

KARAKTERISTIK MORFOLOGI, BIOKIMIA, DAN MOLEKULER ISOLAT KHAMIR IK-2 HASIL ISOLASI DARI JUS BUAH SIRSAK (*Annona muricata* L.)

Vivi Suryaningsih¹, Rejeki Siti Ferniah¹, Endang Kusdiyantini¹
Laboratorium Bioteknologi

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang
Jalan Prof. Soedarto, SH, Semarang, 50275, Telp: (024)7474754; Fax (024) 76480923

Corresponding author : ferniah_mikro@yahoo.com

Abstract

Yeast was found in foods that contain lots of sugar as fruits. Yeast utilizes simple sugars in food to gain energy. Yeast has a role in the natural fermentation of the fruit that resulting of decay, discoloration, and cause the fruit not durable. The purpose of this research were to isolate the *yeast* from the soursop fruit and to identify the *yeast* in morphology, biochemistry, and molecular test based on Internal Transcribed Spacer (ITS). Isolation of *yeast* was performed by growing on medium PDA and chloramphenicol. Identification was done through biochemical test by looking at the capabilities in the fermentation of carbohydrate and the abilities to grow on a medium to high osmotic pressure. Molecular identification was done using Internal Transcribed Spacer (ITS) region. The result showed that isolate IK-2 *yeast* from the soursop fruit juice had a distinctive form round to oval, prominent elevation, the colour creamy white, form a buds, able to ferment glucose and sucrose, but not able to ferment lactose, as well as being able to grow on media with glucose level 50 %. Molecular analysis of the ITS region using ITS1 and ITS4 primers, and phylogenetic analysis using Neighbor Joining. The result of the Basic Local Alignment Tools (BLAST) showed that the isolate had 95% homology with *Candida tropicalis*.

Key Words : *Yeast*, *Soursop* (*Annona muricata* L.), *Internal Transcribed Spacer* (ITS)

Abstrak

Khamir seringkali ditemukan pada makanan yang banyak mengandung gula seperti pada buah-buahan. Khamir memanfaatkan gula sederhana pada makanan untuk mendapatkan energi. Khamir memiliki peran dalam fermentasi buah secara alami yang mengakibatkan terjadinya pembusukan, perubahan warna, dan menyebabkan buah menjadi tidak tahan lama. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi khamir dari buah sirsak dan mengidentifikasi khamir secara morfologi, uji biokimia, dan molekuler berdasarkan daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS). Isolasi khamir dilakukan dengan menumbuhkan pada medium PDA dan kloramfenikol. Identifikasi dilakukan melalui uji biokimia dan Identifikasi molekuler menggunakan daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS). Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat khamir IK-2 yang diisolasi dari jus buah sirsak memiliki bentuk oval, elevasi menonjol, berwarna putih agak krem, pembentukan tunas, mampu memfermentasi glukosa dan sukrosa, tetapi tidak pada laktosa, serta mampu tumbuh pada media dengan kadar glukosa 50%. Analisis molekuler daerah ITS menggunakan primer ITS1 dan ITS4, dan analisis filogenetik menggunakan *Neighbor Joining*. Hasil *Basic Local Alignment Tools* (BLAST) menunjukkan homologi 95% dengan *Candida tropicalis*.

Kata kunci : Khamir, Sirsak (*Annona muricata* L.), *Internal Transcribed Spacer* (ITS)

PENDAHULUAN

Khamir merupakan mikroorganisme dari golongan fungi yang termasuk uniseluler, biasanya hidup sebagai saprofit maupun parasit. (Widiastutik, 2013). Khamir banyak ditemukan di berbagai tempat terutama pada tumbuhan seperti buah-buahan, biji-bijian dan makanan yang mengandung gula. Khamir juga ditemukan di tanah, udara dan kulit binatang. (Mahreni, 2011).

Khamir memiliki berbagai peran penting dalam kehidupan. Beberapa khamir dapat dimanfaatkan dalam berbagai bidang industri, terutama dalam bidang fermentasi makanan maupun minuman. Beberapa produk yang dihasilkan sudah dikomersilkan dan memiliki potensi untuk perkembangan bioteknologi.

