

Komunitas Mikrob pada Hasil Fermentasi *Nata De Coco* Berdasarkan Marka *Random Amplified Polymorphic DNA*

(Microbial Community on Nata de Coco Fermentation Products Based on Random Amplified Polymorphic DNA Markers)

Raden Aje Syahbarie¹, Antonius Suwanto^{2*}, Aris Tri Wahyudi²

(Diterima Juli 2022/Disetujui Agustus 2023)

ABSTRAK

Fermentasi *nata de coco* secara tradisional sering menghasilkan tebal nata yang tidak konsisten. Dari sisi produsen, lembaran nata yang tipis merugikan karena sebagian besar media fermentasi terbuang percuma. Penyebab utama kondisi ini diduga adalah populasi mikrob pada kultur starter yang tidak sama pada setiap *batch*. Jadi, komunitas mikrob yang dikulturkan pada berbagai mutu nata tebal dan tipis yang tersedia perlu dipelajari sebagai dasar untuk merancang kultur starter *nata de coco* yang lebih baik. Penelitian ini menunjukkan bahwa nata tebal memiliki lebih banyak bakteri *Komagataeibacter intermedius* (pembentuk pelikel) daripada nata tipis. Dalam fermentasi nata tradisional, *K. intermedius* selalu hidup berdampingan dengan mikrob lain dari kelompok bakteri dan khamir. Analisis dengan *Random Amplified Polymorphic DNA* memperlihatkan bahwa keragaman genetik kelompok bakteri lebih tinggi daripada khamir.

Kata kunci: dendrogram kekerabatan, keragaman genetik mikrob, makanan fermentasi, *nata de coco*

ABSTRACT

Traditional nata de coco fermentation often results in inconsistent nata thickness. From the producer's perspective, thin nata sheets are detrimental because most fermentation media will be wasted. The main cause of this condition may be that the microbial population in the starter culture is different in each batch. It is necessary to observe the cultured microbial community on various qualities of available thick and thin nata to design a better nata de coco starter culture. This study showed thick nata had more *Komagataeibacter intermedius* bacteria (pellicle forming) than thin nata. In traditional nata fermentation, *K. intermedius* always coexists with other microbes from the bacteria and yeast groups. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis indicated that the genetic diversity of bacteria was higher than that of the yeast group.

Keywords: dendrogram of relationship, fermented food, microbial genetic diversity, *nata de coco*

PENDAHULUAN

Nata de coco (NDC) dikenal sebagai produk fermentasi yang kaya akan serat pangan. Umumnya NDC dihasilkan melalui proses fermentasi oleh bakteri *Acetobacter xylinum* (nama sekarang: *Komagataeibacter xylinus*) (Yamada *et al.* 2012) dengan media fermentasi berupa kelapa atau santan. Proses fermentasi ini menghasilkan lapisan nata, yaitu substansi menyerupai gel yang terbentuk di permukaan media cair, dengan warna putih hingga krem kekuningan (Muchtar *et al.* 2017). Nata adalah molekul selulosa yang terbentuk dari aktivitas katalitik enzim selulosa sintase dengan molekul glukosa sebagai

substratnya. Produksi selulosa asal bakteri ini selain dipengaruhi oleh sumber karbon yang digunakan, juga sangat dipengaruhi oleh faktor lain seperti suhu, mineral, pH, sumber nitrogen dan sulfur (Jagannath *et al.* 2011). Di samping itu, baik dan buruknya mutu nata dipengaruhi oleh berbagai macam mikrob yang terlibat, akibat dari fermentasi nata yang pada umumnya masih dikerjakan secara tradisional (Seumahu *et al.* 2007).

Fermentasi NDC dapat menggunakan kultur mikrob campuran sebagai kultur starternya. Keuntungan yang dapat diperoleh dari kultur mikrob campuran antara lain hasil (*yield*) produk lebih tinggi, lebih tahan akan mikrob kontaminan, penggunaan substrat yang lebih baik, dan efisien (Smid & Lacroix 2013). Sayangnya, kultur campuran tersebut belum terdefinisi dengan baik sehingga sulit memantau kondisinya.

