



UNIVERSITAS INDONESIA

**PEMBUATAN DAN PEMBERIAN *POLLEN SUBSTITUTE*
MENGUNAKAN *Debaryomyces hansenii* CR133 SEBAGAI
PAKAN TAMBAHAN *Apis cerana* FABRICIUS**

SKRIPSI

ESTRININGTYAS AGUS RISMAWANTI

0706263826

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

DEPARTEMEN BIOLOGI

DEPOK

JULI 2011



UNIVERSITAS INDONESIA

**PEMBUATAN DAN PEMBERIAN *POLLEN SUBSTITUTE*
MENGUNAKAN *Debaryomyces hansenii* CR133 SEBAGAI
PAKAN TAMBAHAN *Apis cerana* FABRICIUS**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

ESTRINGTYAS AGUS RISMAWANTI

0706263826

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 : Estriningtyas Agus Rismawanti

NPM : 0706263826

Tanda Tangan : 

Tanggal : 13 Juli 2011


HALAMAN PENGESAHAN


Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Estriningtyas Agus Rismawanti
NPM : 0706263826
Program Studi : Biologi
Judul Skripsi : Pembuatan dan Pemberian *Pollen Substitute* Menggunakan *Debaryomyces hansenii* CR133 sebagai Pakan Tambahan *Apis cerana* Fabricius


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

Pembimbing II : Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D ()

Penguji I : Ariyanti Oetari, Ph.D ()

Penguji II : Drs. Wisnu Wardhana, M. Si ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 13 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains, Jurusan Biologi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Penulis menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Adi Basukriadi, M. Sc. dan Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D., selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran, serta telah memberi bimbingan, motivasi, perhatian, dan kesabaran selama penelitian hingga tersusunnya skripsi ini;
2. Hibah Kompetitif Penelitian Strategis Nasional Dikti TA 2010 atas nama Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D, yang telah membiayai Penulis selama melakukan penelitian;
3. Ariyanti Oetari, Ph.D. dan Drs. Wisnu Wardhana, M. Si., selaku dosen penguji yang memberikan saran dan masukan sehingga penelitian ini menjadi lebih baik;
4. Dr. rer. nat. Mufti Petala Patria, M. Sc., selaku Ketua Departemen Biologi dan Penasehat Akademis, Dra. Nining Betawati Prihantini, M. Sc., selaku Sekretaris Departemen Biologi, serta Dra. Titi Soedjiati, S. U., selaku Koordinator Pendidikan Departemen Biologi, dan kepada seluruh staf pengajar Departemen Biologi FMIPA UI atas bekal ilmu yang diberikan;
5. Mba Asri, Pak Taryana, Pak Taryono, Bu Ida, dan seluruh karyawan Departemen Biologi FMIPA UI atas semua bantuan yang diberikan;
6. Kedua orang tua tersayang Riswandi dan Riyati yang telah memberi dukungan moral dan materi, kasih sayang, pengertian, semangat, dan pengorbanan sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian hingga pembuatan skripsi ini.
7. Saudara-saudaraku tersayang, Ariyadi Zeni Purwanto, Budiarini Dwi Herowati, Dhian Catur Witasari dan Christiani Tri Hastuti, atas do'a,

dukungan, kasih sayang, dan semangat serta kebersamaan yang diberikan kepada penulis;

8. Rekan satu TIM Virgine Enfinali, Ibu Retno W., dan Bregas Adi Luhur yang selalu bersama, membantu penulis, memberikan semangat, dukungan, dan pengertian selama penelitian dan penulisan skripsi ini;
9. Sahabat yang selalu memberi dukungan dan kasih sayang hingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi, Arty Dwi Januari, Ade Tri Aryani, Putri Imora, Nanda Nugraheni S., dan Rina Apriliani S.;
10. Sahabat di Laboratorium Mikrobiologi yang senantiasa membantu penulis dalam penelitian maupun penulisan skripsi serta memberi semangat; Dachniar, Diana, Mora, Fahreza, Bama, Doni, Kirana, Galuh, Rendi, Ken, Kak Ovin, Kak Novia, Mba Reno, dan Mba Lia;
11. Bapak Ahmad Supriadi, Bapak Aepudin, dan Bapak Ita yang telah banyak membantu dalam penelitian dan usaha memperoleh data yang penulis perlukan di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA-UI dan Peternakan Lebah Ciburial, Bandung;
12. Teman-teman kerja praktek di Laboratorium Mikrobiologi, terutama kepada CITRUS (Rizki, Nova, Rusli, dan Sentot), yang telah banyak membantu penelitian penulis, DIVAS, DEMON, dan CANNON yang telah memberi dukungan kepada penulis;
13. Teman-teman di Departemen Biologi khususnya BLOSSOM '07, teman-teman dari PERHIMAK UI, dan kepada Anjar, Eska, Fitri, Terry, Rina, Rini, Nela, Ria, Andi, Tyas, Kak Zizah, Ozi, dan Ica yang telah memberikan bantuan, semangat dan perhatian kepada penulis.
14. Semua pihak yang telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi.

Akhir kata, penulis berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Depok, 15 Juli 2011

Penulis

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

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

Nama : Estriningtyas Agus Rismawanti
NPM : 0706273826
Program Studi : S1
Departemen : Biologi
Fekultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

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

Pembuatan dan Pemberian *Pollen Substitute* Menggunakan *Debaryomyces hansenii* CR133 sebagai Pakan Tambahan *Apis cerana* Fabricius

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan 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



(Estriningtyas Agus Rismawanti)

ABSTRAK

Nama : Estriningtyas Agus Rismawanti
Program Studi : Biologi S1
Judul : Pembuatan dan Pemberian *Pollen Substitute* Menggunakan
Debaryomyces hansenii CR133 sebagai Pakan Tambahan
Apis cerana Fabricius

Penelitian bertujuan membuat *pollen substitute* (PS) yang disukai dan dapat meningkatkan produktivitas lebah madu *A. cerana*. *Pollen substitute* dibuat dengan bahan dasar tepung kedelai dan susu skim. Pada penelitian ini *A. cerana* diberikan tiga macam *pollen substitute*, yaitu PS A (mengandung bahan dasar, *Debaryomyces hansenii* CR133, madu); PS B (mengandung bahan dasar, sirup gula); PS C (mengandung bahan dasar, madu). Pemberian PS selama 20 hari, dan lebah dibiarkan mencari serbuk sari dan nektar di alam. Koloni kontrol tidak diberi PS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa PS yang dibuat memenuhi kriteria sebagai PS yang baik. *Apis cerana* menyukai PS A dan PS C dengan tingkat konsumsi yang lebih tinggi dibandingkan PS B. Pemberian semua jenis PS meningkatkan keliling (0,3--4,5 cm per hari) dan jumlah *honeycomb*. Pada kontrol terdapat kenaikan keliling *honeycomb* (0,2--0,5 cm per hari), namun tidak ada penambahan jumlah *honeycomb*. Secara umum, lebah pekerja yang diberi PS dan kontrol mengalami kenaikan berat badan (5--56,94%).

Kata kunci:

Pollen substitute, *Apis cerana*, *Debaryomyces hansenii* CR133, lebah madu

ABSTRACT

Name : Estriningtyas Agus Rismawanti
Program Study : S1 Biology
Title : Preparation of the Pollen Substitute Made of *Debaryomyces hansenii* CR133 and Its Uses as a Feed Supplement to *Apis cerana* Fabricius

The research aimed to make pollen substitutes preferred by and increase the productivity of *A. cerana*. Basic ingredients of pollen substitutes (PS) were soy flour and skim milk. There were three types of pollen substitutes, i.e. PS A (contained basic ingredients, *Debaryomyces hansenii* CR133, honey); PS B (basic ingredients, sugar syrup); and PS C (basic ingredients, honey). The pollen substitutes were fed to colonies of *A. cerana* for 20 days, but they were allowed to forage on flowers. No PS was given to the control colonies. The results showed that *A. cerana* preferred PS A and PS C to PS B. Increases of circumference and number of honeycombs were observed in colonies fed with all types of PSs (0,3--4,5 cm/day). There was an increase of the circumference of honeycombs in the control (0,2--0,5 cm/day), but there was no addition of new honeycomb. Generally, the weight of individual worker bees increased in colonies fed with PSs and control (5--56,94%).

Key words:

Apis cerana, *Debaryomyces hansenii* CR133, honeybee, pollen substitute, yeast

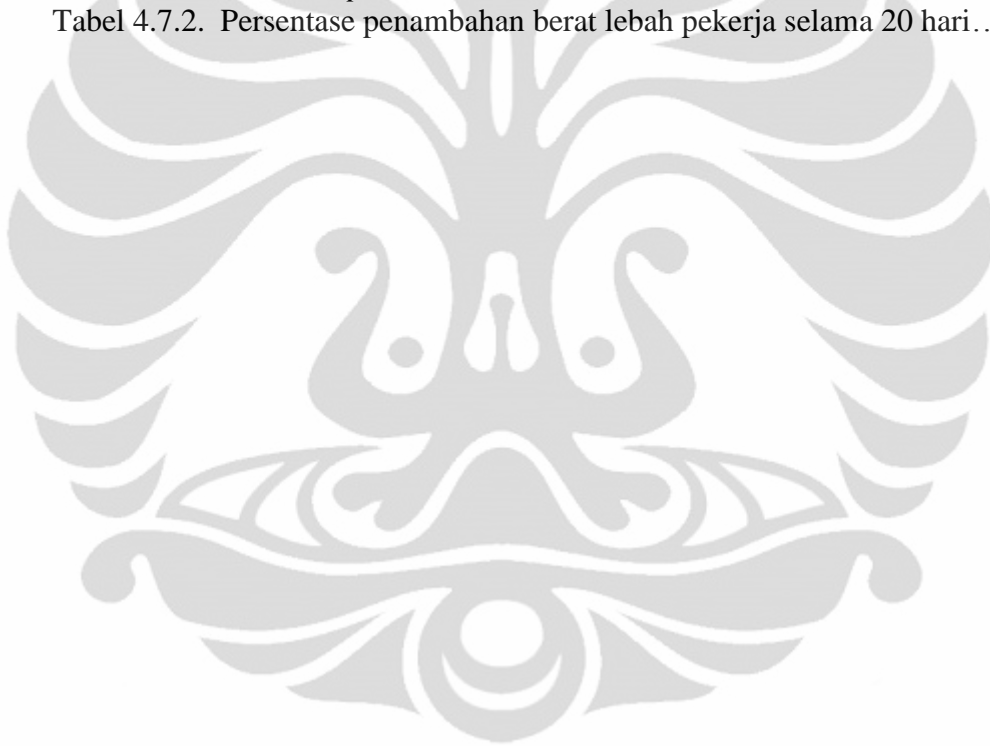
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
1. PENDAHULUAN.....	1
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Khamir.....	5
2.1.1. Ciri-ciri umum.....	5
2.1.2. <i>Debaryomyces hansenii</i>	6
2.2. Lebah Madu.....	7
2.2.1. <i>Apis cerana</i>	7
2.2.2. Manfaat serbuk sari bagi lebah madu.....	10
2.2.3. Budidaya lebah madu di Indonesia.....	12
2.3. Interaksi antara Khamir, Lebah Madu <i>Apis cerana</i> , dan Bunga yang Dikunjunginya.....	14
2.4. <i>Pollen substitute</i>	15
2.4.1. <i>Pollen substitute</i>	15
2.4.2. Pembuatan <i>pollen substitute</i>	16
3. METODOLOGI PENELITIAN.....	20
3.1. Lokasi dan Waktu.....	20
3.2. Alat.....	20
3.3. Bahan.....	20
3.3.1. Koloni lebah madu dan lokasi peternakan.....	20
3.3.2. Mikroorganisme.....	21
3.3.3. Medium.....	21
3.3.4. Bahan kimia.....	21
3.3.5. Bahan habis pakai.....	21
3.4. Cara Kerja.....	21
3.4.1. Pembuatan medium.....	22
3.4.1.1. <i>Yeast Malt Agar</i> (YMA).....	22
3.4.1.2. <i>Yeast Malt Broth</i> (YMB).....	22
3.4.1.3. <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA).....	23
3.4.1.4. <i>Plate Count Agar</i> (PCA).....	23
3.4.2. Pemurnian isolat khamir dari <i>stock culture</i>	23
3.4.3. Pemeliharaan biakan khamir.....	24

3.4.4	Pengamatan morfologi khamir <i>Debaryomyces hansenii</i> CR133.....	25
3.4.5	Penghitungan jumlah sel <i>Debaryomyces hansenii</i> CR133 dengan metode TPC (<i>Total Plate Count</i>).....	25
3.4.6	Produksi biomassa kering <i>Debaryomyces hansenii</i> CR133.....	26
3.4.7	Pembuatan tepung kedelai rendah lemak.....	27
3.4.8	<i>Pollen substitute</i>	29
3.4.8.1	Pembuatan <i>pollen substitute</i>	29
3.4.8.2	Analisis komposisi kimia <i>pollen substitute</i>	30
3.4.9	Persiapan koloni lebah madu.....	30
3.4.10	Pemberian pakan <i>A. cerana</i>	31
3.4.11	Pengamatan konsumsi pakan lebah madu <i>A. cerana</i>	32
3.4.12	Pengamatan produktivitas lebah madu <i>A. cerana</i>	33
3.4.12.1	Penambahan jumlah dan keliling <i>honeycomb</i>	33
3.4.12.2	Berat lebah pekerja.....	30
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	35
4.1.	Pengamatan Morfologi <i>Debaryomyces hansenii</i> CR133.....	35
4.2.	Penghitungan Sel <i>Debaryomyces hansenii</i> CR133 dengan Metode Total Plate Count.....	37
4.3.	Produksi Biomassa Kering <i>Debaryomyces hansenii</i> CR133.....	37
4.4.	Pembuatan Tepung Kedelai Rendah Lemak.....	39
4.5.	Pembuatan <i>Pollen substitute</i>	40
4.6.	Pengamatan Konsumsi Pakan Lebah Madu <i>A. cerana</i>	42
4.7.	Pengamatan Produktivitas Lebah madu <i>A. cerana</i>	45
4.7.1.	Penambahan jumlah dan keliling <i>honeycomb</i>	45
4.7.2.	Berat lebah pekerja.....	49
5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	53
5.1.	Kesimpulan.....	53
5.2.	Saran.....	54
	DAFTAR REFERENSI.....	55

DAFTAR TABEL

Tabel 4.2.	Hasil Total Plate Count (TPC) isolat <i>Debaryomyces hansenii</i> CR133 berumur 3 hari pada medium PCA (<i>Plate Count Agar</i>).....	37
Tabel 4.3.	Hasil pembuatan biomassa <i>Debaryomyces hansenii</i> CR133 dari fermentasi pada 500 ml medium YMB.....	38
Tabel 4.4.	Perbandingan kadar lemak, protein dan komponen lain dari tepung kedelai sebelum dan setelah diekstraksi dengan heksan.....	40
Tabel 4.5.	Perbandingan kadar lemak, protein, dan komponen lain dari <i>pollen substitute</i> A dan bahan dasar <i>pollen substitute</i>	41
Tabel 4.7.1.	Penambahan jumlah dan keliling honey comb sebelum dan setelah diberikan <i>pollen substitute</i>	47
Tabel 4.7.2.	Persentase penambahan berat lebah pekerja selama 20 hari.....	49



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.2.1.	Lebah ratu, lebah pekerja, dan lebah jantan <i>Apis mellifera</i>	8
Gambar 2.2.1.2.	Morfologi lebah madu.....	8
Gambar 2.2.2.	Sepuluh asam amino esensial yang diperlukan oleh lebah.....	11
Gambar 2.2.3.1.	Pembudidayaan lebah madu <i>Apis cerana</i> di Desa Ciburial Bandung, Jawa Barat.....	12
Gambar 2.2.3.1.	Kotak sarang pada budidaya <i>Apis mellifera</i> dan <i>Apis cerana</i>	13
Gambar 2.1.2.	Bunga <i>Widelia trilobata</i> (L.) Hitchc yang dikunjungi lebah madu <i>A. cerana</i>	15
Gambar 3.4.2.	Metode <i>four quadrant streak plate</i>	24
Gambar 3.4.6.	Pengeringan biomassa khamir dengan metode <i>freeze-dryer</i> (liofilisasi).....	28
Gambar 3.4.7.	Pembuatan tepung kedelai rendah lemak.....	29
Gambar 4.1.1	<i>Debaryomyces hansenii</i> CR133; A. Pertumbuhan pada medium padat YMA, B. Pertumbuhan pada medium cair YMB.....	36
Gambar 4.1.2.	Pengamatan morfologi <i>Debaryomyces hansenii</i> CR133	36
Gambar 4.3.	Biomassa basah <i>Debaryomyces hansenii</i> CR133 dalam medium YMB	39
Gambar 4.6.1.	Letak pemberian <i>pollen substitute</i>	42
Gambar 4.6.2.	Grafik persentase kesukaan <i>Apis cerana</i> terhadap <i>pollen substitute</i> yang diberikan selama 20 hari.....	43
Gambar 4.7.1.	Penambahan keliling <i>honeycomb</i> rata-rata per hari dari setiap perlakuan dibandingkan dengan kontrol	47
Gambar 4.7.2.	Kenaikan berat lebah pekerja rata-rata/ekor/hari pada <i>Apis cerana</i>	51

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Tingkat Konsumsi Lebah Madu <i>Apis cerana</i> terhadap <i>pollen substitute A</i>	61
Lampiran 2. Tingkat Konsumsi Lebah Madu <i>Apis cerana</i> terhadap <i>pollen substitute B</i>	63
Lampiran 3. Tingkat Konsumsi Lebah Madu <i>Apis cerana</i> terhadap <i>pollen substitute C</i>	65
Lampiran 4. Pengukuran Suhu dan Kelembaban selama 20 hari.....	67
Lampiran 5. Peningkatan Berat Lebah Pekerja.....	68
Lampiran 6. Hasil Analisis Anova dengan Software SPSS pada Data Konsumsi Lebah madu <i>Apis cerana</i> terhadap <i>pollen substitute</i> yang diberikan.....	69
Lampiran 7. Skema Kerja Penelitian	72
Lampiran 8. Skema Kerja Enumerasi dan Pembuatan biomassa kering.....	73
Lampiran 9. Skema kerja pembuatan <i>pollen substitute</i> dan Pemberian <i>pollen substitute</i> pada koloni <i>A. cerana</i>	74
Lampiran 10. Gambar.....	75

BAB 1 PENDAHULUAN

Serbuk sari, nektar, dan air dibutuhkan lebah madu untuk menjaga kelangsungan hidupnya. Nektar merupakan sumber karbohidrat, sedangkan serbuk sari merupakan sumber protein, asam amino, lipid, vitamin, dan mineral bagi lebah madu. Nektar dikumpulkan oleh lebah pekerja di dalam *honey sac*. Sebagian dari nektar yang dikumpulkan disimpan di dalam *honeycomb* untuk diubah menjadi madu yang merupakan cadangan makanan (Somerville 2000: 1--2). Serbuk sari dikumpulkan oleh lebah dalam *pollen basket* dan sebagian disimpan di dalam *honeycomb* untuk diubah menjadi *bee bread* (Gilliam 1979: 43).

Koloni lebah madu membutuhkan protein dan asam amino dari serbuk sari untuk pertumbuhan dan perkembangannya. Kandungan protein minimal yang dibutuhkan oleh lebah madu untuk memproduksi madu secara optimum adalah 20%, sedangkan asam amino esensial dari serbuk sari yang dibutuhkan lebah madu ada 10 jenis. Kandungan protein dan asam amino esensial dari serbuk sari setiap jenis tanaman bervariasi, sehingga untuk memenuhi kebutuhan protein dan asam amino esensial, lebah madu mengumpulkan serbuk sari dari berbagai jenis bunga (Somerville 2000: 2). Kualitas dan kuantitas serbuk sari menentukan perkembangan dan kondisi kesehatan koloni lebah madu, terutama untuk perkembangan larva, jumlah telur, dan produktivitas koloni (DeGrandi-Hoffman *dkk.* 2008: 266).

Ketersediaan serbuk sari tergantung pada musim bunga. Terlambatnya musim berbunga karena anomali cuaca dan perubahan iklim menyebabkan ketersediaan serbuk sari terbatas. Keterbatasan serbuk sari yang diperoleh dapat mengakibatkan lebah pergi meninggalkan sarangnya atau mingga (*abscond*), koloni melemah, dan rentan terhadap predator (Prakash *dkk.* 2007: 155). Salah satu cara untuk mengatasi kelangkaan serbuk sari adalah membuat pakan pengganti serbuk sari (*pollen substitute*) (DeGrandi-Hoffman *dkk.* 2008: 266).

Penelitian mengenai *pollen substitute* telah banyak dilakukan sejak puluhan tahun yang lalu. Haydak (1957: 90) meneliti komposisi *pollen substitute*

yang dapat menggantikan serbuk sari dengan kandungan protein yang tinggi. Menurut Haydak (1967: 4), komposisi *pollen substitute* yang terbaik adalah tepung kedelai, biomassa kering khamir, dan susu skim bubuk. Komposisi asam amino *pollen substitute* dari ketiga bahan tersebut saling melengkapi kebutuhan asam amino esensial lebah madu.

Sebagai bahan *pollen substitute*, tepung kedelai memiliki kandungan protein yang tinggi (sekitar 50 %) dan merupakan bahan alami yang murah. Namun demikian, tepung kedelai mengandung lemak dengan konsentrasi yang tinggi (15%) (Somerville 2000: 6). Lemak dengan konsentrasi yang tinggi lebih disukai oleh lebah madu, namun menyebabkan konsumsi lebah madu terhadap protein menurun. Berkurangnya jumlah protein yang dikonsumsi menyebabkan pertumbuhan koloni lebah madu terhambat dan dapat mengurangi lama hidup (*longevity*) lebah madu (Manning 2008: 81). Somerville (2000: 6) menyarankan kandungan lemak pada tepung kedelai yang digunakan untuk *pollen substitute* tidak melebihi 7 %.