Khamir biasa didapatkan dengan cara isolasi dari berbagai medium, seperti pada buah-buahan. Salah satu buah yang dapat dijadikan sebagai sumber untuk diisolasi adalah sirsak dalam bentuk jus sirsak. Isolasi dilakukan untuk memperoleh spesies khamir dari jus buah sirsak, yang kemudian akan diidentifikasi terlebih dahulu secara makroskopis, mikroskopis, uji biokimia serta molekulernya. Identifikasi secara makroskopis dapat diamati dari morfologi koloni, meliputi bentuk, tekstur, warna, permukaan, dan elevasi. Secara mikroskopis dapat diamati sampai pada tingkat selnya menggunakan mikroskop meliputi bentuk, ukuran, dan pembentukan budding. Uji biokimia dilakukan dengan uji fermentasi karbohidrat dan uji pertumbuhan pada konsentrasi gula 50%, sedangkan secara molekuler dengan cara melihat genomnya berdasarkan urutan basa DNA daerah Internal *Transcribed Spacer (ITS)* dan melihat hubungan kekerabatan dengan pohon filogenetik. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi khamir dari jus sirsak dan mengidentifikasi khamir secara morfologi, uji biokimia, serta molekuler berdasarkan daerah ITS.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, FSM Undip dan Laboratorium Bacteriology ICT Undip. Waktu pelaksanaan penelitian yaitu Maret hingga Agustus 2017.

Bahan. Jus buah sirsak (*Annona muricata* L.), alkohol 70%, PDA (*Potato Dextrose Agar*), PDB (*Potato Dextrose Broth*), Kloramfenikol, *Methylene blue*, glukosa, sukrosa, dan laktosa, *yeast extract*, pepton, *phenol red*, aquades, agar, ddH₂O, Primer ITS1 dan ITS4, My Taq, 5x Buffer PCR, Marker 1kb, Agarosa, TAE (Tris-CL, asam asetat glasial dan EDTA), *staining dye*, *loading buffer*, *chelex* 20%.

Alat. blender, botol sampel, pisau, bunsen, cawan petri, pipet tetes, saringan teh, tabung reaksi, tabung Durham, rak tabung reaksi, *hotplate*, erlenmeyer, *Ose* bulat, *spreader*, *wrapping plastic*, aluminium foil, gelas benda dan kaca penutup, fotomikrograf, *sentrifuge*, karet gelang, plastik putih, *vortex*, mikropipet, *microtube*, spektrofotometer, elektroforesis, *Geldoc*, gelas ukur, label, gunting, autoklaf, *freezer*, timbangan digital, *thermal cyclor*.

Preparasi Sampel

Dua buah sirsak yang matang dan segar dengan berat rata-rata 300 – 500 g, dicuci dengan air. Buah disimpan dalam kulkas dengan suhu 4 °C selama 1 minggu. Daging buah 150 g diblender dengan penambahan air 200 ml. Tiga ratus lima puluh mililiter ekstrak jus kemudian disaring menggunakan saringan teh dan ditempatkan pada gelas kaca. Ekstrak disimpan pada suhu ruang selama 24 – 48 jam.

Isolasi Khamir

Ekstrak sirsak yang telah disimpan selama satu hari, diambil 1ml dilakukan seri pengenceran 10⁻⁶ menggunakan aquades steril kemudian diambil sebanyak 0,1 ml dan *dispread-plated* pada medium PDA dalam keadaan aseptis dan diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam, Kontrol *plating* dilakukan pada medium PDA dan 0.5 g bubuk kloramfenikol yang digunakan sebagai antibiotik untuk mencegah tumbuhnya bakteri. Isolat dimurnikan dengan cara *distreak* kembali pada medium agar miring di tabung reaksi (Okwulehie, 2010).

Identifikasi Secara Morfologi

Makroskopis. Pengamatan morfologi makroskopis merupakan pengamatan morfologi koloni pada saat isolasi dan purifikasi, meliputi bentuk koloni, elevasi, warna, tepi dan permukaan (Kreger, 1987 ; dalam Widiastutik, 2013).

