Karakterisasi dan Klasifikasi Numerik Khamir Madu Hutan dari Sulawesi Tengah

Characterization and Numerical Classification of Yeasts Isolated from Wild Honey in Central Sulawesi

Prihartini M¹, Ilmi M^{1*}

¹Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Jalan Teknik Selatan, Sekip Utara 55281, Yogyakarta

Prihartini M, Ilmi M. 2018 — Karakterisasi dan Klasifikasi Numerik Khamir Madu Hutan dari Sulawesi Tengah. Jurnal Mikologi Indonesia 2 (2), 112—128

Abstrak

Khamir merupakan fungi uniseluler yang memiliki habitat hidup di hampir semua tempat seperti wilayah akuatik, daratan, dan udara termasuk dalam makanan. Madu merupakan salah satu makanan dengan kandungan gula tinggi dan aktivitas air (aw) yang rendah. Madu hutan Sulawesi Tengah merupakan salah satu jenis madu asal Indonesia yang dihasilkan oleh lebah madu *Apis dorsata*. Madu mengandung mikroorganisme, terutama khamir, yang berasal dari nektar yang dihisap oleh lebah madu. Penelitian karakterisasi dan klasifikasi khamir dalam madu hutan Sulawesi Tengah dilakukan untuk memperoleh informasi mengenai keragaman isolat khamir dalam madu hutan dan untuk mengetahui karakteristik isolat khamir dalam madu hutan Sulawesi Tengah. Khamir diisolasi dari sampel madu hutan menggunakan medium *Bean Sprouts Extract Agar* (BSEA). Isolat dikarakterisasi meliputi uji karakter morfologi koloni, morfologi sel, dan uji karakter fisiologi-biokimia. Masing-masing karakter yang diuji dikodekan dengan 1 apabila hasil positif dan 0 apabila negatif dan dibuat matriks $n \times t$. Data dianalisis dengan metode taksonomi numerik dengan tingkat kemiripan ditentukan menggunakan *Jaccard coefficient* (SJ) dan *Simple Matching coefficient* (SSM). Sementara pengelompokan (*clustering*) digunakan metode UPGMA. Data diolah menggunakan program MVSP dan disajikan dalam bentuk dendrogram. Dari 11 sampel madu hutan berhasil diisolasi 27 jenis khamir yang dikelompokkan menjadi 6 genus dan 1 *outlier* berdasarkan nilai indeks kesamaan $\geq 70\%$ menunjukkan keragaman yang rendah. Karakteristik isolat khamir dalam madu hutan Sulawesi Tengah yaitu merupakan khamir *Ascogenous* yang bersifat osmofilik, mampu mengasimilasi 8 jenis karbon, tumbuh pada suhu 37°C, memfermentasi glukosa, non-fermentatif terhadap galaktosa, laktosa, dan sukrosa, serta mengasimilasi nitrogen khususnya KNO₃.

Kata kunci – karakterisasi–khamir–klasifikasi numerik–madu hutan

Abstract

Yeast is unicellular fungi that living in almost all ecosystems from aquatic, land, and air areas including food. Honey is one of the foods with high sugar content and low water activity (aw). Central Sulawesi wild honey is one type of honey from Indonesia produced by

Apis dorsata honey bees. The honey contains microorganisms, especially yeasts that are primarily introduced by honeybees. This study was conducted to characterize and classify yeasts diversity in Central Sulawesi wild honey. The yeasts were isolated from wild honey samples using Bean Sprouts Extract Agar (BSEA) medium. Isolates were characterized based on their colony morphology, cell morphology, and biochemical-physiological characters. Each character was encoded with 1 if the result was positive and 0 if negative, and was made in matrix $n \times t$. The data was analyzed by numerical taxonomic method with similarity level determined using Jaccard coefficient (SJ) and Simple Matching coefficient (SSM). UPGMA method was used for clustering. Data was processed using MVSP program and presented as dendrogram. A total 27 yeasts species from 11 samples of wild honey were successfully isolated. These species were grouped into 6 genus and 1 outlier based on a dendrogram with a cut-off $\geq 70\%$ similarity. Characteristics of yeasts isolated from Central Sulawesi wild honey are osmohilic Ascomycetes yeasts, capable of assimilating 8 types of carbon, enable to grow at 37°C , enable to fermenting glucose, non-fermentative to galactose, lactose and sucrose, and enable to assimilating nitrogen especially KNO_3 .

Keywords— characterisation — numerical classification—yeast — wild honey

Pendahuluan

Khamir (*yeast*) merupakan fungi uniseluler eukariotik yang reproduksi aseksualnya terutama melalui pembentukan tunas (*budding*) atau pembelahan (*fission*) dan memiliki fase seksual yang tidak tertutup dalam badan buah (Kurtzman *et al.* 2011). Ukuran sel khamir sangat bervariasi bergantung pada jenis spesies dan kondisi pertumbuhannya (Walker 2009). Beberapa khamir memiliki panjang sel 2-3 μm sementara khamir lainnya dapat mencapai 20-50 μm . Lebar sel khamir yaitu antara 1-10 μm (Walker 2009).

Menurut McLaughlin dan Spatafora (2015), khamir termasuk dalam Kingdom Eumycota. Berdasarkan taksonominya, khamir termasuk dalam dua kelompok yaitu filum *Ascomycota* dan filum *Basidiomycota* (Kurtzman & Sugiyama 2015). Filum *Ascomycota* merupakan kelompok khamir yang memproduksi askospora (*asporogenous yeast*) dan tidak membentuk askokarp. Sebagian besar khamir kelompok ini merupakan anggota dari ordo *Saccharomycetales* (Hamamoto & Nakase 2000). Sementara itu filum *Basidiomycota* memproduksi basidia yang merupakan sel-sel, di mana spora seksual (basidiospora) diproduksi. Ciri-ciri khamir *Basidiomycota* yaitu memiliki bentuk koloni *soft*, pada umumnya *slimy* atau *muroid*. Contoh khamir anggota filum *Basidiomycota* yaitu genus *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* (Boekhout *et al.* 2011). Khamir *Basidiomycetes* dapat dibedakan dari khamir *Ascomycetes* dengan uji urease positif (Choudhary & Johri 2009).

Khamir memiliki habitat hidup hampir di semua tempat yaitu di wilayah akuatik, daratan, dan udara (Starmer & Lachance 2011). Khamir banyak ditemukan pada daun, buah, dan nektar bunga. Khamir lainnya banyak ditemukan di saluran pencernaan beberapa hewan khususnya serangga dan juga beberapa ada yang bersifat patogen pada manusia dan hewan berdarah panas (Carlile *et al.* 2001). Beberapa khamir hidup pada lingkungan ekstrem seperti lingkungan dengan kandungan konsentrasi gula atau garam yang tinggi (memiliki aktivitas air yang rendah), temperatur yang rendah, dan ketersediaan oksigen yang rendah (Walker 2009). Selain itu khamir juga mampu tumbuh pada makanan. Salah satu makanan yang diketahui terdapat khamir yang tumbuh di dalamnya yaitu madu (Thacker 2012).

