

## **Khamir Antagonis untuk Pengendalian Penyakit Antraknosa pada Buah Avokad Selama Penyimpanan**

### **The Use of Antagonistic Yeast for Controlling Anthracnose Disease on Avocado Fruit During Storage**

**Yuli Fitriati<sup>1,2</sup>, Suryo Wiyono<sup>1\*</sup>, Ivone Oley Sumarauw<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

<sup>2</sup>Badan Karantina Pertanian, Jakarta 12550

#### **ABSTRAK**

Antraknosa yang disebabkan oleh *Colletotrichum gloeosporioides* merupakan penyakit penting pada buah avokad dalam penyimpanan. Metode pengendalian yang efektif, murah, dan aman diperlukan untuk menggantikan fungisida dalam pengendalian penyakit pascapanen. Penelitian ini bertujuan mendapatkan dan mengidentifikasi khamir antagonis dari avokad yang efektif mengendalikan penyakit antraknosa pada buah avokad. Penelitian dimulai dengan isolasi *C. gloeosporioides* dan khamir dari buah avokad, diikuti dengan uji *in vivo*, uji antibiosis, dan uji aktivitas kitinolitik. Uji *in vivo* dilakukan dengan pencelupan buah avokad dalam suspensi sel khamir. Khamir yang berhasil diisolasi dari buah avokad ialah sebanyak 23 isolat. Berdasarkan uji *in vivo*, terdapat delapan isolat khamir yang efektif menghambat penyakit antraknosa pada buah avokad pada konsentrasi  $10^6$  mL<sup>-1</sup> dan  $10^7$  mL<sup>-1</sup>. Namun hanya empat isolat yang dipilih untuk identifikasi berdasarkan morfologi dan molekuler. Dua spesies khamir yang diidentifikasi ialah *Pichia anomala* (isolat A33 dan A37) dan *Candida intermedia* (isolat A35 dan A36).

Kata kunci: *Candida intermedia*, *Colletotrichum gloeosporioides*, penyakit pascapanen, *Pichia anomala*

#### **ABSTRACT**

Anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* is an important disease in avocado fruit during storage. An effective, cheap, and safe control method is necessary as an alternative to substitute the use of fungicides in postharvest disease control. This research aimed to identify yeast antagonist from avocados that are effective in controlling anthracnose disease on avocado fruit. Research was started with isolation of *C. gloeosporioides* and yeast from avocado fruit, followed by *in vivo* bioassay, antibiosis assay, and chitinolytic activity assay. *In vivo* bioassay was done by dipping avocado fruit on yeast cell suspension. As many as 23 yeasts isolates was obtained from avocado fruits. Eight yeast isolates (A28, A32, A33, A34, A35, A36, A37, A38) showed very effective for inhibiting anthracnose disease in avocado fruit at concentration of  $10^6$  mL<sup>-1</sup> and  $10^7$  mL<sup>-1</sup>. However, only four isolates were chosen for further characterization based on morphological and molecular identification. Two species of yeast was identified as *Pichia anomala*, i.e. isolates A33 and A37 and *Candida intermedia*, i.e. isolates A35 and A36.

Key words: *Candida intermedia*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pichia anomala*, postharvest disease

---

\*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Jalan Kamper, Bogor 16680  
Tel: 0251-8629364, Faks: 0251-8629362, Surel: swiyono2@yahoo.de

## PENDAHULUAN

Avokad (*Persea americana*) merupakan salah satu produk hortikultura yang bernilai ekonomi tinggi dan merupakan komoditas target ekspor. Busuk buah pascapanen yang disebabkan *Colletotrichum gloeosporioides* merupakan masalah utama pada buah avokad karena cendawan ini menyebabkan penyakit antraknosa yang bersifat laten. Gejala berupa bercak berwarna cokelat akan muncul pada saat buah menjadi lembut sehingga buah tidak dapat dipasarkan.