Mikroskopis. Pengamatan secara mikroskopik, merupakan pengamatan sel yang dilakukan menggunakan mikroskop dengan pewarnaan menggunakan *Methylene blue* untuk melihat bentuk sel, *budding* dan ukuran sel (Kreger, 1987 ; dalam Widiastutik 2013).

Identifikasi Secara Biokimia

Uji Fermentasi Gula. Gula yang digunakan adalah glukosa, sukrosa, dan laktosa. 0.1 ml isolat dalam PDB diinokulasikan pada medium yang mengandung glukosa, sukrosa dan laktosa 0.2 gram. Isolat selanjutnya diinkubasi selama 7 – 14 hari pada suhu ruang dan diamati perubahannya. Uji fermentasi akan menunjukkan hasil positif apabila warna merah medium fermentasi berubah menjadi kekuningan dan terdapat gelembung pada tabung Durham. Uji dilakukan dengan melakukan dua ulangan (*duplo*) (Harley, 2002; dalam Widiastutik, 2013).

Uji Pertumbuhan pada Medium Glucose Yeast Peptone Konsentrasi Gula 50%. Satu ose isolat diinokulasikan pada medium *Glucose Yeast Peptone* dengan kadar gula 50% dan diamati perumbuhannya selama 24 – 48 jam pada suhu ruang. Uji dilakukan dengan melakukan 2 ulangan (*duplo*) (Kurtzman & Fell, 1998).

Identifikasi Secara Molekuler

Isolasi DNA Isolat IK-2 menggunakan Metode Chelating Ion Exchange (Chelex). Isolasi DNA dilakukan menggunakan metode *chelex* menurut Walsh *et al.*, (2013). Isolasi dilakukan dengan cara mengambil isolat IK-2 3 ose umur 48 jam dimasukkan ke dalam 1.5 ml tube yang berisi ddH₂O 100 µl, kemudian ditambahkan 1 ml saponin 0.5% dalam PBS. Perendaman dilakukan semalam pada suhu 4 °C. Sampel disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit, selanjutnya ditambahkan PBS 1x, sentrifugasi 12.000 rpm selama 5 menit.

Supernatan dibuang, dan sebanyak 100 µL ddh₂O, 50 µL chelex 20% ditambahkan. Sampel dihomogenisasi, kemudian dididihkan selama 10 menit. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan (cairan yang terdapat pada bagian atas) diambil dengan mikropipet dan dipisahkan dari pelet (endapan). Supernatan yang mengandung genom DNA kemudian dipindahkan pada tube yang bersih. Sampel dapat disimpan di dalam *freezer* dengan suhu - 20°C.

Pengecekan konsentrasi dan kemurnian DNA menggunakan Nanodrop. Pengukuran jumlah DNA melalui spektrofotometer didasarkan pada prinsip iradiasi sinar ultra violet (UV) yang diserap oleh nukleotida dan protein dalam larutan. Penyerapan iradiasi sinar UV secara maksimal oleh DNA dicapai pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan penyerapan maksimal oleh protein dicapai pada panjang gelombang 280 nm (Muladno, 2002).

Amplifikasi dengan PCR. Amplifikasi daerah ITS rDNA dilakukan dengan pembuatan PCR mix dengan volume 50 µL, yang terdiri dari DNA *template* sebanyak 6 µL, Primer *forward* 1 µL, primer *reverse* 1 µL, ddH₂O 31 µL, Buffer PCR 10 µL dan *My taq* 1 µL. Primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') sebagai *forward primer* dan ITS 4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') sebagai *reverse primer*. Amplifikasi dimulai dengan tahapan denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 1 menit (1 siklus), selanjutnya 25 – 35 siklus yang terdiri dari: Denaturasi 95 ° C selama 15 detik, *annealing* 55 °C selama 15 detik dan pemanjangan (*extension*) 72 °C selama 10 detik.

Elektroforesis. Deteksi hasil isolasi menggunakan elektroforesis horizontal atau sering disebut elektroforesis agarose, langkah yang dilakukan menurut Ausubel (1995) dengan konsentrasi gel agarosa 0.8%.

