

# **Isolasi dan Identifikasi Molekuler *Yeast* Antagonis pada Lebah Madu (*Apis* sp.)**

## **Skripsi**



**Dea Inanditya Raharja  
31130039**

**Program Studi Biologi  
Fakultas Bioteknologi  
Universitas Kristen Duta Wacana  
Yogyakarta  
2017**

# **Isolasi dan Identifikasi Molekuler *Yeast* Antagonis pada Lebah Madu (*Apis* sp.)**

Skripsi  
Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains (S.Si) pada Program Studi Biologi  
Fakultas Bioteknologi  
Universitas Kristen Duta Wacana






**Dea Inanditya Raharja  
31130039**


**Program Studi Biologi  
Fakultas Bioteknologi  
Universitas Kristen Duta Wacana  
Yogyakarta  
2017**

**HALAMAN PENGESAHAN**

Skripsi dengan judul:  
**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER *YEAST* ANTAGONIS PADA LEBAH MADU**  
(*Apis sp.*)  
telah diajukan dan dipertahankan oleh:  
**DEA INANDITYA RAHARJA**  
**31130039**  
dalam Ujian Skripsi Program Studi Biologi  
Fakultas Bioteknologi  
Universitas Kristen Duta Wacana  
dan dinyatakan DITERIMA untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Sains  
pada tanggal 23 Oktober 2017.

Nama dosen	Tanda Tangan
1. Dr. Dhira Satwika, M.Sc (Dosen Pembimbing I/Penguji)	
2. Dr. Guntoro (Dosen Pembimbing II/Penguji)	
3. Dr. Budi Setyadi Daryono, M.Agr.Sc. (Dosen Penguji/Ketua Tim Penguji)	

Yogyakarta, 27 Oktober 2017  
Disahkan oleh:

  
Dekan,  
**Drs. Kisworo, M.Sc**

Ketua Program Studi  
  
**Dra. Aniek Prasetyaningsih, M.Si**

## LEMBAR PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dea Inanditya Raharja

NIM : 31130039

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi dengan judul:

**“Isolasi dan Identifikasi Molekuler *Yeast* Antagonis pada Lebah Madu (*Apis* sp.)”**

adalah hasil karya saya dan bukan merupakan duplikasi sebagian atau seluruhnya dari karya orang lain, yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu di dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Pernyataan ini dibuat dengan sebenar-benarnya secara sadar dan bertanggung jawab dan saya bersedia menerima sanksi pembatalan skripsi apabila terbukti melakukan duplikasi terhadap skripsi atau karya ilmiah lain yang sudah ada.

Yogyakarta, 27 Oktober 2017

METERAI  
TEMPEL

CB7AEF671610178

6000  
RUPIAH



Dea Inanditya Raharja

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena berkat-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **Isolasi dan Identifikasi Molekuler *Yeast Antagonis* pada Lebah Madu (*Apis sp.*)**.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu persyaratan yang harus ditempuh untuk mencapai gelar Sarjana Sains (S.Si) pada Program Studi Biologi, Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta. Skripsi ini berhasil diselesaikan berkat bimbingan dan bantuan dari semua pihak. Untuk itu pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Dr. Dhira Satwika, M.Sc., selaku Dosen Pembimbing yang telah memberi bimbingan, nasehat, masukan serta waktunya selama penelitian dan penulisan skripsi sehingga dapat menyelesaikan skripsi.
2. Dr. Guntoro, sebagai Dosen Pembimbing kedua yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan dalam menyelesaikan skripsi.
3. Dr. Budi Setyadi Daryono, M.Agr.Sc., sebagai Dosen Penguji yang telah meluangkan waktu untuk memberikan masukan dan bimbingan menyelesaikan skripsi.
4. Drs. Kisworo, M.Sc., selaku Dekan Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana.
5. Seluruh Dosen Fakultas Bioteknologi untuk semua yang telah diberikan.
6. Laboran Mikrobiologi dan Riset Universitas Kristen Duta Wacana, terimakasih untuk bantuan, waktu, dan bimbingan selama penelitian di Lab.
7. Orang tua yang tidak pernah lelah dalam mendidik, memberi kasih sayang, semangat dan dorongan untuk menyelesaikan skripsi ini.
8. Teman-teman skripsi seperjuangan, terimakasih atas dukungan dan kebersamaan selama mengerjakan skripsi ini.
9. Teman-teman Bioteknologi angkatan 2013, terima kasih untuk kebersamaan berjuang bersama selama 4 tahun ini. Semoga tetap kompak selalu.