Madu merupakan substansi manis alami yang diproduksi oleh lebah madu dari nektar tanaman, sekresi dari bagian tubuh tanaman, atau sekresi dari serangga penghisap nektar tanaman yang kemudian dikumpulkan oleh lebah tersebut, ditransformasi dengan mengkombinasikan substansi spesifik, didepositkan, dikeringkan, disimpan, dan dibiarkan matang di dalam sarang lebah (Codex Alimentarius Commission 2000). Madu memiliki

tekstur kental, mengandung gula yang tinggi (tekanan osmotik tinggi), dan memiliki aktivitas air (a_w) yang rendah yang hanya diproduksi secara alami oleh lebah madu dari nektar bunga (Thacker 2012). Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki jenis-jenis madu yang bervariasi, salah satunya yaitu madu hutan asal Sulawesi Tengah yang merupakan salah satu sentra produksi madu hutan di Indonesia. Madu hutan merupakan madu yang diambil langsung dari sarang lebah madu di hutan yang membentuk sarang lebah terbuka pada ketinggian lebih dari 10 m di wilayah hutan hujan tropis (Hadisoesilo 2001).

Penelitian yang telah ada menunjukkan bahwa di dalam madu terdapat mikroorganisme yang tumbuh, terutama khamir osmofilik dan kapang serta bakteri pembentuk spora (Rosa & Peter 2006, Sereia *et al.* 2010). Namun kandungan substansi alami yang terdapat dalam madu menyebabkan madu mengandung mikrobial dengan level yang rendah. Kontaminasi mikrobial di dalam madu sebagian besar disebabkan karena perlakuan pasca-panen dan kebersihan dalam penanganan (Snowdon & Cliver 1996). Beberapa faktor yang berkontribusi pada sifat antimikrobial alami pada madu antara lain tekanan osmotik tinggi, aktivitas air (a_w) yang rendah, pH rendah, rasio C-N yang tinggi, potensial redoks yang rendah, kandungan protein yang rendah, sistem glukosa oksidase, viskositas yang membatasi oksigen terlarut, dan kandungan bahan-bahan kimia seperti *lysozyme*, asam (fenolik), *pinocembrin*, terpen, *benzyl alcohol*, dan senyawa volatil (Tysset & de Rautlin de la Roy 1974, Molan 1992).

Beberapa penelitian yang telah dilakukan melaporkan bahwa khamir yang terdapat pada madu pada umumnya berasal dari genus *Ascosphaera*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Nematospora*, *Oosporidium*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Schwanniomyces*, *Trichosporan*, *Torula*, *Torulopsis*, dan *Zygosaccharomyces* (Snowdon & Cliver 1996). Sementara itu penelitian mengenai karakterisasi dan klasifikasi isolat khamir dari madu hutan Sulawesi Tengah belum ada sehingga hal ini dapat menjadi peluang untuk memperoleh informasi mengenai karakteristik dan keragaman isolat khamir yang terdapat dalam madu hutan Sulawesi Tengah.

Metoda Penelitian

Waktu dan lokasi

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta pada bulan Desember 2017 hingga Mei 2018.

Isolasi dan purifikasi khamir dari madu hutan

Khamir diisolasi dari 11 sampel madu hutan asal Sulawesi Tengah yang diperoleh dari hasil penelitian Rasyiid (2017) yang terdiri dari 7 kabupaten, 3 kecamatan, dan 1 kelurahan (Gambar 1) dengan metode pengenceran ke dalam medium *Bean Sprouts Extract Agar* (BSEA).

Karakterisasi dan klasifikasi isolat khamir dari sampel madu hutan

Karakterisasi dan klasifikasi isolat khamir dari sampel madu hutan digunakan buku acuan "*The Yeasts: A Taxonomic Study 5th ed.*" oleh Kurtzman *et al.* (2011) dan "*The Yeasts: A Taxonomic Study 4th ed.*" oleh Kurtzman *et al.* (1998) meliputi uji karakter morfologi koloni, morfologi sel, dan uji karakter fisiologi-biokimia.

Morfologi koloni

Isolat khamir ditumbuhkan dalam *Malt Extract Agar* (MEA) secara *streak plate* dan diinkubasi selama 1-7 hari pada suhu 25°C. Pengamatan morfologi koloni meliputi tekstur, warna, permukaan, elevasi dan margin. Ilustrasi dan definisi digunakan referensi buku *Ainsworth and Bisby's dictionary of The Fungi* (2008).

Morfologi sel

Isolat ditumbuhkan dalam *Malt Extract Broth* (MEB) dan diinkubasi selama 2-4 hari lalu diamati dibawah mikroskop. Pengamatan yang dilakukan meliputi tipe reproduksi aseksual (vegetatif), bentuk sel, ukuran sel dan susunan sel. Kemudian diamati pertumbuhan khamir di dalam medium cair.

Pengamatan filamentasi, pembentukan endospora aseksual, pembentukan kladospora dan pembentukan basidiospora dilakukan dengan menggunakan teknik *Dalman Plate*. Isolat khamir diinokulasikan ke dalam medium *Corn Meal Agar* (CMA) secara *streak plate* pada satu sisi dan satu sisi lainnya (paralel). Diatas bekas masing-masing *streak* diletakkan gelas penutup steril secara aseptis. Kultur diinkubasi selama 21 hari pada suhu 25°C. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop.

Pengamatan askospora dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada medium *vegetable wedges* (medium wortel). Isolat diinokulasikan ke dalam medium wortel secara *streak plate*, diinkubasi pada suhu 25°C. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop setelah hari ke-21.

Sifat fisiologi-biokimia

Kemampuan fermentasi karbohidrat diuji menggunakan tabung Durham. Digunakan 5 jenis gula yaitu (*D-glucose*, *D-galactose*, *D-sucrose*, *D-maltose* dan *D-lactose*). Isolat khamir diinokulasi ke dalam medium 5 mL *fermentation basal medium* yang ditambahkan 2% (w/v) larutan gula uji dan diinkubasi selama 7 hari pada 25°C. Hasil pengamatan dikategorikan menjadi 3, (+) apabila *strongly positive* yaitu tabung Durham terisi gas dan terjadi perubahan warna dalam waktu 4 hari, (w) *weakly positive* apabila tabung Durham terisi gas 1/3 dari volume tabung namun terjadi perubahan warna pada hari ke-7, dan (-) *negative* apabila tidak terbentuk gas dan tidak terjadi perubahan warna pada hari ke-7.

Uji asimilasi karbon digunakan metode *Auxanograms* (Kurtzman & Fell 1998) dengan modifikasi. Sumber karbon yang digunakan yaitu *D-glucose*, *D-lactose*, *D-maltose*, *D-galactose*, *citric acid*, *D-xylose*, *D-sucrose* dan *D-mannitol*. Medium basal agar nitrogen (*nitrogen base*) yang telah ditambahkan sumber karbon setara 5 g glukosa dituang ke dalam petri yang telah ditandai dengan spidol yang membagi petri menjadi 8 kuadran. Masing-masing isolat khamir diinokulasikan secara *streak* ke dalam medium pada bagian tepi. Dalam satu cawan petri, dapat diinokulasikan 1-8 jenis isolat khamir secara bersamaan. Pengamatan dilakukan setiap 2 hari hingga hari ke-4. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan koloni pada medium.

Uji asimilasi nitrogen digunakan metode *Auxanograms* (Kurtzman & Fell 1998) dengan modifikasi. Isolat khamir diinokulasikan secara *streak* pada medium basal agar karbon (*carbon base*) padat yang telah ditambahkan sumber nitrogen (0,26 g KNO₃ dan 0,64 g NaNO₂). Pengamatan dilakukan setelah 2 dan 4 hari. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan dalam medium.

Uji pertumbuhan dalam medium dengan tekanan osmotik tinggi dilakukan dengan menginokulasi isolat khamir ke dalam 5 mL medium cair 10% NaCl + 5% glukosa. Untuk pertumbuhan dalam medium 50% dan 60% glukosa, 1 ose isolat khamir diinokulasikan ke dalam medium 50% dan 60% glukosa agar. Kemudian diinkubasi selama 7 hari pada suhu 25°C. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan dalam medium.