Sequencing. Hasil amplifikasi yang didapatkan dilakukan *sequencing* menggunakan jasa perusahaan Biologi Molekuler 1st BASE Malaysia. Analisis penyejajaran menggunakan program BLAST (*Basic Local Allignment Search Tools*). Selanjutnya, urutan tersebut dibandingkan dengan database yang dapat

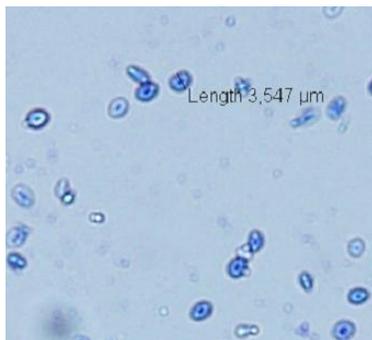
diakses melalui NCBI Genbank www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST (Haddad *et al.*, 2014).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat khamir IK-2 yang diisolasi dari jus sirsak, memiliki kenampakan makroskopik dan mikroskopik yang dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 1.

Tabel 1. Kenampakan Makroskopik dan Mikroskopik Isolat IK-2 yang diisolasi dari Jus Sirsak.

Karakteristik	Morfologi	
	Koloni	Sel
Bentuk koloni	Bulat	-
Warna koloni	Putih agak krem	-
Elevasi	Menonjol	-
Permukaan	Mengkilap	-
Tepian	Rata	-
Bentuk sel	-	Oval
Reproduksi aseksual	-	<i>Budding</i>
Ukuran sel	-	3.5 μm



Gambar 1. Morfologi Sel IK-2 (3.5 μm) perbesaran 20x10 menggunakan pewarna *Methylene blue*

Isolat IK-2 memiliki kenampakan dengan ciri-ciri bentuk koloni bulat, berwarna putih

agak krem, elevasi menonjol, permukaan mengkilap, tepian rata, bentuk sel oval, reproduksi dengan pembentukan *budding*, dan memiliki ukuran 3.5 μm . Menurut Bhatia (2016), khamir memiliki ukuran yang bervariasi, biasanya memiliki diameter 3 – 4 μm , dan ada yang mencapai 40 μm .

Pengamatan mikroskopik dilakukan dengan perbesaran 20x10 menggunakan bantuan pewarna *methylene blue*. Pemberian pewarna *methylene blue* dilakukan untuk membedakan antara sel khamir yang hidup dan yang mati. *Methylene blue* akan masuk melalui membran sel khamir. Menurut Fugelsang & Edwards (2007) *methylene blue* akan menghasilkan warna ketika terjadi reaksi reduksi oksidasi. Reduksi menyebabkan warna memudar dan oksidasi menyebabkan munculnya warna biru. Sel khamir yang hidup memiliki kemampuan untuk mereduksi pewarna *methylene blue* sehingga warna memudar. Sel khamir yang mati tidak mampu mereduksi *methylene blue*, sehingga *methylene blue* teroksidasi dan muncul warna biru sampai hitam.

Uji biokimia yang digunakan untuk identifikasi yaitu uji fermentasi karbohidrat dan uji pertumbuhan pada media *Glucose Yeast Peptone* konsentrasi gula 50%. Hasil uji biokimia ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji Biokimia Isolat IK-2 dari Jus Sirsak

Isolat	Medium				Waktu
	Glukosa	Sukrosa	Laktosa	GYP konsentrasi Gula 50%	
IK-2	+	+	-	+	++

Keterangan :

+ : Hasil uji positif

- : Hasil uji negatif

Waktu

++ : Cepat

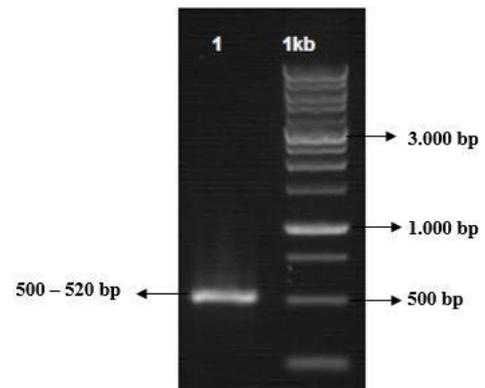
Berdasarkan hasil uji fermentasi yang diperoleh, isolat IK-2 menunjukkan perubahan warna pada media glukosa dan sukrosa setelah 7 – 12 hari, warna berubah dari merah menjadi kuning serta muncul gelembung pada tabung Durham. Tetapi, pada media yang mengandung

