

MISIDENTIFIKASI FENOTIPIK KHAMIR AMILOLITIK DARI TAPE SINGKONG YANG TERUNGKAP MELALUI SEKUENSING ITS rDNA

*Phenotypic Misidentification Of Amilolytic Yeast From Cassava Tape Revealed Through ITS
rDNA Sequencing*

Heru Widyatmoko^{1)*}, Nurhayati Nurhayati²⁾, Achmad Subagio²⁾

¹⁾Program Studi Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas PGRI Banyuwangi
Jl. Ikan Tongkol, Kertosari, Kec. Banyuwangi, Kabupaten Banyuwangi, Jawa Timur 68416

²⁾Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember
Jalan Kalimantan No. 37 – Kampus Tegalboto Kotak POS 159 Jember, Jawa Timur, 68121, Indonesia

*Korespondensi Penulis: heruwidyatmoko@unibabwi.ac.id

ABSTRACT

Accurate yeast identification was very important for studying microbial diversity and optimizing traditional food fermentation processes. The production of cassava tapai depended on specific yeasts capable of hydrolyzing starch and fermenting sugars. However, many studies still relied on phenotypic identification methods, which could lead to taxonomic inaccuracies. This study aimed to explore the reliability of phenotypic identification using the API 20C AUX Kit compared with molecular identification through rDNA sequencing of the internal transcribed spacer region. Four groups of indigenous amylolytic yeasts isolated from cassava tapai were characterized using the API 20C AUX carbohydrate assimilation profile and were phenotypically identified as *Candida guilliermondii*, *Trichosporon mucoides*, *Cryptococcus humicola*, and *Candida utilis*. Molecular identification was performed through PCR amplification of the ITS region using ITS1 and ITS4 primers, followed by DNA sequencing, and the results were analyzed using the BLAST method. The molecular results revealed discrepancies between phenotypic and genotypic identification. Isolate C, which was initially identified as *Cryptococcus humicola*, showed 100% sequence identity with *Saccharomycopsis fibuligera*. Isolate D, previously identified as *Candida utilis*, was reclassified as *Candida tropicalis* with 100% identity. These findings indicated phenotypic misidentification when relying solely on biochemical assimilation profiles.

Keywords: amylolytic yeast, cassava tapai, ITS sequencing, misidentification, phenotypic identification

PENDAHULUAN

Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) merupakan salah satu komoditas pangan penting di Indonesia yang dimanfaatkan sebagai sumber karbohidrat sekaligus bahan baku berbagai produk pangan tradisional. Berdasarkan data terbaru dari Badan Pusat Statistik, produksi singkong nasional masih menunjukkan peran strategis dalam mendukung ketahanan pangan dan pengembangan industri berbasis hasil pertanian. Salah satu produk fermentasi tradisional berbahan dasar singkong yang banyak dikonsumsi masyarakat adalah tape singkong. Produk ini dihasilkan melalui proses fermentasi yang melibatkan komunitas mikroorganisme kompleks, terutama

khamir, kapang, dan bakteri asam laktat yang bekerja secara sinergis dalam mengubah pati menjadi senyawa-senyawa yang memberikan karakteristik khas tape berupa tekstur lunak, cita rasa manis-asam, aroma alkohol, dan rasa yang disukai konsumen (Tamang et al., 2020; Nout, 2021).

Fermentasi tape singkong berlangsung melalui dua tahapan utama. Tahap pertama melibatkan hidrolisis pati menjadi gula sederhana oleh mikroorganisme amilolitik yang menghasilkan enzim amilase, sedangkan tahap kedua ditandai dengan konversi gula menjadi etanol, asam organik, dan berbagai senyawa volatil yang berkontribusi terhadap mutu sensori produk. Khamir

amilolitik memiliki peran penting dalam proses tersebut karena kemampuannya menghasilkan enzim ekstraseluler yang menghidrolisis amilosa dan amilopektin menjadi glukosa yang kemudian dimanfaatkan selama fermentasi (Behera et al., 2021; Ray & Joshi, 2022).

Keberhasilan fermentasi tape sangat dipengaruhi oleh komposisi mikroorganisme yang terdapat dalam ragi starter. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa komunitas khamir pada tape singkong terdiri atas spesies yang beragam, antara lain dari genus *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Wickerhamomyces*, dan *Meyerozyma* yang memiliki karakter fisiologis dan metabolik berbeda-beda (Suharni et al., 2022; Septiani et al., 2024).

Identifikasi khamir umumnya dilakukan berdasarkan karakter fenotipik seperti morfologi koloni, bentuk sel, pembentukan pseudohifa, dan kemampuan asimilasi atau fermentasi berbagai sumber karbon. Meskipun metode fenotipik relatif sederhana dan ekonomis, pendekatan ini sering menghasilkan kesalahan identifikasi karena karakter yang diamati dapat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, media pertumbuhan, dan variasi fisiologis antar strain. Selain itu, beberapa spesies khamir yang berbeda dapat menunjukkan karakter fenotipik yang sangat mirip sehingga sulit dibedakan hanya melalui pengamatan konvensional (Kurtzman et al., 2022; Groenewald et al., 2023).

Perkembangan biologi molekuler telah menyediakan metode yang lebih akurat untuk identifikasi khamir, salah satunya melalui analisis daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) rDNA. Wilayah ITS merupakan penanda molekuler yang banyak digunakan karena memiliki tingkat variasi antargenus dan antarspesies yang tinggi sehingga efektif untuk identifikasi dan penentuan hubungan filogenetik khamir. Sekuensing ITS rDNA telah terbukti mampu mengungkap ketidaksesuaian atau misidentifikasi yang sebelumnya terjadi pada identifikasi berbasis fenotipik, termasuk pada

mikroorganisme yang berperan dalam fermentasi pangan tradisional (Vu et al., 2023; Daniel et al., 2024).

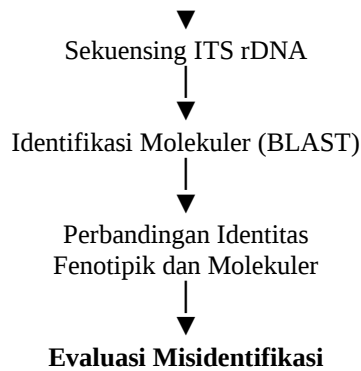
Meskipun beberapa penelitian telah melaporkan keberadaan khamir amilolitik pada tape singkong, informasi mengenai tingkat akurasi identifikasi fenotipik dibandingkan dengan identifikasi molekuler masih terbatas. Kesalahan identifikasi dapat menyebabkan interpretasi yang kurang tepat terhadap peran mikroorganisme dalam fermentasi serta menghambat pengembangan kultur starter yang spesifik. Oleh karena itu, evaluasi ulang identitas khamir menggunakan pendekatan molekuler menjadi sangat penting untuk memperoleh data taksonomi yang lebih akurat.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengungkap terjadinya misidentifikasi fenotipik pada khamir amilolitik yang diisolasi dari tape singkong melalui pendekatan sekuensing ITS rDNA. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi yang lebih akurat mengenai identitas khamir amilolitik pada tape singkong, sekaligus menjadi dasar pengembangan starter fermentasi dan kajian biodiversitas mikroorganisme pangan fermentasi tradisional Indonesia.