Saat ini terdapat kecenderungan global untuk mengurangi penggunaan fungisida dan mencari alternatif pengendalian penyakit pascapanen yang lebih aman dan ramah lingkungan, misalnya dengan menggunakan agens hayati. Beberapa mikroba antagonis sebagai agens hayati telah dilaporkan dapat mengendalikan beberapa patogen pada sayuran dan buah-buahan. Khamir merupakan mikroba potensial untuk digunakan sebagai agens hayati karena mudah diperbanyak dan memiliki beberapa sifat yang dapat dimanipulasi untuk meningkatkan efisiensi penggunaannya. Beberapa tahun terakhir, khamir telah digunakan sebagai agens hayati untuk mengendalikan penyakit-penyakit pascapanen. Perlakuan khamir *Pichia anomala*, *P. guilliermondii*, *Lipomyces tetrasporus*, dan *Metschnikowia lunata* pada buah jambu dapat menekan busuk buah yang disebabkan *Botryodiplodia theobromae* (Hashem dan Alamri 2009). Khamir *Aureobasidium pullulans* dan *Rhodotorula mucilaginosa* yang diisolasi dari buah pir dapat menekan infeksi *Penicillium expansum* dan mengurangi insidensi penyakit hingga 33% (Robiglio *et al.* 2011).

Eksplorasi khamir dari buah avokad dilakukan untuk mengidentifikasi jenis-jenis khamir antagonis yang efektif sebagai agens hayati yang dapat mengendalikan penyakit antraknosa pada buah avokad.

## BAHAN DAN METODE

### Isolasi *C. gloeosporioides* dan khamir dari Buah Avokad

Isolasi *C. gloeosporioides* dilakukan dengan teknik penanaman jaringan buah avokad yang bergejala antraknosa pada medium *green bean agar* (GBA) dan *potato dextrose agar* (PDA).

Khamir diisolasi dari 3 buah avokad dengan metode pencucian dan pengayaan pada medium *yeast glucose chloramphenicol* (YGC). Metode pengayaan dilakukan dengan cara mengambil bagian buah avokad yang telah matang sebanyak 10 g, dimasukkan dalam 90 mL medium YGC dan dikocok dengan kecepatan 140 rpm selama 72 jam. Sebanyak 1 mL endapan sel khamir dipindahkan ke dalam 9 mL air steril dan diencerkan berseri pada  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , dan  $10^{-5}$  untuk mengisolasi khamir pada medium agar-agar YGC dan diinkubasi selama 48 jam. Semua jenis khamir dengan morfologi berbeda diisolasi dan diremajakan pada medium PDA miring dan selanjutnya digunakan sebagai biakan koleksi.

### Uji Khamir pada Insidensi Penyakit Antraknosa

Masing-masing isolat khamir disuspensikan pada konsentrasi  $10^6$ – $10^7$  sel  $\text{mL}^{-1}$  dengan ditambah Twin 20 0.1%. Suspensi ini digunakan sebagai agens pengendalian penyakit antraknosa pada avokad. Buah avokad disterilkan dengan natrium hipoklorit 1% selama 2 menit, dicuci 2 kali dengan air suling steril, dan dikeringanginkan. Buah avokad dicelupkan dalam suspensi khamir. Inokulasi cendawan *C. gloeosporioides* dilakukan dengan meneteskan 30  $\mu\text{L}$  suspensi *C. gloeosporioides* (konsentrasi  $10^7$   $\text{mL}^{-1}$ ) pada bagian ujung, tengah, dan pangkal buah avokad. Larutan fungisida benomil 0.5% digunakan sebagai pembanding.

Seluruh perlakuan diulang 3 kali. Insidensi penyakit diamati dan dihitung setiap hari

selama 7 hari pengamatan dengan rumus sebagai berikut:

$$KP = \frac{n}{N} \times 100\%, \text{ dengan}$$

KP, insidensi penyakit; n, jumlah titik inokulasi yang menunjukkan gejala sakit; N, jumlah titik inokulasi yang diamati.