Dari sisi produsen, lembaran NDC yang tipis akan merugikan karena rendemennya jauh berkurang daripada semestinya sehingga ada bahan baku yang terbuang percuma. Nata yang tipis mengindikasikan telah terjadi sesuatu pada proses fermentasinya sehingga tebalnya tidak optimum. Jika dikaitkan dengan kultur starter yang digunakan (kultur campuran

¹ Sekolah Pascasarjana, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB University, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

² Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB University, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

* Penulis Korespondensi:

Email: antoniussuwanto@gmail.com

yang belum terdefinisi), hal ini dapat terjadi karena tidak tepatnya nisbah populasi dalam komunitas mikrob yang ada. Oleh karena itu, perlu diamati kondisi komunitas mikrob yang ada pada nata tipis tersebut dan membandingkannya dengan nata yang tebalnya normal. Pengamatan komunitas mikrob tersebut penting karena proses utama produksi NDC menggunakan mikrob sehingga mutu yang dihasilkan pasti berkaitan dengan kondisi mikrobnnya.

Seumahu *et al.* (2007) telah meneliti komunitas bakteri pada sampel nata dengan mutu baik dan buruk dengan menggunakan teknik *amplified ribosomal DNA restriction analysis* (ARDRA). Akan tetapi, teknik ini tidak mampu membedakan mikroorganisme yang berkekerabatan dekat (intraspecies). Oleh karena itu diperlukan teknik lain yang memiliki tingkat diskriminasi lebih baik seperti teknik *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) (Trček & Raspor 1999), yang dapat membedakan mikroorganisme sampai pada tingkat galur. Teknik ini pun tidak memerlukan biaya tinggi, cara kerjanya ringkas, dan dapat dilakukan di laboratorium dengan peralatan *polymerase chain reaction* (PCR) sederhana (Babu *et al.* 2014). Penelitian ini bertujuan membandingkan komunitas mikrob terkultur, meliputi bakteri dan khamir, yang ada pada hasil fermentasi NDC dengan lapisan nata tipis dan tebal sehingga diharapkan dapat menjadi dasar untuk penyiapan kultur starter dari campuran mikrob yang lebih definitif.

METODE PENELITIAN

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini ialah sampel NDC dengan kategori tebal (tebal 1,1 cm; tekstur kokoh; permukaan halus) dan tipis (tebal 0,5 cm; tekstur agak lunak; permukaan halus) yang didapatkan dari produsen *nata de coco* di Kota Sukabumi. Media yang digunakan yaitu *coconut water agar* (CWA), *acidified potato dextrose agar* (APDA), dan *coconut water broth* (CWB).

Analisis Mikrobiologi

Sampel berupa hasil panen nata tebal dan tipis masing-masing tiga lembar diambil dengan teknik *purposive sampling* dari tempat fermentasi. Nampan fermentasi berisi lembaran nata ditransfer ke laboratorium untuk diproses secara aseptik. Setiap lembar nata dipotong dengan ukuran 3 cm × 3 cm, lalu diblender bersama cairan sisa fermentasinya selama 15 detik sebanyak 3 kali sampai menjadi bubur (Chávez-Pacheco *et al.* 2005).

Bubur nata diencerkan secara serial menggunakan 0.85% NaCl steril sampai tingkat pengenceran 10⁴ lalu disebar pada media CWA untuk menumbuhkan bakteri, dan pada APDA untuk menumbuhkan khamir (Wongjirathiti & Yottakot 2017). Cawan petri selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama tujuh hari. Pada hari ketujuh, koloni bakteri dan khamir yang tumbuh diamati. Jumlah koloni bakteri dan khamir pada

cawan dihitung dengan rentang koloni total yang tumbuh sebanyak 30–300 koloni (Sanders *et al.* 2012). Setiap isolat yang tumbuh diuji kemampuan pembentukan natanya dengan cara diinokulasikan ke tabung reaksi berisi 3 mL media CWB dan diinkubasi pada suhu 30°C selama delapan hari. Pada hari ke-8 diamati nata yang terbentuk di permukaan media tersebut.