METODE PENELITIAN

Tahapan Penelitian





Gambar 1. Diagram alir penelitian

2.1 Isolasi Khamir dari Tape Singkong

Sampel tape singkong sebanyak 10 g dimasukkan ke dalam 90 mL akuades steril dan dihomogenkan menggunakan vortex selama 2 menit. Suspensi kemudian diencerkan secara serial hingga tingkat pengenceran yang sesuai. Sebanyak 0,1 mL suspensi hasil pengenceran diinokulasikan pada media Malt Extract Agar (MEA; Merck) menggunakan metode sebar permukaan (*spread plate*) dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 48–72 jam.

Koloni khamir yang tumbuh diamati berdasarkan karakter morfologi, kemudian dipilih koloni yang berbeda dan dimurnikan dengan metode gores kuadran (*quadrant streak method*) pada media MEA hingga diperoleh isolat murni. Isolat murni selanjutnya disimpan pada media miring MEA untuk analisis lebih lanjut.

2.2 Seleksi dan Penentuan Aktivitas Amilolitik Khamir

Kemampuan amilolitik isolat khamir diuji menggunakan media MEA yang dimodifikasi dengan penambahan pati larut 1% (b/v). Setiap isolat diinokulasikan pada permukaan media dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 48 jam. Setelah inkubasi, media ditetesi larutan iodin yang terdiri atas 0,2% I₂ dan 2% KI dalam 100 mL akuades steril. Isolat yang mampu menghidrolisis pati ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni. Diameter koloni dan diameter zona bening diukur menggunakan jangka sorong digital.

Indeks amilolitik dihitung menggunakan rumus:

$$IA = \frac{D_z - D_k}{D_k}$$

Keterangan:

- IA = Indeks amilolitik
- D_z = Diameter total zona bening (mm)
- D_k = Diameter koloni khamir (mm)

Isolat dengan indeks amilolitik tertinggi dipilih untuk identifikasi fenotipik dan molekuler.

2.3 Identifikasi Fenotipik Khamir Amilolitik

Identifikasi fenotipik dilakukan berdasarkan karakter makroskopis dan mikroskopis isolat. Pengamatan makroskopis meliputi warna koloni, bentuk koloni, elevasi, tekstur permukaan, dan tipe tepi koloni. Pengamatan mikroskopis dilakukan menggunakan preparat basah yang diamati dengan mikroskop cahaya pada perbesaran 400× dan 1000× untuk menentukan bentuk sel, pola pertunasan (*budding*), serta keberadaan pseudohifa. Identifikasi awal spesies khamir dilakukan dengan membandingkan karakter fenotipik yang diperoleh dengan kunci identifikasi khamir yang tersedia dalam literatur taksonomi. Data hasil pengamatan dikonversi menjadi data biner, dimana nilai 1 menunjukkan karakter hadir dan nilai 0 menunjukkan karakter tidak hadir. Data biner kemudian dianalisis menggunakan metode hierarchical clustering dengan algoritma Ward dan jarak Euclidean. Hasil analisis divisualisasikan dalam bentuk heatmap dan dendrogram untuk menggambarkan tingkat kemiripan antar isolat.

2.4 Ekstraksi DNA Genom

DNA genom khamir diekstraksi dari kultur berumur 24–48 jam menggunakan metode ekstraksi DNA jamur atau kit ekstraksi DNA komersial sesuai petunjuk produsen. Kualitas dan

kuantitas DNA dievaluasi menggunakan spektrofotometer NanoDrop dan elektroforesis gel agarosa 1%.

2.5 Amplifikasi dan Sekuensing ITS rDNA

Amplifikasi daerah ITS rDNA dilakukan menggunakan primer universal ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') dan ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

Reaksi PCR dilakukan dalam volume total 25 µL yang terdiri atas master mix PCR, primer forward dan reverse, DNA template, serta akuades bebas nuklease. Program PCR meliputi denaturasi awal pada 95°C selama 5 menit, diikuti 35 siklus denaturasi pada 95°C selama 30 detik, annealing pada 55°C selama 30 detik, ekstensi pada 72°C selama 1 menit, dan ekstensi akhir pada 72°C selama 7 menit. Produk PCR diverifikasi melalui elektroforesis gel agarosa 1,5% dan selanjutnya dikirim untuk proses sekuensing.

2.6 Analisis Sekuen dan Evaluasi Misidentifikasi Fenotipik

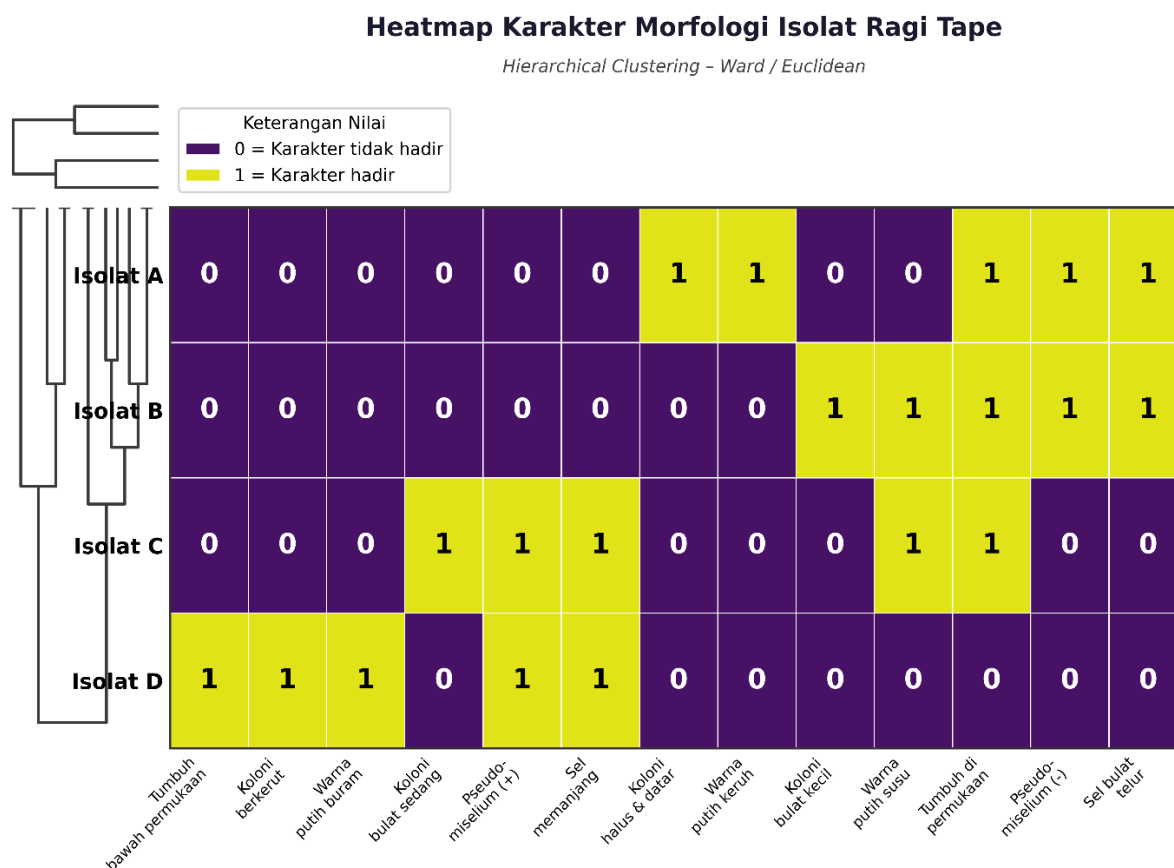
Hasil sekuensing diedit dan disejajarkan (*alignment*) menggunakan perangkat lunak bioinformatika. Identifikasi molekuler dilakukan dengan membandingkan sekuen ITS rDNA terhadap basis data National Center for Biotechnology Information menggunakan program BLASTn. Spesies dengan nilai kemiripan $\geq 99\%$ digunakan sebagai identitas molekuler isolat. Hasil identifikasi molekuler kemudian dibandingkan dengan hasil identifikasi fenotipik. Perbedaan identitas yang diperoleh dari kedua metode