Bahan alami kaya protein selain tepung kedelai yang umum digunakan dalam *pollen substitute* adalah khamir. Khamir mengandung protein, asam amino, dan vitamin B kompleks. Vitamin B kompleks berperan dalam perkembangan kelenjar *hypopharyngeal* pada lebah madu (Somerville 2005: 30). Kelenjar *hypopharyngeal* lebah madu menghasilkan *royal jelly* yang berperan sebagai nutrisi bagi larva lebah madu (Manning 2008: 4). Namun demikian, campuran tepung kedelai dan biomassa kering khamir tidak mencukupi kebutuhan protein lebah madu. Oleh karena itu, diperlukan penambahan susu skim untuk mendapatkan kualitas protein yang baik (Haydak 1957: 90).

Penelitian mengenai pemberian *pollen substitute* kepada lebah madu lebih banyak dilaporkan pada *Apis mellifera* Linnaeus dibandingkan *A. cerana* Fabricius. Informasi mengenai pemberian *pollen substitute* kepada *A. cerana* masih sangat terbatas. Hal tersebut disebabkan karena budidaya dan penyebaran *A. mellifera* lebih luas dibandingkan dengan *Apis cerana* (Sihombing 2005: 10). Penelitian terhadap *A. cerana* perlu dilakukan karena terdesaknya kawasan yang dihuni *A. cerana* oleh lebah introduksi *A. mellifera*. Peningkatan produktivitas dan

sifat mudah minggat akibat kurangnya ketersediaan serbuk sari dapat diatasi dengan pemberian *pollen substitute*.

Pemberian *pollen substitute* sebagai pakan lebah madu sudah umum dilakukan di luar negeri, namun di Indonesia belum banyak dilaporkan. Penelitian pemberian *pollen substitute* (mengandung tepung kedelai, susu skim, dan biomassa kering khamir) kepada *Apis mellifera* telah dilaporkan oleh Haydak (1967: 4), akan tetapi pemberian *pollen substitute* tersebut kepada *A. cerana* belum pernah dilaporkan. Agustina (2008) melaporkan pemberian *pollen substitute* mengandung kacang kedelai, kacang merah, dan kacang hijau, yang ditambahkan vitamin B kompleks dan sirup gula kepada *A. mellifera*. Namun demikian, pemberian *pollen substitute* tersebut tidak meningkatkan produktivitas *A. mellifera*. Krisnawati (2003: 10--20) melaporkan pemberian *pollen supplement* (mengandung tepung kedelai, tepung biji randu, dan bekatul yang ditambahkan serbuk sari jagung, dan sirup gula) yang ditambahkan ragi kepada *A. cerana*, namun hasilnya pemberian *pollen substitute* tidak lebih baik dari serbuk sari alami. Pemberian *pollen substitute* yang dapat meningkatkan produktivitas *A. cerana* belum dilakukan di Indonesia. Pemberian *pollen substitute* menggunakan khamir yang berasal dari saluran pencernaan lebah madu *A. cerana* belum pernah dilaporkan sebelumnya.

Pada penelitian ini, *pollen substitute* dibuat menggunakan khamir lokal *Debaryomyces hansenii* CR133 koleksi *University of Indonesia Culture Collection* (UICC). Khamir *D. hansenii* CR133 adalah isolat khamir dari saluran pencernaan lebah madu *A. cerana* yang mengumpulkan nektar (*nectar collecting bee*, *NCB*) di Desa Ciburial, Bandung. *Debaryomyces hansenii* CR133 telah diisolasi dan diidentifikasi oleh Basukriadi *dkk.* (2010: 46).

DeGrandi-Hofman *dkk.* (2009: 583--584) melaporkan bahwa mikroorganisme, termasuk khamir, yang terdapat pada lebah madu berperan penting dalam memberikan nutrisi dan menjaga kesehatan lebah madu. *Pollen substitute* yang mengandung khamir lokal dari saluran pencernaan lebah madu diharapkan akan disukai oleh *A. cerana* dan dapat meningkatkan produktivitasnya. *Pollen substitute* yang akan dibuat dengan bahan dasar tepung kedelai rendah lemak dan susu skim ada tiga macam, yaitu PS A yang mengandung bahan dasar,

Debaryomyces hansenii CR133 dan madu; PS B yang mengandung bahan dasar dan sirup gula; PS C yang mengandung bahan dasar dan madu. Menurut Campana dan Moeller (1977: 40) preferensi atau kesukaan koloni lebah madu terhadap pakan tertentu ditunjukkan oleh jumlah pakan yang dikonsumsi per hari.

Tujuan penelitian adalah membuat *pollen substitute* yang disukai dan diharapkan dapat meningkatkan produktivitas *A. cerana*. Dalam penelitian ini, *pollen substitute* yang disukai oleh koloni lebah madu adalah yang banyak dikonsumsi. Peningkatan produktivitas diukur melalui peningkatan jumlah dan keliling *honeycomb*, serta peningkatan berat lebah pekerja.

Hasil penelitian diharapkan dapat membuat *pollen substitute* yang dapat digunakan oleh peternak lebah madu, terutama ketika mengalami krisis serbuk sari di alam. *Pollen substitute* yang dihasilkan dapat membantu peternak lebah madu di Indonesia dalam mengembangkan koloni dan meningkatkan produktivitas lebah madu lokal. Selain itu, pemberian *pollen substitute* diharapkan dapat melindungi keberadaan jenis lebah madu *Apis cerana* dan lebah madu lokal lainnya di Indonesia dalam upaya konservasi sumber daya hayati *indigenous*.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Khamir

2.1.1. Ciri-ciri umum

Fungi merupakan organisme eukariot yang tidak berklorofil dan bersifat heterotrof. Berdasarkan karakter morfologinya fungi dibagi menjadi tiga, yaitu khamir (*yeast*), kapang (*moulds*), dan cendawan (*mushrooms*). Kapang merupakan fungi multiseluler yang memiliki struktur seperti benang atau filamen yang disebut hifa. Kapang disebut juga fungi yang berfilamen. Cendawan merupakan fungi yang memiliki tubuh buah yang berukuran makroskopik, sedangkan khamir merupakan fungi uniseluler (Tortora *dkk.* 2010: 331).

Kingdom fungi diklasifikasikan ke dalam 5 phylum yaitu, *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*, dan *Glomeromycota*. Phylum *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, dan *Glomeromycota* tergolong ke dalam fungi tingkat rendah (*lower fungi*), sedangkan kingdom *Ascomycota* dan *Basidiomycota* tergolong ke dalam fungi tingkat tinggi (*higher fungi*) (Mueller *dkk.* 2004: 10--17; Webster dan Weber 2007: 221).

Khamir termasuk ke dalam fungi tingkat tinggi yang terdiri dari phylum *Ascomycota* dan *Basidiomycota*. Fungi *Ascomycota* menghasilkan spora seksual yang berada di dalam *ascus*. Spora seksual yang dihasilkan *Ascomycota* disebut *ascospore*. Fungi *Basidiomycota* menghasilkan spora seksual yang disebut *basidiospore*. *Basidiospore* dihasilkan oleh basidium dan berada di luar basidium (Tortora *dkk.* 2010: 334--335).

Khamir disebut bersifat dimorfik apabila memiliki dua fase dalam siklus hidupnya, yaitu fase hifa (membentuk hifa, multiseluler) dan fase khamir (berbentuk sel tunggal, uniseluler) (Talaro 2009: 134). Khamir dapat membentuk hifa/miselium palsu (*pseudohypha*) yang disebut *pseudomycelium*. *Pseudomycelium* adalah sel-sel khamir yang menghasilkan sel anak (tunas) tetapi

tidak melepaskan diri dari sel induknya, sehingga saling berhubungan membentuk rantai (Webster dan Weber 2007: 3).

Khamir dapat hidup pada lingkungan dengan kadar oksigen rendah (fakultatif anaerobik) (Tortora *dkk.* 2010: 98 dan 332). Morfologi sel khamir dapat berbentuk *globose*, *subglobose*, *elips*, oval, silindris, bola, *baciliform*, *lunate*, atau *triangular*. Bentuk reproduksi aseksual sel khamir dapat berupa *budding*, *fission*, *ballistospore*, *arthroconidia*, *pseudomycelium*, *true mycelium*, dan sterigmata. *Budding* dapat dibedakan berdasarkan posisi munculnya, yaitu: monopolar jika tunas muncul pada satu kutub sel, bipolar jika tunas muncul di kedua kutub sel, dan multilateral atau multipolar jika tunas muncul dari bagian lateral pada sel (Kurtzman dan Fell 1998: 80--81).

2.1.2. *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder dan Kreger-van Rij (1952)

Debaryomyces hansenii memiliki nama lain *Torulopsis famata* (Harrison) S. A. Meyer dan Yarrow dan *Torulaspora hansenii* (Zopf) Van der Walt dan Johannsen. *Debaryomyces hansenii* memiliki koloni berwarna putih hingga krem, bertekstur *butyrous* (seperti mentega), dan bereproduksi aseksual dengan *budding*, dan bereproduksi aseksual dengan menghasilkan askospora (*ascospores*). Askospora dihasilkan di dalam askus, pada *D. hansenii* di dalam satu askus umumnya terdapat satu spora yang berbentuk bulat (*spheroidal*). Dinding sel *Debaryomyces hansenii* terdiri atas mannosa dan glukosa. Khamir tersebut menghasilkan enzim-enzim yang dapat mendegradasi berbagai jenis substrat, antara lain proteolitik dan lipolitik. Sumber gula yang dapat difermentasi oleh *D. hansenii* adalah glukosa, maltosa, sukrosa, trehalosa, melibiosa, dan raffinosa (Barnett *dkk.* 2000: 242--243).

Debaryomyces hansenii merupakan khamir yang tahan terhadap lingkungan dengan kadar garam tinggi dan pH rendah, osmotoleran, dan tahan terhadap penyimpanan pada suhu rendah (kriopreservasi). Spesies tersebut dapat menggunakan asam laktat dan asam sitrat (EMBL-EBI 2011: 1). Kemampuan *D. hansenii* yang tahan terhadap kondisi kadar garam tinggi menyebabkan *D. hansenii* memiliki komposisi membran dengan fluiditas yang lebih tinggi.

Universitas Indonesia

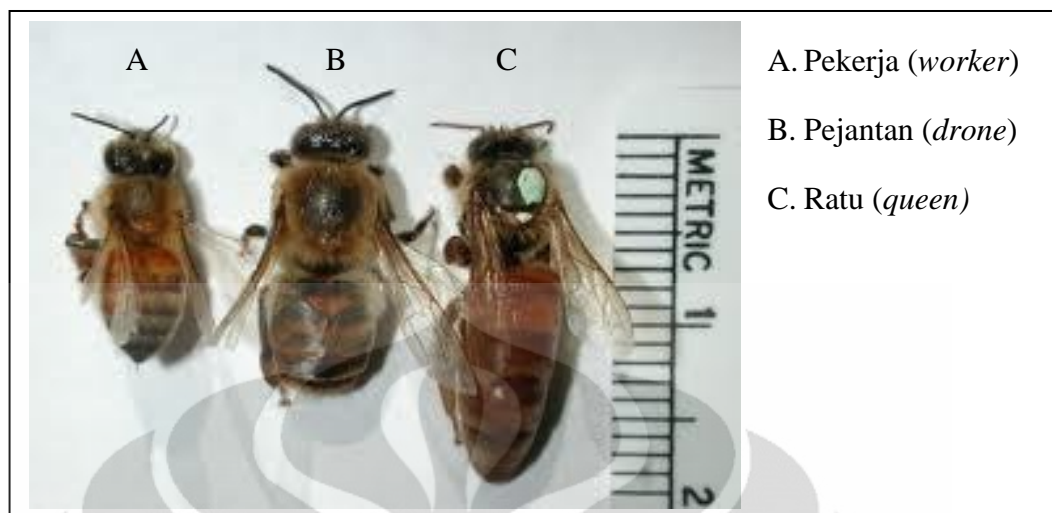
Membran plasma *D. hansenii* pada lingkungan berkadar garam tinggi memiliki komposisi fosfolipid, sterol, dan asam lemak yang tinggi (Turk *dkk.* 2007: 3591--3592). *Debaryomyces hansenii* merupakan fungi non-patogenik (EMBL-EBI 2011:1).

2.2. Lebah Madu

2.2.1. *Apis cerana* (Fabricius, 1793)

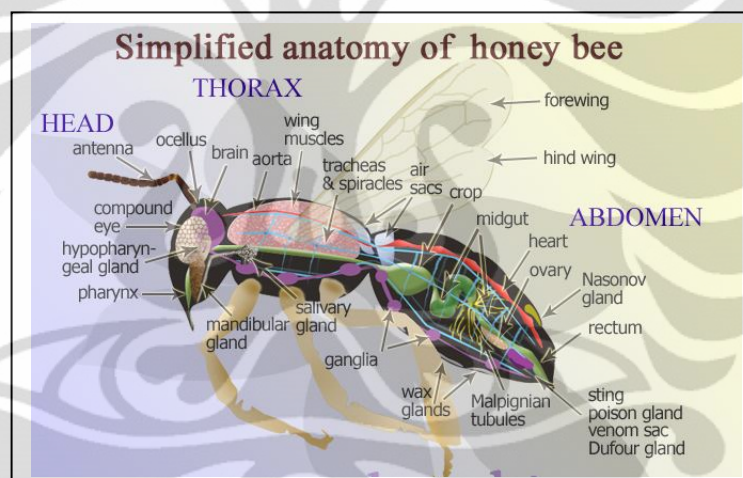
Lebah madu adalah serangga sosial yang hidup berkoloni. Koloni lebah madu memiliki tiga kasta, yaitu ratu (*queen*), lebah pekerja (*worker*), dan lebah jantan (*drone*) (Gambar 2.2.1.1). Lebah pekerja memiliki pembagian tugas berdasarkan umur individu. Lebah yang masih muda bertugas membersihkan sel, merawat dan memberi makan larva, serta membuat *honeycomb* (sisir madu). Ketika lebah semakin tua, aktivitasnya berubah dari lebah perawat (*nurse bee*) menjadi lebah pengumpul madu dan nektar. Lebah pekerja memiliki struktur tubuh yang menunjang pekerjaannya (Gambar 2.2.1.2) (Oldroyd dan Wongsiri 2006: 1 dan 14). Lebah perawat menghasilkan *royal jelly* dari kelenjar *hypopharyngeal* (1998: 1288). Lebah pembuat *honeycomb* memiliki kelenjar penghasil malam (*wax*) (Sihombing 2005: 66). Lebah pengumpul nektar (*nectar collecting bee*, NCB) memiliki *honey sac*, dan lebah pengumpul serbuk sari (*pollen collecting bee*, PCB) memiliki *pollen basket* dibagian kaki belakangnya (Simpson 2007: 6).

Lebah madu hanya terdiri dari satu genus yaitu *Apis*. Kawasan Asia memiliki delapan spesies dari genus *Apis*, yaitu *Apis florea* Fabricius, *Apis andreniformis* Smith, *Apis dorsata* Fabricius, *Apis laboriosa* Smith, *Apis cerana* Fabricius, *Apis koschevnikovi* Enderlein, *Apis nuluensis* Tingek, Koeniger dan Koeniger, dan *Apis nigrocincta* Smith. Selain di Asia, *Apis* juga terdapat di Eropa yaitu *A. mellifera* Linnaeus (Oldroyd dan Wongsiri 2006: 14).



Gambar 2.2.1.1. Lebah ratu, lebah pekerja, dan lebah jantan *Apis mellifera*

[Sumber: Pheylonian Production Kohr 2011: 2 dengan modifikasi.]



Gambar 2.2.1.2. Morfologi lebah madu

[Sumber: Nemose 2011: 7.]

Apis cerana merupakan lebah madu dari belahan bumi bagian timur yang disebut juga *cavity-nesting bee*, karena tinggal di dalam lubang sebagai sarangnya. *Apis cerana* hidup kosmopolit dan tersebar di pulau Kalimantan, Jawa, Sumatra (Indonesia), Semenanjung Malaysia, dan bagian selatan Thailand (Oldroyd dan Wongsiri 2006: 5 dan 32). Spesies *Apis cerana* terdiri dari tiga subspecies, yaitu *A. cerana cerana*, *A. cerana indica*, dan *A. cerana javana* (Sihombing 2005: 8).

Menurut Engel (1999: 167), klasifikasi *A. cerana* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Animalia</i>
Phylum	: <i>Arthropoda</i>
Class	: <i>Insecta</i>
Order	: <i>Hymenoptera</i>
Suborder	: <i>Apocrita</i>
Family	: <i>Apidae</i>
Subfamily	: <i>Apinae</i>
Genus	: <i>Apis</i>
Species	: <i>Apis cerana</i> Fabricus

Apis cerana merupakan lebah madu Asia yang banyak dipelihara oleh masyarakat tradisional untuk menghasilkan madu. Lebah madu *A. cerana* biasa hidup di tempat-tempat buatan manusia seperti kotak sarang, atau atap rumah. Lebah madu dapat meningkatkan hasil pertanian karena perannya sebagai penyerbuk. Peternak lebah madu lebih memilih membudidayakan lebah madu *A. mellifera* dibandingkan *A. cerana* karena produktivitas *A. mellifera* 2--10 kali lebih baik dari *A. cerana*. Namun demikian, peternak lokal masih mempertahankan pembudidayaan lebah madu lokal *A. cerana* karena biaya awal yang murah dan pemeliharaannya yang mudah, serta ketahanannya terhadap insektisida lebih baik dibandingkan *A. mellifera* (Oldroyd dan Wongsiri 2006: 220, 229, 232--241).

Lebah madu mengumpulkan madu bunga, serbuk sari, propolis, dan air untuk menjaga kelangsungan hidupnya. Madu bunga dikumpulkan dan disimpan di dalam sel-sel sarangnya. Serbuk sari mengandung protein, asam amino, lemak, vitamin, dan mineral yang dibutuhkan untuk makanan lebah madu. Air dikumpulkan untuk mengatur kelembaban dan temperatur sarang, serta untuk melarutkan madu yang disimpan untuk dikonsumsi. Propolis berfungsi untuk menjaga kesehatan koloni dan melekatkan sarang (Somerville 2000: 1).

Madu bunga merupakan zat yang disekresikan oleh kelenjar pada dasar bunga yang disebut *nectaries*. Madu bunga mengandung sukrosa, *laevulose*, dektrosa dan kadar air yang tinggi. Selain itu, madu bunga juga mengandung

mineral, vitamin, pigmen, senyawa aromatik, asam organik, dan nitrogen (Somerville 2000: 1).

Produk yang dihasilkan lebah madu bermanfaat bagi manusia. Produk lebah madu yang dimanfaatkan manusia adalah madu, *royal jelly*, *bee bread*, *beewax*, dan propolis. Madu yang berasal dari nektar bunga dimanfaatkan dalam bidang kesehatan, kosmetik dan farmasi. *Royal jelly* dimanfaatkan untuk menjaga stamina, menyembuhkan penyakit, bahan campuran kosmetik, dan bahan campuran obat-obatan. *Bee bread* dimanfaatkan untuk campuran bahan obat-obatan. *Beewax* (lilin lebah/malam) dimanfaatkan untuk industri farmasi dan kosmetik sebagai pelengkap bahan campuran. Propolis bermanfaat untuk menyembuhkan luka, penyakit kulit, dan membunuh virus influenza (Sentra Informasi IPTEK 2005: 3). Namun demikian, *Apis cerana* tidak menghasilkan propolis (Bees for development 2011: 1).

2.2.2. Manfaat serbuk sari bagi lebah madu

Serbuk sari (*pollen*) merupakan alat reproduksi jantan pada bunga. Serbuk sari dibawa oleh lebah madu pada bagian kaki belakangnya yang disebut *pollen basket*. Serbuk sari tersebut kemudian dibawa ke sarang dan disimpan di dalam sel-sel sarangnya. Serbuk sari merupakan sumber protein, lipid, vitamin, dan juga mineral bagi koloni lebah madu (Somerville 2000: 1--2). Protein pada serbuk sari merupakan komponen utama, yang mengandung asam amino esensial bagi lebah (Rogala dan Szymas 2004: 19). Ketersediaan serbuk sari sangat menentukan perkembangan dan kondisi kesehatan koloni terutama bagi perkembangan larva, jumlah telur, dan produktivitas koloni (DeGrandi-Hoffman dkk. 2008: 266). Produktivitas koloni lebah madu dapat diketahui dengan penambahan bobot koloni, konversi pakan, luas sarang anakan, bobot badan lebah pekerja, mortalitas anakan lebah madu, dan produksi madu (Saffari dkk. 2006: 231; Agustina 2008: 2).

Serbuk sari yang dikumpulkan oleh lebah madu pekerja tidak langsung dikonsumsi, melainkan disimpan di dalam sarangnya untuk dijadikan *bee bread* yang akan dikonsumsi oleh lebah dewasa dan larva. *Bee bread* memiliki

komponen yang berbeda dengan serbuk sari yang dikumpulkan di dalam *pollen basket* lebah pekerja (*pollen collecting bees, PCB*) karena *bee bread* merupakan serbuk sari yang telah mengalami fermentasi di dalam *honeycomb* (Gilliam 1979: 43).