### Uji Antibiosis dan Uji Kitinolitik *in Vitro* Khamir terhadap *C. gloeosporioides*

Sebanyak 1 lup khamir digoreskan pada medium PDA tepat di tengah cawan petri (Ø 9 mm) secara transversal. Biakan murni *C. gloeosporioides* berumur 14 hari (Ø 5 mm) diletakkan pada sisi kanan dan kiri goresan khamir dengan jarak  $\pm$  3 cm, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar. Pengamatan uji antibiosis ini dilakukan dengan mengukur lebar zona hambat khamir terhadap *C. gloeosporioides* setiap hari sampai hari ke-15 inkubasi.

Sebanyak 1 lup khamir, umur 3 hari, digoreskan pada medium agar-agar kitin 0.2% secara transversal tepat di tengah cawan (Ø 9 mm) dan diinkubasikan pada suhu ruang. Pengamatan uji kitinolitik ini dilakukan setiap hari selama 7 hari terhadap zona bening yang terbentuk pada tepi koloni khamir.

Uji antibiosis dan kitinolitik di atas disusun dalam rancangan acak lengkap dengan 5 ulangan. Data yang diperoleh dianalisis dengan Minitab 16 untuk *windows*. Pengaruh perlakuan dianalisis dengan sidik ragam dan apabila terdapat beda nyata dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (*Fisher's test*) pada tingkat kepercayaan 95%.

### Identifikasi Khamir

Isolat khamir terpilih diidentifikasi secara morfologi dan molekuler dengan *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan primer umum 18 S rDNA dengan *forward primer* ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') dan *reverse primer* ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3').

Sebanyak 1 mL biakan khamir pada medium *potato dextrose broth* (PDB)

disentrifugasi dengan kecepatan 15 000 x g selama 5 menit, kemudian ditambah 200 µL bufer Harju dan dikocok kuat selama 1 menit. Tabung didinginkan dalam es selama 2 menit, diinkubasi pada suhu 95 °C selama 1 menit, dan didinginkan kembali dalam es selama 2 menit, dan dikocok kuat selama 30 detik. Selanjutnya, sebanyak 200 µL kloroform ditambahkan, lalu dikocok kuat selama 2 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 15 000 x g selama 5 menit. Supernatan ditambahi 400 µL etanol dingin, diinkubasi dalam suhu -20 °C selama 30 menit dan disentrifugasi pada kecepatan 15 000 x g selama 8 menit. Pelet kemudian diambil dan ditambah dengan 500 µL etanol dingin, disentrifugasi dengan kecepatan 15 000 x g selama 8 menit. Pelet yang terdiri atas DNA khamir disuspensikan dalam 30 µL ddH<sub>2</sub>O (*nuclease free water*).

Sebanyak 2 µL suspensi DNA diamplifikasi dengan volume reaksi 25 µL yang terdiri atas 12.5 µL *master mix* (Qiagen), 1 µL Primer Forward (ITS1), 1 µL Primer Reverse (ITS4), dan 8.5 µL dH<sub>2</sub>O. Amplifikasi menggunakan primer 18S rDNA, yaitu pasangan ITS1/ITS4. Amplifikasi dilakukan dengan mesin PCR Fast Thermal Cycler Gene Amp PCR System 9800 (PE Applied Biosystems, Norwalk US) dengan siklus denaturasi awal 95 °C selama 5 menit, denaturasi 95 °C selama 45 detik, penempelan primer 55 °C selama 30 detik, dan ekstensi 72 °C selama 1 menit 30 detik. Langkah ke-2 sampai dengan 4 diulang sebanyak 35 siklus dan ekstensi akhir 72 °C selama 7 menit. Elektroforesis dilakukan dalam 1.5% b/v gel agarosa (TopVision, Fermentas) dengan marker GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Fermentas) dan diwarnai dengan etidium bromida.

Fragmen DNA hasil amplifikasi dikirim ke PT Genetica Science untuk sikuensing menggunakan pasangan primer ITS1/ITS4. Analisis homologi asam amino gen khamir menggunakan *blast local alignment search tool* (BLAST) pada situs *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) ([www.blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov)).