tersebut dikategorikan sebagai kasus misidentifikasi fenotipik. Tingkat kesesuaian antara metode fenotipik dan molekuler dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Karakteristik Morfologi dan Aktivitas Amilolitik Khamir Asal Tape Singkong

Sebanyak sepuluh isolat khamir berhasil diisolasi dari tape singkong dan dikelompokkan menjadi empat kelompok berdasarkan kesamaan karakter morfologi, yaitu kelompok A, B, C, dan D (**Gambar 2**). Pengelompokan dilakukan berdasarkan karakter makroskopis dan mikroskopis yang meliputi bentuk koloni, warna koloni, karakter permukaan koloni, keberadaan pseudomiselium, dan bentuk sel. Kelompok A menunjukkan koloni berbentuk datar dengan permukaan halus berwarna putih keruh serta tidak membentuk pseudomiselium. Sel pada kelompok ini berbentuk bulat hingga oval. Kelompok B memiliki koloni berbentuk bulat kecil dengan permukaan halus berwarna putih susu, tidak membentuk pseudomiselium, dan memiliki bentuk sel bulat hingga oval. Kelompok C menunjukkan koloni berbentuk bulat berukuran sedang dengan warna putih krem, serta membentuk pseudomiselium dan sel memanjang menyerupai hifa. Sementara itu, kelompok D memiliki koloni bertekstur berkerut dengan warna putih buram, disertai pembentukan pseudomiselium dan sel memanjang.



Gambar 2. Heatmap karakter morfologi isolat ragi tape dengan *hierarchical clustering* menggunakan metode Ward berdasarkan jarak Euclidean.

Berdasarkan heatmap dan analisis *hierarchical clustering*, isolat C dan D menunjukkan tingkat kemiripan morfologi yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat A dan B. Kemiripan tersebut terutama ditunjukkan oleh keberadaan pseudomiselium dan bentuk sel memanjang. Sebaliknya, isolat A dan B memiliki karakteristik yang serupa berupa tidak terbentuknya pseudomiselium dan bentuk sel bulat telur. Hasil ini mengindikasikan adanya pengelompokan morfologi yang dapat mencerminkan perbedaan spesies atau strain khamir yang terdapat dalam ragi tape. Kemampuan amilolitik dari masing-masing kelompok isolat disajikan pada **Tabel 1**. Hasil pengujian menunjukkan isolat A tidak menghasilkan zona bening setelah penambahan larutan iodin, sehingga tidak memiliki aktivitas amilolitik. Sebaliknya, isolat B, C, dan D menghasilkan zona

bening menunjukkan kemampuan menghidrolisis pati melalui produksi enzim amilase.⁸

Tabel 1. Kemampuan relatif amilolitik khamir tape

	Diameter Diameter		Indeks Amilolitik
Isol	kolo	dari	
at	ni	k	
(mm)	(mm)	(mm)	
A	0	0	0
B	1.35	2.35	0,74
C	2.55	11.5	3.51
D	3.4	6,75	0,99

Aktivitas amilolitik tertinggi ditemukan pada isolat C dengan diameter zona bening sebesar 11,50 mm dan indeks amilolitik sebesar 3,51. Isolat D menghasilkan diameter zona bening

sebesar 6,75 mm dengan indeks amilolitik sebesar 0,99, sedangkan isolat B menunjukkan aktivitas amilolitik paling rendah dengan diameter zona bening sebesar 2,35 mm dan indeks amilolitik sebesar 0,74. Berdasarkan hasil tersebut, isolat C dan D dipilih untuk analisis molekuler lebih lanjut karena memiliki kemampuan amilolitik yang lebih tinggi dibandingkan isolat lainnya.

Besarnya zona bening yang terbentuk di sekitar koloni menunjukkan kemampuan isolat dalam menghasilkan enzim amilase ekstraseluler untuk menghidrolisis pati menjadi gula sederhana. Semakin besar zona bening yang dihasilkan, semakin tinggi aktivitas amilolitik isolat tersebut. Menurut Hostinová et al. (2010), diameter zona bening yang luas berkorelasi positif dengan kemampuan produksi enzim amilase oleh mikroorganisme. Pemilihan isolat kelompok C dan D untuk tahap identifikasi molekuler dilakukan karena kedua isolat tersebut berpotensi berperan penting dalam proses sakarifikasi pati selama fermentasi tape singkong. Identifikasi molekuler menggunakan sekuensing ITS rDNA selanjutnya dilakukan untuk mengonfirmasi identitas isolat dan mengevaluasi kemungkinan terjadinya misidentifikasi berdasarkan karakter fenotipik.

Penelitian telah melaporkan keberadaan khamir amilolitik pada produk pangan dan minuman fermentasi tradisional. Khamir yang diisolasi dari tape, *chhang*, *jau chhang*, *sura*, serta starter fermentasi seperti *phap* dan *deli* telah diidentifikasi sebagai *Saccharomycopsis fibuligera*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, dan *Pichia kudriavzevii* (Thakur et al., 2015). Spesies-spesies tersebut diketahui memiliki kemampuan menghasilkan enzim amilase yang berperan dalam hidrolisis pati selama proses fermentasi. *Saccharomycopsis fibuligera* merupakan salah satu khamir amilolitik yang banyak ditemukan pada fermentasi berbasis pati. Yalcin et al.

