elongate*, sel berukuran $(2,3--5,7) \times (6,0--9,0)$ μm , terdapat dalam bentuk sel tunggal, berpasangan, dan gumpalan kecil.

Keberadaan *Pichia burtonii* pada saluran pencernaan *Apis cerana* belum pernah dilaporkan. Kurtzman (1998a: 249) mengisolasi *P. burtonii* dari serbuk sari yang dibawa oleh lebah madu di Brazil. Menurut Raspor dan Zupan (2006: 380), genus *Pichia* biasa ditemukan pada madu dan dapat mendeteriorasi madu. Madu merupakan substrat yang memiliki kadar gula yang tinggi (Raspor & Zupan 2006: 380).

4.3.13 *Pichia farinosa* (Lindner) E.C. Hansen (1904)

Hasil BLAST dari isolat CR190 adalah *Pichia farinosa*. Isolat tersebut berasal dari PCB dan menunjukkan homologi *sequence* daerah ITS rDNA sebesar 94%. *Pichia farinosa* termasuk ke dalam kelompok khamir *Ascomycetes* teleomorfik.

Pengamatan morfologi isolat CR190 pada medium YMA 3 hari menunjukkan warna koloni putih, tekstur koloni *butyrous*, permukaan kusam, profil menggunung, dan tepi yang lurus. Kurtzman (1998a: 304) menumbuhkan *P. farinosa* di *morphology agar* selama 7 hari pada suhu 25° C, ciri-cirinya adalah memiliki *pseudohyphae*, koloni berwarna putih, permukaan halus sampai kasar, dan tepi koloni berlekuk serta memiliki aroma seperti ester. Pengamatan morfologi sel yang dilakukan Kurtzman (1998a: 304) dilakukan pada medium 5% *malt extract agar* selama 3 hari pada suhu 25° C menunjukkan bentuk sel *ovoidal* sampai *elongate*, sel berukuran $(1,5--5,0) \times (3,0--18,0)$ μm , terdapat dalam bentuk sel tunggal, berpasangan dan rantai pendek.

Hasil pengamatan askospora isolat CR190 pada medium YMB selama 7 hari menunjukkan bahwa askus terdiri atas satu sampai empat askospora dengan bentuk bulat (*spheroidal*) dan juga terdapat spora tanpa askus. Menurut Kurtzman (1998a: 304), *Pichia farinosa* memiliki askus yang terdiri atas satu sampai empat askospora dan umumnya memiliki askus yang kuat, namun demikian kadang-kadang terdapat spora tanpa askus.

Keberadaan *Pichia farinosa* pada saluran pencernaan *Apis cerana* belum pernah dilaporkan. Menurut Raspor dan Zupan (2006: 380), genus *Pichia* biasa ditemukan pada madu dan dapat mendeteriorasi madu. Madu merupakan substrat yang memiliki kadar gula yang tinggi.

4.3.14 *Rhodotorula mucilaginosa* (Jorgensen) F.C. Harrison (1928)

Hasil BLAST dari isolat CR103, CR167, CR174, CR187A, dan CR160 adalah *Rhodotorula mucilaginosa*. Isolat-isolat tersebut berasal dari PCB dan NCB. Homologi *sequence* daerah ITS rDNA semua isolat tersebut adalah sebesar 99%. *Rhodotorula mucilaginosa* termasuk ke dalam kelompok khamir *Basidiomycetes* anamorfik.

Pengamatan morfologi isolat CR103 pada medium YMA 3 hari menunjukkan warna koloni merah muda, tekstur koloni *mucoïd*, permukaan mengkilap, profil menggunggung, dan tepi yang lurus. Fell dan Statzell-Tallman (1998: 821) menumbuhkan *Rh. mucilaginosa* di *corn meal agar* selama 1 bulan pada suhu 19° C memiliki ciri-ciri tidak memiliki *pseudohyphae*. Pengamatan makroskopik pada medium 5% *malt-extract agar* selama 1 bulan pada suhu 25° C, ciri-cirinya adalah koloni berwarna mulai dari jingga sampai merah muda, tekstur rata, tepi koloni rata, dan permukaan kusam sampai mengkilap.

Keberadaan *Rhodotorula mucilaginosa* pada saluran pencernaan *Apis cerana* belum pernah dilaporkan. Menurut Raspor dan Zupan (2006: 380), genus *Rhodotorula* biasa ditemukan pada madu dan dapat mendeteriorasi madu.