Uji pertumbuhan dalam berbagai suhu dilakukan dengan menginokulasi isolat ke dalam medium MEA. Inkubasi dilakukan pada suhu 25, 30, dan 37°C selama 4 hari. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan dalam medium.

Uji kemampuan hidrolisis urea dilakukan dengan menginokulasi isolat khamir ke dalam medium *Christensen's Agar* miring. Inkubasi dilakukan selama 4 hari pada suhu 25°C. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi merah muda pada medium uji.

Uji toleransi terhadap 1% asam asetat dilakukan dengan menginokulasi isolat khamir ke dalam medium agar 1% asam asetat secara *streak plate*. Kemudian diinkubasi selama 2-4 hari pada suhu 25°C. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan dalam medium.

Uji pencairan gelatin dilakukan dengan menginokulasi khamir ke dalam medium MEB yang ditambahkan 20% gelatin. Inkubasi dilakukan hingga minggu ke-3 pada suhu 25°C. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pencairan gelatin (terdapat aktivitas proteolitik).

Uji produksi asam dilakukan dengan menumbuhkan isolat khamir dalam medium *Custer's Chalk* agar secara *streak plate*. Diinkubasi pada suhu 25°C selama 4 hari. Hasil positif ditunjukkan dengan kapur yang terlarut sebagai akibat adanya produksi asam oleh khamir yang mungkin terbentuk.

Pengolahan dan analisis data

Masing-masing isolat diuji dengan beberapa karakter tersebut di atas. Karakter dikodekan dengan 1 apabila hasil positif, dan 0 apabila negatif. Selanjutnya dibuat matriks n (strain mikroba) $\times t$ (unit karakter). Data dianalisis dengan taksonomi numerik. Tingkat kemiripan (similaritas) setiap strain mikroba (OTU/*Operational Taxonomical Unit*) ditentukan menggunakan *Jaccard's coefficient* (S_J) yang mengabaikan sifat negatif ganda (Sneath 1957) dan *Simple Matching Coefficient* (S_{SM}) yang melibatkan sifat negatif ganda. Pengelompokan (*clustering*) digunakan metode *Unweighted Paired Group Method with Arithmetic Averages* (UPGMA) (Sneath dan Sokal 1974). Data diolah menggunakan program *Multi Variate Statistical Package* (MVSP) yang selanjutnya disajikan dalam bentuk dendrogram.

Jaccard's Coefficient :

$$S_J = \frac{a}{a + b + c} \times 100\%$$

(Jaccard 1901)

Simple Matching Coefficient :

$$S_{SM} = \frac{a + d}{a + b + c + d} \times 100\%$$

(Sokal & Michener 1958)

Keterangan :

- a = kedua strain positif (+)
- b = strain pertama (+), strain kedua (-)
- c = strain pertama (-), strain kedua (+)
- d = strain pertama (-), strain kedua (-)

Persentase isolat dengan karakter positif pada masing-masing kluster yang terbentuk dihitung dan disajikan dalam bentuk tabel. Analisis data dilakukan secara deskriptif meliputi klasifikasi isolat khamir dan karakteristik isolat khamir yang ada dalam madu hutan Sulawesi Tengah.

Hasil

Isolasi dan purifikasi isolat khamir dari madu hutan Sulawesi Tengah

Pada penelitian ini, dilakukan isolasi khamir dari 11 sampel madu hutan asal 7 kabupaten, 3 kecamatan, dan 1 kelurahan di Sulawesi Tengah. Berdasarkan hasil isolasi, diperoleh total 28 jenis isolat khamir (Tabel 1). Sebanyak 2 isolat diisolasi dari madu hutan

asal Kecamatan Ampana, Kabupaten Tojo Una-Una (AP 1, AP 3), 2 isolat diisolasi dari madu hutan asal Kabupaten Banggai Kepulauan (BK 1.1, BK 3.2), 2 isolat diisolasi dari madu hutan asal Kecamatan Kasimbar, Kabupaten Parigi-Moutong (KS 1, KS 2), 3 isolat diisolasi dari madu hutan asal Kecamatan Luwuk, Kabupaten Banggai (LW 1.1, LW 3.1, LW 3.2), 4 isolat diisolasi dari madu hutan asal Kabupaten Morowali (MR 1.2, MR 2.2, MR 3.1, MR 3.2), 2 isolat diisolasi dari madu hutan asal Kelurahan Ogoamas, Kabupaten Donggala (OG 1, OG 2), 3 isolat diisolasi dari madu hutan asal Kabupaten Parigi-Moutong (PM 1.1, PM 2.1, PM 3.2), 3 isolat diisolasi dari madu hutan asal Kabupaten Poso (PS 1.1, PS 1.2.1, PS 3.2), 3 isolat diisolasi dari madu hutan asal Kabupaten Sigi (SG 1.2, SG 3.1, SG 3.2), 3 isolat diisolasi dari madu hutan asal Kabupaten Toli-Toli (TL 1.1, TL 2.2, TL 3.2) dan 1 isolat (BL 1) diisolasi dari Kecamatan Balaesang, Kabupaten Donggala dengan lokasi pengambilan sampel berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Rasyiid (2017) seperti ditunjukkan pada Gambar 1.

Gambar 1 Peta lokasi pengambilan sampel madu hutan Sulawesi Tengah. AP.Kecamatan Ampana, Kabupaten Tojo Una-Una. BK.Kabupaten Banggai Kepulauan; KS: Kecamatan Kasimbar, Kabupaten Parigi-Moutong. LW.Kecamatan Luwuk, Kabupaten Banggai. MR.Kabupaten Morowali. OG.Kelurahan Ogoamas, Kabupaten Donggala. PM.Kabupaten Parigi-Moutong. PS.Kabupaten Poso. SG. Kabupaten Sigi. TL.Kabupaten Toli-Toli. BL.Kecamatan Balaesang, Kabupaten Donggala (Rasyiid 2017, Google Earth 2018).

Pada penelitian ini, digunakan 63 jenis karakter untuk mengkarakterisasi 27 isolat khamir. Hasil analisis klasifikasi numerik isolat khamir dari 10 sampel madu hutan asal Sulawesi Tengah yaitu berupa dendrogram dengan menggunakan dua metode perhitungan nilai similaritas yaitu *Simple Matching Coefficient* (S_{sm}) (Gambar 2) dan *Jaccard's Coefficient* (S_j) (Gambar 3) dengan algoritma *Unweighted Paired Group Method with Arithmetic Averages* (UPGMA).