Analisis Molekuler

Penyiapan kultur bakteri dan khamir mengikuti prosedur Moore *et al.* (2004) dengan modifikasi. Selanjutnya dilakukan ekstraksi DNA genom mengikuti protokol pada kit PowerSoil®. DNA hasil ekstraksi digunakan sebagai templat pada *polymerase chain reaction-random amplified polymorphic DNA* (PCR-RAPD) dengan primer yang digunakan, seperti tercantum dalam Tabel 1. Skoring data RAPD diproses menggunakan program PyElph 1.4 (Pavel dan Vasile 2012). Dendrogram kekerabatan dikonstruksi dengan program *Paleontological Statistics* (PAST) (Hammer *et al.* 2001; Beneduzi *et al.* 2018) versi 4.

Tahap berikutnya ialah identifikasi isolat mikrob secara molekuler. Setiap DNA genom yang telah diekstraksi sebelumnya digunakan sebagai templat untuk gen 16S rRNA (bakteri) menggunakan primer 63f dan 1387r (Marchesi *et al.* 1998) serta region *internal transcribed spacer* (ITS) pada khamir dengan menggunakan primer ITS1 dan ITS4 (White *et al.* 1990).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ciri Mikrobiologi

- Pengamatan koloni mikrob

Mikrob yang tumbuh pada media CWA dan APDA dikelompokkan berdasarkan ciri-ciri morfologinya menjadi enam kelompok, yaitu morfotipe I sampai VI. Berdasarkan pengamatan mikroskopis, morfotipe I–V adalah bakteri sedangkan morfotipe VI adalah khamir (Tabel 2).

Media CWA merupakan media padat yang terbuat dari air kelapa dengan tambahan nutrisi dan pH 3,5. Media ini digunakan sebagai media selektif untuk menumbuhkan mikrob yang terdapat dalam NDC (umumnya dari kelompok bakteri); media APDA digunakan untuk menumbuhkan khamir, meskipun bakteri masih dapat tumbuh di media tersebut. Ragam morfologi koloni ini sangat berguna untuk mengelompokkan mikrob secara cepat (Lebaron *et al.* 1998). Enam morfotipe yang teramati menunjukkan setidaknya ada enam macam mikrob pada hasil fermentasi NDC.

- Uji pembentukan lapisan nata (pelikel) setiap isolat mikrob

Dari semua isolat bakteri yang diuji, ada 11 yang mampu membentuk nata, yakni CW-3, CW-5, CW-8, CW-11, CW-13, CW-15, PD-2, PD-5, PD-6, PD-7, dan

Tabel 1 Primer PCR-RAPD untuk sampel mikrob NDC

Nama primer	Susunan basa	Referensi	Jenis sampel
AAB1	5'-AGCGGGCGTA	Trček <i>et al.</i> 1997	bakteri
AAB2	5'-CGCGTGCCCA	Trček <i>et al.</i> 1997	bakteri
OPA18	5'-AGGTGACCGT	Alsulami <i>et al.</i> 2019	bakteri
24	5'-GCGTGA CT TG	Baleiras Couto <i>et al.</i> 1996	khamir
28	5'-AGGAGGAGGA	Baleiras Couto <i>et al.</i> 1996	khamir
OPA11	5'-CAATCG CCGT	Baleiras Couto <i>et al.</i> 1996	khamir

Tabel 2 Morfotipe koloni mikrob terkultur di media *coconut water agar* dan *acidified potato dextrose agar*