4.3.15 *Wickerhamomyces anomalus* (E.C. Hansen) Kurtzman (2011)

Syn. *Pichia anomala* (E.C. Hansen) Kurtzman (1984a)

Hasil BLAST dari isolat CR121 adalah *Wickerhamomyces anomalus*. Isolat tersebut berasal dari PCB. Homologi *sequence* daerah ITS rDNA isolat tersebut adalah sebesar 96%. *Wickerhamomyces anomalus* termasuk ke dalam kelompok khamir *Ascomycetes* teleomorfik.

Pengamatan morfologi makroskopik dan mikroskopik isolat CR121 tidak dilakukan karena isolat tersebut sudah terlebih dulu mati dan tidak bisa ditumbuhkan kembali sebelum dilakukan pengamatan morfologi makroskopik dan mikroskopik. Sebelumnya *Wickerhamomyces anomalus* bernama *Pichia anomala*. Kurtzman (1998a: 287) menumbuhkan *Pichia anomala* pada medium *morphology agar*. Pengamatan dilakukan pada biakan yang berumur 7 hari pada suhu 25° C. Ciri-cirinya adalah terdapat *pseudohyphae* yang bercabang, tidak memiliki *true hyphae*, warna koloni putih sampai kecokelatan, tekstur koloni *butyrous*, dan tepi koloni lurus sampai berlekuk.

Keberadaan khamir *Wickerhamomyces anomalus* pada saluran pencernaan *Apis cerana* belum pernah dilaporkan. Menurut Ricci dkk. (2011: 46), khamir *Wickerhamomyces anomalus* dapat ditemukan pada saluran pencernaan nyamuk *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, dan *Aedes albopictus*.

4.3.16 *Zygosaccharomyces rouxii* (Boutroux) Yarrow (von Arx et al. 1977)

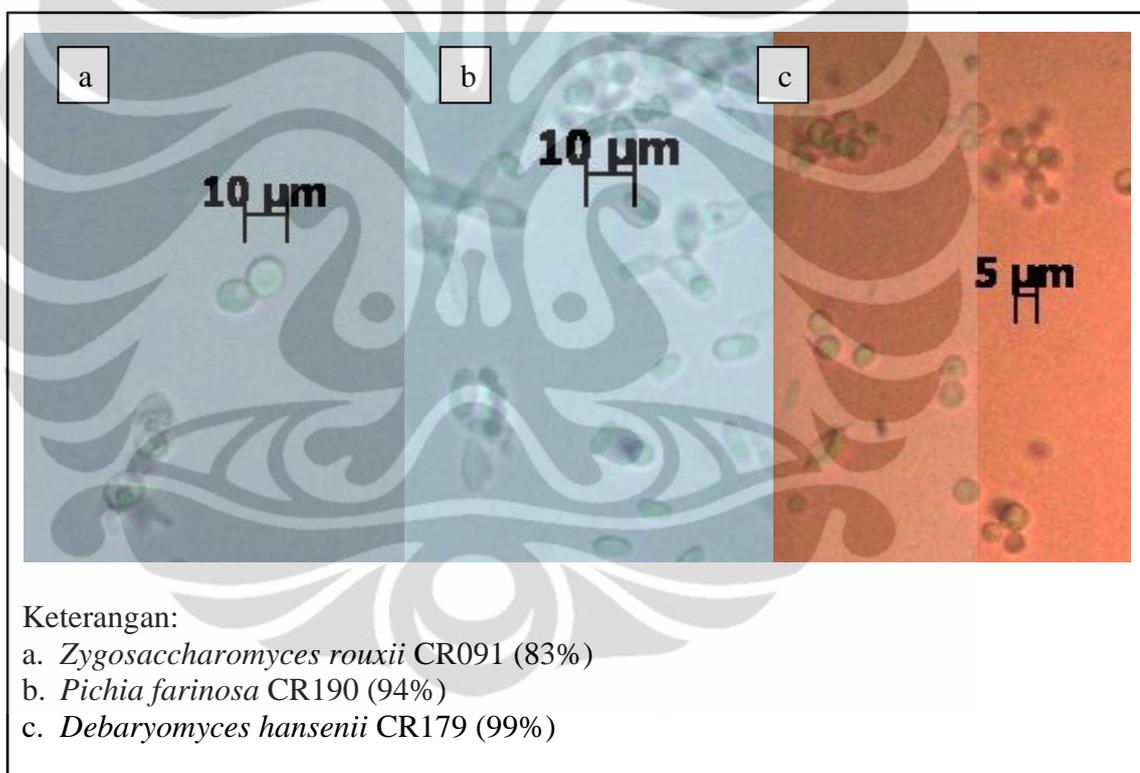
Hasil BLAST dari delapan isolat, yaitu CR091, CR124, CR166, CR186, CR136, CR143, CR149, dan CR154 adalah *Zygosaccharomyces rouxii*. Isolat-isolat yang berasal dari PCB (CR091, CR124, CR166, dan CR186) menunjukkan homologi *sequence* daerah ITS rDNA secara berurutan adalah sebesar 83%, 93%, 80%, dan 94%), sedangkan isolat-isolat yang berasal dari NCB (CR136, CR143, CR149, dan CR154) menunjukkan homologi *sequence* daerah ITS rDNA secara berurutan sebesar 94%, 88%, 94%, dan 97%. *Zygosaccharomyces rouxii* termasuk ke dalam kelompok khamir *Ascomycetes* teleomorfik.