Tabel 1 Isolat khamir dari 11 sampel madu hutan asal Sulawesi Tengah

No.	Sampel	Isolat Khamir
1.	Kecamatan Ampana, Kabupaten Tojo Una-Una (AP)	<ul style="list-style-type: none"> • AP 1 • AP 3
2.	Kabupaten Banggai Kepulauan (BK)	<ul style="list-style-type: none"> • BK 1.1 • BK 3.2
3.	Kecamatan Kasimbar, Kabupaten Parigi-Moutong (KS)	<ul style="list-style-type: none"> • KS 1 • KS 2
4.	Kecamatan Luwuk, Kabupaten Banggai (LW)	<ul style="list-style-type: none"> • LW 1.1 • LW 3.1 • LW 3.2
5.	Kabupaten Morowali (MR)	<ul style="list-style-type: none"> • MR 1.2 • MR 2.2 • MR 3.1 • MR 3.2
6.	Kelurahan Ogoamas, Kabupaten Donggala (OG)	<ul style="list-style-type: none"> • OG 1 • OG 2
7.	Kabupaten Parigi-Moutong (PM)	<ul style="list-style-type: none"> • PM 1.1 • PM 2.1 • PM 3.2
8.	Kabupaten Poso (PS)	<ul style="list-style-type: none"> • PS 1.1 • PS 1.2.1 • PS 3.2
9.	Kabupaten Sigi (SG)	<ul style="list-style-type: none"> • SG 1.2 • SG 3.1 • SG 3.2
10.	Kabupaten Toli-Toli (TL)	<ul style="list-style-type: none"> • TL 1.1 • TL 2.2 • TL 3.2
11.	Kecamatan Balaesang, Kabupaten Donggala (BL)	<ul style="list-style-type: none"> • BL 1

Berdasarkan Gambar 2 diketahui bahwa pada batas indeks similaritas ($IS \geq 70\%$) metode S_{sm} , 27 isolat khamir dikelompokkan menjadi 1 klaster. Sementara berdasarkan Gambar 3 diketahui bahwa pada batas $IS \geq 70\%$ metode S_j , 27 isolat khamir dikelompokkan menjadi 6 klaster dengan 1 *single-item/outlier*.

Berdasarkan Gambar 3 diketahui bahwa 27 isolat khamir mengelompok membentuk 6 klaster yaitu klaster I, II, III, IV, V, dan VI serta 1 *single-item (outlier)* pada nilai similaritas $\geq 70\%$. Klaster I terdiri dari 2 isolat yaitu isolat PS 1.2.1 dan PM 1.1, klaster II terdiri dari 5 isolat yaitu TL 2.2, TL 3.2, TL 1.1, SG 3.2, dan KS 1, klaster III terdiri dari 2 isolat yaitu LW 3.1 dan BK 3.2, klaster IV terdiri 3 isolat yaitu PS 3.2, OG 1, dan KS 2, klaster V terdiri dari 10 isolat yaitu SG 1.2, MR 2.2, MR 1.2, OG 2, LW 3.2, MR 3.2, MR 3.1, SG 3.1, LW 1.1 dan BK 1.1, klaster VI terdiri dari 4 isolat yaitu PM 2.1, AP 3, PM 3.2, dan AP 1, serta isolat PS 1.1 berada di luar kelompok (*single-item/outlier*).

Gambar 2 Dendrogram hubungan fenetik dari 27 isolat khamir hasil analisis *Simple Matching Coefficient* (S_{sm}) dengan dengan batas $IS \geq 70\%$

Gambar 3 Dendrogram hubungan fenetik dari 27 isolat khamir hasil analisis *Jaccard's Coefficient* (S_j) dengan batas $IS \geq 70\%$

Tabel 2 menunjukkan karakter masing-masing klaster yang terbentuk dari hasil klasifikasi numerik-fenetik. Karakteristik masing-masing klaster ditunjukkan dengan persentase isolat positif.

Pembahasan

Isolasi dan purifikasi isolat khamir dari madu hutan Sulawesi Tengah

Madu hutan merupakan salah satu jenis madu asal Indonesia, salah satunya provinsi Sulawesi Tengah yang dihasilkan oleh lebah madu *Apis dorsata* (Hadisoesilo 2001). Madu mengandung kadar gula yang tinggi (tekanan osmotik tinggi), aktivitas air yang rendah

(a_w), pH rendah (lingkungan asam), rasio C-N yang tinggi, potensial redoks (Eh) yang rendah, kandungan protein yang rendah, sistem glukosa oksidase, viskositas yang membatasi oksigen terlarut, dan kandungan bahan-bahan kimia seperti *lysozyme*, asam (fenolik), *pinocembrin*, terpen, *benzyl alcohol*, dan senyawa volatil yang seluruhnya mampu menghambat pertumbuhan mikrobial (Tysset & de Rautlin de la Roy 1974, Molan 1992, Snowdon & Cliver 1996). Berdasarkan ekosistem tersebut, keberadaan khamir yang terdapat di dalam madu hutan didominasi oleh khamir-khamir yang mampu hidup pada kondisi-kondisi ekstrim seperti kondisi dengan tekanan osmotik tinggi, pH rendah, dan kadar air rendah.

Tabel 2 Karakteristik masing-masing kluster

No.	Karakter	Persentase isolat positif (%)						Outlier
		I	II	III	IV	V	VI	
	Tekstur koloni							
1	<i>Butyrous</i> (seperti butter)	100	100	100	100	100	100	100
	Warna koloni							
2	Krem	0	20	0	33	0	50	0
3	Krem kecoklatan	0	0	0	0	0	25	0
4	Putih	100	20	100	0	70	0	0
5	Putih sedikit krem	0	20	0	67	10	25	100
6	Putih susu	0	40	0	0	20	0	0
	Permukaan koloni							
7	<i>Dull</i>	0	40	0	67	20	50	100
8	<i>Smooth</i>	50	60	100	0	80	50	0
9	<i>Rough</i>	50	0	0	33	10	0	0
10	<i>Folded</i>	0	0	0	33	0	0	0
	Bentuk koloni							
11	<i>Circular</i>	100	100	100	100	100	100	100
	Elevasi koloni							
12	<i>Raised</i>	100	80	100	100	90	100	0
13	<i>Convex</i>	0	20	0	0	0	0	100
14	<i>Pulvinate</i>	0	0	0	0	10	0	0
	Tepi koloni							
15	<i>Entire</i>	100	100	100	100	100	100	100
	Tipe pertunasan							
16	<i>Multilateral budding</i>	100	100	100	100	100	100	100
	Bentuk Sel							
17	<i>Subglobose (prolate spheroidal)</i>	0	0	50	33	0	50	0
18	<i>Broadly ellipsoidal (subprolate)</i>	100	100	0	67	100	50	0
19	<i>Ellipsoidal</i>	0	0	50	0	0	0	100
	Panjang sel (μm)							
20	<4	0	0	100	0	30	0	0
21	4-5	100	100	0	100	70	0	100
22	>5	0	0	0	0	0	100	0
	Lebar sel (μm)							
23	<3.5	50	20	100	0	90	0	100
24	3.5-5	50	80	0	100	10	50	0
25	>5	0	0	0	0	0	50	0
	Susunan sel							
26	<i>Aggregated in large clumps</i>	100	100	100	100	100	100	100
	Pertumbuhan dalam medium cair							
27	<i>Compact sediment</i>	50	0	0	0	0	75	0
28	<i>Flocculent sediment</i>	50	100	100	100	100	25	100
	Filamentasi							
29	<i>Pseudohifa</i>	50	0	0	67	0	100	100
No.	Karakter	Persentase isolat positif (%)						