Morfotipe	Bentuk	Elevasi	Warna	Diameter (mm)
I	sirkular	<i>raised</i>	cokelat muda, mengkilap	2–3
II	sirkular	<i>umbonate</i>	putih, buram	2–3
III	sirkular	<i>umbonate</i>	cokelat, buram	1–2
IV	sirkular	konveks	cokelat muda, buram	1–2
V	sirkular	<i>umbonate</i>	putih, transparan	2–3
VI	sirkular	konveks	krem, buram	3–5

PD-8. Ukuran nata yang dihasilkan beragam, tetapi uji fisiologis ini bersifat kualitatif, maka pengamatan dibatasi dengan ada atau tidaknya nata yang terbentuk. Isolat bakteri lainnya tidak membentuk nata melainkan membentuk lapisan (biofilm) tipis di permukaan media CWB (Gambar 1). Ketika disentuh, lapisan tipis tersebut langsung hancur sehingga dipastikan bukan nata.

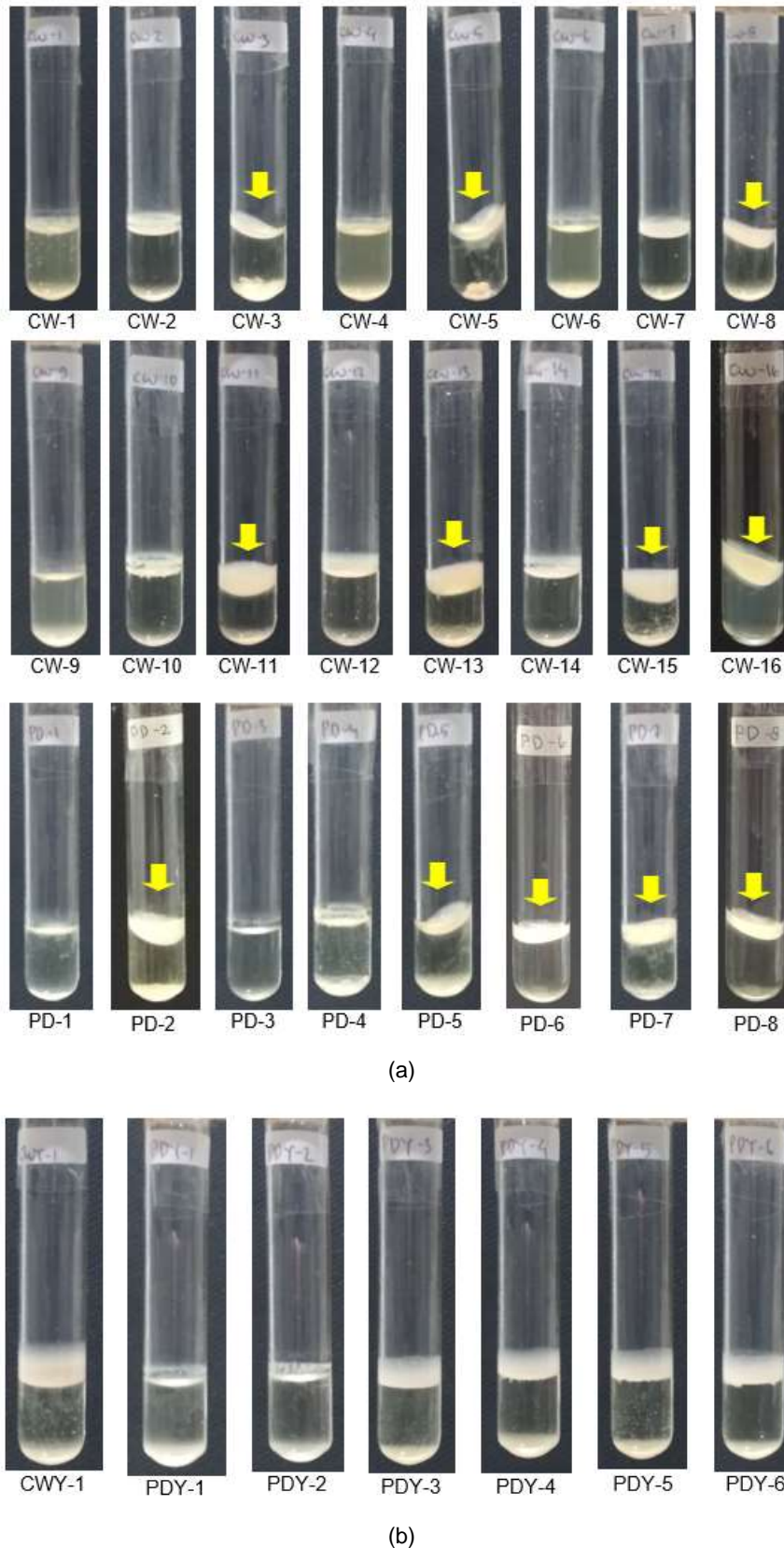
Beberapa bakteri dalam proses fermentasi dapat menghasilkan biofilm, baik dalam kultur tunggal maupun campuran. Biofilm merupakan kumpulan mikrob yang melekat dan tinggal dalam suatu matriks tertentu (umumnya polisakarida). Mikrob menggunakan biofilm ini sebagai struktur untuk pertahanan diri terhadap cekaman lingkungan dan antibiotik. Oleh karena itulah maka mikrob pembentuk biofilm biasanya dapat bertahan dengan baik pada proses fermentasi dan dapat menjadi populasi dominan dalam suatu komunitas mikrob (Furukawa 2015; Fan *et al.* 2020). Bakteri *K. Xylinus*, yang dikenal sebagai mikrob utama fermentasi NDC, pada dasarnya juga membentuk biofilm dengan matriks eksopolisakarida (EPS) berupa selulosa (Valera *et al.* 2015; Bertsch *et al.* 2021). Hal serupa terjadi pada *kombucha*, dengan *symbiotic culture of bacteria and yeast* (SCOBY) yang lebih dikenal sebagai “jamur” *kombucha* juga merupakan biofilm dari matriks selulosa tempat komunitas bakteri dan khamir. Biofilm ini pada dasarnya dibentuk untuk menciptakan kondisi lingkungan yang lebih stabil bagi mikrob tersebut (Harrison & Curtin 2021).