Pengamatan morfologi isolat CR091 pada medium YMA 3 hari menunjukkan warna koloni putih, tekstur koloni *butyrous*, permukaan kusam, profil menggunung, dan tepi yang lurus. Kurtzman (1998b: 431) menumbuhkan *Z. rouxii* pada medium *morphology agar* selama 7 hari pada suhu 25° C, ciri-cirinya adalah terdapat sedikit *pseudohyphae*, *true hyphae* tidak terbentuk, tekstur *boutyrous*, warna koloni putih, permukaan koloni kusam atau mengilap dan tepi koloni rata atau sedikit bergelombang. Pengamatan yang dilakukan oleh Kurtzman (1998b: 431) pada medium 5% *malt-extract agar* selama 3 hari pada suhu 25° C menunjukkan ciri-ciri

bentuk sel *spheroidal* sampai *cylindrioidal*, sel berukuran $(3,0--7,8) \times (3,5--8,1) \mu\text{m}$, terdapat sel tunggal, berpasangan, atau membentuk koloni kecil.

Hasil pengamatan askospora isolat CR091 pada medium YMB selama 7 hari menunjukkan bahwa askus terdiri atas satu askospora dengan bentuk bulat (*spheroidal*). Menurut Kurtzman (1998b: 431), *Z. rouxii* memiliki askus yang terdiri atas satu sampai empat askospora yang berbentuk *spheroidal* sampai *ovoidal*.

Zygosaccharomyces rouxii dapat ditemukan pada lebah dalam jumlah yang kecil (Ganter 2006: 339--340). *Zygosaccharomyces rouxii* merupakan spesies khamir yang osmotoleran atau osmofilik (Raspor & Zupan 2006: 381; Saha *dkk.* 2007: 519).



Gambar 4.3.1 Pengamatan askospora isolat khamir dari saluran pencernaan *Apis cerana* di Apiari Desa Ciburial, dalam medium YMB 7 hari pada suhu ruang.

BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Hasil identifikasi 48 isolat-isolat khamir yang berasal dari saluran pencernaan lebah madu *Apis cerana* berdasarkan data *sequence* daerah ITS rDNA menunjukkan bahwa isolat-isolat khamir tersebut secara taksonomi beragam, termasuk ke dalam *Phylum Ascomycota* dari *Class Hemiascomycetes* dan *phylum Basidiomycota* dari *Class Urediniomycetes*. Sebagian besar spesies khamir yang diperoleh termasuk ke dalam *Phylum Ascomycota* dari *Class Hemiascomycetes* Spesies-spesies yang didapat terdiri atas delapan genus dan 16 spesies, di antaranya adalah *Candida cf. apicola*, *C. cf. azyma*, *C. etchellsii*, *C. multigemmis*, *C. naeodendra*, *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus flavescens*, *Cr. heveanensis*, *Debaryomyces rouxii*, *Kodamaea ohmeri*, *Pichia burtonii*, *Pichia farinosa*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Wickerhamomyces anomalus* dan *Zygosaccharomyces rouxii*.
2. Spesies-spesies khamir yang diperoleh dari PCB lebih banyak daripada NCB. Beberapa spesies khamir (*Candida cf. apicola*, *C. etchellsii*, *D. hansenii*, *Rh. mucilaginosa* dan *Z. rouxii*) dapat ditemukan baik pada PCB maupun NCB.
3. Pada penelitian ini keberadaan spesies baru dari saluran pencernaan *A. cerana* dapat dideteksi yaitu sebanyak 20 isolat dari total 48 isolat (42%) yang terdiri dari PCB (12 isolat) dan NCB (8 isolat).