	I	II	III	IV	V	VI	Outlier
Jumlah askospora							
30 1-4	0	0	50	100	100	0	0
Bentuk askospora							
31 <i>Globose</i>	0	0	50	100	100	0	0
Permukaan askospora							
32 <i>Soft</i>	0	0	50	100	100	0	0
Bentuk askus							
33 <i>Conjugated (dumbbell-shaped)</i>	0	0	50	100	100	0	0
Fermentasi D-glucose							
34 Lemah	50	0	0	0	40	0	0
35 Positif (<i>strong</i>)	50	100	100	100	60	100	100
Fermentasi D-galactose							
36 Negatif	0	0	0	0	0	0	0
Fermentasi D- Sucrose							
37 Negatif	0	0	0	0	0	0	0
Fermentasi D-Maltose							
38 Negatif	50	40	0	67	90	0	0
39 Lemah	50	60	0	33	10	25	100
40 Positif (<i>strong</i>)	0	0	100	0	0	75	0
Fermentasi D-Lactose							
41 Negatif	0	0	0	0	0	0	0
Asimilasi Karbon							
42 <i>D-glucose</i>	100	100	100	100	100	100	100
43 <i>Lactose</i>	100	100	100	100	100	100	100
44 <i>Maltose</i>	100	100	100	100	100	100	100
45 <i>D-galactose</i>	100	100	100	100	100	100	100
46 <i>Citric Acid</i>	100	100	100	100	100	100	100
47 <i>D-Xylose</i>	100	100	100	100	100	100	100
48 <i>Sucrose</i>	100	100	100	100	100	100	100
49 <i>D-mannitol</i>	100	100	100	100	100	100	100
Asimilasi Nitrogen							
50 KNO ₃	100	100	100	100	100	100	100
51 NaNO ₂	100	80	0	33	90	100	0
Tekanan osmotik							
10% NaCl+5% glukosa							
52 +3(<i>good</i>)	100	0	100	33	50	50	100
53 +2(<i>moderate</i>)	0	20	0	0	40	50	0
54 +1(<i>weak</i>)	0	80	0	67	10	0	0
55 50% glukosa	100	100	100	100	100	100	100
56 60% glukosa	100	100	100	100	100	100	100
Pertumbuhan dalam berbagai suhu							
57 Suhu 35°C	100	100	100	100	100	100	100
58 Suhu 37°C	100	100	100	100	100	100	100
59 Suhu 25°C	100	100	100	100	100	100	100
Lain-lain							
60 Hidrolisis urea	0	0	0	0	0	0	0
61 Pertumbuhan dalam medium 1% asam asetat	0	60	50	33	40	75	0
62 Pencairan gelatin	0	0	0	33	10	100	0
63 Produksi asam	100	20	100	100	60	50	100

Isolasi khamir dari madu hutan asal Sulawesi Tengah dilakukan dengan metode pengenceran yaitu menggunakan medium *Bean Sprouts Extract Agar* (BSEA) (Saono *et al.* 1974) secara *spread plate* dengan pengenceran sampel hingga 10^{-1} . Medium BSEA merupakan medium kompleks yang banyak digunakan dalam penelitian khususnya khamir

(Saono *et al.* 1974). Dari 11 sampel madu hutan asal Sulawesi Tengah, berhasil diisolasi 28 jenis isolat khamir murni yang berasal dari 11 madu hutan asal Sulawesi Tengah yaitu seperti ditunjukkan pada Tabel 1. Dari 28 isolat tersebut hanya 27 isolat yang mampu tumbuh dan dapat digunakan untuk pengujian karakterisasi. Hal ini dapat dimungkinkan karena kondisi lingkungan dan ketersediaan nutrien yang berbeda dari habitat asal dari khamir tersebut. Isolat khamir yang paling banyak ditemukan berasal dari sampel madu hutan asal Kabupaten Morowali yaitu sebanyak 4 isolat. Sementara isolat khamir yang ditemukan pada madu hutan asal Kecamatan Balaesang, Kabupaten Donggala hanya 1 isolat. Madu hutan asal Kabupaten Morowali memiliki tekstur cair sedikit kental dan terdapat gelembung. Adanya banyak gelembung mengindikasikan bahwa di dalam madu hutan ini terdapat aktivitas mikrobial khususnya khamir yang melakukan fermentasi menghasilkan gas CO₂. Sementara madu hutan asal Kecamatan Balaesang, Kabupaten Donggala memiliki tekstur kental dan tidak ada gelembung. Tidak adanya gelembung mengindikasikan sedikit/tidak adanya aktivitas mikrobial khususnya khamir di dalam madu hutan tersebut.

Karakteristik dan keragaman isolat khamir pada masing-masing klaster

Isolat yang diperoleh dikarakterisasi lebih lanjut menggunakan 63 jenis karakter yang meliputi karakter morfologi koloni, morfologi sel, dan karakter fisiologi-biokimia. Isolat khamir diklasifikasi menggunakan metode taksonomi numerik yang disajikan dalam bentuk dendrogram dengan analisis indeks kesamaan (IK) atau *Similarity Index* (SI) metode S_{sm} (Gambar 2) dan S_j (Gambar 3). Pada kedua dendrogram tersebut digunakan batas IS (*cut-off*) untuk analisis klastering sebesar $\geq 70\%$. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Campbell (1972), spesies yang membentuk klaster pada tingkat kesamaan 70% atau lebih dapat digolongkan sebagai anggota dalam satu genus. Sementara itu menurut Sneath (1962), nilai indeks kesamaan $\geq 85\%$ menunjukkan satu spesies. Oleh karena itu, berdasarkan Gambar 2 diketahui bahwa pada batas IS $\geq 70\%$ metode S_{sm} , 27 isolat khamir dikelompokkan menjadi 1 klaster. Sementara berdasarkan Gambar 3, diketahui bahwa pada batas IS $\geq 70\%$ metode S_j , 27 isolat khamir dikelompokkan menjadi 6 klaster dengan 1 *single-item/outlier*.

Berdasarkan Gambar 2 dan 3, diketahui bahwa nilai koefisien korelasi (r) metode S_{sm} yaitu sebesar 79,75%, lebih rendah dibandingkan metode S_j yaitu sebesar 80,12%. Hal ini disebabkan karena pada metode S_{sm} mengikutsertakan sifat negatif ganda (*double negative*) yang akan menimbulkan bias karena terdapat beberapa karakter seperti morfologi koloni dan sel yang memiliki hasil negatif yang tidak dapat dihitung sebagai karakter. Seperti pada bentuk sel *spheroidal*, apabila seluruh isolat bernilai negatif, maka nilai negatif tersebut bukan merupakan suatu karakter karena dimungkinkan isolat tersebut memiliki karakter bentuk sel yang lain (selain *spheroidal*). Sementara pada karakter fisiologi-biokimia, karakter negatif dapat dihitung sebagai satu karakter, seperti halnya pada karakter fermentasi. Khamir yang tidak mampu memfermentasi, maka digolongkan ke dalam khamir non-fermentatif (1 karakter). Pada penelitian ini, karakter morfologi koloni dan sel mencakup 49,2% dari seluruh karakter yang diuji (31 karakter dari total 63 karakter). Nilai r diperoleh dari nilai IS hasil perhitungan dan IS turunan dendrogram. Sementara nilai IS diperoleh dari analisis data pada tabel $n \times t$ yang metodenya dapat secara S_{sm} atau S_j . Apabila perhitungan nilai IS menggunakan metode S_{sm} , maka sifat negatif ganda dari 49,2% karakter turut dimasukkan ke dalam perhitungan, sehingga akan mempengaruhi nilai IS.

Menurut Sneath & Sokal (1973) serta Sackin & Jones (1985), nilai r berkisar antara 0,6-0,95 menunjukkan prosedur klastering telah menghasilkan representasi yang baik dari struktur taksonomi yang diturunkan dari matriks similaritas. Sehingga semakin tinggi nilai r maka dendrogram semakin baik (*valid*). Oleh karena nilai r dari metode S_j (80,12%) lebih tinggi dibandingkan S_{sm} (79,75%), maka pada pembahasan selanjutnya digunakan analisis dendrogram dengan perhitungan IS metode S_j .