## HASIL

***Colletotrichum gloeosporioides* dan Khamir dari Buah Avokad**

Isolat *C. gloeosporioides* dari buah avokad yang bergejala antraknosa pada medium PDA memiliki ciri morfologi miselium berwarna putih hingga putih keabu-abuan, massa konidium kebasah-basahan berwarna seperti warna ikan salmon. Melalui pengamatan mikroskopi dapat diamati konidium membulat, hialin, bersel satu, konidiofor tegak dan memiliki seta pendek

Sebanyak 23 isolat khamir diperoleh dari 3 buah avokad dengan morfologi koloni yang beragam. Perbedaan dapat terlihat dari bentuk tepi koloni (halus atau bergelombang), elevasi koloni (datar atau cembung), bentuk sel (berantai, oval atau bulat), warna koloni (krem atau putih), dan permukaan koloni (kasar atau licin) (Tabel 1).

**Khamir Antagonis untuk Pengendalian Penyakit Antraknosa pada Buah Avokad**

Sebanyak 14 isolat khamir konsentrasi  $10^6$  sel  $\text{mL}^{-1}$  dan 11 isolat pada konsentrasi  $10^7$  sel  $\text{mL}^{-1}$  efektif dalam mengurangi insidensi penyakit antraknosa pada buah avokad yang diinokulasi *C. gloeosporioides* dan berbeda nyata dengan buah yang tidak diberi perlakuan dengan khamir (Tabel 2). Terdapat 13 isolat khamir pada konsentrasi  $10^6$  sel  $\text{mL}^{-1}$  yang memiliki tingkat hambatan relatif (THR) sama dengan fungisida benomil. Pada konsentrasi sel khamir  $10^7$   $\text{mL}^{-1}$ , terdapat 11 isolat khamir yang memiliki THR sama dengan fungisida (Tabel 3).

Pada penelitian ini diperoleh 8 isolat khamir yang efektif dalam menekan insidensi penyakit antraknosa pada buah avokad dan memberikan tingkat hambatan relatif yang sama dengan fungisida benomil serta berpotensi digunakan sebagai agens pengendali hayati

Tabel 1 Morfologi koloni dan bentuk sel khamir pada medium *potato dextrose agar*

Biakan Khamir	Bentuk Tepi Koloni	Elevasi Koloni	Bentuk Sel	Warna Koloni	Permukaan Koloni
A32	Bergelombang	Datar	Berantai, oval	Krem	Kasar
A33	Halus	Cembung	Bulat	Putih	Licin
A34	Bergelombang	Datar	Berantai, oval	Krem	Kasar
A37	Halus	Cembung	Bulat	Putih	Licin

Tabel 2 Kejadian penyakit antraknosa pada buah avokad yang diberi perlakuan khamir pada 7 hari setelah inokulasi

Isolat khamir	Insidensi penyakit antraknosa* (%)		Isolat khamir	Insidensi penyakit antraknosa* (%)	
	$10^6$ $\text{mL}^{-1}$	$10^7$ $\text{mL}^{-1}$		$10^6$ $\text{mL}^{-1}$	$10^7$ $\text{mL}^{-1}$
A11	100.00 a	100.00 a	A26	11.00 d	89.00 ab
A12	100.00 a	100.00 a	A27	44.33 bcd	33.33 cd
A13	100.00 a	100.00 a	A28	22.33 cd	22.33 cd
A14	100.00 a	100.00 a	A31	44.33 bcd	66.67 abc
A15	100.00 a	100.00 a	A32	0.00 d	33.33 cd
A16	100.00 a	89.00 ab	A33	0.00 d	0.00 d
A17	100.00 a	100.00 a	A34	11.00 d	0.00 d
A21	89.00 ab	89.00 ab	A35	33.33 cd	0.00 d
A22	33.33 cd	55.33 abc	A36	33.33 cd	0.00 d
A23	22.33 cd	43.33 bcd	A37	22.33 cd	0.00 d
A24	78.00 abc	22.00 cd	A38	11.00 d	33.33 cd
A25	0.00 d	66.67 abc	Fungisida benomil	0.00 d	0.00 d

\*Angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan hasil tidak berbeda nyata

Tabel 3 Tingkat hambatan relatif beberapa konsentrasi khamir terhadap perkembangan perkembangan *Colletotrichum gloeosporioides* pada buah avokad berdasarkan diameter bercak