(2013) melaporkan bahwa isolat *S. fibuligera* mampu menghasilkan zona bening sebesar 16–18 mm pada media yang mengandung pati, menunjukkan aktivitas amilolitik yang tinggi. Selain itu, *Candida tropicalis* juga diketahui mampu menghasilkan glukamilase ketika ditumbuhkan pada media berpati. Eric et al. (2016) melaporkan bahwa *C. tropicalis* menghasilkan zona bening sekitar 2 mm pada media pati, sedangkan Umeh et al. (2014) menunjukkan bahwa spesies tersebut memiliki aktivitas amilase sebesar 5,82 $\mu\text{mol menit}^{-1}$ yang mengindikasikan kemampuan menghidrolisis pati secara efektif.

Pada penelitian ini, isolat kelompok C menghasilkan diameter zona bening sebesar 11,50 mm, sedangkan isolat kelompok D menghasilkan zona bening sebesar 6,75 mm. Nilai tersebut menunjukkan bahwa kedua isolat memiliki kemampuan amilolitik yang cukup tinggi dan berpotensi berperan dalam proses sakarifikasi pati selama fermentasi tape singkong. Namun demikian, kemiripan kemampuan amilolitik antarspesies khamir tidak dapat digunakan sebagai dasar identifikasi spesies secara akurat. Oleh karena itu, diperlukan analisis molekuler menggunakan sekuensing ITS rDNA untuk mengonfirmasi identitas isolat dan mengevaluasi kemungkinan terjadinya misidentifikasi berdasarkan karakter fenotipik.

3.2 Profil Fermentasi dan Identifikasi Fenotipik Khamir Asal Tape Singkong

Identifikasi fenotipik isolat khamir dilakukan berdasarkan profil asimilasi karbon menggunakan kit API 20C AUX. Hasil pengujian menunjukkan bahwa masing-masing kelompok isolat memiliki pola asimilasi karbon yang berbeda sehingga menghasilkan dugaan identitas spesies yang berbeda pula (**Tabel 2**).

Isolat A diidentifikasi sebagai *Candida guilliermondii* dengan tingkat

kemiripan sebesar 50,0%. Isolat ini mampu mengasimilasi berbagai sumber karbon, antara lain D-glukosa, gliserol, kalsium 2-keto-glukonat, L-arabinosa, D-xilosa, adonitol, xylitol, D-galaktosa, inositol, D-sorbitol, metil- α -D-glukopiranosida, N-asetil-glukosamin, D-seliobiosa, D-maltosa, D-sakarosa, D-trehalosa, D-melezitosa, dan D-rafinosa.

Isolat B diidentifikasi sebagai *Trichosporon mucoides* dengan tingkat kemiripan sebesar 82,9%. Isolat ini mampu mengasimilasi D-glukosa, gliserol, kalsium 2-keto-glukonat, D-xilosa, adonitol, xylitol, D-galaktosa, inositol, D-sorbitol, metil- α -D-glukopiranosida, N-asetil-glukosamin, D-seliobiosa, D-laktosa, D-maltosa, D-sakarosa, D-trehalosa, D-melezitosa, dan D-rafinosa.

Berdasarkan hasil API 20C AUX, isolat C diidentifikasi sebagai *Cryptococcus humicola* dengan tingkat kemiripan sebesar 77,0%. Isolat ini mampu mengasimilasi D-glukosa, gliserol, kalsium

2-keto-glukonat, L-arabinosa, adonitol, xylitol, inositol, D-sorbitol, metil- α -D-glukopiranosida, N-asetil-glukosamin, D-seliobiosa, D-laktosa, D-maltosa, D-sakarosa, D-trehalosa, D-melezitosa, dan D-rafinosa.

Sementara itu, isolat kelompok D diidentifikasi sebagai *Candida utilis* dengan tingkat kemiripan tertinggi, yaitu 99,4%. Isolat ini mampu mengasimilasi D-glukosa, gliserol, D-seliobiosa, D-maltosa, D-sakarosa, D-trehalosa, dan D-rafinosa. Hasil identifikasi fenotipik menunjukkan bahwa tingkat kemiripan antar isolat bervariasi, yaitu berkisar antara 50,0% hingga 99,4%. Rendahnya tingkat kemiripan pada beberapa isolat, khususnya A dan C, menunjukkan adanya ketidakpastian dalam identifikasi spesies berdasarkan karakter fisiologis dan kemampuan asimilasi karbon.

Tabel.2.. Profil indeks dari asimilasi karbon oleh ragi tapai

Identifikasi			R	M	T	S	M	L	C	N	M	S	SAY	G	X	A	X	A	2	G	G	
Identitas	Isolasi	sertifikasi	A	L	R	A	A	A	E	A	D	HAI	N	A	L	D	Y	R	K	L	L	HAI
		(%)	F	Z	E	C	L	C	L	G	G	R	HAI	L	T	HAI	L	A	G	Y	U	H
<i>C. guilliermondii</i>	A	50.0	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	---
<i>T. mucoides</i>	B	82,9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	---
<i>Cr. humicola</i>	C	77.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>C. utilis</i>	D	99,4	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

+ = carbon assimilated (turbid), - = carbon not assimilated (non-turbid), GLU = D-glucose ; Gly = glycerol; 2KG= calcium 2-keto-gluconate; ARA = L-arabinose; XYL = D-Xylose; ADO = adonitol; XLT = xylitol; GAL = D-galactose; INO = inositol; SOR = D-sorbitol, MDG = methyl- α -D-glucopyranoside; NAG = N-acetyl-glucosamine; CEL = D-cellobiose; LAC = D-lactose (bovine origin); MAL = D-maltose; SAC = D-saccharose (sucrose); TRE = D-trehalose; MLZ = D-melezitose; RAF = D-raffinose, H/PH = hyphae/pseudohyphae

Pada penelitian ini, isolat kelompok C dan D yang memiliki aktivitas amilolitik tertinggi dipilih untuk analisis molekuler menggunakan sekuensing ITS rDNA. Analisis tersebut dilakukan untuk memverifikasi hasil identifikasi fenotipik

dan mengevaluasi kemungkinan terjadinya misidentifikasi spesies berdasarkan metode konvensional. Karakteristik fenotipik yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan kesesuaian dengan beberapa laporan sebelumnya mengenai spesies khamir yang

teridentifikasi melalui API 20C AUX. *Candida guilliermondii* umumnya memiliki sel berbentuk oval hingga memanjang, dapat membentuk filamen pendek, namun tidak menunjukkan pembentukan pseudomiselium yang jelas (Castanheira et al., 2013). Berdasarkan karakterisasi menggunakan kit identifikasi khamir, spesies ini dilaporkan mampu mengasimilasi berbagai sumber karbon, seperti melibiosa, sukrosa, galaktosa, selobiosa, xilosa, dulcitol, dan rafinosa (Ogba et al., 2013). Selain itu, isolat *C. guilliermondii* yang diisolasi dari fermentasi pati pada produksi tradisional

Menurut Takashima et al. (2001), spesies ini memiliki karakteristik fisiologis berupa ketidakmampuan mengasimilasi rafinosa, heksadekana, butana-2,3-diol, dan natrium nitrat sebagai sumber nutrisi. Namun demikian, beberapa karakter fisiologis *Cryptococcus* diketahui tumpang tindih dengan genus khamir lainnya sehingga identifikasi berdasarkan uji asimilasi karbon sering kali memerlukan konfirmasi molekuler.