Berdasarkan Gambar 3, diketahui bahwa 6 klaster yang terbentuk pada $IS \geq 70\%$ dapat dimungkinkan terdiri dari isolat khamir dengan genus yang sama. Klaster I terdiri dari isolat PS 1.2.1 dan PM 1.1 yang bergabung pada $IS 70,3\%$. Berdasarkan Tabel 3, diketahui bahwa isolat yang tergabung pada klaster ini memiliki karakteristik morfologi koloni dan sel yaitu koloni berwarna putih, permukaan koloni *raised*, bentuk sel *broadly ellipsoidal (subprolate)* dengan panjang sel 4-5 μm . Sementara itu karakteristik fisiologi-biokimia yang dimiliki oleh klaster ini yaitu mampu mengasimilasi nitrogen khususnya $NaNO_2$, mampu tumbuh pada medium dengan tekanan osmotik tinggi yaitu medium 10% $NaCl+5\%$ glukosa dengan nilai +3 (*good*), tidak membentuk askospora sehingga diketahui bahwa kedua isolat khamir tersebut berkembang biak secara asexual dengan pembentukan tunas (*budding*), dan tidak memiliki kemampuan untuk pencairan gelatin. Sementara itu hanya isolat PS 1.2.1 yang mampu membentuk pseudohifa. Kedua isolat khamir dalam klaster ini mampu mengasimilasi nitrogen seperti KNO_3 dan $NaNO_2$. Hal ini sesuai dengan teori yang dikemukakan oleh Kurtzman *et al.* (2011) yaitu khamir yang mampu menggunakan nitrat sebagai sumber nitrogen juga mampu tumbuh pada kondisi dengan nitrit sebagai sumber nitrogen, namun tidak berlaku bagi sebaliknya karena nitrit dapat bersifat toksik bagi beberapa khamir dengan terbentuknya asam nitrat pada pH 6. Sementara itu kedua isolat yang tergabung dalam klaster I ini berasal dari sampel madu hutan yang berbeda lokasi pengambilannya yaitu madu hutan Kabupaten Poso (PS 1.2.1) dan Kabupaten Parigi-Moutong (PM 1.1). Berdasarkan Gambar 1 diketahui bahwa kedua lokasi pengambilan madu hutan tersebut terletak berjauhan. Hal ini menunjukkan bahwa genus ini bersifat kosmopolit karena dapat ditemukan pada lokasi yang berbeda.

Klaster II beranggotakan 5 isolat yaitu TL 2.2, TL 3.2, TL 1.1, SG 3.2, dan KS 1. Isolat TL 1.1 dan TL 3.2 bergabung pada $IS 84,8\%$ yang kemudian bergabung dengan SG 3.2 pada $IS 80,4\%$. Ketiganya bergabung dengan KS 1 pada $IS 75,5\%$ yang selanjutnya bergabung lagi dengan isolat TL 2.2 pada $IS 74,6\%$. Berdasarkan Tabel 3, diketahui bahwa karakteristik dari klaster II yaitu memiliki bentuk sel *broadly ellipsoidal (subprolate)*, permukaan koloni *raised*, panjang sel 4-5 μm , lebar sel 3,5-5 μm , mampu mengasimilasi nitrogen khususnya $NaNO_2$, dan mampu tumbuh dalam medium dengan tekanan osmotik tinggi yaitu medium 10% $NaCl+5\%$ glukosa dengan nilai +1 (*weak*), tidak membentuk pseudohifa, tidak membentuk askospora sehingga diketahui berkembang biak secara asexual dengan pembentukan tunas (*budding*), dan tidak memiliki kemampuan untuk pencairan gelatin. Pada klaster II, Isolat TL 1.1, 3.2, dan 2.2 yang tergabung dalam satu klaster yang sama seluruhnya berasal dari sampel dengan lokasi pengambilan yang sama yaitu Kab. Toli-Toli. Sementara itu seluruh isolat TL, isolat SG 3.2, dan isolat KS 1 yang tergabung dalam klaster ini berasal dari sampel madu hutan dengan lokasi pengambilan yang berbeda yaitu Kabupaten Toli-Toli (TL), Kabupaten Sigi (SG 3.2) dan Kecamatan Kasimbar, Kabupaten Parigi-Moutong (KS 1). Berdasarkan lokasi pengambilan sampelnya (Gambar 1) diketahui bahwa lokasi ketiga lokasi tersebut berjauhan sehingga diketahui bahwa genus khamir tersebut bersifat kosmopolit.

Klaster III beranggotakan 2 isolat yaitu LW 3.1 dan BK 3.2 dengan $IS 80,6\%$. Berdasarkan Tabel 3, diketahui bahwa karakteristik dari klaster III yaitu memiliki koloni berwarna putih dengan tekstur *soft* dan permukaan koloni *raised*. Memiliki panjang sel $<4 \mu m$, lebar sel $<3,5 \mu m$, mampu memfermentasi *D-maltose (strong)*, mampu tumbuh pada medium dengan tekanan osmotik tinggi yaitu medium 10% $NaCl+5\%$ glukosa dengan nilai +3 (*strong*), mampu mengasimilasi nitrogen yaitu KNO_3 namun tidak $NaNO_2$, dan tidak memiliki kemampuan untuk pencairan gelatin. Sementara itu hanya isolat LW 3.1 yang mampu membentuk askospora sehingga diketahui bahwa isolat tersebut berkembang biak secara seksual. Pada klaster III, kedua isolat khamir tersebut berasal dari dua lokasi pengambilan yang berbeda yaitu Kec. Luwuk Kab. Banggai dan Kab. Banggai Kepulauan. Berdasarkan Gambar 1, diketahui bahwa lokasi pengambilan kedua jenis madu hutan tersebut

terletak berdekatan namun terpisah oleh Selat Peleng sehingga dapat dimungkinkan genus tersebut bersifat kosmopolit karena dapat ditemukan pada daerah yang berbeda.

Klaster IV beranggotakan 3 isolat yaitu PS 3.2, OG 1, dan KS 2. Isolat OG 1 dan KS 2 bergabung pada IS 80% lalu bergabung dengan PS 3.2 pada IS 73,6%. Karakter dari klaster IV berdasarkan Tabel 3 yaitu memiliki permukaan koloni *raised*, memiliki panjang sel 4-5 μm , lebar sel 3.5-5 μm , dan dapat membentuk askospora. Seluruh isolat khamir pada klaster ini mampu membentuk askospora, sehingga menunjukkan bahwa isolat khamir tersebut berkembang biak secara seksual. Pada klaster IV diketahui bahwa isolat OG 1, KS 2, dan PS 3.2 berasal dari madu hutan dengan lokasi pengambilan sampel yang berjauhan yaitu Kelurahan Ogoamas Kabupaten Donggala (OG 1), Kecamatan Kasimbar Kabupaten Parigi-Moutong (KS 2), dan Kabupaten Poso (PS). Ini menunjukkan bahwa genus tersebut bersifat kosmopolit.