laktosa tidak terjadi perubahan warna media dan tidak dijumpai adanya gelembung pada tabung Durham. Menurut Bhowmik (2011), perubahan warna yang terjadi disebabkan karena aktivitas khamir memfermentasi glukosa dan sukrosa sehingga menghasilkan asam dan menyebabkan terjadinya perubahan warna pada media dari merah menjadi kuning, aktivitas tersebut juga menghasilkan gas ditandai dengan munculnya gelembung udara pada tabung Durham. Apabila partikel karbohidrat terfermentasi, produk akhir yang dihasilkan bersifat asam maka, akan menurunkan pH sehingga indikator pH akan berubah (*phenol red* berubah dari merah menjadi kuning). Apabila gas diproduksi bersama dengan asam akan terbentuk gelembung udara pada tabung Durham. Isolat IK-2 negatif terhadap uji laktosa, hal ini disebabkan karena khamir tidak dapat memecah laktosa. Isolat IK-2 memiliki aktivitas yang cepat karena perubahan warna terjadi pada umur biakan 2 hari dan muncul gelembung pada umur biakan 7 hari. Menurut Kurtzman & Fell (1998) munculnya gelembung pada tabung Durham pada umur biakan 7 hari termasuk reaksi yang *strongly positive*.

Uji biokimia juga dilakukan dengan uji pertumbuhan pada media *Glucose Yeast Peptone* dengan konsentrasi gula 50%. Hasil uji menunjukkan isolat IK-2 mampu tumbuh pada media *Glucose Yeast Peptone* dengan konsentrasi gula 50%. Menurut Kurtzman & Fell (1998) khamir sering tumbuh pada media yang memiliki konsentrasi gula cukup tinggi, hal ini dilakukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Media seperti *Glucose Yeast Peptone* (GYP) dan *Yeast Malt Agar* (YMA) yang mengandung konsentrasi gula 30-50% sangat cocok untuk khamir yang bersifat osmofilik dan osmotoleran dari bahan makanan dan jus yang memiliki kadar air yang rendah. Isolat IK-2 mampu tumbuh pada kadar gula tinggi karena memiliki sifat osmotoleran. Menurut Gandjar & Sjamsuridzal (2006) osmotoleran yaitu memiliki kemampuan untuk hidup pada tekanan osmose tinggi.

Identifikasi molekuler isolat IK-2 dilakukan dengan metode *chelex 100*. Hasil yang telah didapatkan selanjutnya diamplifikasi dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Hasil analisis PCR isolat IK-2 ditunjukkan pada Gambar 2



Gambar 2. Hasil amplifikasi daerah ITS isolat IK-2 dengan konsentrasi gel agarose 0.8% dengan *staining dye* dan Marker 1kb.

Keterangan

1Kb : Marker 1Kb

1 : Isolat IK-2

2

Berdasarkan hasil amplifikasi daerah ITS, diketahui isolat IK-2 memiliki ukuran antara 500 – 520 bp. Menurut Korabecna *et al.*, (2003) hasil amplifikasi fragmen daerah ITS menggunakan primer ITS1 dan ITS4 memiliki ukuran sekitar 380 – 900 bp.

Produk yang diperoleh dari PCR kemudian *disequencing* untuk mengetahui urutan nukleotida dari sampel IK-2. Hasil *sequencing* Isolat IK-2 ditunjukkan pada Gambar 3.

GTGAACCTGG	GGATTGGTCC	TCTTGATT	GCTTAATTGC
CACCACATGT	GTTTTIAT	GAACAAATT	CTTTGGTGGC
GGGAGCAATC	CTACCGCCAG	AGGTTATAAC	TAAACCAAAC
TTTTATTTA	CAGTCAAAC	TGATTATA	TTACAATAGT
CAAAACTTTT	AACAACGGAT	CTCTGGTTC	TCGCATCGAT
GAAGAACGCA	GCGAAATGCG	ATACGTAATA	TGAATTGCAG
ATATTTGTGA	ATCATCGAAT	CTTTGAACGC	ACATTGCCCC
CTTTGGTATT	CCAAAGGGCA	TGCCTGTTT	AGCGTCATT
CTCCCTCAA	CCCCGGGTT	TGGTGTGAG	CAATACGCTA
GGTTTGTGTTG	AAAGAATTTA	ACGTGAAAC	TTATTTAAA
GCGACTTAGG	TTTATTCAA	AAACCTTAAT	TTGGTTAGGG
GCAACAACAT	TTAATTCAT	ACCTTGACC	TCAAATCAGG
TAGGACAGCC	CCGTTACAAT	TTAACCTTAT	CATTAACCGA
AG			