Kandungan karbohidrat serbuk sari dapat diketahui menggunakan teknik kromatografi. Gula yang terdapat di dalam serbuk sari sekitar 39.8 (34.6--48.8)% dari komposisi serbuk sari, yang terdiri atas 15.20--23.90% fruktosa, 10.86--18.19% glukosa, 4.20--9.40% sukrosa dan 0.79--3.20% maltosa. Zat tepung (karbohidrat) yang terdapat dalam serbuk sari berkisar antara 2--17% (Szczena *dkk.* 2002: 108). Lebah madu membutuhkan protein rata-rata 20 % dari serbuk sari untuk mencapai produksi madu optimum (Somerville 2000: 2). Kandungan asam amino esensial yang diperlukan lebah madu terdiri atas 10 jenis, yaitu valin, treonin, metionin, leusin, isoleusin, fenilalanin, lisin, histidin, arginin, dan triptofan (Gambar 2.2.2) (DeGroot (1953), *lihat* Somerville 2000: 2). Kandungan asam amino serbuk sari dari setiap jenis bunga bervariasi. Oleh karena itu, lebah madu harus mengunjungi banyak jenis bunga untuk memenuhi kebutuhan proteinnya (Somerville 2005: 4).

Amino acid	Ideal ratio from de Groot (g per 16g N)
Threonine	3
Valine	4
Methionine	1.5
Leucine	4.5
Iso-leucine	4
Phenylalanine	2.5
Lysine	3
Histidine	1.5
Arginine	3
Tryptophan	1

Gambar 2.2.2. Sepuluh asam amino esensial yang diperlukan oleh lebah
[Sumber: Somerville 2000: 2.]

2.2.3. Budidaya lebah madu di Indonesia

Lebah madu telah dikenal sebagai penghasil madu. Selain menghasilkan madu, lebah madu juga menghasilkan malam, propolis, dan *royal jelly*. Produksi madu di Indonesia diperoleh dari *A. cerana*, *A. mellifera*, dan *A. dorsata* (Sihombing 2005: 1 dan 9). Saat ini, produksi madu di Indonesia belum mencukupi kebutuhan madu Indonesia. Produksi madu di Indonesia mencapai kurang lebih 1.500 ton/ tahun sedangkan kebutuhan madu di Indonesia sekitar 2.200 ton/ tahun. Kekurangan tersebut dicukupi dengan mengimpor madu dari Cina, Vietnam, dan Australia (Darmono 2010: 1).

Budidaya lebah madu yang paling banyak dilakukan di Indonesia adalah *A. cerana* dan *A. mellifera*. *Apis mellifera* merupakan lebah madu introduksi dari Eropa yang penyebarannya paling luas dibandingkan lebah madu yang lain. *Apis mellifera* dan *A. cerana* memiliki persamaan, yaitu bentuk *honeycomb*, dan penempatan sarang di tempat yang berongga dan terlindungi. *Apis mellifera* lebih produktif dari *A. cerana*. Permasalahan budidaya *A. cerana* di Indonesia adalah belum adanya pembuatan kotak sarang standar (Gambar 2.2.3.1), sifat *A. cerana* yang agresif, dan mudah berpindah, serta terdesaknya *A. cerana* oleh *A. mellifera* (Sihombing 2005: 11--12).



Gambar 2.2.3.1. Pembudidayaan lebah madu *Apis cerana* di Desa Ciburial
Bandung, Jawa Barat

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Kotak standar untuk *A. mellifera* memiliki dua susun kotak yang di dalamnya terdapat *frame* (Gambar 2.2.3.2). Ukuran kotak bawah (48 x 39,5 x 22,5) cm untuk *honeycomb* berisi larva, pupa, dan ratu. Ukuran kotak atas (48 x 39,5 x 14,2) cm untuk *honeycomb* berisi madu, dengan ukuran tutup (49 x 40,5 x 5) cm (Sihombing 2005: 118).



Gambar 2.2.3.1. Kotak sarang pada budidaya *Apis mellifera* dan *Apis cerana*
 [Sumber: Kelly 2010: 2--3 dengan modifikasi.]

2.3. Interaksi antara Khamir, Lebah Madu *Apis cerana*, dan Bunga yang Dikunjungnya

Interaksi antara fungi dengan serangga dapat berbentuk simbiosis mutualisme, parasitisme, atau komensalisme. Simbiosis mutualisme terjadi pada khamir yang berasosiasi dengan lebah madu. Khamir dikonsumsi secara rutin oleh lebah madu dan khamir membantu proses fermentasi pada saluran pencernaan lebah madu. Simbiosis parasitisme terjadi pada fungi *entomophthora* yang merupakan parasit bagi serangga (Batra *dkk.* 1973: 14). Fenomena simbiosis komensalisme ditunjukkan ketika lebah madu berperan sebagai vektor dalam penyebaran khamir ke habitat tertentu (Stevic 1962 *lihat* Mortimera dan Polsinelli 1999: 204).

Khamir dapat berada pada saluran pencernaan lebah madu, bunga, serta produk dari lebah seperti *bee bread* dan madu. Habitat khamir pada bunga termasuk pada nektar dan serbuk sari. Khamir pada saluran pencernaan lebah madu membantu proses fermentasi. Khamir juga membantu proses pembentukan *bee bread* dan madu (Gilliam 1979: 49; Somerville 2000: 1). Proses perubahan nektar menjadi madu dibantu oleh mikroorganisme yang berasal dari saluran pencernaan lebah madu. Mikroorganisme pada madu dan *bee bread* dapat berasal dari bunga yang dikunjungi lebah madu (Gambar 2.1.2) (Somerville 2000: 1).

Bunga dan bagian-bagiannya merupakan habitat alami bagi berbagai mikroorganisme, termasuk berbagai spesies khamir. Jumlah khamir di dalam bunga akan mempengaruhi komponen atau komposisi madu bunga. Keberadaan khamir pada madu bunga mengakibatkan perubahan komponen gula, penambahan hasil metabolit khamir, dan penambahan zat yang bersifat *volatile* (mudah menguap) (De Vega *dkk.* 2009: 802).



Gambar 2.1.2. Bunga *Widelia trilobata* (L.) Hitchc yang dikunjungi lebah madu
A. cerana

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

2.4. *Pollen Substitute*

2.4.1. *Pollen substitute*

Pollen substitute merupakan pakan pengganti serbuk sari yang mengandung protein yang diperlukan oleh lebah madu. *Pollen substitute* umumnya memiliki komposisi tepung kedelai, tepung gandum, khamir, sirup, vitamin, dan mineral, yang komposisi proteinnya menyerupai serbuk sari. Beberapa faktor yang perlu diperhatikan ketika membuat *pollen substitute* adalah sebagai berikut: daya tarik terhadap lebah, ketersediaan bahan baku, biaya pembuatan *pollen substitute*, nilai nutrien, dan senyawa yang bersifat racun (Somerville 2000: 6--7).

Haydak (1957: 90) membuat formulasi *pollen substitute* dengan komposisi tepung kedelai, *brewer yeast*, susu skim bubuk, dan kuning telur kering dengan perbandingan 2 ½:1:1:½. Pada tahun 1967 Haydak menyempurnakan formulasi *pollen substitute* menjadi tepung kedelai, susu skim, dan khamir dengan

Universitas Indonesia

perbandingan 3: 1: 1. Dalam penelitian Rogala dan Szymas (2004: 30) *pollen substitute* dibuat dengan menggunakan protein kentang (32%), tepung kedelai (18%), ekstrak lobak (6%), khamir *Candida utilis* (6%), tepung gandum (14,8%), tepung jagung (17,5%), minyak kedelai (3,3%), lesitin (0,5%), polfamix W (1,4%), vitazol AD3EC (0,2%), dan glukosa dengan vitamin C (0,1%). Rogala dan Szymas (2004: 30) melaporkan bahwa *pollen substitute* dapat meningkatkan ukuran kelenjar faringeal, kandungan lemak tubuh dan jumlah hemosit yang dihasilkan di dalam hemolimfe.

Pemberian *pollen substitute* pada koloni lebah madu akan mempengaruhi pertumbuhan bobot koloni, luas sarang anakan, bobot badan lebah pekerja, mortalitas anakan lebah madu, dan produksi madu (Saffari *dkk.* 2006: 231).

Pollen substitute yang mengandung biomassa khamir dan tepung kedelai dua kali lebih efisien untuk perkembangan lebah jika dibandingkan dengan *pollen supplement* yang berasal dari sarang lebah yang telah disimpan selama musim panas dan ditambahkan tepung kedelai. Penambahan susu skim meningkatkan kualitas protein *pollen substitute* yang hanya terdiri dari tepung kedelai dan khamir (Haydak 1957: 90).

Pollen supplement merupakan pakan lebah madu yang di dalam campurannya ditambahkan serbuk sari alami. *Pollen supplement* dan *pollen substitute* memiliki fungsi yang sama, yaitu sebagai pakan lebah madu. *Pollen supplement* diberikan pada saat musim bunga sedikit. *Pollen supplement* juga digunakan untuk mempertahankan stabilitas dan kesehatan koloni (Somerville 2000: 28).

2.4.2. Pembuatan *pollen substitute*

Penelitian mengenai *pollen substitute* telah dilakukan selama bertahun-tahun. Komposisi *pollen substitute* yang mirip dengan serbuk sari alami adalah tepung kedelai rendah lemak, susu skim, dan khamir dengan perbandingan 3: 1: 1 (Haydak 1967: 4). Tepung kedelai banyak digunakan sebagai bahan pembuatan *pollen substitute* karena menarik bagi lebah madu, banyak tersedia, dan merupakan komponen dengan kandungan protein tinggi dengan harga yang relatif

rendah merupakan bahan alami yang murah (Somerville 2005: 31). Tepung kedelai memiliki kandungan protein yang tinggi (50%), tetapi tidak memiliki asam amino *tryptophan*. Kandungan lemak yang dapat diterima oleh lebah madu yaitu kurang dari 7%. Namun demikian, tepung kedelai memiliki kandungan lemak yang tinggi (15%). (Somerville 2000: 6). Kadar lemak yang tinggi mempengaruhi ukuran kepala lebah madu menjadi lebih besar. Hal tersebut menyebabkan ukuran kelenjar *hypopharingeal* membesar, sehingga aktivitas kelenjar *hypopharingeal* terhambat. Kelenjar *hypopharingeal* pada lebah madu berfungsi untuk menghasilkan *royal jelly* yang merupakan makanan lebah ratu, larva, dan pejantan. Selain mempengaruhi ukuran kepala, kandungan lemak yang tinggi lebih disukai oleh lebah madu, namun menyebabkan asupan protein menurun. Berkurangnya konsumsi protein menyebabkan pertumbuhan koloni lebah madu terhambat dan memperpendek usia lebah madu (*longevity*) (Manning 2008: 4, 81, dan 84).

Kandungan lemak tepung kedelai dapat diturunkan dengan ekstraksi. Ekstraksi adalah suatu cara untuk mendapatkan minyak atau lemak dari bahan yang diduga mengandung minyak atau lemak. Cara ekstraksi lemak ada tiga macam, yaitu rendering (*dry rendering dan wet rendering*), *mechanical expression* dan *solvent extraction* (Ketaren (2008) lihat Ganjar 2009: 83). Selain memiliki kandungan lemak yang tinggi, tepung kedelai memiliki kandungan vitamin B kompleks yang rendah sehingga dalam pembuatan *pollen substitute* perlu ditambahkan khamir. Khamir memiliki kandungan vitamin B kompleks yang tinggi dan mencukupi kebutuhan lebah madu (Somerville 2005: 31). Selain itu, khamir juga mengandung karbohidrat, asam amino, protein, lipid, dan mineral (Tortora *dkk.* 2010: 98--104).

Biomassa adalah materi organik yang dapat digunakan sebagai sumber energi. Biomassa khamir dibuat dengan mengumpulkan sel-sel khamir. Hal tersebut dapat dilakukan dengan menumbuhkan khamir dalam suatu medium (NEED project 2004:10). Biomassa khamir dapat diperoleh dengan melakukan fermentasi pada medium cair (*broth*). Cara pengumpulan sel khamir dapat dilakukan dengan sentrifugasi. Biomassa dalam bentuk kering dapat diperoleh

dengan cara *freeze-drying* atau lebih dikenal dengan nama liofilisasi (Suryani 2008: 31--32).

Biomassa khamir dapat diperoleh dengan proses fermentasi. Fermentasi adalah proses perubahan suatu bahan organik, dapat berupa makanan, oleh mikroorganisme. Proses fermentasi membutuhkan beberapa komponen utama yaitu substrat dan mikroorganisme, termasuk enzim dari mikroorganisme. Proses fermentasi dapat terjadi karena adanya enzim dari mikroorganisme. Hasil yang diperoleh dari proses fermentasi dapat bermacam-macam, yaitu enzim mikroorganisme, hasil metabolit mikroorganisme, perombakan senyawa kompleks, zat-zat kimia lain seperti asam asetat, alkohol, dan asam laktat, serta biomassa sel mikroorganisme (Adams dan Nout 2001: 1--6).

Medium adalah media tumbuh mikroorganisme yang telah diketahui komponennya. Medium tidak hanya digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme, tetapi juga dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Barrow dan Feltham 2003: 9). Medium yang mengandung *yeast extract*, pepton, *malt extract* dan glukosa baik untuk pertumbuhan khamir. Ekstrak khamir mengandung asam amino dan vitamin B kompleks, dan digunakan sebagai tambahan pada medium. Pepton mengandung enzim hidrolisis dan asam sehingga dapat digunakan untuk mengurangi kontaminasi (Barrow dan Feltham 2003: 9--10). *Malt* merupakan sumber karbon yang dapat digunakan untuk mencegah pertumbuhan yang terlalu cepat pada khamir, karena *malt* merupakan polisakarida (Black 2002: 358). Medium yang mengandung glukosa paling baik untuk merawat dan menumbuhkan khamir. Selain itu, glukosa juga dapat digunakan untuk memperbaiki pertumbuhan khamir yang diisolasi dari daerah atau tempat dengan a_w rendah (Kurtzman dan Fell 1998: 78).

Proses fermentasi diharapkan dapat menghasilkan biomassa yang stabil, sehingga diperlukan pembuatan standar jumlah inokulum untuk pembuatan biomassa. Inokulum adalah mikroorganisme yang diintroduksi ke dalam medium untuk memulai pertumbuhan (Tortora *dkk.* 2010 : 164). Jumlah sel yang dapat digunakan untuk inokulum perbanyak biomassa khamir adalah $1\text{--}2 \times 10^8$ CFU/ml (Bossie dan Martin 1989: 6409).

Biomassa yang diperoleh dalam medium cair perlu dipisahkan dari mediumnya. Hal tersebut dapat dilakukan dengan sentrifugasi. Sentrifugasi adalah proses dalam fisika yang digunakan untuk memisahkan suspensi materi dalam medium cair. Teori dasar dari sentrifugasi adalah pemakaian efek gravitasi partikel pada fase suspensi. Partikel yang memiliki massa jenis yang berbeda akan menempati tempat yang berbeda dalam medium sebagai respon terhadap gravitasi (Chaplin 2004: 1).

Biomassa yang telah diperoleh kemudian diubah ke dalam bentuk kering untuk penyimpanan dalam jangka panjang. Pengeringan biomassa dapat dilakukan dengan *freeze dry* atau liofilisasi. Liofilisasi merupakan proses penstabilan suatu zat dengan teknik pembekuan dan mengurangi pelarut dengan cara sublimasi dan desorpsi. Teknik liofilisasi akan mempercepat pelarut terserap dan mengembalikan substrat ke kondisi awal. Liofilisasi dilakukan dengan alat *freeze dryer*, pelarut lebih cepat berkurang dengan sublimasi (Jennings 2008: 4).

Pollen substitute dapat dibuat dalam bentuk bubuk dan diberikan dalam bentuk pasta maupun bubuk (Haydak 1957: 91). Menurut Haydak (1957: 91) pembuatan *pollen substitute* dalam bentuk kering atau serbuk bertujuan memudahkan penggunaan dan membuat masa penyimpanan menjadi lebih lama. Penyimpanan dalam bentuk pasta atau cair dapat mengakibatkan perubahan bentuk pada *pollen substitute* karena *pollen substitute* bentuk pasta atau cair lebih rentan terhadap kontaminasi. Selain itu, penyimpanan dalam bentuk pasta atau cair menyebabkan kualitas *pollen substitute* berubah karena berkurangnya kadar air akibat penguapan.

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Lokasi dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi dan *Centre of Excellent Indigenous Biological Resources-Genome Studies*, University of Indonesia FMIPA-UI, Depok, dan Peternakan lebah madu *Apis cerana* di desa Ciburial, Dago Pakar, Bandung mulai bulan November 2010 hingga Mei 2011.

3.2. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah autoklaf [Hirayama], lemari pendingin [GASSIO], kompor listrik [Sanyo], oven [Heraeus], pemanas air [SHARP], timbangan digital [AND EW-300 G, ACIS BC-500, dan ACIS MN-200], shaker incubator [OSK 6311], sentrifugator [International Clinical Centrifuse model CL], vorteks [Bio-Rad dan Maxi Mix II Type 37600], mikropipet [Gilson] ukuran 100-1000, mikropipet [Gilson] ukuran 20--200, *tips*, mikroskop trinokular [Carl ZEISS], lemari pendingin [AMB-HI-LO], Erlenmeyer 250 ml, Erlenmeyer 500 ml, gelas *beaker*, gelas ukur, cawan petri, tabung reaksi, batang pengaduk, jarum tanam bulat (*ose*), tusuk sate steril, botol alkohol, *object glass*, *cover glass*, pipet, spatel *Drygalski*, pembakar spirtus, *pestel*, *mortar*, meteran kain, timbangan badan, karton kuning ukuran 20 x 20 cm, kapas, dan *transfer box*.

3.3. Bahan

3.3.1. Koloni lebah madu dan lokasi peternakan

Koloni lebah madu yang digunakan adalah koloni lebah madu *Apis cerana* di Peternakan Lebah Madu desa Cikurutug, Ciburial, Bandung. Koloni yang

digunakan untuk setiap perlakuan ada 3 koloni dengan ukuran kurang lebih sama, sehingga jumlah seluruhnya adalah 12 koloni.

3.3.2. Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan adalah khamir *Debaryomyces hansenii* CR133 yang diisolasi dari saluran pencernaan lebah madu *Apis cerana* pengumpul madu bunga (*nectar collecting bee, NCB*) (Basukriadi dkk. 2009). Strain khamir tersebut merupakan koleksi dari *University of Indonesia Culture Collection* (UICC) Departemen Biologi FMIPA UI.

3.3.3. Medium

Medium yang digunakan adalah sebagai berikut: *Potato dextrose agar* (PDA) digunakan untuk pembuatan *stock* dan *working culture*. *Plate count Agar* (PCA) digunakan untuk enumerasi khamir. *Yeast Malt Agar* (YMA) digunakan untuk pertumbuhan khamir. *Yeast Malt Broth* (YMB) digunakan untuk media pertumbuhan biomasa khamir.

3.3.4. Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan dari [Liofilchem] adalah pepton dan glukosa, dari [BD] *yeast extract*, agar, *malt extract*, *potato dextrose agar*, *plate count agar*, tetrasiklin [Kimia Farma], *chloramphenicol* [Wako], akuades steril, etanol 90%, alkohol 70% teknis, aseton teknis, eter, dan *lactophenol cotton blue*.

3.3.5. Bahan habis pakai

Bahan habis pakai yang digunakan adalah *wrapping plastic*, parafilm [M kode PM 996], dan bahan yang digunakan sebagai campuran pada pembuatan pasta *pollen substitute*, yaitu madu yang dihasilkan Peternakan *A. cerana* di desa

Cikurutug, Ciburial, Bandung, gula pasir putih [Gulaku], dan akuades kemasan [Aqua].

3.4. Cara Kerja

3.4.1. Pembuatan medium

3.4.1.1. *Yeast Malt Agar* (YMA)

Medium YMA dibuat berdasarkan Kurtzman dan Fell (1998: 79), dengan komposisi *yeast extract* 3 g, *malt extract* 3 g, pepton 5 g, glukosa 10 g, agar 15 g, dan akuades 1000 ml. Medium YMA dibuat dengan melarutkan semua bahan dalam akuades. Sterilisasi dilakukan pada 121°C selama 15 menit menggunakan autoklaf. Medium ditunggu hingga sedikit dingin, suhu kurang lebih 40 °C kemudian ditambahkan 500 mg tetrasiklin. Medium kemudian dituang ke dalam cawan petri ± 20 ml.

Pembuatan medium YMA miring pada tabung dilakukan dengan menambahkan 0,2 g *chloramphenicol* yang telah dilarutkan dalam 1 ml etanol 96 % ke dalam medium yang telah dididihkan hingga terlarut. Medium dipindahkan ke dalam tabung reaksi, masing-masing sebanyak 5 ml. Medium kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Tabung reaksi berisi medium steril kemudian diletakkan pada papan yang dimiringkan, lalu dibiarkan hingga agar mengeras.

3.4.1.2. *Yeast Malt Broth* (YMB)

Medium YMB dibuat berdasarkan Kurtzman dan Fell (1998: 79), dengan komposisi *yeast extract* 3 g, *malt extract* 3 g, pepton 5 g, glukosa 10 g, dan akuades 1000 ml. Medium YMB dibuat dengan melarutkan semua bahan dalam akuades. Pembuatan medium YMB dalam erlenmeyer dilakukan dengan menambahkan 500 mg tetrasiklin ke dalam medium yang telah dididihkan.

Medium kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 2 atm selama 15 menit.

3.4.1.3. *Potato Dextrose Agar (PDA)*

Medium PDA miring pada tabung dibuat dengan melarutkan sebanyak 39 g PDA dengan 1000 ml akuades berdasarkan cara yang tertera dalam kemasan [BD]. Larutan tersebut kemudian diaduk sambil dipanaskan hingga agar terlarut. Pembuatan medium PDA dalam tabung dilakukan dengan menambahkan 0,2 g *chloramphenicol* yang telah dilarutkan dalam 1 ml etanol 96 % ke dalam medium yang telah dididihkan. Medium dipindahkan ke dalam tabung reaksi, masing-masing sebanyak 5 ml. Medium kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 2 atm selama 15 menit. Tabung reaksi berisi medium steril kemudian diletakkan pada papan yang dimiringkan, lalu dibiarkan hingga agar mengeras.