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan pengecekan ulang *sequence* daerah ITS, baik menggunakan primer yang sama ataupun dengan menggunakan primer *reverse* (ITS4) pada isolat-isolat yang memiliki homologi *sequence* daerah ITS rDNA < 98%.
2. Perlu dilakukan analisis *sequence* daerah D1/D2 LSU untuk melengkapi data *sequence* daerah ITS rDNA.

3. Perlu dilakukan pengamatan dan karakterisasi alat reproduksi seksual (askospora) yang lebih mendalam pada spesies *D. hansenii*, *Pichia farinosa* dan *Z. rouxii* untuk melengkapi data hasil identifikasi berdasarkan analisis *sequence* daerah ITS rDNA.



DAFTAR REFERENSI

- Abliz, P., K. Fukushima, K. Takizawa & K. Nshimura. 2004. Specific oligonucleotide primers for identification of *Cladophialophora carionalis*, a causative agent of chromoblastomycosis. *J. Clin. Microbiol.* **42**(1): 404--407.
- Ahmed, Z. Optimization of PCR conditions *in vitro* for maximum amplification of DNA from *Xanthomonas campestris* 13551. *Journal of Applied Sciences Research.* **2**(3): 112--122.
- Applied Biosystems. 2001. *ABI Prism 310 genetic analyzer: User guide*. California: xiv + 8-22 hlm.
- Ba, A.S., S. A. Phillips, Jr. & J. T. Anderson. 2000. Yeasts in mound soil of the red imported fire ant. *Mycol. Res.* **104**(8) : 969--973.
- Barnett, J.A., R.W. Payne & D. Yarrow. 2000. *Yeasts: Characteristics and identification*. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge: ix + 1139 hlm.
- Barr, M.E. 2001. Ascomycota. *Dalam*: McLaughlin, D.J., E.G. McLaughlin & P.A. Lemke (eds.). 2001. *The mycota VII Part A: Systematics and evolution*. Springer-Verlag, Berlin: 161--177.
- Basukriadi, A., W. Sjamsuridzal & B.B. Putra. 2010. Molecular identification and diversity of yeast associated with *Apis cerana* foraging on flowers of *Jatropha integerrima*. *JMI*, **4**(1): 44--48.
- Black, J.G. 1999. *Microbiology principles and explorations*. John Wiley & Sons, inc., New York: xxiv + 786 hlm.
- Boekhout, T. 1998. Diagnostic descriptions and key to presently accepted heterobasidiomycetous genera. *Dalam*: Kurtzman, C.P. & J.W. Fell (eds.). 1998. *The yeasts: A taxonomic study*. 4th ed. Elsevier, Amsterdam: 627-633.
- Boekhout, T. & H.J. Phaff. 2003. Yeast biodiversity. *Dalam*: Boekhout, T. & V. Robert (eds.). 2003. *Yeast in food: Beneficial and detrimental aspects*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge: 1--38.
- Brysch-Herzberg, M. 2004. Ecology of yeasts in plant-bumblebee mutualism in Central Europe. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **50**: 87--100.

- Canadian Honey Council. 2011. Honey Bee Cooperation and Communication. 1 hlm.
http://www.honeycouncil.ca/index.php/canadianhoney_teachers, 6 Juli 2011,
 pk. 15.00.
- Cappuccino, J.G. & N. Sherman. 2002. *Micobiology: A laboratory manual*.
 Benjamin/Cummings, San Francisco: xvi + 491 hlm.
- Choudary, D.K. & B.N. Johri. 2009. Basidiomycetous yeasts: Current status. *Dalam*:
 T. Satyanarayana & G. Kunze. (eds.). 2009. *Yeast Biotechnology: Diversity
 and Applications*. Springer Science + Business Media B.V, Berlin: 19--46.
- Ciardo, D.E., G. Schär, E.C. Böttger, M. Altwegg & P.P. Bosshard. 2006. Internal
 transcribed spacer sequencing versus biochemical profiling for identification
 of medically important yeasts. *Journal of Clinical Microbiology* **44**(1): 77--
 84.
- Daniel, H-M. & W. Meyer. 2003. Evaluation of ribosomal RNA and actin gene
 sequences for the identification of ascomycetous yeasts. *International Journal
 of Food microbiology* **86**: 61--78.
- Deak, T. 2006. Environmental factors influencing yeasts. *Dalam*: Rosa, C. & G.
 Peter (eds.). 2006. *The yeast handbook: Biodiversity and ecophysiology of
 yeasts*. Springer-Verlag, Berlin: 155--174.
- Deak, T. 2008. *Handbook of food spoilage yeasts*. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton:
 xxii + 325 hlm.
- Demain, A.L., H.J. Phaff & C.P. Kurtzman. 1998. The industrial and agricultural
 significance of yeasts. *Dalam*: Kurtzman, C.P. & J.W. Fell (eds.). 1998. *The
 yeasts: A taxonomic study*. 4th ed. Elsevier, Amsterdam: 13--19.
- Fell, W., G.M. Blatt & A. Statzell-Tallman. 1998. Validation of the basidiomycetous
 yeast, *Sporidiobolus microsporus* sp. nov., based on phenotypic and
 molecular analyses. *Antonie van Leeuwenhoek*. **74**: 265--270.
- Fell, J.W., T. Boekhout, A. Fonseca & J. Sampaio. 2001. Basidiomycetous yeasts.
Dalam: McLaughlin, D.J., E.G. McLaughlin & P.A. Lemke (eds.). 2001. *The
 mycota VV Part B: Systematics and evolution*. Springer, Tokyo: 1--36.
- Ganter, P.F. 2006. Yeast and invertebrate associations. *Dalam*: Rosa, C. & G. Peter
 (eds.). 2006. *The yeast handbook: Biodiversity and ecophysiology of yeasts*.
 Springer-Verlag, Berlin: 303--370.