Penulis sangat menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih jauh dari sempurna karena keterbatasan baik pengetahuan maupun kemampuan, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan. Semoga naskah skripsi ini bermanfaat bagi pihak-pihak yang membutuhkannya.

Yogyakarta, 27 Oktober 2017

Penulis

Dea Inanditya Raharja

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN JUDUL .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
LEMBAR PERNYATAAN .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI .....	vi
DAFTAR TABEL .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN .....	ix
ABSTRAK .....	x
<i>ABSTRACT</i> .....	xi
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	1
1.3 Tujuan .....	2
1.4 Manfaat Penelitian .....	2
BAB II STUDI PUSTAKA .....	3
2.1 Pengertian <i>Yeast</i> .....	3
2.2 Siklus Hidup .....	3
2.3 Pertumbuhan dan Metabolisme <i>Yeast</i> .....	4
2.4 Habitat <i>Yeast</i> .....	5
2.5 Identifikasi Molekuler .....	6
BAB III METODE PENELITIAN .....	8
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	8
3.2 Alat .....	8
3.3 Bahan .....	8
3.4 Cara Kerja .....	8
3.4.1 Preparasi alat dan bahan .....	8
3.4.2 Tahapan penelitian .....	8
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....	12
4.1 Isolasi dan Karakterisasi <i>Yeast</i> .....	12
4.2 Aktivitas Antagonisme <i>Yeast</i> .....	13
4.3 Isolasi Total DNA dan <i>Linear DNA Plasmid</i> .....	14
4.4 Identifikasi Molekuler .....	14
4.5 Hasil Sekuensing .....	15
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....	22
5.1 Kesimpulan .....	22
5.2 Saran .....	22
DAFTAR PUSTAKA .....	23
LAMPIRAN .....	27

## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
Tabel 1. <i>Genetic basis</i> fenomena antagonisme pada <i>yeast</i> yang telah banyak diteliti .....	7
Tabel 2. PCR <i>Master Mix</i> .....	12
Tabel 3. Kondisi PCR .....	12
Tabel 4. Hasil isolasi <i>yeast</i> dan uji aktivitas antagonisme .....	14
Tabel 5. Uji kuantitas DNA dengan spektrofotometer .....	16

©UKDW

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
Gambar 1. <i>Yeast</i> merupakan organisme sel tunggal namun memiliki bagian sel mirip dengan organisme tingkat tinggi .....	5
Gambar 2. Siklus hidup <i>Budding Yeast</i> .....	5
Gambar 3. A : Warna koloni putih dan ukuran koloni besar isolat A12, B : Warna koloni kuning dan ukuran koloni kecil isolat A33 .....	14
Gambar 4. A : <i>Budding</i> isolat A12 yang dapat merupakan <i>unipolar budding site</i> , B : <i>Budding</i> isolat A33 yang merupakan <i>bipolar budding site</i> , perbesaran mikroskop 100x10 kali .....	15
Gambar 5. Hasil uji aktivitas antagonisme dengan metode <i>pour plate</i> isolat A12 (A1) dan A33 (B1) dan dengan metode kertas saring isolat A12 (A2) dan A33 (B2) .....	15
Gambar 6. Hasil isolasi total genom DNA dan <i>linear DNA plasmid</i> .....	16
Gambar 7. Hasil PCR sampel A12 dan A33 dengan primer ITS .....	17
Gambar 8. Hubungan filogenetik isolat A12 dengan 60 <i>hit</i> spesies pada analisis BLAST metode <i>Maximum Likelihood</i> dan nilai <i>Bootstrap</i> adalah 1000x replikasi. Tanda merah merupakan spesies yang telah dimanfaatkan sifat antagonisnya .....	19
Gambar 9. Hubungan filogenetik isolat A33 dengan 60 <i>hit</i> spesies pada analisis BLAST metode <i>Maximum Likelihood</i> dan nilai <i>Bootstrap</i> adalah 1000x replikasi. Tanda merah merupakan spesies yang telah dimanfaatkan sifat antagonisnya .....	20
Gambar 10. Hubungan filogenetik isolat A33 dengan 60 <i>hit</i> spesies ditambah dengan sekuen A12 pada analisis BLAST metode <i>Maximum Likelihood</i> dan nilai <i>Bootstrap</i> adalah 1000x replikasi .....	21