3.4.1.4. *Plate Count Agar (PCA)*

Medium PCA dibuat dengan melarutkan 23,5 g PCA ke dalam akuades 1000 ml berdasarkan cara yang tertera pada kemasan [BD]. Sterilisasi dilakukan pada 121°C selama 15 menit menggunakan autoklaf. Medium ditunggu hingga sedikit dingin, suhu ± 40 °C kemudian ditambahkan 500 mg tetrasiklin. Medium kemudian dituang ke dalam cawan petri ± 20 ml untuk setiap cawan petri.

3.4.2. Pemurnian isolat khamir dari *stock culture*

Pemurnian isolat khamir *Debaryomyces hansenii* dari *stock culture* yang disimpan pada medium gliserol 10% dan trehalosa 5%, dilakukan dengan metode *four-way streak plate* berdasarkan Cappuccino dan Sherman (1996: 13). Proses pemurnian khamir dilakukan dengan mengambil biakan khamir dengan tusuk gigi steril. Medium YMA dibagi menjadi empat kuadran. Biakan kemudian digoreskan pada medium YMA pada kuadran pertama. Tusuk gigi steril diganti, kemudian

goresan pertama menyentuh goresan tiga terbawah dan digoreskan pada kuadran kedua. Hal yang sama dilakukan pada kuadran ke tiga dan keempat (Gambar 3.4.2). Namun demikian, goresan dari setiap kuadran tidak boleh bersentuhan. Biakan kemudian diinkubasi selama 3 hari pada suhu ruang hingga biakan tumbuh. Purifikasi dilakukan minimal 2 kali, dan koloni dinyatakan murni apabila tidak terdapat jenis lain yang tumbuh. Koloni tunggal yang terpisah dari koloni lainnya, dipindahkan sebagai *stock culture* dan *working culture*.



Gambar 3.4.2. Metode *four quadrant streak plate*

3.4.3. Pemeliharaan biakan khamir

Pemeliharaan biakan khamir bertujuan untuk membuat *stock* dan *working culture*. Koloni khamir yang telah murni dipindahkan ke dalam dua tabung medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) miring 5 ml sebagai *stock culture* dan *working culture*. Pembuatan *stock culture* dilakukan dengan metode *streak* menggunakan jarum tanam bulat (ose). Biakan diambil dari *single colony* hasil purifikasi menggunakan ose kemudian digoreskan pada medium PDA dari dasar medium hingga bagian paling atas.

Stock culture dan *working culture* kemudian diinkubasi pada suhu ruang hingga biakan tumbuh cukup banyak. Biakan khamir *stock culture* yang telah tumbuh dengan baik disimpan dalam *refrigerator* pada suhu 4°C. Biakan *working culture* khamir disimpan pada suhu ruang agar dapat digunakan untuk pengamatan morfologi sel, maupun mengamati karakteristik dan fungsi mikroorganisme tersebut (Kurtzman dan Fell 1998: 79).

3.4.4. Pengamatan morfologi khamir *Debaryomyces hansenii* CR133

Pengamatan dilakukan untuk mengetahui karakteristik khamir *Debaryomyces hansenii* CR133. Khamir dari hasil purifikasi dapat diamati langsung untuk pengamatan makroskopik. Berdasarkan Kurtzman dan Fell (1998: 81--82) pengamatan morfologi makroskopik pada khamir yang ditumbuhkan pada medium padat meliputi tekstur, warna, permukaan, profil, dan tepi koloni, sedangkan pada medium cair meliputi sedimen, *ring*, *pellicle*, dan *islet*.

Pengamatan pada medium cair dapat dilakukan dengan menumbuhkan khamir terlebih dahulu dalam medium YMB 5 ml kemudian diinkubasi selama 3 hari untuk pengamatan mikroskopik. Sel khamir diambil dari *working culture* dengan jarum tanam bulat kemudian dicampurkan dalam medium YMB. Setelah 3 hari biakan diamati keberadaan endapan, *islet*, *pellicle*, dan *ring*.

Pembuatan preparat dilakukan dengan menggunakan *lactophenol cotton blue* yang ditetaskan pada *object glass*. Kemudian, isolat ditetaskan dengan menggunakan pipet Gilson dan ditutup dengan *cover glass* kemudian diamati dibawa mikroskop trinokular. Menurut Cappuccino dan Sherman (1996: 205) pengamatan mikroskopik khamir meliputi pengukuran panjang dan lebar sel khamir serta mengamati terbentuknya *budding* dan askospora. Pengukuran panjang dan lebar sel khamir dilakukan terhadap 20 sel dewasa yang sedang *budding*.

3.4.5. Penghitungan sel *Debaryomyces hansenii* CR133 dengan metode *Total Plate Count* (TPC)

Penghitungan atau enumerasi sel khamir dilakukan untuk mengetahui jumlah inokulum dalam pembuatan biomassa khamir. Dengan mengetahui jumlah inokulum, maka dapat dibuat ukuran biomassa khamir yang sama dengan proses sebelumnya. Penghitungan dilakukan pada biakan *D. hansenii* CR133 yang ditumbuhkan pada medium YMA sebanyak 15 gores setelah diinkubasi selama 3 hari. Lima belas gores *D. hansenii* CR133 merupakan jumlah goresan yang

digunakan sebagai standar untuk membuat biomassa khamir. Penghitungan sel khamir dilakukan dengan metode *Total Plate Count* (TPC) menurut Cappuccino dan Sherman (1996: 117).

Total plate count dilakukan pada biakan khamir CR133 yang ditumbuhkan dalam medium YMA dengan metode *streak* berjumlah 15 gores. Biakan tersebut kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 3 hari. Biakan khamir disuspensikan dengan 5 ml aquades steril. Suspensi dihomogenkan menggunakan *vorteks*. Suspensi sel khamir kemudian diencerkan menggunakan akuades steril hingga faktor pengenceran 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7} . Sebanyak 0,1 ml suspensi sel khamir dari masing-masing pengenceran disebar secara merata menggunakan spatel *drygalsky* di atas medium PCA. Masing-masing faktor pengenceran dilakukan tiga kali pengulangan (Lampiran 7). Hasil *total plate count* dihitung koloni yang tumbuh, koloni tersebut disebut dengan *colony forming unit* (CFU). *Colony forming unit* merupakan koloni bakteri yang tumbuh yang diasumsikan terbentuk dari satu sel vegetatif (Cappucino dan Sherman 1996: 117). Biakan kemudian diinkubasi selama 3 hari pada suhu ruang. Hasil mikroorganisme yang tumbuh dihitung dan dikalkulasikan secara matematis dengan rumus (1):

$$\text{cfu/ml} = \frac{\sum \text{koloni terhitung}}{\text{volume inokulasi} \times \text{pengenceran}} \dots\dots\dots(1)$$

(Hogg 2005: 93).

3.4.6. Produksi biomassa kering *Debaryomyces hansenii* CR133

Pembuatan biomassa khamir tersebut dilakukan dengan beberapa tahap, yaitu fermentasi, sentrifugasi, liofilisasi, dan penumbukan biomassa sel khamir. Fermentasi dilakukan pada medium *Yeast Malt Broth* (YMB). Proses fermentasi diawali dengan pembuatan inokulum sel khamir *Debaryomyces hansenii* CR133 pada medium *Yeast Malt Agar* (YMA) yang diinkubasi selama 3 hari pada suhu ruang. Khamir kemudian dibuat suspensi dengan ditambahkan 5 ml YMB, dan diinokulasikan kedalam YMB 95 ml, yang kemudian diinkubasi selama 2 hari dalam *shaker incubator* pada suhu ruang. Medium YMB 100 ml tersebut

digunakan sebagai *starter* pada proses fermentasi pembuatan biomassa khamir. Sel khamir pada medium YMB 100 ml dipindahkan kedalam *batch* berisi medium YMB 400 ml yang kemudian diinkubasi selama 2 hari dalam *shaker incubator* pada suhu ruang.

Hasil fermentasi pada medium YMB kemudian dipanen dengan menggunakan sentrifugator. Pemanenan biomassa khamir *D. hansenii* CR133 dilakukan dengan sentrifugasi 6000 g selama 6 menit. Menurut Turk *dkk.* (2007: 3587) pemanenan sel *Debaryomyces hansenii* dapat dilakukan pada 4000 g selama 10 menit. *Debaryomyces hansenii* merupakan sel khamir yang tahan terhadap perubahan tekanan dan mampu mengatasi kondisi lingkungan yang berubah, sehingga perubahan kecepatan dan waktu tidak merusak sel *D. hansenii* (EMBL-EBI 2011: 1). Biomassa *Debaryomyces hansenii* CR133 yang dihasilkan dari sentrifugasi kemudian dicuci dua kali dengan menggunakan akuades steril. Hasil biomassa dalam bentuk pelet kemudian di *freeze-drying* atau liofilisasi (Gambar 3.4.6). Liofilisasi dilakukan untuk mengeringkan biomassa yang diperoleh.

Liofilisasi atau *freeze-drying* dilakukan pada suhu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ dengan tekanan 2 atm selama 6 jam dan diulang 3 kali dengan jeda waktu satu hari. Bentuk padatan biomassa kemudian ditumbuk dengan mortar dan pestel untuk mendapatkan biomassa kering dalam bentuk serbuk. Biomassa kering dalam bentuk serbuk yang diperoleh kemudian dimasukkan kedalam *plastic clip* dan disimpan pada refrigerator pada suhu $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lampiran 7).



Gambar 3.4.6. Pengeringan biomassa khamir dengan metode *freeze-dryer* (liofilisasi)

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

3.4.7. Pembuatan tepung kedelai rendah lemak

Pembuatan tepung kedelai dibuat dari kedelai lokal yang telah dibersihkan. Kedelai direndam semalam untuk mempermudah pelepasan kulit, kemudian dilepas kulitnya. Kedelai kemudian direbus hingga lunak (15 menit), dikering anginkan dan dioven selama 8 jam selama 3 hari berturut-turut pada suhu 60 °C. Kedelai dihaluskan dengan menggunakan blender hingga berbentuk bubuk. Tepung kedelai diluruhkan kandungan lemak untuk mendapatkan tepung kedelai rendah lemak (Gambar 3.4.7). Tepung kedelai diturunkan kandungannya untuk mendapatkan tepung kedelai rendah lemak.

Penurunan kandungan lemak tepung kedelai dilakukan dengan cara ekstraksi menggunakan larutan heksan dengan perbandingan 1: 3 (berat tepung kedelai/ volume heksan). Heksan dikeluarkan dengan menggunakan pompa vakum dan dikeringkan dengan oven. Kemudian tepung kedelai diekstraksi kembali menggunakan heksan dengan perbandingan yang sama dan diperoleh tepung kedelai rendah lemak. Ekstraksi lemak tepung kedelai dilakukan di Departemen Farmasi, FMIPA UI. Pengukuran kandungan lemak sebelum dan setelah diekstraksi dengan heksana dilakukan di Laboratorium Uji Fakultas Teknologi Pangan dan Gizi, IPB, Bogor.



Gambar 3.4.7. Pembuatan tepung kedelai rendah lemak.
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

3.4.8. *Pollen substitute*

3.4.8.1. Pembuatan *pollen substitute*

Pollen substitute (PS) dibuat dari bahan dasar tepung kedelai rendah lemak dan susu skim. *Pollen substitute* yang diberikan kepada *A. cerana* dibuat dalam tiga jenis yaitu PS A, PS B, dan PS C. Bahan pembuatan PS A adalah tepung kedelai rendah lemak, susu skim, dan biomassa strain khamir *Debaryomyces hansenii* CR133 dengan perbandingan masing-masing bahan 3:1:1 sesuai dengan perbandingan *pollen substitute* menurut Haydak (1967: 4). Untuk satu kali pemberian pakan kepada satu koloni per hari dibutuhkan tepung kedelai rendah

lemak 1,5 g, susu skim 0,5 g, dan biomassa khamir kering *Debaryomyces hansenii* CR133 0,5 g.

Bahan pembuatan PS B adalah tepung kedelai rendah lemak, dan susu skim dengan perbandingan masing-masing bahan 3:1. Untuk satu kali pemberian pakan kepada satu koloni per hari dibutuhkan tepung kedelai rendah lemak 19 g, dan susu skim 0,6 g. Bahan pembuatan PS C adalah tepung kedelai rendah lemak, dan susu skim dengan perbandingan masing-masing bahan 3:1. Untuk satu kali pemberian pakan kepada satu koloni per hari dibutuhkan tepung kedelai rendah lemak 19 g, dan susu skim 0,6 g.

3.4.8.2. Analisis komposisi kimia *pollen substitute*

Analisis kandungan air, abu, lemak, protein, dan karbohidrat tepung kedelai sebelum dan sesudah diekstraksi dengan heksan, serta PS dilakukan di Laboratorium Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian, IPB pada tanggal 27 Oktober dan 10 November 2010. *Pollen substitute* yang dianalisis adalah PS A dan bahan dasar PS. Analisis dilakukan terhadap bahan dasar PS, karena PS B dan PS C memiliki bahan dasar yang sama.

3.4.9. Persiapan koloni lebah madu

Koloni lebah madu *Apis cerana* disiapkan sejumlah 12 kotak, dengan ukuran koloni yang kurang lebih sama untuk setiap perlakuan. Pemilihan koloni ditujukan untuk mendapatkan kondisi koloni yang relatif seragam. Jumlah *honeycomb* pada masing-masing koloni dikurangi, sehingga setiap koloni hanya memiliki *honeycomb* yang sudah tua. Koloni lebah madu *Apis cerana* berada di dalam kotak, sesuai dengan keadaan asli di peternakan lebah madu Ciburial. Lebah pekerja di setiap koloni tetap dibebaskan mengambil pakan alami yang ada disekitar lingkungan peternakan. Hal tersebut dilakukan untuk menghindari *stress* yang dapat mengakibatkan koloni meninggalkan sarangnya (*abscond*). Koloni yang akan diberi perlakuan dihabituisasi dengan pemberian bahan dasar PS selama

tujuh hari. Komposisi bahan dasar PS tersebut adalah tepung kedelai, susu skim, dan air.

3.4.10. Pemberian pakan *Apis cerana*

Penelitian pendahuluan pemberian PS pada lebah madu *A. cerana* sudah dimulai sejak bulan Desember 2010. *Pollen substitute* diberikan dalam dua bentuk, yaitu pasta dan cair. Hal tersebut dilakukan untuk mengetahui preferensi *A. cerana* terhadap bentuk dan tekstur PS. Tempat pemberian pakan diberikan dalam dua bentuk yaitu, dengan menggunakan petri dish dan karton yang ditutup plastik film (*wrapping plastic*).

Pollen substitute yang diberikan dalam cawan petri kurang disukai oleh *A. cerana*. *Pollen substitute* yang diberikan dalam bentuk cair kurang disukai oleh *A. cerana*, yang ditunjukkan dari banyaknya sisa PS yang diberikan setelah 1 minggu. Selain itu, pemberian PS dalam bentuk cair lebih mudah terkontaminasi. Pemberian PS dalam bentuk pasta lebih disukai oleh *A. cerana*. Menurut Haydak (1957: 91) pemberian PS sebaiknya menggunakan tempat yang datar agar lebah lebih mudah untuk mendarat.

Pollen substitute A diletakkan pada karton kuning berukuran 20 x 20 cm yang telah delaminating, kemudian ditambahkan madu 2.5 gr (perbandingan 1: 1) dan diaduk menggunakan tusuk sate yang telah steril. Pembentukan pasta dilakukan dengan menambahkan 1 ml air pada campuran tersebut. Prosedur yang sama juga dilakukan untuk PS B dan PS C, namun untuk PS B komponen madu diganti dengan sirup gula. Masing-masing PS diberikan setiap hari (Lampiran 8).

Pollen substitute diberikan dengan menggunakan lembaran karton berwarna kuning untuk menarik perhatian lebah terhadap pakan yang diberikan. Warna kuning digunakan sebagai penanda/ petunjuk keberadaan tempat makanan bagi lebah. Menurut West Montaint Apiary (2011: 1), lebah dapat melihat spektrum warna dengan panjang gelombang 300--600 nm. Menurut Sugito *dkk* (2005: 43), warna kuning memiliki panjang gelombang 560--590 nm. Selain itu, warna kuning merupakan warna bunga yang banyak dikunjungi lebah madu.

Pemberian pakan dilakukan dengan meletakkan PS yang telah dibuat, ke dalam sarang lebah madu *A. cerana*. *Pollen substitute* diberikan selama 20 hari dengan mengganti PS setiap hari. Selain koloni-koloni yang diberi perlakuan PS, terdapat juga kontrol. Koloni-koloni lebah yang digunakan sebagai kontrol tidak diberi pakan tambahan PS, tetapi dibiarkan mencari serbuk sari dan nektar di alam. Pengamatan produktivitas dilakukan kepada 12 koloni, dengan perincian 3 koloni berisi PS A (koloni 1, 2, dan 3), 3 koloni berisi PS B (koloni 4, 5, dan 6), 3 koloni berisi PS C (koloni 7, 8, dan 9), dan 3 koloni sebagai kontrol (koloni 10, 11, dan 12). *Pollen substitute* diberikan selama 20 hari.

3.4.11. Pengamatan Konsumsi Pakan Lebah Madu *A. cerana*

Pengamatan tingkat kesukaan *A. cerana* terhadap PS yang diberikan, yaitu PS A, PS B, dan PS C dilakukan selama 20 hari. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah PS (dalam bentuk persentase) yang dikonsumsi oleh lebah *A. cerana* setiap hari. Pada koloni kontrol tidak ada pengamatan terhadap konsumsi PS.

Data diperoleh dengan menimbang berat PS sebelum dan setelah diberikan kepada *A. cerana*. Konsumsi PS per hari diukur dengan menimbang berat PS yang diberikan dikurangi dengan berat PS setelah diberikan kepada lebah selama 24 jam.

$$\text{Konsumsi koloni} = \text{berat awal (g)} - \text{berat akhir (g)}$$

$$\text{Persentase konsumsi} = \frac{\text{Konsumsi koloni per hari (g)}}{\text{Berat awal pollen substitute (g)}} \times 100 \%$$

Data yang diperoleh dari persentase konsumsi PS kemudian dikategorikan berdasarkan persentase konsumsi sebagai berikut:

- Kategori 1 : konsumsi 0%-- 25% = tidak disukai
- Kategori 2 : konsumsi 26%--50% = kurang disukai
- Kategori 3 : konsumsi 51%--75% = disukai
- Kategori 4 : konsumsi 76%--100% = sangat disukai

Data konsumsi PS per hari (dalam bentuk %) kemudian dianalisis menggunakan uji ANOVA satu faktor. Jika terdapat perbedaan yang nyata antar

perlakuan PS, maka analisis dilanjutkan dengan menggunakan Uji Perbandingan Berganda (*Multiple Comparison Test*).

3.4.12. Pengamatan Produktivitas Lebah Madu *A. cerana*

Pengamatan produktivitas lebah madu meliputi penambahan berat individu lebah pekerja setelah 20 hari pemberian PS, serta pengukuran penambahan keliling *honeycomb* per hari dan jumlah *honeycomb* setelah 20 hari pemberian PS.

3.4.12.1. Penambahan jumlah dan keliling *honeycomb*

Perubahan *honeycomb* diamati dengan mengukur keliling dan pertambahannya. Pengukuran keliling *honeycomb* dilakukan pada malam hari untuk menghindari gangguan pada koloni lebah yang dapat menyebabkan lebah minggat (*abscond*). Pengukuran keliling *honeycomb* dilakukan dengan menggunakan meteran kain dengan skala sentimeter (cm). Penambahan keliling *honeycomb* dihitung dengan rumus:

$$\text{Penambahan keliling } \textit{honeycomb} = \frac{\sum \text{keliling awal (cm)} - \sum \text{keliling akhir (cm)}}{\text{Jumlah hari terakhir pengukuran}}$$

3.4.12.2. Berat lebah pekerja

Pemberian PS diharapkan dapat meningkatkan produktivitas lebah madu *A. cerana*. Peningkatan berat lebah pekerja menunjukkan kesehatan lebah madu. Aktifitas pengumpulan serbuk sari dan nektar akan meningkat jika lebah madu sehat. Menurut Sihombing (2005: 98) berat muatan serbuk sari seekor lebah berhubungan dengan ukuran *pollen basket* yang dipengaruhi oleh ukuran tubuh dari lebah madu.

Berat 30 atau 50 ekor lebah pekerja ditimbang pada hari ke 0, hari ke 7 dan hari ke 20. Penimbangan dilakukan pada *A. cerana* yang diberi eter, menggunakan timbangan digital dengan ketelitian 0.1 gram. Perhitungan rata-rata berat lebah pekerja sebagai berikut:

$$\text{Berat lebah pekerja rata-rata} = \frac{\text{Berat lebah pekerja yang diambil (g)}}{\text{Jumlah lebah pekerja yang diambil}}$$

Perhitungan persentase kenaikan berat lebah pekerja selama perlakuan:

$$\text{Persentase kenaikan berat} = \frac{\text{Berat lebah pekerja hari terakhir (g)} - \text{berat lebah pekerja hari ke 0 (g)}}{\text{Berat lebah pekerja hari ke 0 (g)}} \times 100 \%$$

Data yang diperoleh dalam penelitian kemudian dideskripsikan dalam bentuk tabel dan histogram.