- Geiser, D. M. 2004. Practical fungal species recognition using molecular phylogenetics. Dalam: Watanabe, M.M., K. Suzuki & T. Seki (eds.). 2004. *Innovative roles of biological resource centers: Proceedings of the tenth international congress for cultures collections Tsukuba, Japan, 10--15 October 2004*. Japan Society for Culture Collections & World Federation for Culture Collections, Tsukuba: 89--92.
- Gilliam, M. 1979. Microbiology of pollen and bee-bread: the yeast. *Apidologie*, **10**(1): 43--53.
- Guarro, J., J. Gene & A.M. Stchigel. 1999. Development in fungal taxonomy. *Clin. Micro. Rev.* **12**(3): 454--500.
- Hall, B.G. 2001. *Phylogenetic trees made easy: A how to manual for molecular biologists*. Sinaeur Associates, Inc., Sunderland: xii + 179 hlm.
- Hamamoto, M. & T. Nakase. 2000. Phylogenetic relationships among fungi inferred from small subunit ribosomal RNA gene sequences. Dalam: Priest, F.G. & M. Goodfellow (eds.). 2000. *Applied microbial systematics*. Kluwer Academic Publisher: 57--71.
- James, S.A., M.D. Collins & I.N. Roberts. 1996. Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspota*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**(1): 189--194.
- James, S.A. & M. Stratford. 2003. Spoilage yeast with emphasis on the genus *Zygosaccharomyces*. Dalam: Boekhout, T. & V. Robert (eds.). 2003. *Yeast in food*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge: 171--191.
- Kathiresan, K. & K. Srinivasan. 2005. Making artificial honey using yeast cells from salivary glands of honey bees. *Indian Journal of Experimental Biology* **43**: 664--666.
- Katsu, M., S. Kidd, A. Ando, M.L. Moretti-Branchini, Y. Mikami, K. Nishimura & W. Meyer. 2003. The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gen show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neformans* species complex. *FEMS Yeast Res.* **1608**: 1--12.

- Kurtzman, C.P. 1990. Classification and general properties of yeasts. *Dalam:* Verachtert, H. & R. De mot (eds.). *Yeast biotechnology and biocatalysis*. Marcel Dekker, Inc., Louvain: 1--34.
- Kurtzman, C.P. 1998a. Description of teleomorphic ascomycetous genera and species: *Pichia* E.C. Hansen emend. Kurtzman. *Dalam:* Kurtzman, C.P. & J.W. Fell (eds.). 1998. *The yeasts: A taxonomic study*. 4th ed. Elsevier, Amsterdam: 273--352.
- Kurtzman, C.P. 1998b. Description of teleomorphic ascomycetous genera and species: *Zygosaccharomyces* Barker. *Dalam:* Kurtzman, C.P. & J.W. Fell (eds.). 1998. *The yeasts: A taxonomic study*. 4th ed. Elsevier, Amsterdam: 424--432.
- Kurtzman, C.P. 1998c. Description of teleomorphic ascomycetous genera and species: *Protomyces* Unger. *Dalam:* Kurtzman, C.P. & J.W. Fell (eds.). 1998. *The yeasts: A taxonomic study*. 4th ed. Elsevier, Amsterdam: 424--432.
- Kurtzman, C.P. & J. Sugiyama. 2001. Ascomycetous yeasts and yeastlike taxa. *Dalam:* McLaughlin, D.J., E.G. McLaughlin & P.A. Lemke (eds.). 2001. *The mycota VII Part A: Systematics and evolution*. Springer-Verlag, Berlin: 179--200.
- Kurtzman, C.P. & J.W. Fell. 2006. Yeast systematics and phylogeny – implications of molecular identification methods for studies in ecology. *Dalam:* Rosa, C. & G. Peter (eds.). 2006. *The yeast handbook: Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer-Verlag, Berlin: 11--30.
- Kurtzman, C.P., T. Boekhout, V. Robert, J.W. Fell & T. Deak. 2003. Methods to identify yeasts. *Dalam:* Boekhout, T. & V. Robert (eds.). 2003. *Yeasts in food*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge: 69--121.
- Lachance, M-A., J.M. Bowles, M.M.C. Diaz & D.H. Janzen. 2001. *Candida cledarium*, *Candida tilneyi*, and *Candida powellii*, three new yeast species from insects associated with flowers. *Int. J. SEM*. 51: 1201--1207.
- Lachance, M-A., J. Dobson, D.N. Wijayanayaka & A.M.E. Smith. 2010. The use of parsimony network analysis for the formal delineation of phylogenetic species of yeasts: *Candida apicola*, *Candida azyrna*, and *Candida parazyrna*