Sementara itu, isolat kelompok D diidentifikasi sebagai *Candida utilis* dengan tingkat kemiripan tertinggi (99,4%). Spesies ini diketahui mampu mengasimilasi D-glukosa, gliserol, metil- α -D-glukopiranosida, D-maltosa, D-sakarosa, D-melezitosa, dan D-rafinosa, serta dapat memanfaatkan nitrat sebagai sumber nitrogen (Tomita et al., 2012). Ouedraogo et al. (2012) melaporkan bahwa isolat *C. utilis* NOY1 yang berasal dari limbah kentang menunjukkan aktivitas amilolitik yang tinggi dengan diameter zona bening mencapai 24 mm dan aktivitas enzim sebesar 1.248 $\mu\text{mol menit}^{-1}$. Karakteristik tersebut menunjukkan bahwa *C. utilis* berpotensi berperan dalam proses degradasi pati pada berbagai produk fermentasi.

Hasil penelitian Kofli et al. (2010) juga menunjukkan bahwa identifikasi khamir pada tape menggunakan API 20C

gari di Nigeria diketahui mampu mengasimilasi D-glukosa, gliserol, kalsium 2-keto-glukonat, L-arabinosa, D-xilosa, adonitol, xylitol, D-galaktosa, D-sorbitol, metil- α -D-glukopiranosida, dan N-asetil-glukosamin. Hasil identifikasi fenotipik juga menunjukkan bahwa isolat kelompok C memiliki kemiripan dengan *Cryptococcus humicola* NAG = N-acetyl-glucosamine; CEL = D-celliobiose; LAC = D-lactose (bovine origin); MAL = D-maltose; SAC = D-saccharose (sucrose); TRE = D-trehalose; MLZ = D-melezitose; RAF = D-raffinose, H/PH = hyphae/pseudohypae

AUX menghasilkan beberapa spesies, antara lain *Cryptococcus humicola*, *Candida guilliermondii*, dan *Trichosporon mucoides*. Temuan tersebut sejalan dengan hasil identifikasi fenotipik yang diperoleh pada penelitian ini. Namun demikian, identifikasi berbasis karakter fisiologis dan profil asimilasi karbon memiliki keterbatasan karena beberapa spesies khamir dapat menunjukkan pola metabolisme yang serupa. Akibatnya, spesies yang berbeda dapat teridentifikasi sebagai spesies yang sama atau sebaliknya.

Oleh karena itu, untuk memastikan ketepatan identifikasi dan mengevaluasi kemungkinan terjadinya misidentifikasi fenotipik, isolat amilolitik terpilih selanjutnya dianalisis menggunakan sekuensing ITS rDNA. Pendekatan molekuler ini digunakan sebagai metode konfirmasi karena wilayah ITS merupakan penanda genetik yang memiliki tingkat resolusi tinggi dalam identifikasi khamir pada tingkat spesies.

3.3 Identifikasi Molekuler

Ekstraksi dan Pengukuran gDNA

Isolat khamir ditumbuhkan pada medium MEA (Malt Extract Agar) untuk keperluan ekstraksi gDNA (DNA genomik). Konsentrasi dan kemurnian gDNA diukur menggunakan NanoDrop, dengan hasil

pengukuran yang tersaji pada **Tabel 3** Amplifikasi PCR.

Tabel 3. Pengukuran Konsentrasi DNA Menggunakan NanoDrop

A260/230	A260/280	Konsentrasi (ng/μL)	Volume (mL)	Isolat
1,16	1,64	326,5	30	C
1,13	1,62	212	30	D

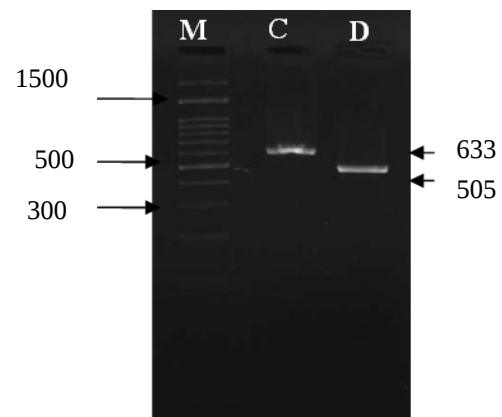
Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan metode Reaksi Rantai Polimerase-rep (rep-PCR) dengan pasangan primer ITS1 dan ITS4 yang diperoleh dari PT Genetika Science Indonesia. Reaksi amplifikasi dilaksanakan dalam total volume 25 μL. Produk PCR divisualisasikan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1% (b/v) dalam buffer 0,5× TBE, sebagaimana tampak pada **Gambar 2**. Pemurnian produk PCR dilakukan menggunakan kit DNA Clean & Concentrator™-5. Pengukuran konsentrasi DNA pada panjang gelombang A260/280 menunjukkan nilai 1,64 untuk isolat kelompok C dan 1,62 untuk isolat kelompok D. Hasil pengukuran kuantitas DNA isolat kelompok C dan D menunjukkan nilai absorbansi (A260/280) masing-masing sebesar 1,64 dan 1,62, sedangkan nilai absorbansi (A260/230) isolat C dan D secara berurutan adalah 1,16 dan 1,13. Hal ini mengindikasikan bahwa kualitas DNA isolat kelompok C dan D cukup baik dan dapat digunakan untuk tahap amplifikasi PCR. Nilai rasio antara absorbansi DNA dan protein dalam suatu sampel yang menunjukkan kualitas DNA yang baik adalah 1,8–2,0.

Hasil Elektroforesis dan Kemurnian DNA

Hasil elektroforesis produk PCR ukuran fragmen DNA isolat kelompok C adalah 633 bp, sedangkan ukuran fragmen DNA isolat kelompok D adalah 505 bp.

Gambar 2. Produk PCR divisualisasikan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1% (b/v)

Analisis BLAST-N dan Pohon



Filogenetik

Analisis NCBI BLAST hasilnya ditunjukkan pada **Tabel 4** menunjukkan bahwa urutan basa isolat kelompok C dan kelompok D masing-masing memiliki kemiripan dengan *Saccharomycopsis fibuligera* (identitas 100%, fragmen 633 bp) dan *Candida tropicalis* (identitas 100%, fragmen 505 bp), keduanya membentuk cabang baru dalam pohon filogenetik.