Gambar 3. Urutan nukleotida IK-2 yang diisolasi dari buah sirsak

Hasil *sequencing* isolat IK-2 kemudian dianalisis menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*. Hasil BLAST dari isolat IK-2 dengan primer ITS1 dan ITS4 memiliki *query length* 522 bp.

Analisis homologi menggunakan BLAST dipilih berdasarkan *sequence from type material*. Menurut Federhen (2014), *Sequence from type* merupakan bagian yang penting dalam taksonomi karena memiliki tingkat kepercayaan yang sangat tinggi. Hasil analisis homologi menggunakan BLAST ditunjukkan pada Tabel 4

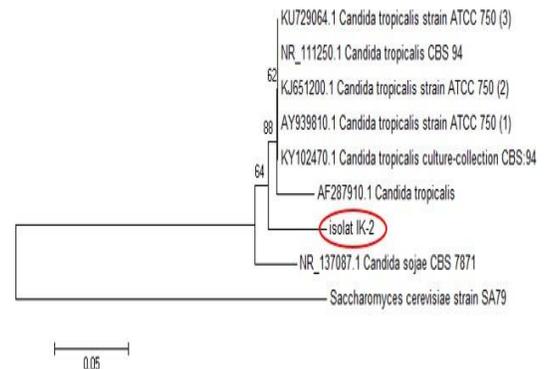
Tabel 4. Hasil analisis homologi menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
<i>Candida tropicalis</i> culture-collection CBS:94	773	773	93%	0.0	95%
<i>Candida tropicalis</i> strain ATCC 750 (1)	773	773	93%	0.0	95%
<i>Candida tropicalis</i> strain ATCC 750 (2)	769	769	92%	0.0	95%
<i>Candida tropicalis</i> strain ATCC 750 (3)	767	767	88%	0.0	97%
<i>Candida tropicalis</i> CBS:94	767	767	88%	0.0	97%
<i>Candida tropicalis</i>	713	713	92%	0.0	94%
<i>Candida sojae</i> CBS 7871	608	608	88%	2e-171	91%

Isolat yang didapatkan termasuk spesies yang berbeda dengan isolat pembandingan yang ada pada *database* NCBI karena memiliki tingkat kemiripan 95% atau kurang dari 99%. Menurut Sugita (1999), spesies yang sama memiliki homologi *sequence* daerah ITS rDNA khamir 99 – 100%, sedangkan homologi yang lebih rendah dari 99% menunjukkan spesies yang berbeda. Homologi *sequence* yang rendah terhadap isolat pembandingan menunjukkan kemungkinan bahwa isolat IK-2 yang didapatkan merupakan taksa baru yang memiliki kemiripan dengan *Candida tropicalis*.

Pohon filogenetik dibuat untuk mengetahui hubungan kekerabatan isolat IK-2 dengan beberapa spesies pembandingan yang diperoleh dari *database* NCBI. Pembuatan pohon filogenetik menggunakan program

MEGA versi 6.0. Pohon filogenetik dikonstruksi dengan *Neighbor-joining tree* dan diuji dengan *Bootstrap method*, dengan *bootstrap* 1.000. *Saccharomyces cerevisiae* dipilih sebagai *outgroup*. Menurut A-rong *et al.*, (2010), pemilihan *outgroup* seringkali dipilih secara acak maupun berdasarkan hubungan yang jelas antara kelompok *ingroup* dan *outgroup*. *Saccharomyces cerevisiae* dipilih sebagai *outgroup* karena memiliki famili yang sama dengan *C. tropicalis*. Pohon filogeni isolat IK-2 akan ditunjukkan pada Gambar 4



Gambar 4. Pohon filogenetik isolat IK-2 dari jus sirsak dengan menggunakan *Neighbor-joining* dengan uji *bootstrap* 1000.