Klaster V beranggotakan 10 isolat yaitu SG 1.2, MR 2.2, MR 1.2, OG 2, LW 3.2, MR 3.2, MR 3.1, SG 3.1, LW 1.1 dan BK 1.1. Seluruh isolat tersebut tergabung dalam satu klaster pada IS 77% sehingga diketahui bahwa seluruh isolat tersebut merupakan isolat khamir dengan genus yang sama, namun diperoleh dari sampel madu hutan yang berbeda-beda. Karakteristik klaster V berdasarkan Tabel 3 yaitu memiliki bentuk sel *broadly ellipsoidal (subprolate)*, tekstur koloni *smooth*, permukaan koloni *raised*, lebar sel < 3,5 μm , tidak membentuk pseudohifa, mampu membentuk askospora, tidak memfermentasi *D-maltose* (kecuali isolat SG 1.2 yang mampu memfermentasi *D-maltose* secara lemah), dan mampu mengasimilasi nitrogen khususnya NaNO_2 . Pada klaster ini, sebanyak 90% isolat khamir tidak memiliki kemampuan untuk memfermentasi gula *D-maltose* sementara untuk isolat SG 1.2 hanya mampu memfermentasi *D-maltose* secara lemah. Maltosa merupakan produk dari hidrolisis pati oleh aktivitas enzim amilase, tergolong disakarida, yaitu tersusun dari dua molekul glukosa (Crumplen *et al.* 1996). Kemampuan suatu khamir dalam memfermentasi maltosa dipengaruhi oleh keberadaan enzim maltase. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Gancedo (1992) dan Thevelein (1994), pada kondisi normal, khamir menggunakan maltosa hanya pada kondisi apabila ketersediaan glukosa rendah yang dikenal dengan *glucose repression*.

Pada klaster V, isolat MR 2.2 dan 1.2 bergabung pada IS 86,8% sehingga dimungkinkan merupakan spesies yang sama yang berasal dari sampel madu hutan yang sama yaitu madu hutan Kabupaten Morowali. Sementara itu isolat MR 3.1, MR 3.2, SG 3.1, dan LW 1.1 juga dimungkinkan merupakan spesies yang sama karena bergabung pada IS 86,7%. Keempat isolat khamir tersebut berasal dari madu hutan yang berbeda, yaitu madu hutan asal Kabupaten Morowali, Kabupaten Sigi, dan Kecamatan Luwuk, Kabupaten Banggai. Hal ini menunjukkan bahwa spesies tersebut bersifat kosmopolit. Berdasarkan hasil tersebut, diketahui bahwa isolat-isolat yang tergabung dalam klaster V lebih banyak dan beragam dibandingkan dengan klaster lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa genus tersebut tersebar (bersifat kosmopolit).

Klaster VI beranggotakan 4 isolat yaitu PM 2.1, AP 3, PM 3.2, dan AP 1 (Gambar 3). Isolat AP 1 dan PM 3.2 bergabung pada IS 81,1% lalu bergabung dengan AP 3 pada IS 72,7%. Kemudian bergabung dengan PM 2.1 pada IS 71,6%. Berdasarkan Tabel 3, karakteristik dari klaster VI yaitu memiliki permukaan koloni *raised*, memiliki panjang sel >5 μm , mampu mengasimilasi nitrogen khususnya (KNO_3 dan NaNO_2). Seluruh isolat khamir yang tergabung dalam klaster VI mampu membentuk pseudohifa, yaitu khamir yang sel-selnya membentuk suatu rantai sel pada kondisi kekurangan nitrogen. Jenis adaptasi ini memudahkan khamir untuk memperoleh sumber nutrisi yang baru (Wright *et al.* 1992). Selain itu, seluruh isolat khamir dalam klaster ini juga mampu melakukan pencairan gelatin. Kurtzman *et al.* (2011) mengatakan bahwa kemampuan khamir dalam mencairkan gelatin merupakan nilai diagnostik yang terbatas, karena beberapa khamir memiliki kemampuan *strongly proteolytic* (dapat mencairkan gelatin secara cepat dalam waktu satu minggu).

Kemampuan khamir dalam mencairkan gelatin ini ditentukan oleh ada/tidaknya enzim proteolitik (Achstetter *et al.* 1981). Pada klaster VI, sampel madu hutan AP dan PM diperoleh dari lokasi yang berbeda yang letaknya berjauhan (terpisah oleh Teluk Tomini) sehingga dimungkinkan genus tersebut bersifat kosmopolit.

Berdasarkan Gambar 3, isolat PS 1.1 merupakan satu-satunya isolat yang membentuk *outlier* (IS < 70%). Karakteristik dari isolat khamir tersebut yaitu memiliki koloni berwarna putih sedikit krem, bentuk sel elipsoidal, membentuk pseudohifa, tidak membentuk askospora, memfermentasi *D-maltose* secara lemah, mampu mengasimilasi KNO₃ namun tidak NaNO₂, mampu tumbuh pada medium 10% NaCl+5% glukosa dengan nilai +3 (*strong*), tidak mampu tumbuh pada medium 1% asam asetat, dan tidak memiliki kemampuan pencairan gelatin. Isolat PS 1.1 merupakan isolat yang berasal dari madu hutan asal Kabupaten Poso. Isolat *outlier* yaitu PS 1.1 ini tidak tergabung dalam klaster manapun pada IS ≥ 70% sehingga dapat dimungkinkan bahwa isolat ini merupakan isolat endemik, artinya isolat ini hanya ditemukan di madu hutan Kabupaten Poso.

Berdasarkan Tabel 2 diketahui bahwa seluruh isolat khamir yang diisolasi dari madu hutan Sulawesi Tengah tidak mampu menghidrolisis urea. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Hagler dan Ahearn (1981), pada umumnya kemampuan menghidrolisis urea tidak dijumpai pada khamir Ascogenous, namun dijumpai pada khamir Basidiomycetous seperti genus *Cryptococcus* dan *Rhodotorula* (Seeliger 1956). Hal ini menunjukkan bahwa seluruh isolat khamir yang diisolasi dari madu hutan Sulawesi Tengah merupakan khamir Ascomycota.

Berdasarkan Tabel 2 juga diketahui bahwa seluruh isolat khamir mampu mengasimilasi 8 jenis karbon yang diuji. Hal ini dapat dimungkinkan karena isolat-isolat khamir tersebut diisolasi dari madu hutan yang merupakan lingkungan dengan ketersediaan sumber karbon yang melimpah. Ketersediaan sumber karbon yang melimpah memungkinkan isolat khamir dapat mengasimilasi berbagai jenis karbon sebagai sumber energi.

Pada penelitian ini juga diketahui bahwa seluruh isolat khamir mampu tumbuh pada medium dengan tekanan osmotik tinggi yaitu medium 50% dan 60% glukosa. Hal ini menunjukkan bahwa seluruh isolat khamir yang diisolasi dari madu hutan Sulawesi Tengah bersifat osmofilik. Hal ini berkaitan dengan habitat asal isolat khamir tersebut yang hidup pada madu hutan yang mengandung gula yang tinggi.

Isolat khamir yang diisolasi dari madu hutan Sulawesi Tengah seluruhnya mampu tumbuh pada suhu 25, 35, dan 37°C. Menurut Cooke (1965), khamir yang mampu tumbuh pada suhu 37°C dapat tumbuh dalam tubuh manusia atau hewan berdarah panas lainnya. Penelitian ini sesuai dengan pernyataan tersebut karena isolat khamir pada penelitian ini diisolasi dari madu hutan Sulawesi Tengah yang diproduksi oleh lebah madu dari nektar bunga.