## DAFTAR LAMPIRAN

	<b>Halaman</b>
Lampiran 1. Komposisi media yang digunakan dalam penelitian .....	30
Lampiran 2. Langkah kerja .....	32
Lampiran 3. Gambar proses penelitian .....	35
Lampiran 4. Gambar karakteristik koloni yeast yang didapat .....	36
Lampiran 5. Contoh hasil uji aktivitas antagonisme .....	40
Lampiran 6. Sekuen sampel A12 dan A33 .....	42
Lampiran 7. Hasil BLASTN sekuen <i>Yeast</i> A12 .....	43
Lampiran 8. Hasil BLASTN sekuen <i>Yeast</i> A33 .....	50

©UKDW

# ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER YEAST ANTAGONIS PADA LEBAH MADU (*Apis* sp.)

Dea Inanditya Raharja  
31130039

Program Studi Biologi, Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana

## ABSTRAK

*Yeast* yang memiliki sifat antagonis adalah strain yang memiliki kemampuan untuk mensekresi protein atau glikoprotein yang bersifat letal bagi strain *yeast* tertentu (*sensitive yeast*) sehingga menghambat pertumbuhan sel lain, yang disebut dengan peristiwa antagonisme. *Yeast* memiliki habitat dengan pH rendah dan konsentrasi gula tinggi. Buah dan bunga merupakan habitat *yeast* yang sering dikunjungi oleh berbagai vektor *yeast* seperti lebah madu (*Apis* sp.). Pada penelitian ini dilakukan isolasi *yeast* yang meliputi tahapan preparasi sampel, pengamatan morfologi secara makroskopik dan mikroskopik, uji aktivitas antagonisme, isolasi total genom DNA dan *linear DNA plasmid*, identifikasi molekuler dengan penanda gen *Internal Transcribed Spacer* (ITS), dan analisis filogenetik dengan 60 spesies yang diambil dari 10.000 *hit* sekuen berdasarkan analisis BLAST menggunakan MEGA6. *Yeast* yang diisolasi dari saluran pencernaan lebah madu (*Apis* sp.) yang bersifat antagonis yang diperoleh pada penelitian ini yaitu 2 sampel yang diduga merupakan spesies *Candida tropicalis*. Analisis filogenetik menunjukkan sampel berkerabat dengan *Pichia guilliermondii*, *Pichia anomala*, *Wickerhamomyces anomalus*, dan *Debaromyces hansenii* yang telah banyak dimanfaatkan aktivitas antagonismenya. Isolat *Candida tropicalis* strain 1 dan 2 yang didapatkan pada penelitian ini memiliki klaster yang berbeda dengan spesies yang sifat antagonisnya dikode oleh *virus-like element* (VLE), sehingga sifat antagonisnya diduga disebabkan oleh faktor lain, yaitu terletak pada kromosom.

**Kata Kunci:** *yeast*, aktivitas antagonisme, lebah madu, *Internal Transcribed Spacer* (ITS), *Candida tropicalis*

# ISOLATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF ANTAGONISTIC YEAST from HONEY BEE (*Apis* sp.)

Dea Inanditya Raharja  
31130039

Dept. of Biology, Faculty of Biotechnology  
Duta Wacana Christian University, Yogyakarta

## ABSTRACT

Antagonistic yeasts are yeast strains that secrete protein and glycoprotein lethal toxin for certain yeast strains, thus inhibiting the growth of other cells, which is known as antagonism phenomenon. Yeast are easily found in natural habitats with low pH value and high sugar concentrations, such as fruits and flowers, which are often accessed by various yeast vectors, especially the honey bee (*Apis* sp.). It is then the aim of this study to isolate antagonistic yeast(s) from the honey-bee and molecularly identify it, which consisted of yeast isolation, macroscopic and microscopic morphology observation, antagonism activity test, isolation of total genome DNA and linear DNA plasmids. Molecular identification was then done by mean of Internal Transcribed Spacer as genetic marker, and the construction of phylogenetic tree of randomly 60 species from 10,000 hit sequences based on BLAST analysis with MEGA6. Two strains of antagonistic yeasts were isolated from the digestive tract of honey bees, both are identify as *Candida tropicalis* strains. Phylogenetic analysis shown that the two strains have a close relationship with *Pichia guilliermondii*, *Pichia anomala*, *Wickerhamomyces anomalus*, and *Debaromyces hansenii* which are already known having the antagonistic activity. The isolates obtained are separately clustered from yeasts species with antagonistic trait based on virus-like element (VLE). It is then suggested that the antagonistic activity of the two *C. tropicalis* strains obtained are chromosomally controlled. Further study need to be done to elucidate the genetic basis of the antagonistic activity of the two strains obtained.