Isolat IK-2 memiliki nilai *bootstrap* 64% dengan *Candida tropicalis* strain ATCC 750 (2), *Candida tropicalis* strain ATCC 750 (1), *C. tropicalis* culture-collection CBS: 94, dan *C. tropicalis*. *Bootstrap* menunjukkan tingkat kesetabilan data yang diuji dengan cara melakukan resampling. Kemiripan antara isolat IK-2 dengan *Candida* ini dikarenakan memiliki kemiripan pada beberapa karakteristik morfologi, biokimia, dan molekuler antara isolat IK-2 dengan *Candida tropicalis* yang dapat dilihat pada Tabel 5

Tabel 5. Morfologi, Biokimia, dan Karakter ITS rDNA isolat IK-2 dari jus sirsak dibandingkan dengan *Candida tropicalis*

Karakter	Isolat ik-2	Kemiripan dengan <i>Candida tropicalis</i>
Bentuk koloni	Bulat	Bulat (Barnett <i>et al.</i> , 1990 ; Kurtzman <i>et al.</i> , 1998)
Warna koloni	Putih agak krem	Putih – krem (Barnett <i>et al.</i> , 1990)
Elevasi	Cembung	-
Tekstur	<i>Butyrous</i>	<i>Butyrous</i> (Barnett <i>et al.</i> , 1990)
Bentuk sel	Oval	Bulat – Oval (Barnett <i>et al.</i> , 1990 ; Kurtzman <i>et al.</i> , 1998)
Sel aseksual	<i>Budding</i>	<i>Budding</i> (Barnett <i>et al.</i> , 1990)
Ukuran Sel	3.5 µm	3.5 – 7.0 µm (Barnett <i>et al.</i> , 1990 ; Kurtzman <i>et al.</i> , 1998)
Fermentasi Glukosa	+	+ (Barnett <i>et al.</i> , 1990 ; Kurtzman <i>et al.</i> , 1998)
Fermentasi Sukrosa	+	v (Barnett <i>et al.</i> , 1990)
Fermentasi Laktosa	-	- (Barnett <i>et al.</i> , 1990)
Pertumbuhan pada medium GYP	+	+ (Barnett <i>et al.</i> , 1990)
konsentrasi gula 50%		
Panjang ITS rDNA	522 bp	517 – 524 bp (Fujita <i>et al.</i> , 2001)

Keterangan :

- + : Hasil positif
- : Hasil negatif
- v : Hasil dapat positif/ negatif

Kemiripan antara isolat IK-2 dengan *Candida* ini dikarenakan memiliki kemiripan pada beberapa karakteristik, salah satunya memiliki morfologi yang mirip. Isolat IK-2 memiliki ciri-ciri berwarna putih agak krem, menonjol, berbentuk circular, dan permukaan mengkilap. Hal ini sesuai dengan pendapat Talaro *et al.*, (2012) yang menyatakan bahwa *Candida* memiliki koloni berwarna putih, membentuk budding. Morfologi koloni *Candida* pada medium padat umumnya berbentuk bulat dengan permukaan sedikit cembung, halus, licin. Hal ini didukung oleh Barnett *et al.*, (1990) yang menyatakan bahwa *Candida tropicalis* memiliki warna putih sampai krem, koloni bulat, reproduksi vegetatif dengan membentuk *budding*, dan tidak memiliki reproduksi seksual.

Menurut Barnett *et al.*, (1990) *Candida tropicalis* dapat ditemukan pada molase, air, buah, ragi dan manusia. *Candida* termasuk kosmopolit atau mampu hidup diberbagai tempat. Beberapa jenis candida banyak ditemukan di alam termasuk pada buah-buahan. *Candida* memiliki peran dalam pembusukan buah sirsak dengan melakukan fermentasi secara alami. Beberapa mikroorganisme menyebabkan pembusukan, perubahan warna, dan fermentasi secara alami yang dapat menyebabkan buah menjadi tidak tahan lama (Okwulehie, 2010). Identifikasi secara molekuler pada daerah ITS isolat IK-2 menunjukkan bahwa IK-2 memiliki panjang DNA 522 bp. IK-2 memiliki kemiripan dengan panjang DNA *Candida tropicalis* yang berhasil diisolasi oleh Fujita *et al.*, (2001).