Berdasarkan uraian tersebut di atas diketahui bahwa keragaman isolat khamir dalam madu hutan Sulawesi Tengah tergolong rendah karena diduga hanya ditemukan 6 jenis genus yang berbeda serta 1 jenis isolat *outlier*. Hal ini sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa hanya sejumlah kecil organisme yang mampu tumbuh di dalam madu akibat adanya zat alami dalam madu yang berperan sebagai antimikrobia. Kandungan senyawa dalam madu ini mempengaruhi pertumbuhan dan kelangsungan hidup beberapa mikroorganisme (Sinacori *et al.* 2013). Hal ini juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Rasyiid (2017) yang mengemukakan bahwa dalam 10 sampel madu hutan Sulawesi Tengah ini mengandung berbagai macam golongan metabolit sekunder seperti alkaloid, terpenoid, tanin, flavonoid, dan fenolik. Keberadaan senyawa metabolit sekunder tersebut terutama asam fenolik, flavonoid, dan terpen mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme termasuk khamir karena memiliki sifat antimikrobia (Tysset & de Rautlin de la Roy 1974, Molan 1992). Oleh karena itu, keragaman isolat khamir dalam madu hutan tergolong rendah.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan sebanyak 27 isolat khamir berhasil diisolasi dari madu hutan asal Sulawesi Tengah. Keragaman isolat khamir dalam madu hutan Sulawesi Tengah tergolong rendah, yaitu diduga hanya ditemukan 6 genus khamir yang berbeda dan 1 isolat *outlier*. Karakteristik isolat khamir yang diisolasi dari madu hutan Sulawesi Tengah yaitu merupakan khamir Ascomycota yang bersifat osmofilik, mampu mengasimilasi 8 jenis karbon, mampu tumbuh pada suhu 37°C, mampu memfermentasi glukosa, non-fermentatif terhadap galaktosa, laktosa, dan sukrosa, serta mampu mengasimilasi nitrogen khususnya KNO₃.

Ucapan Terima Kasih

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

Pustaka

- Achstetter T, Ehmann C, Wolf DH. 1981– New proteolytic enzymes in yeasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 207(2), 445–454.
- Boekhout T, Fonseca A, Sampaio JP, Bandoni RJ, Fell JW, Kwon-Chung KJ. 2011 – Discussion of teleomorphic and anamorphic basidiomycetous yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW– *The yeasts: ataxonomic study* 5th ed. Elsevier, B. V. London, p. 1340.
- Campbell I. 1972 – Numerical analysis of the genera *Saccharomyces* and *Kluyveromyces*. *Gen Microbiol* 73(2), 279–301.
- Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW. 2001 – *The fungi*, 2nd edition. Academic Press. California, pp. 70–76.
- Choudhary DK, Johri BN. 2009– Basidiomycetous yeasts: current status. In: Satyanarayana T, Kunze G– *Yeast biotechnology: diversity and applications*. Springer Science. New Delhi, pp. 19–43.
- Codex Alimentarius Commission. 2000 – Draft revised standard for honey at step 8. *Alinorm* 01 (25), 19.
- Cooke WMB. 1965 –The growth of yeasts at 37°C. U. S. Department of Health, Education, and Welfare. Bureau of State Services, Public Health Service.
- Crumplén RM, Slaughter JC, Stewart GG. 1996 – Characteristics of maltose transporter activity in an ale and lager strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Letters in applied microbiology* 23, 448–452.
- Gancedo M. 1992 – Carbon catabolite repression in yeast. *Biochemical* 206, 297–313.
- Hadisoedilo S. 2001 – The diversity of indigenous honey bee species of Indonesia. *Biodiv* 2 (1), 123–128.
- Hagler AN, Ahearn DG. 1981 – Rapid diazonium blue B test to detect basidiomycetous yeasts. *Syst. Bacteriol* (31), 204–208.
- Hamamoto M, Nakase T. 2000 –Phylogenetic relationship among fungi inferred from small subunit ribosomal RNA genes sequences. In: Priest FG, Goodfellow M– *Applied microbial systematics*. Springer-Science Business Media, B. V. New York, pp. 60–67.
- Jaccard P. 1901 – Étude comparative de la distribution florale dans un portion des alpes et des Jura. *Bull. Soc. Vaud. Sc. Nat.* 37(142), 547–579.
- Kurtzman CP, Sugiyama J. 2015 –*Saccharomycotina* and *Taphromycotina*: the yeasts and yeast-like fungi of the Ascomycota. In: McLaughlin DJ, Spatopora JW– *The mycota: systematics and evolution Part B*, VII ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York, pp. 3–11.
- Kurtzman CP, Fell JW. 1998 –The yeasts: ataxonomic study 4th ed. Elsevier Science B. V. Amsterdam, pp. 79–100.

- Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. 2011 – The yeasts, ataxonomic study 5th Edition. Elsevier B. V. London, pp. 3, 88–107.
- McLaughlin DJ, Spatafora JW. 2015 – The mycota. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York, p. 7.
- Molan P. 1992 – The antibacterial activity of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. Bee World 73, 5–28.
- Rasyiid M. 2017 – Keragaman serbuk sari dan metabolit sekunder pada madu hutan Sulawesi Tengah [Skripsi]. Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Rosa CA, Peter G. 2006 – Biodiversity and scophysiology of yeasts. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Berlin, p. 380.
- Sackin MJ, Jones D. 1985 – Computer-assisted classification. In: Goodfellow M, O'Donnell AG– Handbook of new bacterial systematics. Academic Press. London, pp. 282–217.
- Saono S, Gandjar I, Basuki T, Karsono H. 1974 – Mycoflora of “Ragi” and some other traditional fermented foods of Indonesia. Annales Bogorienses 5(4), 187–196.
- Seeliger HPR. 1956 – Use of a urease test for the screening and identification of cryptococci. Bacteriol 72, 127–131.
- Sereia MJ, Toledo VAA, Marchini LC, Alves EM, Faquinello P, Toledo TCSOA. 2010 – Microorganisms in organic and non organic honey samples of africanized honeybees. Apiculture Science 54 (1), 49–53.
- Sinacori M, Francesca N, Alfonso A, Cruciata M, Sannino C, Settanni L, Moschetti G. 2013 – Cultivable microorganisms associated with honeys of different geographical and botanical origin. Food. Microbiol 38, 284–294.
- Sneath PHA. 1957 – Some thoughts on bacterial classification. In: Gunn BA, Keiser JF, Corwell RR– Numerical taxonomy of *Staphylococci* isolated from clinical sources. Systematic Bacteriology 33 (4), 738–750.
- Sneath PHA. 1962 – The Construction of taxonomic groups. Symposia of the Society for General Microbiology 12, 289–332.
- Sneath PHA, Sokal RR. 1973 – Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman. San Francisco.
- Sneath PHA, Sokal RR. 1974 – Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman. San Francisco.
- Snowdon JA, Cliver DO. 1996 – Review Article: microorganism in honey. Food Microbiology (31), 1–26.
- Sokal RR, Michener CD. 1958 – A statistical method for evaluating systematic relationship. The University of Kansas Science Bulletin 38(22), 1409–1438.
- Starmer WT, Lachance MA. 2011 – Yeast Ecology. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T– The yeasts, ataxonomic study, 5th Edition. Elsevier B. V. London, p. 65.
- Thacker E. 2012 – The honey book. James Direct, Inc. Ohio.
- Thevelein JM. 1994 – Signal transduction in yeast. John Wiley & Sons Ltd. New York, pp. 1753–1755.
- Tysset C, de Rautlin de la Roy Y. 1974 – Assays on the study of ‘Osmophilic’ yeasts, organisms causing fermentations of honey collected in France. Ass. Diplom. Microbial. Fat. Pharm. Univ. Nancy Bull, 134, 1–26.
- Walker GM. 2009 – Yeasts. In: Schaechter M – Desk encyclopedia of microbiology, 2nd ed. Elsevier/Academic Press. London, ppl. 1174–1187.
- Wright RM, Repine T, Repine JE. 1992 – Reversible pseudohyphal growth in haploid *Saccharomyces cerevisiae* is an aerobic process. Curr Genet 23, 388–391.