**Keywords:** yeast, antagonistic activity, honey bee, Internal Transcribed Spacer (ITS), *Candida tropicalis*

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia memiliki keragaman (flora dan fauna) yang sangat besar, bahkan keanekaragaman hayati Indonesia termasuk tiga besar di dunia bersama-sama dengan Brazil di Amerika Selatan dan Zaire di Afrika. Di dalam tubuh hewan atau tumbuhan itu tersimpan sifat-sifat unggul seperti *yeast*.

*Yeast* adalah salah satu mikroorganisme yang termasuk dalam golongan fungi yang dibedakan bentuknya dari *mould* (kapang) karena berbentuk uniseluler. *Yeast* sangat mudah dibedakan dengan mikroorganisme lain, misalnya dengan bakteri, karena ukuran sel yang lebih besar dan morfologi yang berbeda. Spesies *yeast* ada yang membutuhkan oksigen untuk respirasi seluler aerobik (aerob obligat) atau anaerobik, namun juga dapat menghasilkan energi secara aerobik (anaerob fakultatif). Tidak seperti bakteri, belum ada spesies khamir yang hanya dapat tumbuh secara anaerob (anaerob obligat).

*Yeast* ditemukan di seluruh habitat, baik di tanah dan permukaan tanaman dan sangat melimpah pada media dengan kadar gula tinggi seperti nektar bunga dan buah. *Yeast* dilaporkan ditemukan pada serangga karena serangga hinggap dan mencari nektar pada bunga maupun buah, contohnya lebah madu. *Yeast* memiliki kemampuan untuk mematikan sel reseptif dengan mengeluarkan protein tertentu, sehingga *yeast* dapat digunakan untuk pengobatan beberapa penyakit, terutama yang disebabkan oleh jamur dan dapat digunakan sebagai kontrol terhadap populasi tertentu (Bevan & Makower, 1963; Hashem & Alamri, 2009; Hamby & Becher, 2016).

Lebah madu memiliki hubungan simbiotik yang erat dengan lingkungannya. Lebah madu membangun sarang yang diambil dari tanah, akar pohon dan daun kering. Dalam mengambil nektar bunga, lebah dapat hinggap pada lebih dari 10 spesies bunga tiap harinya. Lebah madu hinggap pada tempat-tempat yang merupakan habitat *yeast* seperti tanah, nektar dan serbuk sari bunga (Slavikova & Vadkertiova, 2003). *Yeast* dapat ditemukan pada nektar karena *yeast* berperan dalam fermentasi pada nektar. *Yeast* pada serbuk sari bunga memerlukan vektor serangga untuk memindahkannya dari bunga satu ke bunga yang lain. Salah satu vektor *yeast* yaitu lebah madu. Lebah madu yang mengambil nektar bunga memungkinkan *yeast* masuk dalam pencernaan lebah madu. *Yeast* memiliki peran penting dalam saluran pencernaan serangga karena serangga memerlukan agen pemecah gula dalam saluran pencernaannya sebelum dicerna oleh serangga. Hal tersebut berarti *yeast* sebagai agen fermentasi dalam saluran pencernaan serangga (Vega & Dowd, 2005). Selain itu, *yeast* dalam saluran pencernaan lebah madu juga merupakan probiotik yang berperan mencegah pertumbuhan mikroorganisme lain yang tidak diinginkan dalam pencernaan lebah madu. *Yeast* juga dapat merupakan mikroorganisme yang mengganggu aktivitas yang terjadi dalam saluran pencernaan lebah madu. Hal ini tergantung dari jenis spesiesnya. Sehingga sangat memungkinkan bahwa spesies *yeast* dapat ditemukan dalam saluran pencernaan serangga terutama lebah madu.