Tabel 4. Hasil BLAST-N Gen 5.8S Isolat C dan Kelompok D

Akses	Spesies	Skor Maks	Skor Total	Cakupan Kueri	e-Value	Isolat
KX37360.1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	1142	1142	100%	0	C
KY102470.1	<i>Candida tropicalis</i>	911	911	100%	0	D

Hasil analisis sekuen ITS rDNA menunjukkan bahwa isolat kelompok C memiliki tingkat identitas 100% dengan *Saccharomycopsis fibuligera*, sedangkan isolat kelompok D memiliki tingkat identitas 100% dengan *Candida tropicalis*. Kedua spesies tersebut merupakan khamir yang umum ditemukan pada berbagai produk fermentasi berbasis pati dan berperan penting dalam proses sakarifikasi maupun fermentasi.

Karakteristik *S. fibuligera* (Isolat C)

Saccharomycopsis fibuligera merupakan khamir amilolitik yang banyak ditemukan pada produk fermentasi tradisional di Asia. Spesies ini telah dilaporkan terdapat pada fermentasi beras ketan merah (*Hong Qu*) di Tiongkok (Chiang et al., 2006) serta pada berbagai minuman fermentasi tradisional berbasis sereal dan pati (Thakur et al., 2015). Kemampuan amilolitik *S. fibuligera* menjadikannya salah satu mikroorganisme utama dalam proses degradasi pati selama fermentasi. Saelim et al. (2008) melaporkan bahwa isolat *S. fibuligera* YCY1 yang diisolasi dari starter fermentasi Loog-Pang mampu menghasilkan zona bening sebesar 8,0 mm pada media berpati. Isolat tersebut diketahui mampu mengasimilasi beberapa sumber karbon utama, seperti D-glukosa, D-maltosa, D-sakarosa, D-seliobiosa, dan gliserol. Secara morfologi, *S. fibuligera* memiliki koloni berwarna putih hingga abu-abu, sel berbentuk oval yang berkembang biak secara bertunas, serta mampu tumbuh pada suhu 25–37°C.

Karakteristik tersebut sejalan dengan hasil penelitian ini, di mana isolat kelompok C menunjukkan aktivitas amilolitik tertinggi dengan diameter zona bening mencapai 11,50 mm. Kemampuan tersebut mendukung hasil identifikasi molekuler bahwa isolat kelompok C merupakan *S. fibuligera*, yang dikenal sebagai salah satu khamir amilolitik utama pada fermentasi berbasis pati.

Karakteristik *C. tropicalis* (Isolat D)

Sementara itu, isolat kelompok D teridentifikasi sebagai *Candida tropicalis*. Spesies ini telah banyak dilaporkan ditemukan pada berbagai produk fermentasi tradisional, termasuk minuman fermentasi singkong “taruba” dari Brasil (Ramos et al., 2015), starter fermentasi tradisional di India (Sha et al., 2017), serta produk daging fermentasi Turki yang dikenal sebagai “sucuk” (Ozturk et al., 2014). Selain berperan dalam fermentasi, *C. tropicalis* juga diketahui memiliki

potensi sebagai agen probiotik dan penghasil biosurfaktan.

Secara fisiologis, *C. tropicalis* mampu mengasimilasi berbagai jenis gula sederhana seperti glukosa, galaktosa, maltosa, sukrosa, dekstrosa, dan trehalosa (Arekar et al., 2015; Umeh et al., 2014). Spesies ini juga diketahui mampu menghasilkan enzim amilase dan membentuk pseudomiselium maupun hifa sejati (Lackey et al., 2013). Karakter morfologi *C. tropicalis* umumnya berupa koloni berwarna putih hingga abu-putih dengan permukaan halus, sel berbentuk oval, serta reproduksi secara pertunasan (Syal et al., 2013; Umeh et al., 2014). Karakteristik tersebut sesuai dengan hasil pengamatan morfologi pada isolat kelompok D yang menunjukkan adanya pseudomiselium dan sel memanjang.

Ukuran fragmen ITS rDNA yang diperoleh pada penelitian ini juga mendukung hasil identifikasi molekuler. Fragmen ITS isolat kelompok D berukuran sekitar 505 bp, mendekati ukuran produk PCR ITS yang dilaporkan untuk *C. tropicalis*, yaitu sekitar 530 bp (Corbaci et al., 2012). Selain itu, Schwan et al. (2007) melaporkan bahwa daerah D1/D2 rDNA *C. tropicalis* memiliki panjang sekitar 594 bp, yang menunjukkan bahwa ukuran fragmen yang diperoleh masih berada dalam kisaran yang umum ditemukan pada spesies tersebut.

Temuan ini menunjukkan bahwa hasil identifikasi molekuler berbeda dengan hasil identifikasi fenotipik yang diperoleh menggunakan API 20C AUX. Isolat kelompok C yang sebelumnya diidentifikasi sebagai *Cryptococcus humicola* ternyata memiliki identitas molekuler sebagai *Saccharomycopsis fibuligera*, sedangkan isolat kelompok D yang teridentifikasi sebagai *Candida utilis* berdasarkan karakter fenotipik terbukti merupakan *Candida tropicalis*. Perbedaan tersebut mengindikasikan adanya keterbatasan metode identifikasi berbasis karakter fisiologis dan profil asimilasi

karbon, terutama ketika digunakan untuk membedakan spesies khamir yang memiliki karakter metabolik serupa.