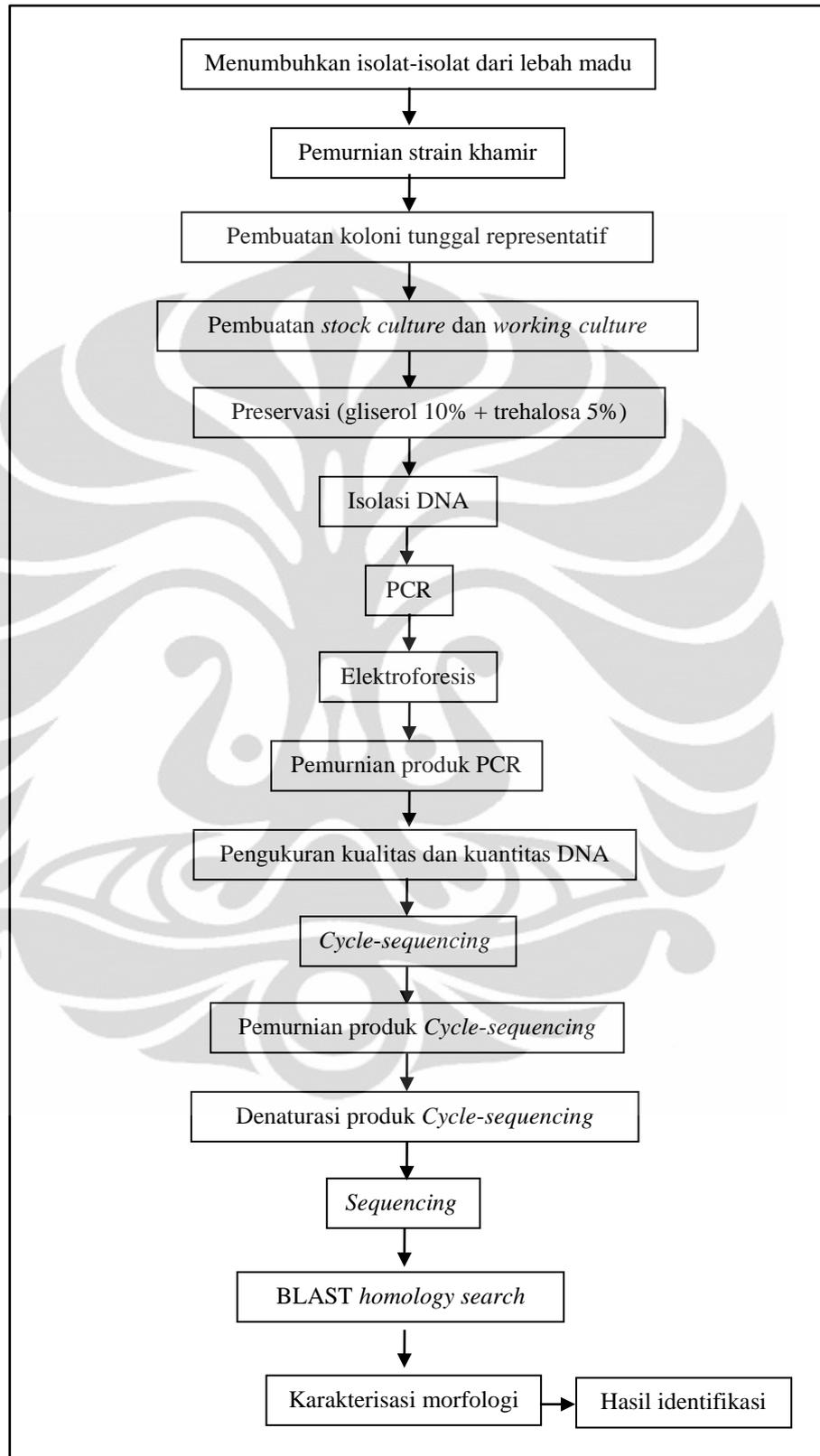
- sp. nov., cosmopolitan yeasts associated with floricolous insects. *Antonie van Leeuwenhoek*. **97**: 155--170.
- Mankowski, M.E & J.J. Morrell. 2004. Yeasts associated with the infrabuccal pocket and colonies of the carpenter ant *Camponotus vicinus*. *Mycologia*. **96**(2): 226-231.
- Meyer, S.A., R.W. Payne & D. Yarrow. 1998. Descriptions of anamorphic ascomycetous genera and species: *Candida* Berkhout. *Dalam*: Kurtzman, C.P. & J.K. Fell (eds.). 1998. *The yeast: A taxonomic study*. 4th ed. Elsevier, Amsterdam: 454--573.
- Michener, C.D. 2007. More about bees. 3 hlm.
http://www.everythingabout.net/articles/biology/animals/arthropods/insects/bees/more_bees.shtml, 15 September 2010, pk. 11.45.
- Moat, A.G., J.W. Foster & M.P. Spector. 2002. *Microbial physiology*. 4th ed. Wiley-Liss, Inc., New York: xx + 715 hlm.
- Moore, R.T. Cytology and ultrastructure of yeasts and yeastlike fungi. *Dalam*: Kurtzman, C.P. & J.K. Fell (eds.). 1998. *The yeast: A taxonomic study*. 4th ed. Elsevier, Amsterdam: 33--44.
- Mrázek, J., L. Štosová, K. Fliegerová, T. Kott & J. Kopečný. 2008. Diversity of insect intestinal microflora. *Folia Microbiol.* **53**(3): 229--233.
- Nakase, T., M. Suzuki, H.J. Phaff & C.P. Kurtzman. 1998. Description of teleomorphic ascomycetous genera and species: *Debaryomyces* Lodder dan Kreger-van Rij Nom. Cons. *Dalam*: Kurtzman, C.P. & J.W. Fell (eds.). 1998. *The yeasts: A taxonomic study*. 4th ed. Elsevier, Amsterdam: 157--173.
- Nguyen, N.H., S-O. Suh & M. Blackwell. 2007. Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from *Neuroptera* and other insects. *Mycologia* **99**(6): 842--858.
- NPCS Board of Consultants & Engineers. 2007. The complete book on beekeeping and honey processing. 50 hlm.
http://www.niir.org/books/book/zb,,136_a_0_0_a/The+Complete+Book+on+Beekeeping+and+Honey+Processing/, 17 Oktober 2010, pk. 16.30.
- Oldroyd, B.P. & S. Wongsiri. 2006. *Asian honeybee: Biology, consevation, and human interaction*. Harvard University Press, Cambridge: xv + 340 hlm.