Isolat khamir	Tingkat hambatan relatif*		Isolat khamir	Tingkat hambatan relatif*	
	10 <sup>6</sup> mL <sup>-1</sup>	10 <sup>7</sup> mL <sup>-1</sup>		10 <sup>6</sup> mL <sup>-1</sup>	10 <sup>7</sup> mL <sup>-1</sup>
A11	13.45 ef	14.29 defg	A26	95.76 ab	48.29 bcde
A12	21.36d ef	19.03 defg	A27	49.80 bcde	100.00 a
A13	5.32 ef	3.94 fg	A28	66.67 abcd	94.20 a
A14	0.00 f	0.00 g	A31	73.07 ab	39.78 cdefg
A15	5.60 ef	8.82 efg	A32	100.00 a	81.51 ab
A16	12.46 ef	29.63 defg	A33	100.00 a	81.51 ab
A17	9.24 ef	0.00 g	A34	92.75 ab	100.00 a
A21	24.28 cdef	14.78 defg	A35	66.67 abcd	83.51 ab
A22	77.17 ab	51.35 bcd	A36	69.40 abc	100.00 a
A23	83.47 ab	44.54 bcdef	A37	75.76 ab	100.00 a
A24	24.42 cdef	94.41 a	A38	95.83 ab	80.02 abc
A25	100.00 a		Fungisida Benomil	100.00 a	100.00 a

\*Angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan hasil tidak berbeda nyata

*C. gloeosporioides* di penyimpanan. Dari 8 isolat tersebut, hanya 4 isolat yang akan dikarakterisasi lanjut, yaitu isolat A32, A33, A34, dan A37.

Buah avokad yang tidak diberi perlakuan khamir tampak ditumbuhi oleh cendawan pascapanen dan menunjukkan gejala penyakit antraknosa pada 8 hari setelah inokulasi *C. gloeosporioides*. Buah avokad yang diberi perlakuan fungisida benomil tidak menunjukkan adanya gejala bercak pada titik inokulasi, demikian juga yang diberi perlakuan khamir A32, A33, A34, dan A37 (Gambar 1).

#### Kemampuan Khamir untuk Menghambat *C. gloeosporioides* dan Aktivitas Kitinolitiknya

Uji *in vitro* aktivitas antibiosis khamir terhadap *C. gloeosporioides* pada medium PDA menunjukkan tidak ada satu pun khamir yang memberi zona hambat. Demikian juga seluruh isolat khamir yang diisolasi dari buah avokad hingga hari ke-7 tidak menunjukkan zona bening pada medium agar-agar kitin.

#### Identifikasi Khamir

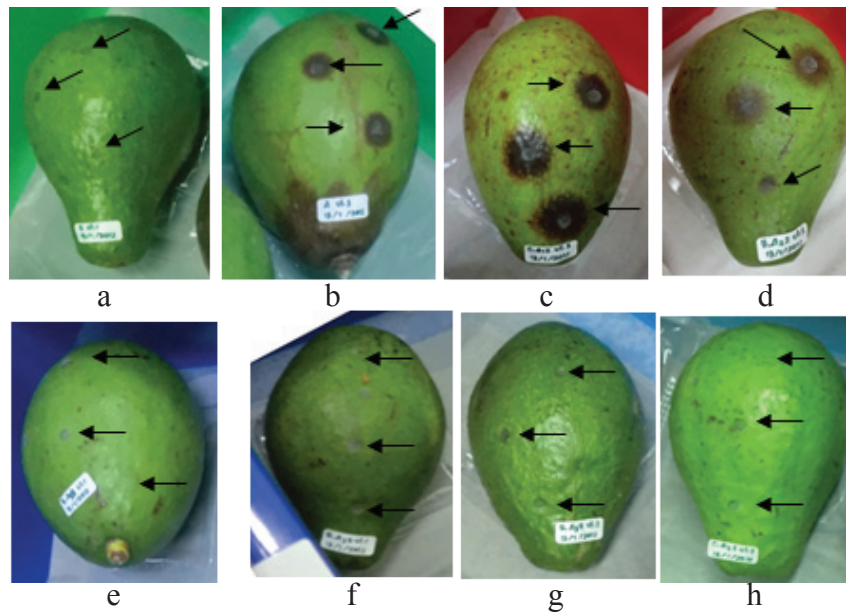
Amplifikasi menggunakan pasangan primer ITS1/ITS4 berhasil mendapatkan pita DNA target berukuran ± 500 pb dari isolat khamir A32, A33, A34, dan A37 (Gambar 2). Hasil analisis BLAST menunjukkan