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

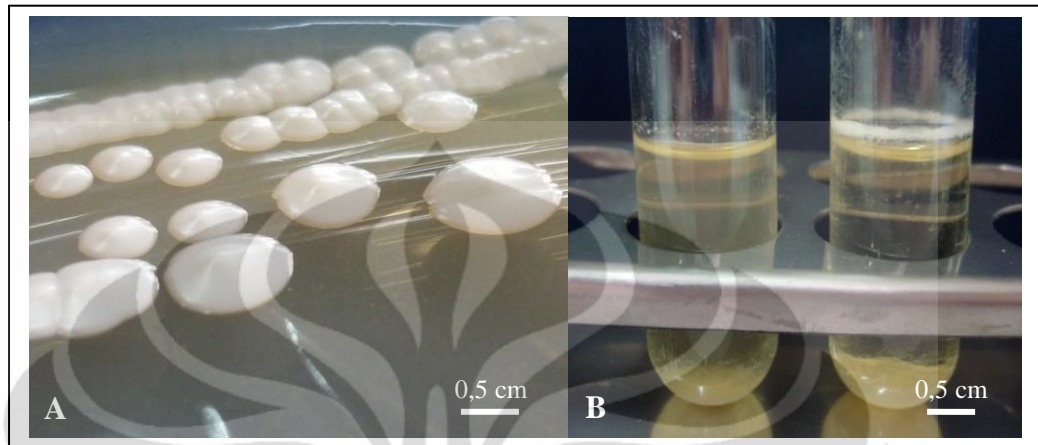
4.1. Pengamatan Morfologi Khamir *Debaryomyces hansenii* CR133

Pengamatan morfologi strain khamir *D. hansenii* CR133 meliputi pengamatan morfologi koloni dan morfologi secara mikroskopik. Pengamatan dilakukan untuk mencocokkan karakteristik morfologi strain *D. hansenii* CR133 dengan karakteristik spesies tersebut seperti yang tercantum pada monograf khamir “*The Yeast, a taxonomic study*” oleh Kurtzman dan Fell (1998).

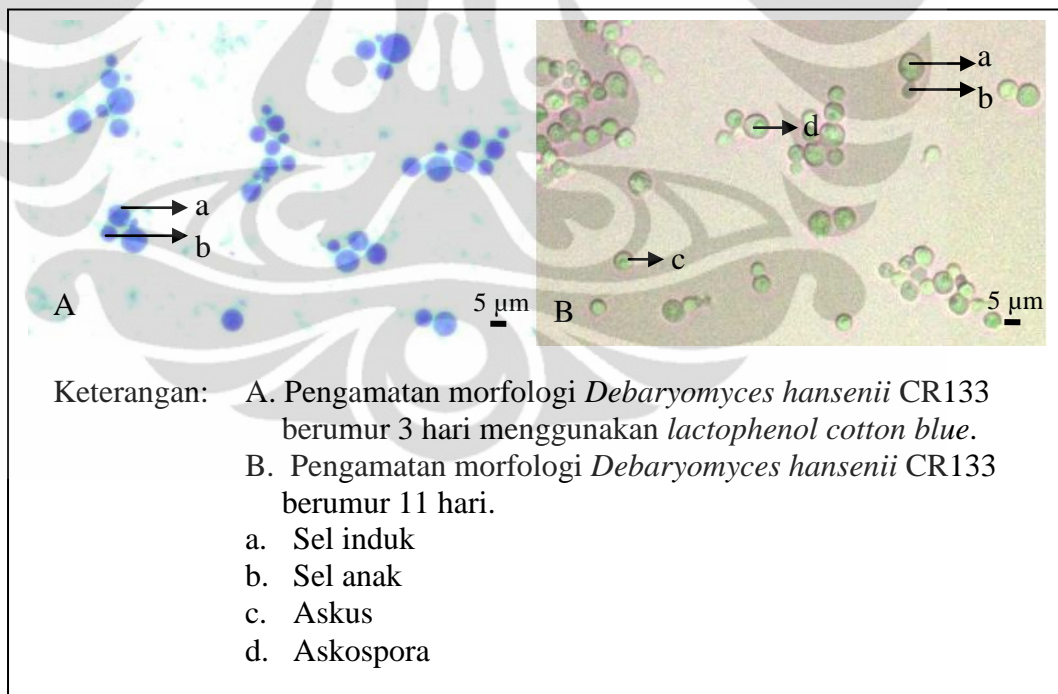
Pengamatan morfologi secara makroskopik pada medium YMA (*yeast malt agar*) menunjukkan bahwa koloni *D. hansenii* CR133 berwarna putih dengan permukaan mengkilap, profil menggunung, tepian koloni lurus, dan tekstur mentega. Pengamatan morfologi secara makroskopik pada medium YMB (*yeast malt broth*) menunjukkan adanya sedimen, *ring*, *pellicle*, dan *islet* (Gambar 4.1.1). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa isolat CR133 memiliki beberapa ciri morfologi yang sama dengan *D. hansenii* yang dideskripsikan oleh Kurtzman dan Fell (1998: 162--163) yang melaporkan bahwa pada medium YMA (*yeast malt agar*) koloni *D. hansenii* berwarna putih hingga kekuningan, bertekstur halus, berkerut, dan mentega, dengan permukaan mengkilap hingga kusam. *Debaryomyces hansenii* juga memiliki sedimen, *ring*, *pellicle*, dan *islet* ketika ditumbuhkan pada medium YMB (*yeast malt broth*).

Pengamatan morfologi secara mikroskopik yang dilakukan pada *D. hansenii* CR133 menunjukkan bahwa sel khamir berbentuk bulat, *short ovoidal*, memiliki tipe *budding* multipolar, memiliki askus yang di dalamnya terdapat satu askospora berbentuk *spheroidal*, dan ukuran sel (4,17--10,43) μm x (5,06--10,97) μm (n=20). Askospora diperoleh pada *D. hansenii* CR133 berumur 11 hari (Gambar 4.1.2). Kurtzman dan Fell (1998: 162) melaporkan bahwa *D. hansenii* berumur 3 hari pada medium YMB (*yeast malt broth*) pada suhu 25°C, memiliki bentuk sel *spheroidal*, *short ovoidal*, dengan ukuran sel (2--7,2) μm x (2,2--8,6) μm . Sel *D. hansenii* memiliki sel yang dapat membentuk rantai pendek.

Askospora pada *D. hansenii* dapat diamati setelah 1--2 minggu, memiliki bentuk *spheroidal*, dan di dalam satu askus hanya terdapat satu askospora.



Gambar 4.1.1. *Debaryomyces hansenii* CR133; A. Pertumbuhan pada medium padat YMA, B. Pertumbuhan pada medium cair YMB
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



- Keterangan:
- A. Pengamatan morfologi *Debaryomyces hansenii* CR133 berumur 3 hari menggunakan *lactophenol cotton blue*.
 - B. Pengamatan morfologi *Debaryomyces hansenii* CR133 berumur 11 hari.
 - a. Sel induk
 - b. Sel anak
 - c. Askus
 - d. Askospora

Gambar 4.1.2. Pengamatan morfologi *Debaryomyces hansenii* CR133

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

4.2. Penghitungan Sel *Debaryomyces hansenii* CR133 dengan Metode Total Plate Count (TPC)

Jumlah sel khamir *D. hansenii* CR133 yang diperoleh dengan enumerasi menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*) adalah $1\text{--}4,9 \times 10^8$ CFU/ml sampel (Tabel 4.2.). Kisaran jumlah sel 10^8 cfu/ml merupakan kisaran jumlah sel yang optimal untuk inokulum perbanyakkan biomassa khamir. Menurut Bossie dan Martin (1989: 6409) jumlah sel yang dapat digunakan untuk inokulum perbanyakkan biomassa khamir adalah $1\text{--}2 \times 10^8$ CFU/ml. Hammad *dkk.* (2009: 131) menggunakan biomassa *Candida tropicalis* sebagai *pollen substitute*. *Candida tropicalis* diberikan dengan konsentrasi 25% (berat/volume), namun tidak diketahui jumlah khamir yang digunakan sebagai inokulum dalam pembuatan biomassa.

Tabel 4.2. Total Plate Count (TPC) isolat *Debaryomyces hansenii* CR133 berumur 3 hari pada medium PCA (*Plate Count Agar*)

Spesies	Pengenceran	Pengulangan	Σ koloni 3 hari	Jumlah cfu/ml	Standar deviasi
<i>D. hansenii CR133</i>	10^{-5}	1	110	$1,17 \times 10^8$	$\pm 2,20 \times 10^8$
		2	119		
		3	122		
	10^{-6}	1	16	$4,9 \times 10^8$	
		2	6		
		3	124		
	10^{-7}	1	0	1×10^8	
		2	1		
		3	3		
Rata-rata				$2,36 \times 10^8$	

4.3. Produksi Biomassa Kering *Debaryomyces hansenii* CR133

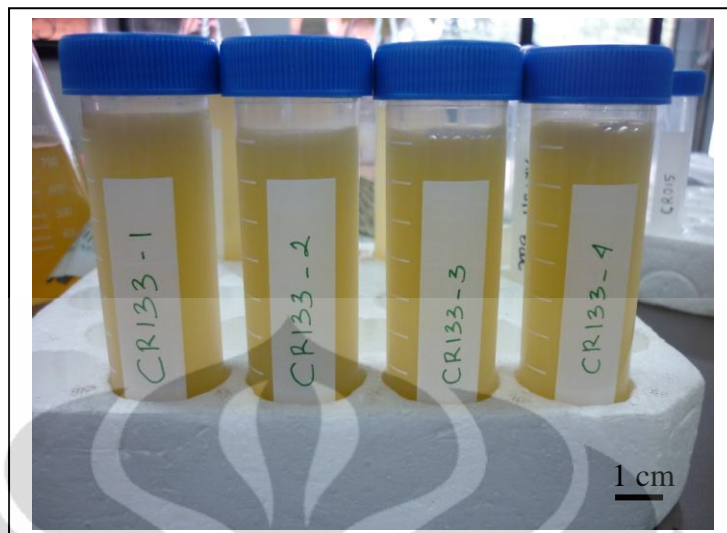
Biomassa kering *Debaryomyces hansenii* CR133 diperoleh dari 500 ml *batch* medium YMB (*Yeast Malt Broth*) yang diinkubasi selama 2 hari adalah 3,4

gram berat kering atau 27 % dari 12,6 gram berat basah (Gambar 4.3). Biomassa kering khamir 3,4 gram hanya dapat memenuhi kebutuhan satu koloni lebah madu selama 6 hari. Oleh karena itu, untuk memenuhi kebutuhan pembuatan *pollen substitute* yang mengandung *D. hansenii* CR133 untuk tiga koloni *A. cerana* selama 20 hari diperlukan 30 gram biomassa kering khamir yang membutuhkan 4500 ml medium YMB (*Yeast Malt Broth*) (Tabel 4.3.).

Tabel 4.3. Hasil pembuatan biomassa *Debaryomyces hansenii* CR133 dari fermentasi pada 500 ml medium YMB

Spesies	No. Seri Tabung	Berat Basah Isolat (g)	Berat Basah Total (g)	Berat Kering Isolat (g)	Berat Kering Total (g)
<i>Debaryomyces hansenii</i> CR133	1	3	12,6	0,7	3,4
	2	2,7		0,8	
	3	3,5		1	
	4	3,4		0,9	

Biomassa khamir dibuat dalam bentuk kering untuk penyimpanan yang lebih lama agar kadar air *pollen substitute* yang dibuat tidak berubah. Selain itu, biomassa dalam bentuk kering lebih mudah dan efisien dalam pemakaian di lapangan. Menurut Haydak (1957: 92) *pollen substitute* dalam bentuk kering memungkinkan penyimpanan lebih lama tanpa merubah kadar air di dalamnya, karena pada penyimpanan dalam bentuk pasta akan terjadi pengurangan kadar air, dan *pollen substitute* menjadi lebih padat.



Gambar 4.3. Biomassa basah *Debaryomyces hansenii* CR133 dalam medium YMB.

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

4.4. Pembuatan Tepung Kedelai Rendah Lemak

Ekstraksi tepung kedelai menggunakan pelarut heksan untuk mengurangi kadar lemak memerlukan dua kali proses. Hal tersebut dilakukan karena dari proses ekstraksi pertama dihasilkan tepung kedelai dengan kadar lemak yang masih tinggi, yaitu 9,9%. Pada proses ekstraksi kedua diperoleh tepung kedelai yang memiliki kadar lemak rendah, yaitu 1,7%. Menurut Somerville (2000: 6), kadar lemak yang baik untuk *pollen substitute* sekitar atau kurang dari 7%. Menurut Manning (2008: 4 dan 81) kadar lemak yang tinggi mempengaruhi ukuran kepala lebah madu, yaitu ukuran kepala membesar. Hal tersebut menyebabkan kelenjar *hypopharingeal* membesar, sehingga aktivitas kelenjar *hypopharingeal* terhambat. kelenjar *hypopharingeal* berfungsi untuk menghasilkan *royal jelly* yang merupakan makanan lebah ratu, pejantan, dan larva. Selain mempengaruhi perkembangan kelenjar *hypopharingeal*, kadar lemak yang tinggi menyebabkan konsumsi pakan menurun karena pakan kurang disukai. Penurunan konsumsi pakan menyebabkan berkurangnya asupan protein, sehingga menghambat pertumbuhan koloni lebah madu. Kadar lemak yang tinggi juga memperpendek masa hidup (*life-span*) lebah madu.

Hasil analisis kimia pada tepung kedelai selain menganalisis kadar lemak juga menganalisis kadar air, abu, protein, dan karbohidrat sebelum dan setelah diekstraksi. Hasil ekstraksi dua kali dengan pelarut heksan ternyata dapat meningkatkan kadar protein tepung kedelai menjadi 59% dan menurunkan kadar karbohidrat menjadi 30% (Tabel 4.4). Peningkatan kadar protein terjadi karena ada penambahan protein yang terlepas ikatannya dari lemak. Peningkatan kadar protein menyebabkan terjadinya penurunan persentase kadar karbohidrat di dalam tepung kedelai karena perhitungan dilakukan dengan menghitung persentase kandungan zat di dalam tepung kedelai. Kenaikan salah satu kadar zat tertentu menyebabkan penurunan kadar komponen lain. Menurut Hoogenkamp (2005: 87) protein kedelai bersifat lipofilik, yang dapat berikatan dengan protein atau lemak. Ekstraksi tepung kedelai menggunakan pelarut heksan telah melepaskan ikatan protein dengan lemak.

Tabel 4.4. Perbandingan kadar lemak, protein dan komponen lain dari tepung kedelai sebelum dan setelah diekstraksi dengan heksan.

No	Kadar	Hasil Analisis (g/100g)		
		Sebelum diekstraksi dengan heksan	Ekstraksi pertama dengan heksan	Ekstraksi kedua dengan heksan
1	Air	4,42	3,38	5,97
2	Abu	2,27	2,89	3,25
3	Lemak	29,79	9,91	1,74
4	Protein	40,89	31,94	58,88
5	Karbohidrat	22,63	51,88	30,16

4.5. Pembuatan *Pollen Substitute*

Analisis kimia terhadap kandungan beberapa bahan di dalam PS A dan komponen dasar PS menunjukkan persamaan dan perbedaan di antara keduanya. Kadar air, abu, dan lemak antara PS A dan komponen dasar PS relatif sama. Namun, kandungan protein PS A ternyata lebih rendah daripada komponen dasar PS, sedangkan kandungan karbohidratnya lebih tinggi (Tabel 4.5). *Pollen substitute* A terdiri atas tepung kedelai, susu skim, dan sel *D. hansenii* CR133,

sedangkan komponen dasar PS hanya mengandung tepung kedelai dan susu skim. Penambahan *D. hansenii* ternyata mempengaruhi kadar karbohidrat, kadar lemak, dan kadar protein di dalam PS A. Hal tersebut disebabkan karena *D. hansenii* mengandung karbohidrat dan lemak. Kadar karbohidrat yang meningkat menyebabkan kadar protein menurun. Hal tersebut diduga karena penghitungan kadar kandungan kimia PS dilakukan dengan menghitung persentasenya. Menurut Barnett *dkk.* (2000: 242), sel *D. hansenii* memiliki manosa dan glukosa yang merupakan karbohidrat, sedangkan Turk *dkk.* (2007: 3591) melaporkan bahwa membran sel *D. hansenii* mengandung fosfolipid, sterol, dan asam lemak.

Kandungan protein PS A dan PS dasar sudah melampaui kriteria *pollen substitute* yang ideal menurut Herbert (1992). Selain itu, kadar karbohidrat PS A dan bahan dasar PS juga memiliki kemiripan dengan serbuk sari alami, sehingga PS yang dibuat diharapkan dapat menggantikan serbuk sari. Menurut Hebert ((1992), lihat Cremones *dkk.* 1998: 1285) kriteria *pollen substitute* yang ideal yaitu mengandung protein berkisar 20--23%. Menurut Somerville (2000: 5), kebutuhan minimum protein lebah madu adalah 20%. Namun demikian, jika bertujuan untuk meningkatkan budidaya dan meluaskan usaha untuk memperbanyak produksi madu, maka kebutuhan proteinnya menjadi 25--30%. Menurut Szczesna *dkk.* (2002: 112) serbuk sari alami mengandung karbohidrat rata-rata 40 % yang tersusun atas berbagai macam gula.

Tabel 4.5. Perbandingan kadar lemak, protein, dan komponen lain dari *pollen substitute A* dan bahan dasar *pollen substitute*

No	Kadar	Hasil Analisis (g/100g)	
		<i>Pollen substitute A</i>	Bahan dasar PS
1	Air	5,27	5,54
2	Abu	2,86	2,87
3	Lemak	1,89	1,79
4	Protein	41,92	51,31
5	Karbohidrat	48,04	38,49

4.6. Pengamatan Konsumsi Pakan Lebah Madu *Apis cerana*

Pengujian kesukaan (preferensi) *A. cerana* terhadap *pollen substitute* dengan komposisi yang berbeda, dilakukan selama 20 hari pada 10 April 2011 hingga 30 April 2011. *Pollen substitute* diberikan sebagai makanan tambahan, karena *A. cerana* tetap dibiarkan bebas mencari serbuk sari dan nektar. *Pollen substitute* diletakkan sedekat mungkin dengan koloni, sehingga alas pakan atau karton hampir menempel dengan *honeycomb* (Gambar 4.6.1).



Gambar 4.6.1. Letak pemberian *pollen substitute*

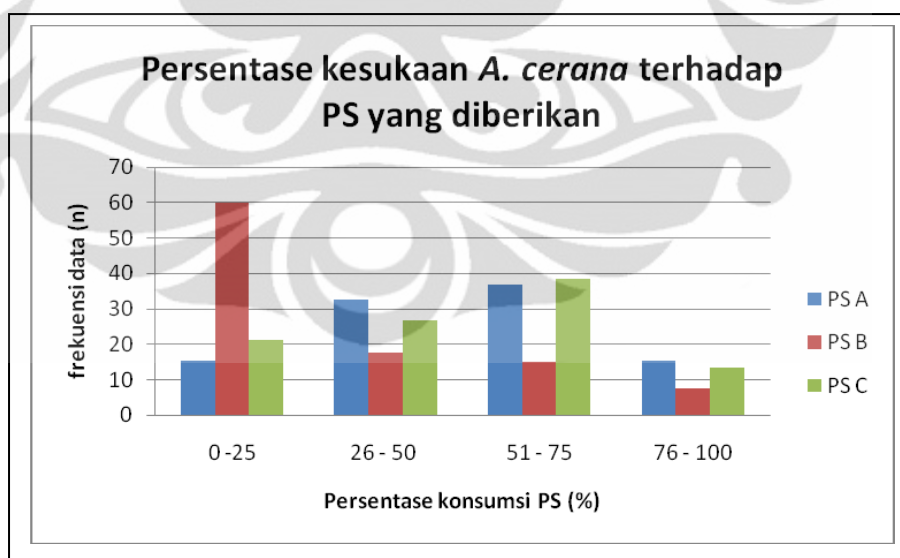
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Data suhu dan kelembaban yang dikumpulkan selama penelitian menunjukkan bahwa pada bulan April 2011 sering turun hujan (Lampiran 4). Hal tersebut mempengaruhi produktivitas koloni lebah, karena lebah pekerja tidak terbang mencari nektar dan serbuk sari ketika hujan. Berdasarkan pengamatan di lapangan, di sekitar peternakan terdapat sedikit bunga kaliandra yang merupakan sumber nektar dan serbuk sari bagi lebah. Menurut Sihombing (2005: 98), kelembaban yang tinggi menyebabkan lebah tidak dapat bekerja dan mengurangi muatan serbuk sari yang dapat dibawa oleh lebah. Menurut Prakash *dkk.* (2007: 155), persediaan serbuk sari pada akhir musim kemarau dan musim hujan sangat

terbatas. Hal tersebut disebabkan bunga pada akhir musim kemarau dan musim hujan terbatas.

Dari hasil pemberian PS A, PS B, dan PS C berturut-turut adalah 46, 40, dan 52 data tingkat konsumsi koloni lebah per hari. Perbedaan jumlah data yang diperoleh dari setiap perlakuan berbeda karena sebagian dari koloni lebah minggat (*abscond*). Koloni yang minggat kemungkinan disebabkan karena terlalu sering diganggu pada saat pemberian pakan maupun pengukuran produktivitas. Menurut Sihombing (2005: 12), *A. cerana* memiliki sifat yang lebih agresif dari *A. mellifera* dan lebih suka berpindah tempat atau terkadang minggat apabila diganggu dan kekurangan sumber pakan.

Data konsumsi per hari dari setiap *pollen substitute* yang diberikan kepada koloni lebah madu ditampilkan pada Gambar 4.6.2. Diagram batang menunjukkan bahwa *A. cerana* lebih menyukai PS A dan PS C daripada PS B. Sekitar 60% dari hasil pengamatan terhadap konsumsi PS B menunjukkan bahwa koloni *A. cerana* tidak menyukai PS B dan 18% kurang menyukainya. Hanya 15% yang menyukai dan 8% yang termasuk kategori sangat menyukai PS B.



Gambar 4.6.2. Grafik persentase kesukaan *Apis cerana* terhadap *pollen substitute* yang diberikan selama 20 hari.