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa: Isolat khamir berhasil diisolasi dari jus buah sirsak. Hasil identifikasi secara morfologi, uji biokimia, dan molekuler berdasarkan daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) menunjukkan bahwa isolat IK-2 memiliki kemiripan 95% dengan *Candida tropicalis* dengan bootstrap nilai 62.

DAFTAR PUSTAKA

- A-rong, L., Yang-Zhou, Z. Hui-jie, Q. & Whi-feng, S.. 2010. Outgroup Selection in Tree Reconstruction : A Case Study of Family Helictidae (Hymenoptera : Apiodea). *Acta Entomologica Sinica*. 53 (2): 192 – 201
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Siedman, J.G., Smith, J.A & Struhl, K. 1995. *Short Protocols in Molecular Biology Third Edition*. John Wiley & Sons Inc. Canada
- Barnett, J.A, Payne, R.W. & Yarrow, D. 1990. *Yeast : Characteristics & Identification*. 2nd Ed. Cambridge University Press.
- Bhatia, S.C. 2016. *Food Biotechnology*. New Delhi : Woodhead Publishing India Ltd.
- Bhowmik, G. 2011. *Anal Techniques in Biotechnology*. New Delhi : Tata McGraw Hill Education Private Ltd.
- Federhen, S. 2014. Type Material in the Taxonomy NCBI Database. *DOI086–D1098 Nucleic Acids Research, 2015, Vol. 43*.
- Fugelsang, K.C., and Edwards, C.G. 2007. *Wine Microbiology : Practical Applications and Procedures, Second Edition*. Springer Science.
- Fujita, S., Y. Senda, S. Nakaguchi & Hashimoto, T. 2001. Multiplex PCR Using Internal Transcribed Spacer 1 and 2 Region for Rapid Detection and Identification of Yeast Strain. *J. of Clin Microbiol*
- Gandjar, I. dan Sjamsuridzal, W. 2006. *Mikologi: Dasar dan Terapan*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Haddad, R. Alemzadeh E., Ahmadi, Ali-Reza, Hosseini, R. & Moezzi, M. 2014. Identification of Chlorophyceae based on 18S rDNA sequences from Persian Gulf. *Iranian J. Of Microbiol*
- Korabecna M., Liska V. and K. Fajfrlik. 2003. The Variability in the Fungal Ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): Its Biological Meaning and Application in Medical Mycology. *J.Applied Microbiol*
- Kurtzman, C. P. dan Fell, Jack W. 1998. *The yeasts, a taxonomic study*. Elsevier Amsterdam
- Mahreni, Suhenry, S. 2011. *Kinetika Pertumbuhan Sel Saccharomyces cerevisiae dalam Media Tepung Kulit Pisang*. Yogyakarta : Universitas Pembangunan Nasional “Veteran” Yogyakarta.
- Okwulehie, Cyriacus, I., and Alfred, N.K. 2010. Fungi associated with deterioration of sour-sop (*Anona muricata*. Linn) fruits in Abia State, Nigeria. *African J. of Microbiology Research*.
- Sugita, T., Nishikawa, A., Ikeda, R. & Shinoda, T. 1999. Identification of Medically Relevant Trichosporon Species Based on Sequences of Internal Transcribed Spacer Regions and Construction of a Database for Trichosporon Identification. *J. Of Clin Microbiol*.
- Talaro, K. P & Chess, B. 2012. *Foundation in Microbiology, Eight Edition*. McGraw-Hill
- Walsh, P.S., Metzger, & Higuchi. 2013. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-based Typing Forensic Material. *J. Biotech 54 (3) : 134 – 139*
- Widiastutik, N., dan Alami, N.H. 2014. Isolasi dan Identifikasi Yeast dari Rhizosfer Rhizophora mucronata Wonorejo. *J. Sains dan Seni Pomits Vol. 3, No.1*