tingkat kesamaan sikuen nukleotida dengan *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*) sebesar 99% untuk isolat A33 dan A37, serta dengan *Candida intermedia* sebesar 100% untuk isolat A35 dan A36.

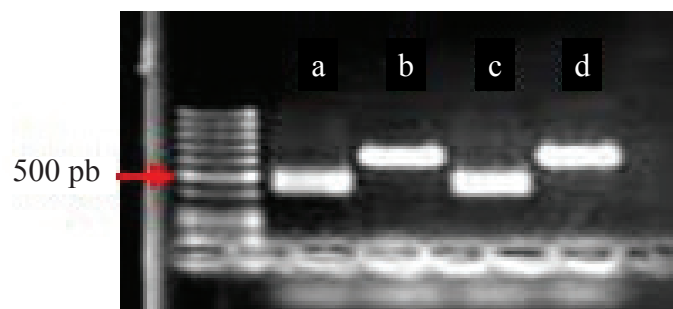
## PEMBAHASAN

Salah satu faktor penentu daya saing produk dalam perdagangan bebas ialah jaminan mutu dan keamanan pangan bagi konsumen dalam menggunakan produk tersebut. Perhatian masyarakat terhadap peningkatan kesehatan dan lingkungan mendorong pengembangan metode pengendalian penyakit yang lebih ramah lingkungan dan aman bagi manusia (Droby 2006). Kementerian Kesehatan dan Kementerian Pertanian Republik Indonesia menetapkan batas minimal residu produk pertanian khususnya benomil pada avokad sebesar 0.5 mg kg<sup>-1</sup> (Kementrian Pertanian 2008).

Agens pengendali hayati telah dilaporkan cukup efektif untuk mengendalikan penyakit pascapanen (Kefialewa dan Ayalewb 2009). Penggunaan mikrob, khususnya khamir, pada permukaan buah dan sayuran telah banyak dipilih untuk mengendalikan penyakit pascapanen. Khamir digunakan sebagai agens hayati pada penyakit pascapanen karena cepat



Gambar 1 Hasil inokulasi *Colletotrichum gloeosporioides* pada buah avokad pada 4 hari setelah inokulasi. a, perlakuan Benomil; b, tanpa perlakuan; c, perlakuan khamir isolat A12; d, perlakuan khamir isolat A31; e, perlakuan khamir isolat A33; f, perlakuan khamir isolat A35; g, perlakuan khamir isolat A36; h, perlakuan khamir isolat A37. Tanda panah, lokasi yang ditetesi dengan *C. gloeosporioides*.



Gambar 2 Visualisasi DNA hasil amplifikasi isolat khamir menggunakan pasangan primer ITS1/ITS4. a, isolat A32; b, isolat A33; c, isolat A37; d, isolat A34.

mengolonisasi dan bertahan pada permukaan buah dalam waktu yang cukup lama pada berbagai kondisi, mampu berkompetisi dalam penggunaan nutrisi dengan patogen, kebutuhan nutrisi khamir sederhana, dapat tumbuh cepat dengan menghasilkan sel dalam jumlah besar, tidak menghasilkan spora alergik atau mikotoksin, serta menghasilkan vitamin, mineral, dan asam amino penting yang digunakan dalam makanan (Hashem dan Alamri 2009).