Perlakuan pemberian PS A dan PS C menunjukkan bahwa hanya sekitar 15% dari data konsumsi per hari yang menunjukkan bahwa koloni *A. cerana* tidak menyukai PS A dan 21% tidak menyukai PS C. Data konsumsi per hari yang masuk kategori kurang menyukai PS A dan PS C secara berturut-turut adalah 33% dan 27%. Terdapat 37% dari hasil pengamatan yang menunjukkan bahwa lebah menyukai PS A dan 38,5 % menyukai PS B. Untuk kategori sangat disukai oleh lebah madu, PS A dan PS C masing-masing memiliki frekuensi sebesar 15% dan 13,5% (Gambar 4.6.1).

Uji homogenitas variansi terhadap data konsumsi harian koloni lebah menunjukkan bahwa variansi dari masing-masing kelompok adalah sama atau homogen ($p > 0,05$). Dengan demikian, analisis data dapat dilanjutkan dengan uji analisis variansi (Anova) untuk membandingkan konsumsi rata-rata lebah terhadap tiga jenis *pollen substitute* yang diberikan.

Hasil uji statistik menggunakan Anova menunjukkan bahwa tingkat konsumsi rata-rata lebah *A. cerana* yang diberikan PS A, PS B, dan PS C berbeda sangat nyata ($p = 0,001$). Tingkat konsumsi rata-rata lebah *A. cerana* pada PS A, PS B, dan PS C secara berurutan adalah 49,8% ($n = 46$), 32,5% ($n = 40$), dan 49,7% ($n = 52$). Uji perbandingan berganda menggunakan Uji Bonferroni menunjukkan ada perbedaan nyata ($p = 0,02$) tingkat konsumsi PS A dengan PS B dan antara PS B dan PS C, tetapi tidak terdapat perbedaan nyata ($p > 0,05$) antara tingkat konsumsi PS A dan PS C oleh koloni lebah *A. cerana*.

Perbedaan tingkat konsumsi lebah *A. cerana* dapat terjadi karena perbedaan komposisi *pollen substitute* yang dibuat. *Pollen substitute A* mengandung bahan dasar PS, madu, dan khamir *D. hansenii* CR133 yang diisolasi dari saluran pencernaan *A. cerana*. *Pollen substitute A* lebih menarik bagi *A. cerana* karena adanya penambahan khamir. Khamir *D. hansenii* CR133 pada PS A merupakan khamir indigenous yang diperoleh dari saluran pencernaan lebah madu *A. cerana*. Basukriadi *dkk.* (2009) mengisolasi *D. hansenii* dari larva, lebah pekerja (NCB dan PCB) serta bunga yang dikunjungi oleh *A. cerana*. Herzberg (2004: 89--97) juga melaporkan bahwa *D. hansenii* ditemukan pada madu, lebah pekerja dan bunga yang dikunjungi oleh *Bombus* sp..

Debaryomyces hansenii yang ditemukan pada lebah dan yang berasosiasi dengan lebah diperkirakan bermanfaat dalam memberi nutrisi dan menjaga kesehatan lebah madu. Keberadaan khamir *D. hansenii* di dalam PS A diduga telah dikenali oleh lebah *A. cerana* karena khamir jenis tersebut berasal dari lokasi yang sama sehingga kemungkinan telah sering dikonsumsi oleh *A. cerana*, sehingga PS A disukai oleh lebah madu *A. cerana*. Menurut Zahra dan Talal (2008: 8) khamir merupakan sumber vitamin B kompleks yang membantu perkembangan kelenjar *hypopharyngeal* lebah madu. Menurut Somerville (2005: 30), *brewers yeast*, *bakers yeast* dan *torula yeast* sangat memikat lebah madu. Kesukaan lebah madu terhadap berbagai jenis khamir mungkin karena kandungan nutriennya yang tinggi.

Pollen substitute B yang mengandung tepung kedelai, susu skim, dan madu juga disukai oleh lebah madu *A. cerana*. *Pollen substitute* B lebih disukai oleh *A. cerana* dibandingkan dengan PS C yang hanya mengandung gula, karena di dalam madu juga terdapat khamir. Munitis *dkk.* (1976: 31) mengisolasi khamir dari madu, dan memperoleh hasil bahwa di dalam madu terdapat khamir osmofilik.

4.7. Pengamatan Produktivitas Lebah Madu *A. cerana*

Produktivitas lebah madu *A. cerana* diamati pada 12 koloni yang diberi tiga perlakuan *pollen substitute* (PS A, PS B, dan PS C) dan kontrol. Masing-masing perlakuan dan kontrol terdiri atas tiga koloni. Pengamatan dilakukan selama 20 hari.

4.7.1. Penambahan jumlah dan keliling *honeycomb*

Pengukuran jumlah dan keliling *honeycomb* diukur pada hari ke 0 dan hari ke 20. Namun demikian, selama penelitian berlangsung sebagian dari koloni lebah yang digunakan minggat (*abscond*), sehingga pengukuran akhir dilakukan pada hari ketika koloni lebah minggat. Koloni lebah yang minggat diganti dengan koloni lebah baru, sehingga jumlahnya lebih dari 12 koloni. Secara umum, hasil

penelitian menunjukkan bahwa terjadi penambahan jumlah *honeycomb* pada koloni lebah yang diberikan *pollen substitute* (PS A, PS B, dan PS C). Pada koloni lebah kontrol (yang tidak diberi *pollen substitute*), tidak terdapat penambahan jumlah *honeycomb* baru (Tabel 4.7.1).

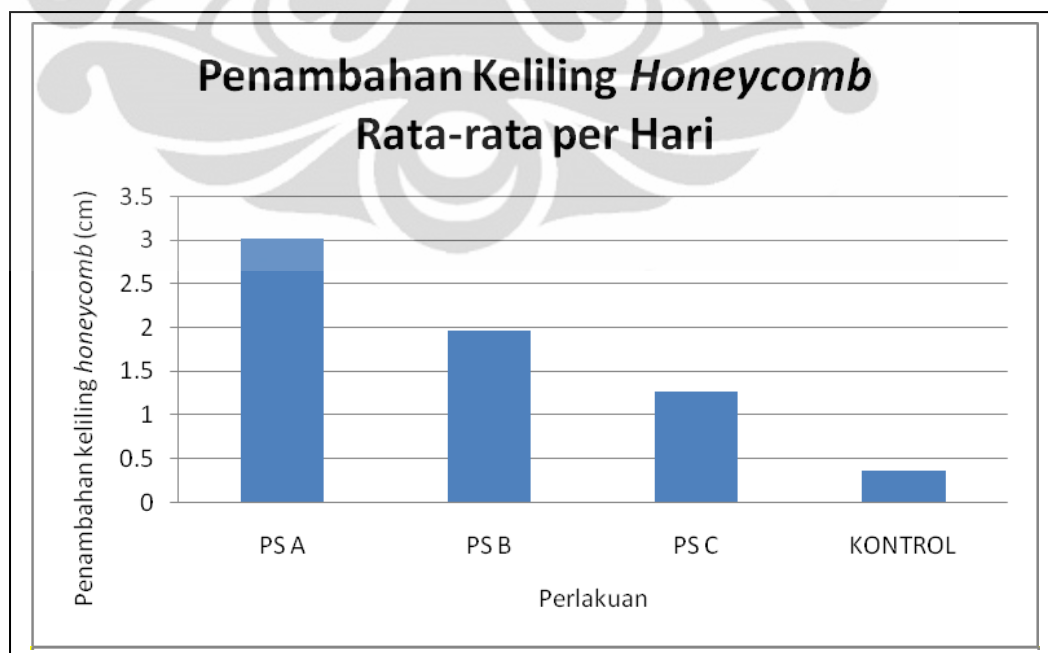
Tiga dari empat koloni yang diberi perlakuan PS A mengalami penambahan jumlah *honeycomb*, masing-masing memiliki satu buah *honeycomb* baru dengan ukuran keliling 13--20 cm. Penambahan keliling *honeycomb* pada koloni lebah yang diberikan PS A sangat bervariasi, yaitu berkisar 0,3--4,5 cm per hari dengan rata-rata 3 cm per hari. Penambahan jumlah *honeycomb* juga dijumpai pada koloni lebah madu yang diberi perlakuan PS B. Dua di antara tiga koloni lebah madu yang diberi perlakuan PS B masing-masing menghasilkan satu buah *honeycomb* baru dengan ukuran keliling 12--13 cm. Penambahan keliling *honeycomb* pada koloni lebah yang diberikan PS B sangat bervariasi, yaitu berkisar 0--3,4 cm per hari dengan rata-rata 1,9 cm per hari. Koloni lebah madu yang diberi perlakuan PS C juga menambah jumlah *honeycomb*. Sama seperti koloni lebah yang diberi PS B, dua di antara koloni yang diberi perlakuan PS C masing-masing menghasilkan satu buah *honeycomb* baru dengan ukuran keliling 12--19 cm. Penambahan keliling *honeycomb* pada koloni lebah yang diberikan PS C sangat bervariasi, yaitu berkisar 0,3--2,35 cm per hari dengan rata-rata per hari. Pada koloni lebah kontrol, tidak ada penambahan jumlah *honeycomb*. Penambahan keliling *honeycomb* pada koloni lebah yang diberikan kontrol cukup bervariasi, yaitu berkisar 0,2--0,5 cm per hari dengan rata-rata 0,4 cm per hari (Tabel 4.7.1 dan Gambar 4.7.1).

Tabel 4.7.1. Penambahan jumlah dan keliling *honeycomb* sebelum dan setelah diberikan *pollen substitute*

No. Koloni	Perlakuan	Jumlah <i>Honeycomb</i> (buah)		Total Keliling <i>Honeycomb</i> (cm)		Penambahan keliling <i>honeycomb</i> (cm)	Penambahan keliling <i>honeycomb</i> per hari (cm)
		Awal	Akhir	Awal	Akhir		
1	PS A	6	6	201	207	6	0,3
2	PS A	3	4	148	173	25	1,3
3*	PS A	7	8	252	282	30	6
4* ⁺	PS A	5	6	157,5	180	22,5	4,5
5*	PS B	6	7	177	208	31	3,4
6*	PS B	5	6	134	161	27	2,5
7	PS B	5	5	169	169	0	0
8	PS C	4	5	103	150	47	2,35
9	PS C	6	7	261	283	22	1,1
10*	PS C	4	4	85	89	4	0,3
11	Kontrol	5	5	218	226,5	8,5	0,4
12	Kontrol	4	4	165	169	4	0,2
13	Kontrol	5	5	175	184	9	0,5

Keterangan : * = koloni minggat

⁺ = koloni pengganti



Gambar 4.7.1. Penambahan keliling *honeycomb* rata-rata per hari dari setiap perlakuan dibandingkan dengan kontrol

Pemberian *pollen substitute* berbahan dasar tepung kedelai rendah lemak dan susu skim selama 5 hingga 20 hari terbukti mampu meningkatkan produktivitas koloni lebah *A. cerana*. Hal tersebut diperlihatkan dengan penambahan jumlah dan keliling *honeycomb* pada koloni-koloni lebah dengan perlakuan PS A, PS B, dan PS C yang lebih tinggi daripada koloni kontrol tanpa pemberian *pollen substitute*. Penambahan keliling *honeycomb* tertinggi hingga terendah secara berturut-turut diperlihatkan oleh koloni-koloni lebah yang diberi perlakuan PS A, PS B, PS C dan kontrol.

Pengamatan yang dilakukan pada salah satu koloni yang diberi PS A menunjukkan bahwa setelah 20 hari perlakuan, *honeycomb* lebah *A. cerana* berisi madu dan pupa calon ratu. Pupa calon ratu dan madu tidak dijumpai di dalam *honeycomb* sebelum pemberian PS A. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian *pollen substitute* A telah meningkatkan produktivitas lebah *A. cerana* dalam menghasilkan madu dan pupa. DeGrandi-Hoffman (2008: 270) melaporkan pemberian *pollen substitute* pada *Apis mellifera* dapat memperluas sarang anakan atau sarang berisi pupa. Pada penelitian lain, Saffari *dkk.* (2006: 231) melaporkan bahwa pemberian *pollen substitute* mempengaruhi sarang berisi pupa, produksi madu dan populasi koloni lebah madu.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa PS A dapat meningkatkan penambahan keliling *honeycomb* tertinggi karena ada penambahan khamir *D. hansenii* CR133 yang diisolasi dari saluran pencernaan lebah *A. cerana*. Penambahan *D. hansenii* CR133 di dalam *pollen substitute* diperkirakan dapat melengkapi kebutuhan asam amino dan vitamin B kompleks yang tidak terdapat pada tepung kedelai dan susu skim. Menurut Somerville (2005: 31), tepung kedelai memiliki kandungan vitamin B kompleks yang rendah sehingga diperlukan penambahan khamir. Haydak (1967: 4) melaporkan bahwa penambahan biomassa kering khamir dapat meningkatkan produktivitas koloni dibandingkan dengan tanpa biomassa kering khamir.

4.7.2. Berat lebah pekerja

Data penambahan berat lebah pekerja rata-rata hanya berasal dari koloni yang bertahan hingga akhir perlakuan, yaitu selama 20 hari, karena sebagian dari koloni yang diberi perlakuan *pollen substitute* minggat. Hasil penelitian menunjukkan peningkatan berat lebah pekerja pada koloni yang diberi perlakuan PS A dan PS C serta kontrol, sedangkan koloni yang diberikan PS B mengalami penurunan berat lebah pekerja (Tabel 4.7.2).

Tabel 4.7.2. Persentase penambahan berat lebah pekerja selama 20 hari

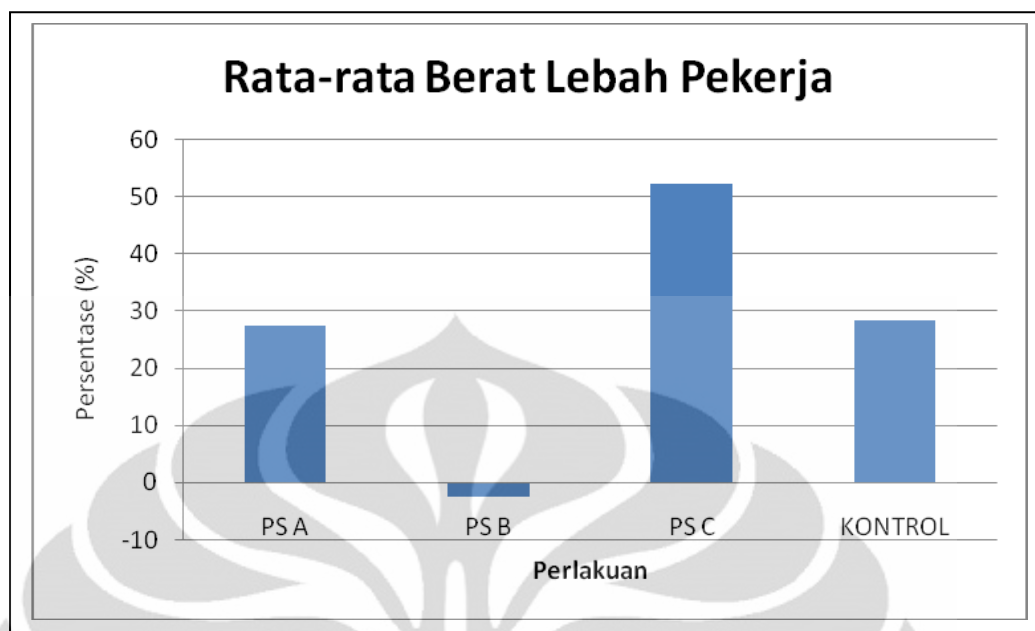
No. Koloni	Perlakuan	Berat lebah pekerja rata-rata per ekor (mg)		Persentase kenaikan (%)
		Awal (mg)	Akhir (mg)	
1	PS A	46,67	70,00	50,00
2	PS A	53,33	56,00	5,00
3	PS B	53,33	52,00	-2,49
4	PS C	43,33	64,00	47,70
5	PS C	43,33	68,00	56,94
6	Kontrol	46,67	66,00	41,42
7	Kontrol	53,33	68,00	27,51
8	Kontrol	53,33	62,00	16,26

Persentase penambahan berat lebah pekerja per ekor, terutama yang diberi perlakuan PS A selama 20 hari sangat bervariasi, yaitu berkisar 5--50%. Variasi yang sangat besar tersebut mungkin disebabkan oleh variasi umur di antara lebah pekerja yang terambil dalam sampel. Variasi umur lebah pekerja sangat menentukan peranannya di dalam pemeliharaan koloni dan jenis makanannya. Menurut Cremonez *dkk.* (1998: 1284) lebah pekerja muda yang berperan sebagai pengasuh (*nurse bees*) mengonsumsi banyak protein berupa serbuk sari. Berdasarkan Brodsgaard *dkk.* (2003: 142), *bee bread* juga dikonsumsi oleh lebah pekerja muda yang berperan sebagai pengasuh (*nurse bees*) untuk memberi makan larva dan mencapai puncak makannya ketika berumur 9 hari. Menurut Cremonez *dkk.* (1998: 1288), kandungan protein di dalam *hemolymph* lebah pekerja muda meningkat dengan tajam ketika diberi *bee bread*, kedelai/khamir, atau serbuk sari. Penelitian yang dilakukan Szymas dan Przyble pada tahun 1996 (*lihat* Al-Ghamdi

dkk., 2011: 76) menyatakan bahwa pemberian *pollen substitute* yang mengandung tepung kedelai dan khamir mengaktifkan kelenjar *hypopharyngeal* pada lebah pekerja muda. Menurut Cremonez dkk. (1998), kelenjar *hypopharyngeal* pada lebah pengasuh mensekresikan komponen utama dari *royal jelly* yang sangat dibutuhkan oleh larva berumur hingga 3 hari.

Ketika lebah semakin tua, maka peranannya berubah dari aktivitas di dalam sarang ke aktivitas mengumpulkan serbuk sari dan nektar. Perubahan peranan tersebut disertai dengan perubahan jenis makanannya, yaitu dari protein ke karbohidrat yang diperlukan untuk terbang. Akibatnya, kandungan protein di dalam *hemolymph* lebah pengumpul serbuk sari dan nektar rendah (Cremonez *et al.* (1998). Pada penelitian ini, pemberian *pollen substitute* (PS A dan PS C) dengan kandungan protein tinggi diperkirakan lebih mempengaruhi penambahan berat lebah pekerja muda daripada kepada lebah pekerja yang sudah dewasa. Hal tersebut menjelaskan fenomena yang terjadi pada koloni lebah yang diberi perlakuan PS B. Nilai negatif pada penambahan berat lebah pekerja per ekor yang diberi perlakuan PS B mungkin disebabkan karena sampel individu lebah yang diambil setelah 20 hari pemberian *pollen substitute* berisi sebagian besar lebah pekerja dewasa.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa variasi persentase penambahan berat lebah yang sangat besar terjadi karena pengambilan sampel lebah yang dilakukan secara acak, sehingga di dalam sampel terdapat campuran lebah pekerja muda dan dewasa. Oleh karena itu, agar tidak terjadi variasi yang besar, sampel lebah yang digunakan harus berumur sama. Secara umum, pemberian *pollen substitute*, baik dengan atau tanpa khamir, memberikan pengaruh positif terhadap penambahan berat lebah pekerja *A. cerana*. Penambahan berat lebah pekerja yang diberi perlakuan *pollen substitute* bahkan dapat melebihi koloni kontrol (Tabel 4.7.2. dan gambar 4.7.2.).



Gambar 4.7.2. Kenaikan berat lebah pekerja rata-rata/ekor/hari pada *Apis cerana*

Pollen substitute (PS) yang telah dibuat dapat menggantikan serbuk sari alami sebagai sumber protein bagi lebah madu. Hasil analisis kimia menunjukkan bahwa bahan *pollen substitute* yang dibuat telah memenuhi kriteria sebagai *pollen substitute* yang baik, yaitu memiliki kadar protein lebih dari 20 % dan kadar lemak kurang dari 7 %, serta memiliki kadar karbohidrat yang mirip dengan serbuk sari alami, yaitu rata-rata 40 %. *Pollen substitute* yang diberikan kepada lebah madu *A. cerana* dikonsumsi dengan tingkat konsumsi yang berbeda-beda. *Pollen substitute* yang lebih disukai oleh lebah madu *A. cerana* adalah PS A dan PS B dengan kategori disukai. Jumlah *honeycomb* pada koloni lebah yang diberi *pollen substitute* mengalami pertambahan keliling dan jumlah *honeycomb*, sedangkan pada kontrol hanya terdapat penambahan keliling *honeycomb*.

Secara umum, individu-individu lebah pekerja yang diberi perlakuan PS dan kontrol mengalami kenaikan berat badan. Data yang diperoleh pada pengamatan berat lebah pekerja untuk masing-masing perlakuan tidak sama. Hal tersebut disebabkan lebah yang minggat (*abscond*) sebelum 20 hari. Untuk menghindari minggat (*abscond*), sebaiknya *pollen substitute* diberikan hanya sekali dalam 1 minggu. Variasi persentase berat lebah yang diperoleh dipengaruhi oleh umur, sehingga pengukuran sebaiknya dilakukan pada lebah pengasuh

berumur sama. Penelitian pemberian *pollen substitute* mengandung khamir yang berasal dari pencernaan lebah madu pada lebah madu *Apis mellifera* perlu dilakukan.