- Phaff, H.J. 1990. Isolation of yeast from natural resources. *Dalam*: Labeda, D.P. (ed.). 1990. *Environmental biotechnology: Isolation of biotechnological organisms from nature*. McGraw-Hill Publishing Company, New York: 53--77.
- Putra, B.B. 2010. Isolasi dan identifikasi khamir dari saluran pencernaan lebah madu *Apis cerana* (Fabricius, 1793) di kampus Universitas Indonesia. Skripsi Sarjana Departemen Biologi FMIPA Universitas Indonesia: x + 72 hlm.
- Rachmayanti, N. 2010. Isolasi dan identifikasi khamir dari bunga *Jatropha integerrima* Jacq. asal kampus Universitas Indonesia, Depok. Skripsi Sarjana Departemen Biologi FMIPA Universitas Indonesia: xi + 89 hlm.
- Raspor, P. & J. Zupan. 2006. Yeasts in extreme environments. *Dalam*: Rosa, C. & G. Peter (eds.). 2006. *The yeast handbook: Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer-Verlag, Berlin: 371--417.
- Ricci, I., M. Mosca, M. Valzano, C. Damiani, P. Scuppa, P. Rossi, E. Crotti, A. Cappelli, U. Ulissi, A. Capone, F. Esposito, A. Alma, M. Mandrioli, L. Sacchi, C. Bandi, D. Daffonchio & G. Favia. 2011. Different mosquito species host *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*): perspectives on vector-borne diseasesymbiotic control. *Antonie van Leeuwenhoek*. **99**:43--50.
- Ridawati. B.S.L. Jenie, I. Djuwita & W. Sjamsuridzal. 2010. Genetic diversity of osmophilic yeasts isolated from Indonesian foods with high concentration of sugar. *Microbiol Indones*. **4**(3): 113--118.
- Rosa, C.A. & M-A. Lachance. 1998. The yeast genus *Starmerella* gen. Nov. And *Starmerella bombicola* sp. Nov., the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer, Gorin & Tullock) Meyer & Yarrow. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **48**: 1413--1417.
- Rosa, C.A., M-A. Lachance, J.O.C. Silva, A.C.P. Teixeira, M.M. Marini, Y. Antonini & R.P. Martins. 2003. Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Research*. **4**: 271--275.
- Rosilawati, M.L., P. Sudarmono & F. Ibrahim. 2002. Sensitivitas metode PCR (*Polymerase chain reaction*) dalam mendeteksi isolat klinis *Mycobacterium tuberculosis*. *J Kedokter Trisakti*. **21**(1): 7--14.