3.4 Misidentifikasi Fenotipik Khamir Amilolitik yang Terungkap Melalui Sekuensing ITS rDNA

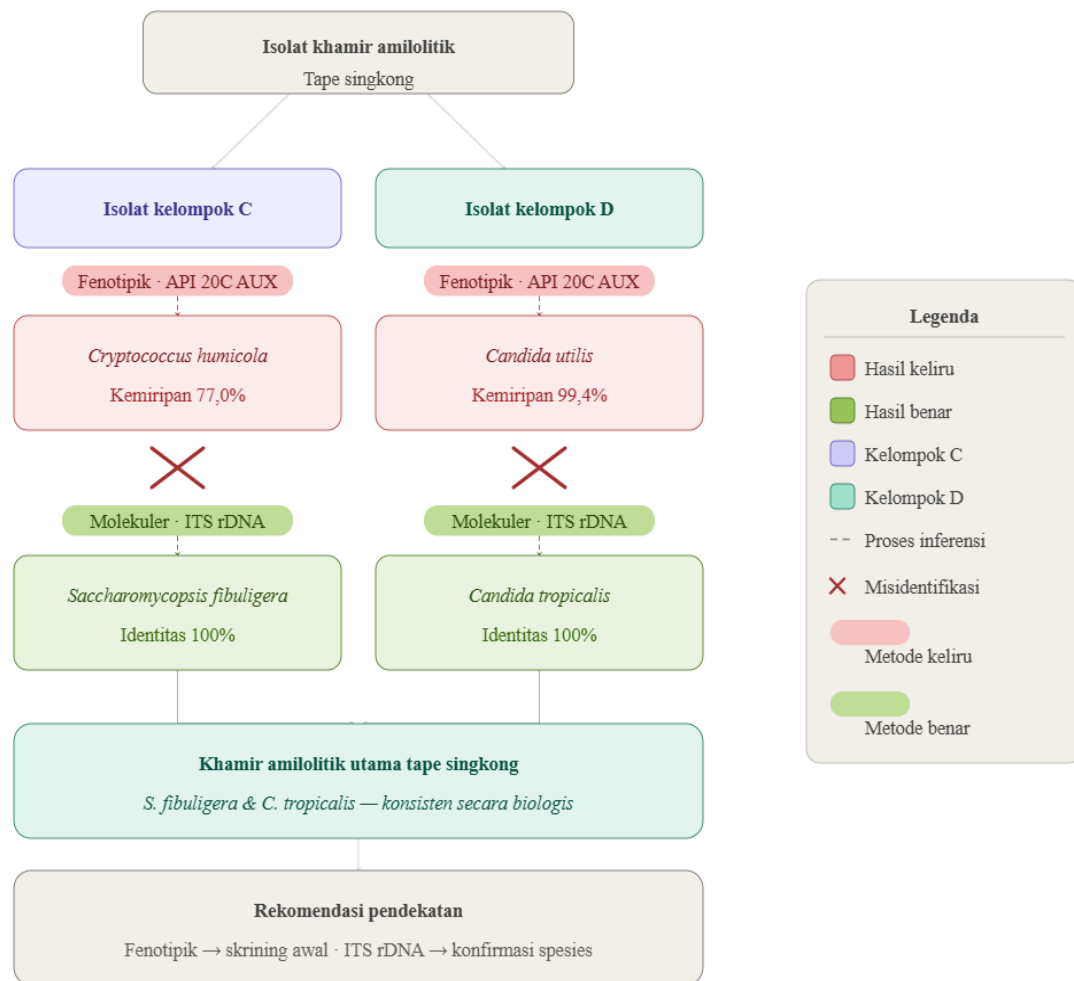
Sebagaimana ditunjukkan pada **Gambar 3**, identifikasi fenotipik memberikan hasil yang berbeda dengan identifikasi molekuler ITS rDNA, sehingga menegaskan pentingnya konfirmasi molekuler dalam penentuan spesies khamir amilolitik tape singkong. Identifikasi fenotipik menggunakan kit API 20C AUX menunjukkan bahwa isolat kelompok C memiliki kemiripan tertinggi dengan *Cryptococcus humicola* (77,0%), sedangkan isolat kelompok D teridentifikasi sebagai *Candida utilis* dengan tingkat kemiripan 99,4%. Namun, hasil identifikasi molekuler berdasarkan sekuensing daerah ITS rDNA menunjukkan hasil yang berbeda. Analisis BLAST terhadap basis data *National Center for Biotechnology Information* menunjukkan bahwa isolat kelompok C memiliki tingkat identitas 100% dengan *Saccharomycopsis fibuligera*, sedangkan isolat kelompok D memiliki tingkat identitas 100% dengan *Candida tropicalis*.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa identifikasi fenotipik tidak selalu menghasilkan identitas spesies yang akurat. Pada isolat kelompok C, perbedaan identifikasi yang cukup besar antara *Cryptococcus humicola* dan *Saccharomycopsis fibuligera* kemungkinan disebabkan oleh adanya kesamaan pola asimilasi karbon yang digunakan sebagai dasar identifikasi API 20C AUX. Meskipun kedua spesies berasal dari kelompok taksonomi yang berbeda, beberapa karakter fisiologis yang serupa dapat menghasilkan profil metabolik yang tumpang tindih sehingga menyebabkan kesalahan interpretasi. Kasus serupa juga ditemukan pada isolat kelompok D. Meskipun API 20C AUX menunjukkan tingkat kemiripan yang sangat tinggi (99,4%) terhadap

Candida utilis, hasil sekuensing ITS rDNA mengidentifikasi isolat tersebut sebagai *Candida tropicalis*. Temuan ini menunjukkan bahwa nilai kemiripan yang tinggi pada metode fenotipik tidak selalu menjamin ketepatan identifikasi spesies. Beberapa spesies dalam genus *Candida* diketahui memiliki pola asimilasi karbon yang sangat mirip sehingga sulit dibedakan hanya berdasarkan karakter fisiologis.

Perbedaan hasil identifikasi tersebut menunjukkan keterbatasan pendekatan fenotipik dalam identifikasi khamir. Karakter morfologi dan fisiologi mikroorganisme dapat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, komposisi media, umur kultur, maupun variasi antarstrain dalam satu spesies. Selain itu, basis data identifikasi fenotipik yang digunakan pada kit komersial sering kali tidak mencakup seluruh variasi genetik yang terdapat pada isolat lingkungan, khususnya khamir yang berasal dari pangan fermentasi tradisional. Sebaliknya, identifikasi molekuler menggunakan daerah ITS rDNA memberikan tingkat resolusi yang lebih tinggi karena wilayah ini memiliki variasi sekuen yang cukup besar antarspesies, tetapi relatif konservatif dalam satu spesies.

Temuan pada penelitian ini menunjukkan bahwa isolat khamir amilolitik utama pada tape singkong bukanlah *Cryptococcus humicola* dan *Candida utilis* sebagaimana ditunjukkan oleh identifikasi fenotipik, melainkan *Saccharomycopsis fibuligera* dan *Candida tropicalis* berdasarkan analisis sekuen ITS rDNA. Kedua spesies tersebut diketahui memiliki kemampuan amilolitik yang baik dan sering ditemukan pada berbagai produk fermentasi berbasis pati sehingga secara biologis lebih konsisten dengan aktivitas amilolitik yang diamati pada penelitian ini.



Gambar. 3. Ilustrasi Misidentifikasi Fenotipik Khamir Amilolitik

Hasil penelitian ini menegaskan bahwa identifikasi fenotipik sebaiknya digunakan sebagai metode skrining awal, sedangkan konfirmasi identitas spesies perlu dilakukan menggunakan pendekatan molekuler.