BAB 5

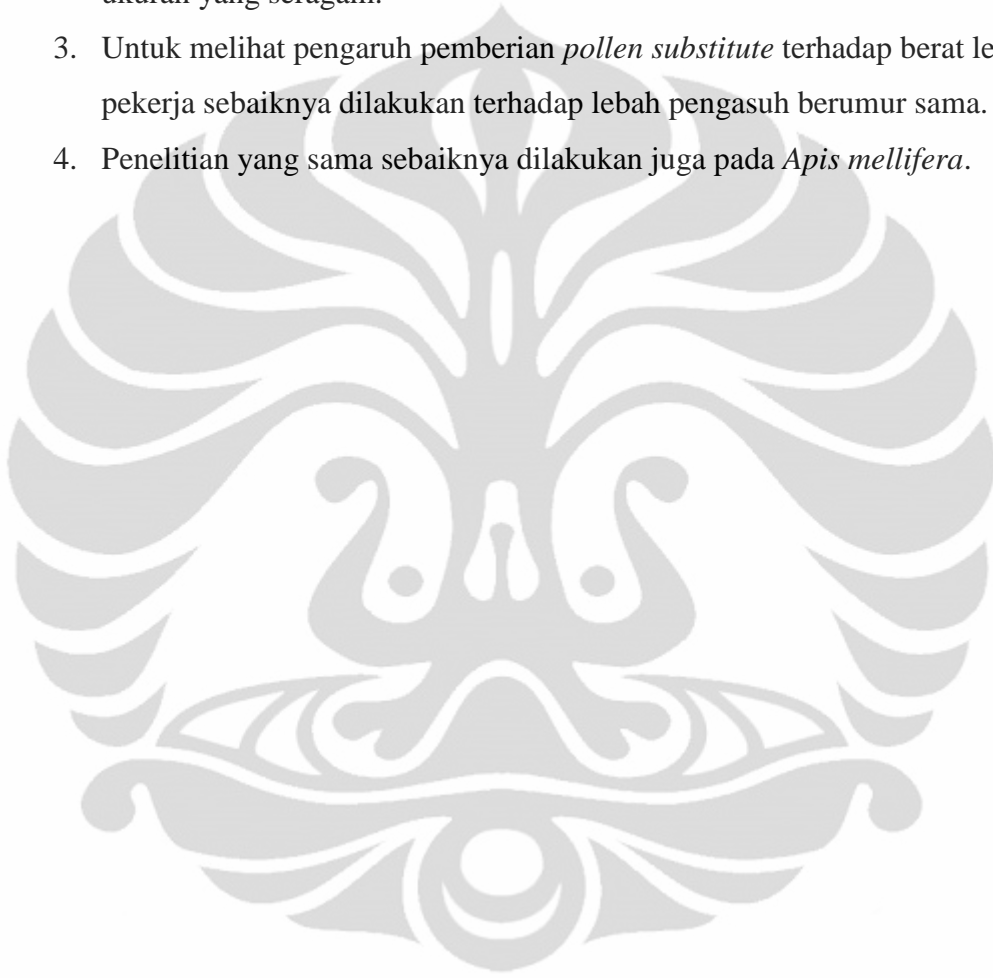
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Penelitian berhasil membuat *Pollen substitute* (PS) berbahan dasar tepung kedelai rendah lemak dan susu skim. Hasil analisis kimia menunjukkan bahwa bahan dasar PS dan PS A (yang mengandung *Debaryomyces hansenii* CR133) telah memenuhi kriteria sebagai *pollen substitute* yang baik.
2. *Pollen substitute* yang diberikan kepada lebah madu *A. cerana* dikonsumsi dengan tingkat yang berbeda-beda. Tingkat konsumsi untuk PS A dan PS C adalah disukai, sedangkan PS B tidak disukai. Uji ANOVA menunjukkan bahwa tingkat konsumsi PS A dan PS C tidak berbeda nyata ($p > 0,05$), sedangkan tingkat konsumsi PS B lebih rendah daripada PS A dan PS C ($p = 0,02$).
3. Jumlah *honeycomb* pada koloni lebah yang diberi perlakuan *pollen substitute* bertambah satu buah, sedangkan pada kontrol tidak.
4. Penambahan *honeycomb* pada koloni yang diberi perlakuan *pollen substitute* (0,3--4,5 cm per hari) lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (0,2--0,5 cm per hari). Penambahan keliling *honeycomb* terbaik terdapat pada koloni lebah yang diberi perlakuan PS A.
5. Secara umum, individu-individu lebah pekerja yang diberi perlakuan PS dan kontrol mengalami kenaikan berat badan (5--56,94 %).

5.2. Saran

1. Untuk menghindari *abscond* (minggat), sebaiknya pemberian *pollen substitute* dilakukan 1 minggu sekali.
2. Koloni yang digunakan untuk perlakuan dan kontrol sebaiknya memiliki ukuran yang seragam.
3. Untuk melihat pengaruh pemberian *pollen substitute* terhadap berat lebah pekerja sebaiknya dilakukan terhadap lebah pengasuh berumur sama.
4. Penelitian yang sama sebaiknya dilakukan juga pada *Apis mellifera*.



DAFTAR REFERENSI

- Adams, M. R., dan M. J. R. Nout. 2001. *Fermentation and food safety*. Aspen publication, Maryland: xi + 306 hlm.
- Agustina, D. K. 2008. *Perkembangan koloni lebah madu Apis melifera L. yang mendapat polen pengganti dari tiga jenis kacang dengan dan tanpa vitamin B kompleks*. Fakultas Peternakan IPB, Bogor: 71 hlm.
- Al-Ghamdi, A. A., A. M. Al-Khaibari, dan M. O. Omar. 2011. Consumption rate of some proteomic diets affecting hypopharyngeal gland development in honey bee workers. *Saudi Journal of Biological Sciences* **18**: 73--77.
- Barnett, J. A., R. W. Payne, dan D. Yarrow. 2000. *Yeasts: Characteristics and identification*. 3rd ed. Cambridge University Press, London: ix + 1139 hlm.
- Barrow, G. I., dan R. K. A. Feltham. 2003. *Cowan and steel's manual for the identification of medical bacteria*. 3rd ed. Cambridge University Press, London: xvii + 331 hlm.
- Basukriadi, A. 2009. *Kajian ekologi Apis cerana dan taksonomi khamir yang berasosiasi dengan Apis cerana di peternakan lebah madu di pulau Jawa*. Laporan Akhir Hibah Kompetitif Penelitian sesuai Prioritas nasional (Dikti).
- Basukriadi, A., Sjamsuridzal. W, dan Putra. B. B. 2010. Molecular identification and diversity of yeasts associated with *Apis cerana* foraging on flower of *Jatropha integerrima*. *Microbiology Indonesia* **4**(1): 44--48.
- Batra, L. R., S. W. T. Batra, dan G. E. Bohart. 1973. The mycoflora of domesticated and wild bees (*Apoidea*). *Mycopathologia et Mycologia applicata*, **49**(1):13--44.
- Bees for development. 2011. *Apis cerana* Group. 9 Januari: 2 hlm.
<http://www.beesfordevelopment.org/portal/topic.php?id=114&p=53>. 20 Mei 2011, pkl 23.47 WIB.

- Black, G.J. 1999. *Microbiology: Principles and exploration*. 4th ed. John Wiley and Sons Inc., Chichester: xxiv + 786 hlm.
- Bossie, M. A., dan C. E. Martin. 1989. Nutritional regulation of yeast Δ -9 fatty acid desaturase activity. *Journal of bacteriology*. **171**(12): 6409--6413.
- Brodsgaard, H. F., C. J. Brodsgaard, H. Hansen, dan G. L. Lovei. 2003. Environmental risk assessment of transgene products using honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *Apidologie* **34**: 139--145.
- Campana, B. J. dan F.E. Moeller. 1977. Honey Bees: Preference for and nutritive value of pollen from five plant sources. *Journal of Economic Entomology* **70**(1): 39--41.
- Capucino, J. G., dan N. Sherman. 1996. *Microbiology: A laboratory manual*. 4th ed. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park: xvii + 477 hlm.
- Chaplin, M. 2004. *Centrifugation*. 20 Desember: 1 hlm. <http://isbu.ac.uk>. 24 Februari 2011, pkl. 16.44 WIB.
- Cremonese, T. M., D. De Jong, dan M. M. G. Bitondi. 1998. Quantification of hemolymph proteins as a fast method for testing protein diets for honeybees (Hymenoptera: Apidae). *Journal Economic Entomology* **91**(6): 1284--1289.
- Darmono. 2010. Budidaya lebah madu. 7 November: 4 hlm. <http://www.dishutbun.bantenprov.go.id/berita-120-budidaya-lebah-madu.html>. 27 Maret 2011, pkl 19.25 WIB.
- De Vega, C., C. M. Herrera, dan S. D. Johnson. 2009. Yeasts in floral nectar of some South African plants: Quantification and associations with pollinator type and sugar concentration. *South African Journal of Botany* **75**: 798--806.
- DeGrandi-Hoffman, G., G. Wardell, F. Ahumada-Segura, T. Rinderer, R. Danka, dan J. Pettis. 2008. Comparisons of *pollen substitute* diets for honeybees: consumption rates by colonies and effects on brood and adult populations. *Apicultural Research and Bee World* **47**(4): 265--270.
- EMBL-EBI. 2001. *Debaryomyces hansenii* tolerates high concentrations of salt and is related to yeasts that cause disease, including *Candida albicans*. 2 Februari: 2

hlm.

http://www.ebi.ac.uk/2can/genomes/eukaryotes/Debaryomyces_hansenii.html.

29 Maret 2011, pkl 05.32 WIB.

- Engel, M. S. 1999. The taxonomy of recent and fossil honeybees (Hymenoptera: Apidae; *Apis*). *Journal of Hymenoptera Research* **8**(2): 165--196.
- Ganjar, A. 2009. Optimasi proses ekstraksi minyak kacang tanah dengan pelarut n-heksana. *Jurnal Teknologi* **2**(1): 80--88.
- Gilliam, M. 1979. Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts. *Apidologie* **10**(1): 43--53.
- Hammad, H. M., M. E. Nour, M. E. Zakaria, dan A. T. Anshor. 2009. The effect of liquid yeast diet (*Candida tropicalis*) as a pollen substitute on some product of honeybee colonies. *Conference on Recent Technologies in Agriculture* **4**: 130--137.
- Haydak, M. H. 1957. Is there a *pollen substitute* is equal to pollen. *The American bee Journal* **97**(3): 90--91.
- Haydak, M. H. 1967. Bee nutrition and pollen substitute. *Apiacta* **1**: 1--4.
- Herzberg, M. 2004. Ecology of yeast in plant-bumblebee mutualism in Central Europe. *Microbiology Ecology* **50**: 87--100.
- Hogg, W. 2005. *Essential microbiology*. John Wiley and Sons Ltd., London: x + 468 hlm.
- Hoogenkamp, H. W. 2005. *Soy protein and formulated meat product*. CABI publishing, London: 285 hlm.
- Jennings, T. A. 2008. *Lyophilization introduction and basic principles*. Informa healthcare, London: xviii + 646 hlm.
- Kelly C, dan H. Kelly. 2011. Honey bee *Apis mellifera*. 15 April: 5 hlm. <http://loughbishophouse.blogspot.com/2011/04/honey-bees-apis-mellifera.html>. 6 Juli 2011, pkl 05.15 WIB.
- Krisnawati, O. 2003. *Perkembangan koloni lebah madu Apis cerana yang diberi pakan tambahan*. Fakultas Peternakan IPB, Bogor: 25 hlm.

- Kurtzman, C. P., dan J. W. Fell. 1998. *The yeast, a taxonomic study*. 4th ed. Elsevier, Amsterdam: xvii + 1055 hlm.
- Manning, R. 2008. *The effect of high and low fat pollens on honeybee longevity*. Australian Government, Sydney: viii + 92 hlm.
- Mortimera, R. and M. Polsinelli. 1999. On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology* **150**: 199--204.
- Mueller, G. M., G. F. Bills, dan M. S. Foster. 2004. *Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, Beijing: vii + 777 hlm.
- Munitis, M. T., E. Canbrera, dan A. Rodriguez-Navarro. 1976. An obligate osmophilic yeast from honey. *Applied and Environment Microbiology* **32**(3): 320--323.
- NEED project. 2004. *Biomass*. 4 April: 2 hlm. www.NEED.org. 4 Desember 2010
- Nemose. 2011. *Apis mellifera* honey bee. 5 April: 8 hlm.
<http://www.geochembio.com/biology/organisms/honeybee/>. 6 Juli 2011, pkl 06.05 WIB.
- Oldroyd, B. P. dan S. Wongsiri. 2006. *Asian honey bees: biology, conservation, and human interaction*. Harvard College, New York: xv + 340 hlm.
- Pheylonian Production Kohr. 2011. Honey bee facts. 3 hlm.
<http://pheylonian.com/honey-bee-facts-c395.php>. 6 Juli 2011, pkl 07.58 WIB.
- Prakash, S., N.S. Bhat, M.I. Naik, dan B.C. Hanumanthaswamy. 2007. Evaluation of pollen supplement and substitute on honey and pollen stores of honey bee, *Apis cerana* Fabricius. *Karnataka Journal of Agricultural Science* **20**(1): 155--157.
- Rogala, R. dan B. Szymas. 2004. Nutritional value for bees of *pollen substitutes* enriched with synthetic amino acid part II: Biological methods. *Apicultural Science* **48** (1): 29--36.
- Saffari, A. M., P. G. Kevani, dan J. L. Atkinson. 2006. A promising *pollen substitute* for honey bees. *American bee journal* 230--231.
- Sentra IPTEK. 2005. Budidaya ternak lebah. 10 Juni: 5 hlm.
<http://www.iptek.net.id/ind/warintek/?mnu=6andttg=4anddoc=4a12>. 29 Maret 2011, pkl 12.35 WIB.

- Sihombing, D. T. H. 2005. *Ilmu ternak lebah madu*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta: xiii + 243 hlm.
- Simpson, S. J. 2007. *Advances in insect physiology*. Elsevier Ltd, Amsterdam: 249 hlm.
- Somerville, D. 2000. Honey bee nutrition and supplementary feeding. *NSW Agriculture* 1--8.
- Somerville, D. 2005. *Fat bees skinny bees: A manual on honey bee nutrition for beekeepers*. NSW Department of Primary Industries, Goulburn: 150 hlm.
- Sugito, H., S. B. Wahyu, K. S. Firdausi, dan S. Mahmudah. 2005. Pengukuran panjang gelombang sumber cahaya berdasarkan pola interferensi celah banyak. *Berkala Fisika* 8(2): 37--44 hlm.
- Suryani. 2008. *Penentuan lipid dalam khamir Rhodotorula dari Taman Nasional Gunung Halimun*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Depok: x + 82 hlm.
- Szczesna, T., H. Rybak-Chmielewska, dan W. Chmielewski. 2002. Sugar composition of pollen loads harvested at diverent periods of the beekeeping season. *Apicultural Science* 46(2): 107--114.
- Talaro, K. P. 2009. *Foundations in microbiology*. Mc-Graw Hill Companies, Inc., New York: xxxii + 830 hlm.
- Tortora, G. G., B. R. Funkey dan C. L. Case. 2010. *Microbiology: An introduction*. 10th ed. Benjamin Cummings, San Fancisco: xxxi + 939 hlm.
- Turk, M., V. Montiel, D. Zigon, A. Plemenitas, dan J. Ramos. 2007. Plasma membrane composition of *Debaryomyces hansenii* adapts to changes in pH and external salinity. *Microbiology* 153: 3586--3592.
- Webster, J., dan R. Weber. 2007. *Introduction of fungi*. 3rd ed. Cambridge University Press, London: xx + 841 hlm.
- West Mountain Apiary. 2011. Colors bees see. 3 Mei: 4 hlm.
http://www.westmtnapiary.com/Bees_and_color.html. 24 Mei 2011, pkl 10.13 WIB.

Zahra, A. dan M. Talal. 2008. Impact of pollen supplements and vitamins on the development of hypopharyngeal gland and on brood area in honey bees.

Journal of Apicultural Science. **52**(2): 5--12.



Lampiran 1. Tingkat Konsumsi Lebah Madu *Apis cerana* terhadap *Pollen Substitute A*

No	Berat sebelum (g)	Berat setelah (g)	Tingkat konsumsi (g)	Persentase konsumsi (%)	Keterangan
1	6,2	6,1	0,1	1,61	tidak disukai
2	7,6	7,1	0,5	6,58	tidak disukai
3	6,6	5,8	0,8	12,12	tidak disukai
4	6,6	5,7	0,9	13,64	tidak disukai
5	6,9	5,8	1,1	15,94	tidak disukai
6	6,1	4,9	1,2	19,67	tidak disukai
7	7,2	5,6	1,6	22,22	tidak disukai
8	6,8	4,9	1,9	27,94	kurang disukai
9	7	5	2	28,57	kurang disukai
10	6,8	4,7	2,1	30,88	kurang disukai
11	6,4	4,4	2	31,25	kurang disukai
12	6,3	4,2	2,1	33,33	kurang disukai
13	7,2	4,8	2,4	33,33	kurang disukai
14	6,9	4,6	2,3	33,33	kurang disukai
15	6,5	3,9	2,6	40,00	kurang disukai
16	6,5	3,9	2,6	40,00	kurang disukai
17	7,5	4,4	3,1	41,33	kurang disukai
18	6,8	3,8	3	44,12	kurang disukai
19	6,6	3,6	3	45,45	kurang disukai
20	6,8	3,6	3,2	47,06	kurang disukai
21	6,8	3,6	3,2	47,06	kurang disukai
22	5,9	3	2,9	49,15	kurang disukai
23	6,5	3,2	3,3	50,77	Disukai
24	7,4	3,6	3,8	51,35	Disukai
25	7,4	3,6	3,8	51,35	Disukai
26	6,5	3,1	3,4	52,31	Disukai
27	4,7	2,2	2,5	53,19	Disukai
28	7,4	3,4	4	54,05	Disukai
29	6,6	3	3,6	54,55	Disukai
30	6,8	2,9	3,9	57,35	Disukai
31	6,8	2,8	4	58,82	Disukai
32	6,7	2,6	4,1	61,19	Disukai
33	6,4	2,4	4	62,50	Disukai
34	6,4	2,4	4	62,50	Disukai
35	7,6	2,4	5,2	68,42	Disukai

(Lanjutan.....)

No	Berat sebelum (g)	Berat setelah (g)	Tingkat konsumsi (g)	Persentase konsumsi (%)	Keterangan
36	6,7	2,1	4,6	68,66	Disukai
37	5,9	1,8	4,1	69,49	Disukai
38	6,5	1,9	4,6	70,77	Disukai
39	6,6	1,9	4,7	71,21	Disukai
40	6,7	1,2	5,5	82,09	sangat disukai
41	6,2	1	5,2	83,87	sangat disukai
42	6,2	0,9	5,3	85,48	sangat disukai
43	6,2	0,8	5,4	87,10	sangat disukai
44	6,4	0,8	5,6	87,50	sangat disukai
45	6,8	0,7	6,1	89,71	sangat disukai
46	6,8	0,5	6,3	92,65	sangat disukai

Lampiran 2. Tingkat Konsumsi Lebah Madu *Apis cerana* terhadap *Pollen Substitute B*

No	Berat sebelum (g)	Berat setelah (g)	Tingkat konsumsi (g)	Persentase konsumsi (%)	Keterangan
1	7,5	7	0,5	6,67	tidak disukai
2	6,7	5,9	0,8	11,94	tidak disukai
3	7,4	6,3	1,1	14,86	tidak disukai
4	7,1	6	1,1	15,49	tidak disukai
5	8	6,7	1,3	16,25	tidak disukai
6	6,9	5,7	1,2	17,39	tidak disukai
7	6,3	5,2	1,1	17,46	tidak disukai
8	6,7	5,5	1,2	17,91	tidak disukai
9	5,9	4,8	1,1	18,64	tidak disukai
10	7,3	5,9	1,4	19,18	tidak disukai
11	8,1	6,5	1,6	19,75	tidak disukai
12	6,7	5,3	1,4	20,90	tidak disukai
13	7,9	6,2	1,7	21,52	tidak disukai
14	6,9	5,4	1,5	21,74	tidak disukai
15	6,9	5,4	1,5	21,74	tidak disukai
16	8	6,2	1,8	22,50	tidak disukai
17	7,4	5,7	1,7	22,97	tidak disukai
18	7,8	6	1,8	23,08	tidak disukai
19	8,1	6,2	1,9	23,46	tidak disukai
20	8,1	6,2	1,9	23,46	tidak disukai
21	7,5	5,7	1,8	24,00	tidak disukai
22	5,8	4,4	1,4	24,14	tidak disukai
23	7	5,3	1,7	24,29	tidak disukai
24	7,6	5,7	1,9	25,00	tidak disukai
25	7,5	5,5	2	26,67	kurang disukai
26	6,6	4,8	1,8	27,27	kurang disukai
27	7,7	5,6	2,1	27,27	kurang disukai
28	7,4	5,2	2,2	29,73	kurang disukai
29	7,5	5	2,5	33,33	kurang disukai
30	7,8	5,2	2,6	33,33	kurang disukai
31	7,2	3,7	3,5	48,61	kurang disukai
32	6,6	3,2	3,4	51,52	disukai
33	12,9	5,6	7,3	56,59	disukai
34	7,3	3	4,3	58,90	disukai

(Lanjutan.....)