- Sambrook, J. & D.W. Russel. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xxvii +1.1--18.136 hlm.
- Sandhu, D.K. & M.K. Waraich. 1985. Yeast associated with pollinating bees and flower nectar. *Microb. Ecol.* (11): 51--58.
- Sjamsuridzal, W. 2006. Sistematika fungi. *Dalam: Roosheroe, I.G. & W. Sjamsuridzal & A. Oetari (eds.). 2006. Mikologi: Dasar dan terapan.* Yayasan Obor Indonesia, Jakarta: 68--91.
- Sjamsuridzal, W. 2008. Workshop on rapid identification of yeasts by molecular method and the use of bioinformatics tools for phylogenetic analysis. Center of Excellence Indigenous Biological Resources-Genome Studies, Depok: 42 hlm.
- Sjamsuridzal, W. & A. Oetari. 2003. Rapid preparation on fungal and bacterial genomic DNA for PCR. *Hayati*. **10**(3): 122--124.
- Spencer, J.F.T. & D.M. Spencer. 1997a. Ecology: Where yeasts live. *Dalam: Spencer, J.F.T. & D.M. Spencer. 1997. Yeasts in natural and artificial habitats.* Springer-Verlag, Berlin: 33--58.
- Spencer, J.F.T. & D.M. Spencer. 1997b. Outside and inside: The morphology and cytology of the yeast cell. *Dalam: Spencer, J.F.T. & D.M. Spencer. 1997. Yeasts in natural and artificial habitats.* Springer-Verlag, Berlin: 80--94.
- Starr, C. & R. Taggart. 2004. *Biology: The unity and diversity of life*. 10th ed. Brooks/Cole-Thomson Learning, Belmont: xxv + 1022 hlm.
- Sugita, T., A. Nishikawa, R. Ikeda & T. Shinoda. 1999. Identification of medically relevant Trichosporon species based on sequences of internal transcribed spacers regions and construction of database of Trichosporon identification. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 1985--1993.
- Suh, S-O., C.M. Gibson & M. Blackwell. 2004. *Metschnikowia chrysoperlae* sp. Nov., *Candida picachoensis* sp. Nov. And *Candida pimensis* sp. Nov., isolated from the green lacewings *Chrysoperla comanche* and *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **54**: 1883--1890.

- Tanaka, H., D.W. Roubik, M. Kato, F. Liew & G. Gunsalam. 2001. Phylogenetic position of *Apis nuluensis* of northern Borneo and phylogeography of *A. Cerana* as inferred from mitochondrial DNA sequences. *Insectes soc.* **48**: 44-51.
- Teixeira, A.C.P., M.M. Marini, J.R. Nicoli, Y. Antonini, R.P. Martins, M-A. Lachance & C.A. Rosa. 2003. *Starmerella meliponinorum* sp. Nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 339--343.
- Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. *Dalam*: Kurtzman, C.P. & J.W. Fell (eds.). 1998. *The yeasts: A taxonomic study*. 4th ed. Elsevier, Amsterdam: 77--100.
- Zacchi, L. & A Vaughan-Martini. 2002. Yeasts associated with insects in agricultural areas of Perugia, Italy. *Ann. Microbiol.* **52**: 237--244.

Lampiran 1. Skema kerja penelitian



Lampiran 2. Tahapan kerja identifikasi molekuler