KESIMPULAN

Penelitian ini membuktikan bahwa identifikasi fenotipik menggunakan kit API 20C AUX tidak selalu menghasilkan identitas spesies yang akurat pada khamir amilolitik dari tape singkong. Isolat kelompok C yang semula teridentifikasi sebagai *Cryptococcus humicola* (kemiripan 77,0%) dan isolat kelompok D yang teridentifikasi sebagai *Candida utilis* (kemiripan 99,4%) terbukti mengalami misidentifikasi setelah dikonfirmasi melalui sekuensing ITS rDNA, dengan hasil masing-

masing menunjukkan tingkat identitas 100% terhadap *Saccharomycopsis fibuligera* dan *Candida tropicalis*. Ketidakkuratan identifikasi fenotipik tersebut disebabkan oleh tumpang tindihnya profil asimilasi karbon antarspesies serta keterbatasan basis data kit komersial dalam mencakup variasi genetik isolat lingkungan dari pangan fermentasi tradisional. Oleh karena itu, pendekatan molekuler berbasis sekuensing ITS rDNA perlu dijadikan metode konfirmasi standar dalam identifikasi khamir, khususnya dalam penelitian biodiversitas mikroorganisme dan pengembangan kultur *starter* untuk fermentasi pangan tradisional Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kemenristekdikti yang telah mendanai penelitian ini melalui Program

Penelitian Strategis Nasional tahun anggaran 2016/2017.

DAFTAR PUSTAKA

- Arekar, C., & Lele, S. S. (2015). Isolation and Characterization of Yeast From Anthocyanin Rich Tropical Fruits As Wine Starter Culture. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 1(2014), 400019. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2015.5.2.146-154>
- Castanheira, M., Woosley, L. N., Diekema, D. J., Jones, R. N., & Pfaller, M. A. (2013). *Candida guilliermondii* and Other Species of *Candida* Misidentified as *Candida famata*: Assessment by Vitek 2, DNA Sequencing Analysis, and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Two Global Antifungal Surveillance Pro. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(1), 117–124. <https://doi.org/10.1128/JCM.01686-12>
- Chen, L., Chi, Z.-M., Chi, Z., & Li, M. (2010). Amylase Production by *Saccharomycopsis fibuligera* A11 in Solid-State Fermentation for Hydrolysis of Cassava Starch. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(1), 252–263. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8744-3>
- Chiang, Y. W., & Ismail, M. (2006). Microbial Diversity and Proximate Composition of Tapai , A Sabah ' s Fermented Beverage. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2(1), 1–6.
- Corbaci, C., Ucar, F. B., & Yalcin, H. T. (2012). Isolation and characterization of yeasts associated with Turkish-style homemade dairy products and their potential as starter cultures. *African Journal of Microbiology Research*, 6(3), 534–542. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.895>
- Eric, Y., Mireille, A. W. A., Francine, A. M. D., & Marcellin, D. (2016). Coculture of *Saccharomyces Cerevisiae* C8-5 and *Candida Tropicalis* C0-7 use for amylase production on Starch Products Medium. *IOSR Journal of Engineering*, 6(10), 41–48. Retrieved from http://www.iosrjen.org/Papers/vol6_issue10/Version2/E0610024148.pdf
- Hostinová, E., Janeček, Š., & Gašperík, J. (2010). Gene Sequence, Bioinformatics and Enzymatic Characterization of α -Amylase from *Saccharomycopsis fibuligera* KZ. *The Protein Journal*, 29(5), 355,364. <https://doi.org/10.1007/s10930-010-9260-6>
- Kofli, N. T., & Dayaon, S. H. M. (2010). Identification of Microorganism from Ragi for Bioethanol Production by API Kit. *Journal of Applied Sciences*, 10(21), 2751–2753. <https://doi.org/10.3923/jas.2010.2751.2753>
- Ogba, M., Abia-Bassey, L., Epoke, J., Mandor, B., & Iwatt, G. (2013). Characterization of *Candida species* isolated from cases of lower respiratory tract infection. *World Journal of AIDS*, 3(September), 201–206.
- Ouedraogo, N., Savadogo, A., Zongo, C., Somda, K. M. & Traore, A. S. (2012). High performance amylolytic yeast strains isolation and identification for valorization of potatoes waste available in Burkina Faso. *International Food Research Journal*, 19(4), 1463–1469.
- Ozturk, I., & Sagdic, O. (2014). Biodiversity of Yeast Mycobiota in “Sucuk,” a Traditional Turkish Fermented Dry Sausage: Phenotypic and Genotypic Identification, Functional and Technological Properties. *Journal of Food Science*, 79(11), 2315–2322. <https://doi.org/10.1111/1750->

- 3841.12662
- Priji, P., Unni, K. N., Sajith, S., & Benjamin, S. (2013). *Candida tropicalis* BPU1, a novel isolate from the rumen of the Malabari goat, is a dual producer of biosurfactant and polyhydroxybutyrate. *Yeast*, 30(1), 103–110. <https://doi.org/10.1002/yea>
- Ramos, C. L., Sousa, E. S. O. de, Ribeiro, J., Almeida, T. M. M., Santos, C. C. A. do A., Abegg, M. A., & Schwan, R. F. (2015). Microbiological and chemical characteristics of tarubá, an indigenous beverage produced from solid cassava fermentation. *Food Microbiology*, 49(1), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.02.005>
- Saelim, K., Dissara, Y., & H-kittikun, A. (2008). Saccharification of cassava starch by *Saccharomycopsis fibuligera* YCY1 isolated from Loog-Pang (rice cake starter). *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 30(April), 65–71.
- Schwan, R. F., Almeida, E. G., Souza-dias, M. A. G., & Jespersen, L. (2007). Yeast diversity in rice - cassava fermentations produced by the indigenous Tapirape people of Brazil. *FEMS Yeast Research*, 7(1), 966–972. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00241.x>
- Sha, S. P., Anupama, A., Pradhan, P., Prasad, G. S., & Tamang, J. P. (2017). Identification of Yeasts by PCR-mediated DGGE in Marcha, an Ethnic Amylolytic Starter of India. *Journal of Ethnic Foods*. <https://doi.org/10.1016/j.jef.2016.11.009>
- Syal, P., & Vohra, A. (2013). Probiotic potential of yeasts isolated from traditional Indian fermented foods. *International Journal of Microbiology Research*, 5(2), 390–398. <https://doi.org/DOI> : <http://dx.doi.org/10.9735/0975-5276.5.2.390-398>
- Takashima, M., Sugita, T., Shinoda, T., & Nakase, T. (2001). Reclassification of the *Cryptococcus humicola* complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(6), 2199–2210. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2199>
- Tomita, Y., Ikeo, K., Tamakawa, H., Gojobori, T., & Ikushima, S. (2012). Genome and Transcriptome Analysis of the Food-Yeast *Candida utilis*. *PLoS ONE*, 7(5), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037226>
- Umeh, S.O. Odibo, F. J. (2014). Amylase activity as affected by different retting methods of cassava tubers. *International Journal of Agricultural Policy and Research*, 2(July), 267–272. Retrieved from <http://journalissues.org/wp-content/u>
- Yalcin, T. H., & Corbaci, C. (2013). Isolation and Characterization of Amylase Producing Yeasts and Improvement of Amylase Production. *Turkish Journal of Biochemistry*, 38(1), 101–108. <https://doi.org/10.5505/tjb.2013.95866>