No	Berat sebelum (g)	Berat setelah (g)	Tingkat konsumsi (g)	Persentase konsumsi (%)	Keterangan
35	7,3	2,9	4,4	60,27	Disukai
36	8,2	3,2	5	60,98	Disukai
37	8,5	3,1	5,4	63,53	Disukai
38	6,4	1,6	4,8	75,00	Disukai
39	5,8	1	4,8	82,76	sangat disukai
40	7,3	0,6	6,7	91,78	sangat disukai



Lampiran 3, Tingkat Konsumsi Lebah Madu *Apis cerana* terhadap *Pollen Substitute C*

No	Berat sebelum (g)	Berat setelah (g)	Tingkat konsumsi (g)	Persentase konsumsi (%)	Keterangan
1	6,4	6,4	0	0,00	tidak disukai
2	6,1	5,7	0,4	6,56	tidak disukai
3	6,4	5,7	0,7	10,94	tidak disukai
4	7,6	6,7	0,9	11,84	tidak disukai
5	6,5	5,7	0,8	12,31	tidak disukai
6	7	6,1	0,9	12,86	tidak disukai
7	7,2	6,2	1	13,89	tidak disukai
8	7,1	6,1	1	14,08	tidak disukai
9	6,9	5,8	1,1	15,94	tidak disukai
10	6,1	4,8	1,3	21,31	tidak disukai
11	7,3	5,7	1,6	21,92	tidak disukai
12	7,2	5,2	2	27,78	kurang disukai
13	5,8	4,1	1,7	29,31	kurang disukai
14	6	4,2	1,8	30,00	kurang disukai
15	7,1	4,4	2,7	38,03	kurang disukai
16	8	4,9	3,1	38,75	kurang disukai
17	7,8	4,6	3,2	41,03	kurang disukai
18	8,2	4,7	3,5	42,68	kurang disukai
19	7,4	4,2	3,2	43,24	kurang disukai
20	7,3	4,1	3,2	43,84	kurang disukai
21	6,6	3,6	3	45,45	kurang disukai
22	7,2	3,9	3,3	45,83	kurang disukai
23	7,5	4	3,5	46,67	kurang disukai
24	7,3	3,8	3,5	47,95	kurang disukai
25	6,9	3,5	3,4	49,28	kurang disukai
26	7,2	3,6	3,6	50,00	kurang disukai
27	6,6	2,9	3,7	56,06	disukai
28	8	3,3	4,7	58,75	disukai
29	7,1	2,9	4,2	59,15	disukai
30	7,4	3	4,4	59,46	disukai
31	7,4	3	4,4	59,46	disukai

(Lanjutan.....)

No	Berat sebelum (g)	Berat setelah (g)	Tingkat konsumsi (g)	Persentase konsumsi (%)	Keterangan
32	7,7	3,1	4,6	59,74	disukai
33	7,5	3	4,5	60,00	disukai
34	7,2	2,8	4,4	61,11	disukai
35	6,5	2,4	4,1	63,08	disukai
36	6,3	2,3	4	63,49	disukai
37	8	2,9	5,1	63,75	disukai
38	7,7	2,6	5,1	66,23	disukai
39	6,3	2,1	4,2	66,67	disukai
40	7,2	2,3	4,9	68,06	disukai
41	8,1	2,4	5,7	70,37	disukai
42	7,7	2,1	5,6	72,73	disukai
43	7	1,9	5,1	72,86	disukai
44	7,5	2	5,5	73,33	disukai
45	6,4	1,7	4,7	73,44	disukai
46	7,1	1,6	5,5	77,46	sangat disukai
47	6,9	1,4	5,5	79,71	sangat disukai
48	7,5	1,3	6,2	82,67	sangat disukai
49	7	0,8	6,2	88,57	sangat disukai
50	7,1	0,8	6,3	88,73	sangat disukai
51	7,3	0,8	6,5	89,04	sangat disukai
52	7,2	0,7	6,5	90,28	sangat disukai

Lampiran 4. Pengukuran Suhu dan Kelembaban selama 20 hari

Hari	Tanggal	Pagi 08.00			Siang 12.00			Sore 16.00		
		Suhu	Kelembaban	Cuaca	Suhu	Kelembaban	Cuaca	Suhu	Kelembaban	Cuaca
0	9							27	79	Berawan
1	10	25	81	Berawan	28,5	69	Cerah	24	84	Hujan ringan
2	11	25	84	Berawan	26	73	Berawan	21	100	Hujan ringan
3	12	25	89	Berawan	26	77	Cerah	25	87	Mendung
4	13	24	91	Cerah	26	77	Cerah	24	94	Mendung
5	14	24	89	Cerah	20	100	Hujan ringan	22	100	Mendung
6	15	22	87	Berawan	25	80	Mendung	25	94	Mendung
7	16	26	74	Cerah	28	72	Cerah	23	98	Hujan ringan
8	17	22	95	Cerah	25	72	Cerah	26	89	Mendung
9	18	24	80	Cerah	27	75	Berawan	22	100	Hujan ringan
10	19	23	95	Cerah	22	94	Hujan ringan	23	91	Berawan
11	20	22,5	92	Berawan	26	77	Mendung	23	94	Hujan ringan
12	21	21	100	Hujan ringan	24	90	Cerah	24	94	Mendung
13	22	23	91,5	Cerah	25	85,5	Mendung	23	98	Hujan ringan
14	23	23	95	Cerah	26	86	Berawan	24	96	Mendung
15	24	23,5	95	Mendung	24	90	Mendung	22	95	Mendung
16	25	23	94	Cerah	26	83	Berawan	23	98	Mendung
17	26	24	89	Berawan	25	87	Berawan	21	100	Hujan ringan
18	27	24	96	Berawan	23	92	Hujan ringan	21	100	Hujan ringan
19	28	25	83	Cerah	27	79	Mendung	24	88	Mendung
20	29	23	90	Cerah	28	72	Cerah	26	87	Mendung

Lampiran 5. Peningkatan Berat Lebah Pekerja

No, Koloni	Perlakuan	Berat Lebah Pekerja						Persentase	Keterangan
		Hari ke 0/30	Berat/1	Hari ke 7/50	Berat/1	Hari ke 20/50	Berat/1		
1	PS A	1,4	46,67	2,8	56	3,5	70	50,00	
2	PS A	1,6	53,33	3,1	62	2,8	56	5,00	
3	PS A	1,5	50,00	-	-	-	-	-	Koloni minggat
4	PS B	-	-	-	-	3,1	62	-	
5	PS B	-	-	-	-	3,3	66	-	
6	PS B	1,6	53,33	2,3	46	2,6	52	-2,50	
7	PS C	1,3	43,33	2,4	48	3,2	64	47,69	
8	PS C	1,3	43,33	3,1	62	3,4	68	56,92	
9	PS C	1,3	43,33	2,7	54	-	-	24,62	Koloni minggat
10	Kontrol	1,4	46,67	3,1	62	3,3	66	41,43	
11	Kontrol	1,6	53,33	3,3	66	3,4	68	27,50	
12	Kontrol	1,6	53,33	3,8	76	3,1	62	16,25	

Lampiran 6. Hasil Analisis Anova dengan Software SPSS pada Data Konsumsi
Lebah madu *Apis cerana* terhadap *pollen substitute* yang diberikan

Oneway

Notes		
Output Created		20-May-2011 09:20:26
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	138
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
Syntax		ONEWAY Konsumsi BY Jenis /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC=BTUKEY BONFERRONI ALPHA(0.05).
Resources	Processor Time	0:00:00.047
	Elapsed Time	0:00:00.633

[DataSet1]

(Lanjutan.....)

Descriptives

Konsumsi

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					1	46		
2	40	32,5470	20,71617	3,27551	25,9216	39,1724	6,67	91,78
3	52	49,7248	24,60834	3,41256	42,8738	56,5758	0,00	90,28
Total	138	44,7756	24,30237	2,06876	40,6848	48,8664	0,00	92,65

Test of Homogeneity of Variances

Konsumsi

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,096	2	135	0,337

ANOVA

Konsumsi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8423,162	2	4211,581	7,843	0,001
Within Groups	72489,762	135	536,961		
Total	80912,924	137			

Post Hoc Tests**Multiple Comparisons**

Dependent Variable:Konsumsi

(I) Jenis	(J) Jenis	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Bonferroni	1 2	17,26735*	5,00970	0,002	5,1229	29,4118
	2 3	0,08954	4,69034	1,000	-11,2807	11,4598
	2 1	-17,26735*	5,00970	0,002	-29,4118	-5,1229
	3 2	-17,17781*	4,87342	0,002	-28,9918	-5,3638
	3 1	-0,08954	4,69034	1,000	-11,4598	11,2807
	1 3	17,17781*	4,87342	0,002	5,3638	28,9918

*. The mean difference is significant at the 0,05 level.

Universitas Indonesia

(Lanjutan.....)

Homogeneous Subsets

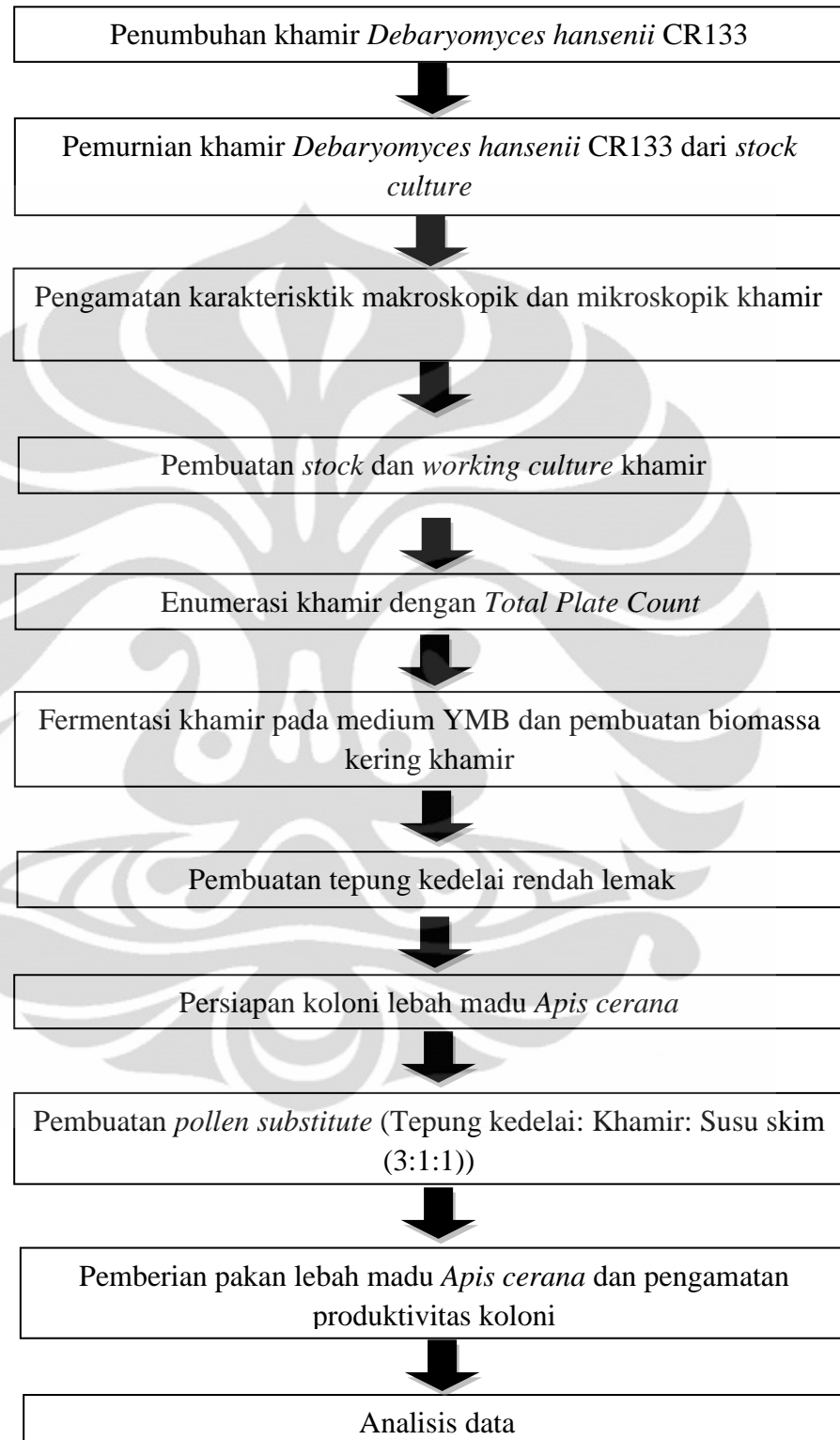
Konsumsi				
	Jenis	N	Subset for alpha = 0,05	
			1	2
Tukey B ^{a,b}	2	40	32,5470	
	3	52		49,7248
	1	46		49,8143

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

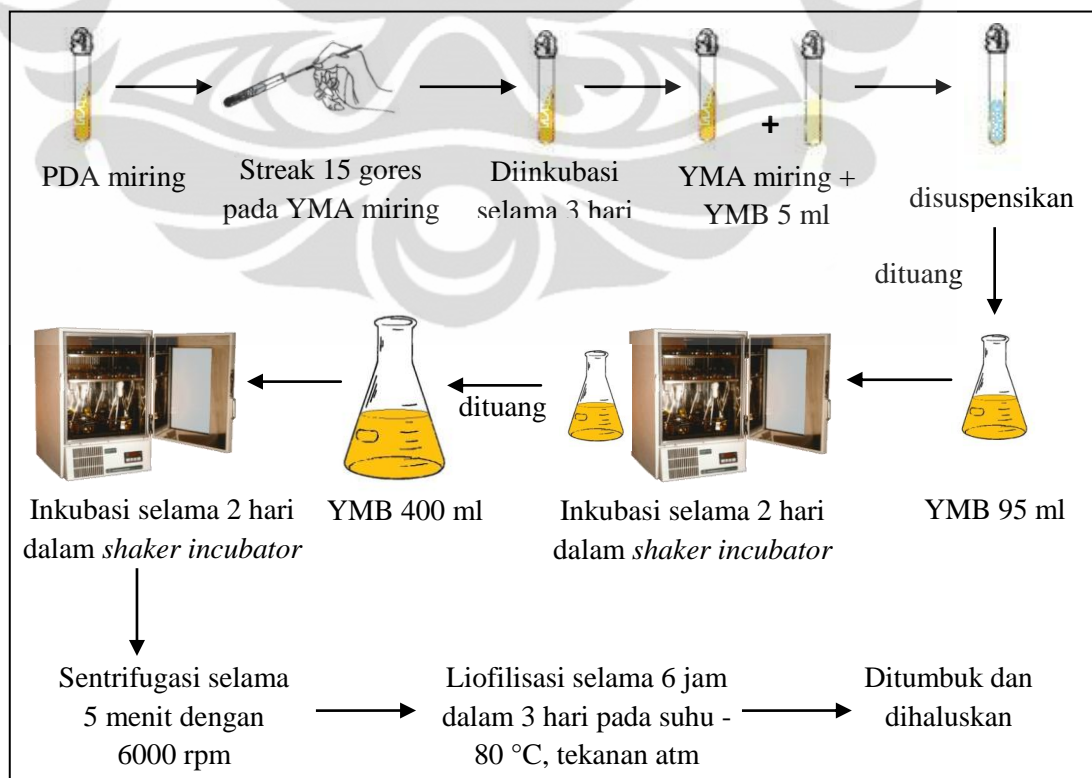
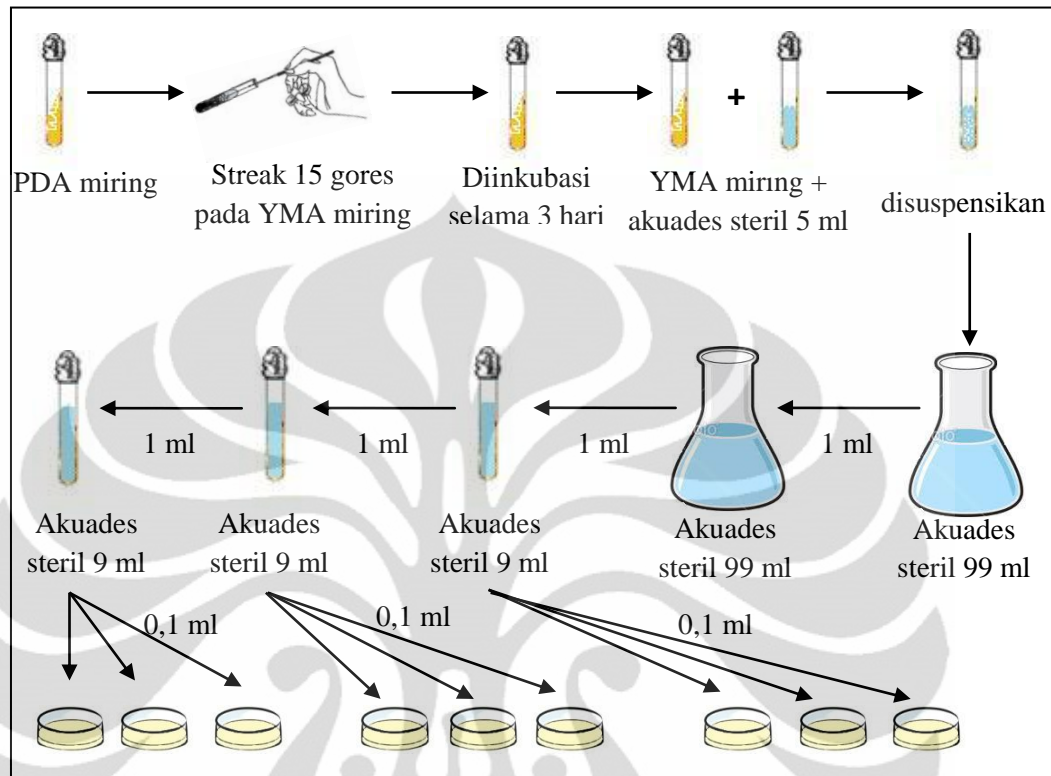
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 45,475.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

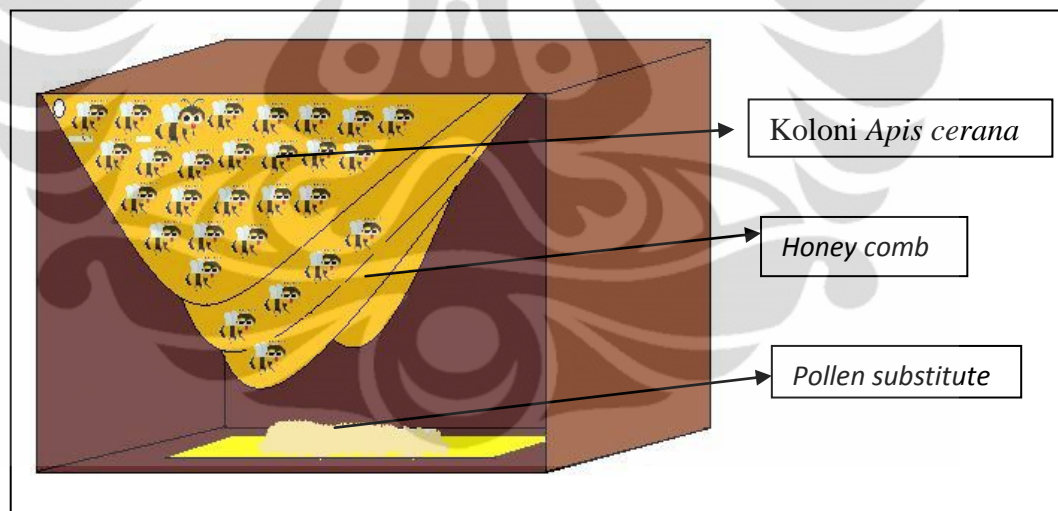
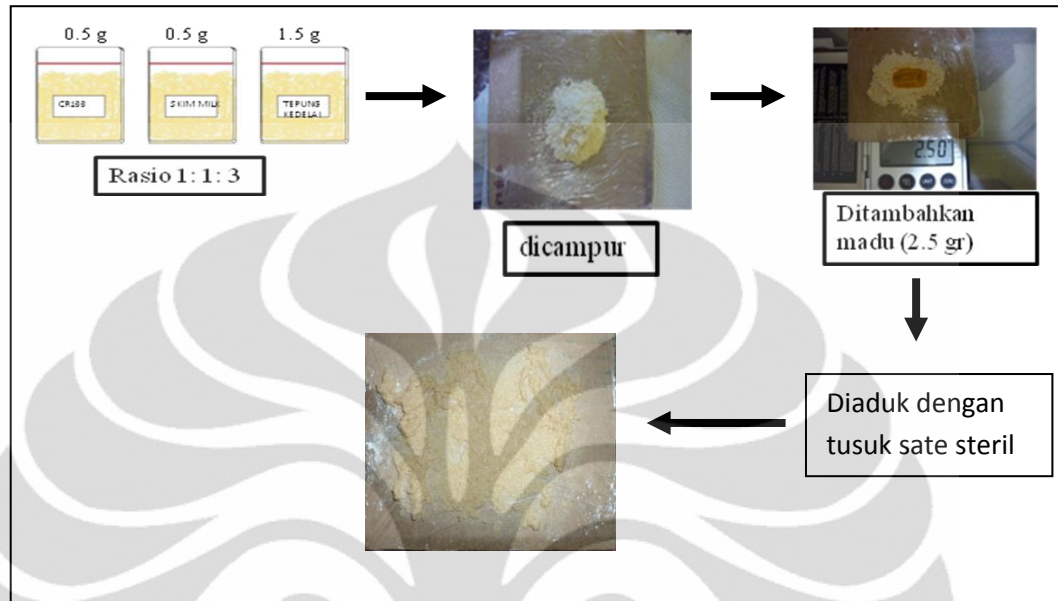
Lampiran 7. Skema Kerja Penelitian



Lampiran 8. Skema Kerja Enumerasi dan Pembuatan biomassa kering



Lampiran 9. Skema kerja pembuatan *pollen substitute* dan Pemberian *pollen substitute* pada koloni *A. cerana*.



Lampiran 10. Gambar



Gambar 1. Pupa calon ratu

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Gambar 2. Pengukuran keliling *honeycomb*

[Sumber: Dokumentasi pribadi]

(Lanjutan.....)



Gambar 4. A. *Pollen substitute* bentuk pasta sebelum diberikan kepada lebah madu *Apis cerana*, B. *Pollen substitute* yang telah diberikan kepada lebah madu *Apis cerana*.

[Sumber: Dokumen pribadi.]



Gambar 5. Penghitungan penambahan jumlah *honeycomb*

[Sumber: Dokumentasi pribadi]