Pemanfaatan *yeast* telah banyak dilakukan di berbagai bidang. Dalam bidang industri makanan dan fermentasi yaitu digunakan untuk mencegah pertumbuhan *yeast* lain yang tidak diinginkan selama proses produksi *wine* dan bir (El-Banna *et al.*, 2011). *Yeast* juga digunakan sebagai biokontrol pada vektor penyakit malaria *Anopheles stephensi* menggunakan *Wickerhamomyces anomalus* (Cappelli *et al.*, 2014), dan penggunaan *Pichia anomala* dalam bidang medis untuk pengembangan obat infeksi jamur patogen yaitu *Candida albicans* (Sawant *et al.*, 1988).

Untuk itu diperlukan penelitian isolasi dan identifikasi *yeast* pada serangga yang menjadi habitatnya yaitu lebah madu yang berpotensi menghambat organisme lain sehingga selanjutnya dapat digunakan untuk aplikasi pada bidang kesehatan, pangan maupun lingkungan.

### 1.2 Rumusan Masalah

Isolasi dan identifikasi *yeast* yang berpotensi memiliki sifat antagonis dari lebah madu (*Apis* sp.).

**1.3 Tujuan**

Memperoleh *yeast* yang memiliki sifat antagonis dari saluran pencernaan lebah madu (*Apis* sp.).

**1.4 Manfaat Penelitian**

Mengetahui *yeast* yang berpotensi menghambat atau bersifat antagonis yang ada pada saluran pencernaan lebah madu (*Apis* sp.).

©UKDW

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Pada penelitian ini didapatkan 2 isolat *yeast* dari saluran pencernaan lebah madu (*Apis* sp.) yang diidentifikasi sebagai *Candida tropicalis* strain 1 dan 2 berdasarkan sifat makroskopik dan mikroskopik yang diamati. Pada kondisi yang dilakukan pada penelitian ini, kedua isolat menunjukkan kemampuan menghambat pertumbuhan strain uji. Analisis hubungan filogenetik menunjukkan bahwa *C. tropicalis* strain 1 dan 2 terletak dalam klaster yang terpisah dengan *yeast* yang dikenal sebagai *killer yeast* yang dikode oleh *virus-like element* (VLE). Berdasar hal ini, diduga bahwa sifat antagonis yang dimiliki oleh *C. tropicalis* strain 1 dan 2 dikode oleh kromosom. Potensi sifat antagonis tersebut dapat dikembangkan dengan memanfaatkan fenomena antagonisme untuk penghambat pertumbuhan organisme lain atau dengan memanfaatkan hubungan simbiosis dari *yeast* terhadap lingkungannya terutama dalam saluran pencernaan lebah madu.

#### **5.2 Saran**

**5.2.1** Perlu dilakukan uji aktivitas antagonisme pada isolat *Candida tropicalis* yang ditemukan dalam penelitian ini terhadap mikroorganisme lain, terutama yang terdapat pada saluran pencernaan lebah madu.