Hasil uji antibiosis secara *in vitro* dan kemampuan kitinolitik pada penelitian ini menunjukkan bahwa antibiosis dan produksi enzim kitinase bukan merupakan mekanisme

kerja khamir dalam mengendalikan penyakit antraknosa pada buah avokad selama penyimpanan. Mekanisme penghambatan patogen oleh khamir melalui produksi kitinase telah dilaporkan oleh El Gaouth *et al.* (2003). Mekanisme penghambatan lainnya adalah dengan menghasilkan sekresi yang menghambat patogen (Guetsky *et al.* 2002), melekat pada dinding sel cendawan, aktivitas peroksidase (El Gaouth *et al.* 2003), kompetisi ruang dan nutrisi serta induksi ketahanan (Guetsky *et al.* 2002; El Gaouth *et al.* 2003).

Dua spesies khamir, yaitu *Pichia anomala* dan *Candida intermedia* berhasil diidentifikasi pada penelitian ini. *P. anomala* adalah

khamir yang termasuk dalam kelompok *Ascomycetes* yang ditemukan secara alami berada pada makanan, biji-biji sereal dan memiliki kemampuan menghambat beberapa cendawan (Fredlund 2004). *P. anomala* juga diklasifikasikan sebagai organisme yang aman dan belum ada laporan yang menyatakan bahwa khamir ini menghasilkan mikotoksin yang berbahaya atau memproduksi spora penyebab alergi. *Candida intermedia* diketahui dapat menghambat pertumbuhan *Colletotrichum graminicola* dan *C. sublineolum* penyebab penyakit antraknosa pada sorgum dan jagung. Hasil uji antagonis *C. intermedia* yang diisolasi dari rizosfer tanaman tebu terhadap *C. graminicola* menunjukkan bahwa *C. intermedia* mampu menekan pertumbuhan cendawan patogen dengan memberikan reaksi antagonisme dari 45.9% sampai 48.9% sedangkan hasil uji antagonis *C. intermedia* terhadap *C. sublineolum* menunjukkan bahwa *C. intermedia* mampu menekan pertumbuhan cendawan patogen dengan memberikan reaksi antagonisme dari 47.7% sampai 48.9% (Rosa-Magri *et al.* 2011).

Beberapa isolat khamir yang diisolasi dari buah avokad terbukti potensial untuk digunakan sebagai agens biokontrol untuk penyakit antraknosa terutama pada buah-buah di tempat penyimpanan. Diperlukan serangkaian penelitian lanjut untuk mengetahui mekanisme kerja khamir dalam menghambat perkembangan *C. gloeosporioides*, penyebab penyakit antraknosa pada buah avokad.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Droby S. 2006. Biological control of postharvest disease of fruit and vegetables: difficulties and challenges. *Phytopathol Pol.* 39:105–117.
- Fredlund E. 2004. Central carbon metabolism in the biocontrol yeast *Pichia anomala*: influence of oxygen limitation [disertasi]. Uppsala (IN): Swedish University of Agricultural Sciences.
- El Ghaouth A, Wilson CL, Wisniewski M. 2003. Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. *Phytopathology.* 93:344–348. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.3.344>.
- Guetsky R, Shtienberg D, Elad Y, Fischer E, Dinoor A. 2002. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. *Phytopathology.* 92:976–985. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.9.976>.
- 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.postharvbio.2009.04.001>.
- Kefialewa Y, Ayalewb A. 2009. Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). *Postharvest Biol Technol.* 50:8–11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.03.007>.
- Kementerian Pertanian. 2008. Peraturan Menteri Pertanian Nomor 35/Permentan/OT.140/7/2008 tentang Persyaratan dan Penerapan Cara Pengolahan Hasil Pertanian Asal Tumbuhan yang Baik (*Good Manufacturing Practices*). Jakarta (ID): Mentan.
- Robiglio A, Sosa MC, Lutz MC, Lopes CA, Sangorr'n MP. 2011. Yeast biocontrol of fungal spoilage of pears stored at low temperature. *Int J Food Microbiol.* 147(3):211–216. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.007>.
- Rosa-Magri MM, Tauk-Tornisielo SM, Ceccato-Antonini SR. 2011. Bioprospection of yeast as biocontrol agent against phytopathogenic molds. *Braz Arch Biol Technol.* 54(1):1–5. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132011000100001>.