## DAFTAR PUSTAKA

- Baumlisberger, M., Moellecken, U., Konig H., Claus H. 2015. The Potential of the Yeast *Debaryomyces hansenii* H525 to Degrade Biogenic Amines in Food. *Microor.* 3:839-850. doi:10.3390/microorganisms3040839.
- Beech, FW., Davenport, RR., Goswell, RW., Burnett, JK. 1968. Identification Methods for Microbiologists. Academic Press, London. 151.
- Belda, I., Ruiz, J., Alonso, A., Marquina, D., Santos, A. 2017. The Biology of *Pichia membranifaciens* Killer Toxins. *Toxin.* 9:112-130. doi:10.3390/toxins9040112.
- Bevan, EA., Makower M. 1963. The physiological basis of the killer character in yeast. *Proc XI Int Congr.* 1:202–203.
- Blakeman, JP. 1985. Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. The American Phytopathological Society Press: St. Paul. 6–30.
- Cappelli, A., Ulissi, U., Valzano, M., Damiani, C., Epis, S., Gabrielli, MG. 2014. A *Wickerhamomyces anomalus* killer strain in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *PLoS ONE.* 9(5):1-9. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095988.
- Claveire, JM., Notredame, C. 2003. Bioinformatics for Dummies. Wiley Publishing, Indianapolis.
- Davis, L., Kuehl, M., Battey, J. 1994. Basic methods: Molecular biology. 2nd ed. Appleton & Lange, Norwola. 777.
- Duina, AA., Miller, ME., Keeney, JB. 2014. Budding Yeast for Budding Geneticists: A Primer on the *Saccharomyces cerevisiae* Model System. *Genet.* 197:33-48.
- El-Banna, AA., El-Sahn, MA., Shehata, MG. 2011. Yeasts producing killer toxins: An overview. *Alex J F Sci Tech.* 8:41-53.
- Ganter, PF. 2006. Yeast and invertebrate associations. Dalam: Rosa, C., Peter G. (eds.). 2006. The yeast handbook: Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Springer, Tokyo: 1-36.
- Gilliam, M. 1979. Microbiology of pollen and bee-bread: the yeast. *Apidologie.* 10(1):43-45.
- Hamby, KA., Becher, PG. 2016. Current knowledge of interactions between *Drosophila suzukii* and microbes, and their potential utility for pest management. *J Pest Sci.* 89:621-630.
- Hashem, M., Alamri, S. 2009. The biocontrol of postharvest disease (*Botryodiplodia theobromae*) of guava (*Psidium guajava* L.) by the application of yeast strains. *Postharvest Biol Technol.* 53:123-130. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.
- Henry, T., Iwen, PC., Hinrichs, SH. 2000. Identification of *Aspergillus* Species Using Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. *J Clin Microbiol.* 34(4):1510-1515.
- Kishida, M., Tokunaga, M., Katayose, Y., Yajima, H., Kawamura-Watabe, A., Hishinuma, F. 1996. Isolation and genetic characterization of pGKL killer-insensitive mutants from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotech Biochem.* 60(5):798–801. PMID: 8704309.

- Klassen, R., Meinhardt, F. 2002. Linear plasmids pWR1A and pWR1B of the yeast *Wingea robertsiae* are associated with a killer phenotype. *Plasmid*. 48(2):142-148. PMID: 12383731.
- Klug, WS., Cummings, MR. 1994. Concepts of genetics. 4th ed. Prentice Hall, Englewood cliffs, New Jersey.
- Laskin, AI., Bennett, JW., Gadd, GM. 2006. Advances in Applied Microbiology. Elsevier Academy Press, San Diego.
- Madhani, HD. 2007. From a to alpha: Yeast as a Model for Cellular Differentiation. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Polonelli, L. 1997. Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev*. 10 (3):369-400. PMC 172926. PMID 9227858.
- Mai, NTT., Linh, MTD., Thu, NP., Tuan, TV. 2016. Identification of a New *Candida tropicalis* Yeast Strain Possessing Antagonistic Activity Against the Spoilage Bacteria Isolated from the Fermented Vegetable Products. *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*. 32(1S):313-320.
- Marquina, D., Santos, A., Peinado, JM. 2002. Biology of killer yeast. *Int Microbiol*. 5:65-71.
- Misra, S., Raghuwanshi, S., Gupta, P., Dutt, K., Saxena, RK. 2012. Fermentation behavior of osmophilic yeast *Candida tropicalis* isolated from the nectar of *Hibiscus rosa sinensis* flowers for xylitol production. *Antonie van Leeuwenhoek*. 101(2):393-402.
- Mrázek, J., Strosová, L., Fliegerová, K., Kott, T., Kopecný, J. 2008. Diversity of insect intestinal microflora. *Folia Microbiol*. 53(3):229-233.
- Muccilli, S., Restuccia, C. 2015. Bioprotective Role of Yeasts. *Microor*. 3:588-611. doi:10.3390/microorganisms3040588.
- Ni, L., Snyder, M. 2001. A Genomic Study of the Bipolar Bud Site Selection Pattern in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molec Biol Cell*. 12:2147-2170.
- Nicholl, DST. 2002. An Introduction to Genetic Engineering. Second edition. Edinburgh: Cambridge University Press.
- Ochango, HC., Gamero, A., Smith, IM., Christensen, JE., Jespersen, L., Arneborg, N. 2016. *In vitro* investigation of *Debaryomyces hansenii* strains for potential probiotic properties. *W J Microbiol Biotechnol*. 32:141. doi 10.1007/s11274-016-2109-1.
- Peay, KG., Kennedy, PG., Bruns, TD. 2008. Fungal community ecology: a hybrid beast with a molecular master. *Biosci*. 58(9):799-810. doi:10.1641/b580907.
- Perez, MF., Contreras, L., Garnica, NM., Fernandez-Zenoff, MV., Farias, ME., Sepulveda, M., Ramallo, J., Dib, JR. 2016. Native Killer Yeasts as Biocontrol Agents of Postharvest Fungal Diseases in Lemons. *PLoS ONE*. 11(10):1-21. doi:10.1371/journal.pone.0165590.
- Polonelli, L., Archibusacci, C., Sestito, M., Morace, G. 1983. Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *J Clin Microbiol*. 17:774-780.



- Pringle, JR., Broach, James, R., Jones, EW. 1997. The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Cell Cycle and Cell Biology Vol. III. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Reece, RJ. 2004. Analysis of genes and genom. The Atrium, Chicester: John Wiley & Sons Ltd.
- Rosa, CA., Lachance, MA., Silva, JOC., Teixeira, ACP., Marini, MM., Antonini, Y., Martins, RP. 2003. Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Res.* 4:271-275.
- Sambrook, JS., Russell, DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Vol 1-3 ed. New York (US): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Satwika, D., Klassen, R., Meinhardt, F. 2012. Anticodon nuclease encoding virus-like elements in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.* 96:345–356.
- Sawant, AD., Abdelal, AT., Ahearn, DG. 1988. Anti-*Candida albicans* activity of *Pichia anomala* as determined by a growth rate reduction assay. *Appl Environ Microbiol.* 54(5):1099–1103.
- Schaffrath, R., Stark, MJR., Gunge, N., Meinhardt, F. 1992. *Kluyveromyces lactis* killer system: ORF1 of pGKL2 has no function in immunity expression and is dispensable for killer plasmid replication and maintenance. *Curr Genet.* 21:357–363.
- Schmitt, JM., Breinig, F. 2006. Yeast viral killer toxin: lethality and self protection. Nature Publishing Group. 4:212-220.
- Schoch, CL., Seifert, KA., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, JL., Levesque, CA., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, PW. 2012. Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region as a Universal DNA Barcode Marker for Fungi. *Proc Nat Amer Sci.* 109(16):6241-6246. doi:10.1073/pnas.1117018109.
- Simard, RE., Blackwood, AC. 1971. Yeast from the St Lawrence River. *Can J Microbiol.* 17:197-203.
- Slavikova, E., Vadkertiova, R. 2003. The Diversity of Yeasts in The Agricultural Soil. *J Basic Microbiol.* 43(5):430-436. doi: 10.1002/jobm.200310277.
- Snustad, DP., Michael, JS. 2003. Principles of Genetics. 3rd ed. John Wiley and Sons, Inc, New York. 840.
- Spencer, JFT., Spencer, DM. 1997. Ecology: Where yeasts live. Dalam: Spencer, J.F.T. & D.M. Spencer. 1997. Yeast in natural and artificial habitats. Springer-Verlag, Berlin: 80-94.
- Stam, JC., Kwakman, J., Meijer, M., Stuitje, AR. 1986. Efficient isolation of the linear DNA killer plasmid of *Kluyveromyces lactis*: evidence for location and expression in the cytoplasm and characterization of their terminally bound proteins. *Nucl Ac Res.* 14:6871-6884.
- Tanaka, T., Weisblum, B. 1975. Construction of a colicin E1-R factor composite plasmid *in vitro*: means for amplification of deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol.* 121:354-362.

- Vega, FE., Dowd PF. 2005. The Role of Yeast as Insect Endosymbiont. Dalam: Vega, FE., Blackwell, M. (ed.) *Insect-fungal Association: Ecology and Evolution*. Oxford University Press, New York: 211-243.
- Walker, GM. 1998. *Development in Yeast Technologies: Yeast Physiology and Biotechnology*. John Wiley & Sons, England. 13.
- Wina, E. 1999. Pemanfaatan Ragi (Yeast) Sebagai Pakan Imbuhan untuk Meningkatkan Produktivitas Ternak Ruminansia. *WARTAZOA*. 9(2):1-8.
- Zhimo, VY., Dilip, D., Sten, J., Ravat, VK., Bhutia, DD., Panja, B., Saha, J. 2016. Antagonistic Yeasts for Biocontrol of the Banana Postharvest Anthracnose Pathogen *Colletotrichum musae*. *J Phytopath*. 165:35-43. doi: 10.1111/jph.12533.

©UKPDW