Pengamatan koloni bakteri dari teknik cawan sebar di media CWA menunjukkan bahwa pada sampel nata tebal jumlah koloni bakteri pembentuk nata dengan morfotipe IV adalah 6,08–6,46 log CFU g⁻¹ dan pada morfotipe I sebanyak 6,37–6,77 log CFU g⁻¹. Sementara itu, untuk morfotipe IV pada sampel nata tipis yang tumbuh di media CWA berada pada kisaran 5,3–5,57 log CFU g⁻¹. Morfotipe II secara konsisten muncul di semua sampel nata tipis, yakni 5,61–5,64 log CFU g⁻¹ (Gambar 2). Dapat ditarik “benang merah” bahwa pada sampel nata tebal jumlah bakteri

pembentuk nata dengan morfotipe IV umumnya berjumlah lebih banyak dibandingkan dengan nata tipis. Hal ini memungkinkan karena dengan semakin banyaknya sel bakteri pembentuk nata maka selulosa yang dihasilkan dapat lebih banyak, dan pada akhirnya NDC yang terbentuk menjadi lebih tebal.

Sementara itu, pada Gambar 3 terlihat lebih sedikit populasi bakteri yang tumbuh. Hal ini dapat terjadi karena media APDA sejatinya memang ditujukan untuk pertumbuhan khamir sehingga lebih sedikit bakteri yang dapat tumbuh. Meskipun demikian, ada gambaran bahwa bakteri dengan morfotipe IV lebih sering muncul di sampel nata tebal daripada di nata tipis dan jumlahnya pun lebih banyak. Ini semakin meyakinkan dugaan bahwa sebenarnya tebal-tipisnya nata yang dihasilkan berhubungan dengan keberadaan bakteri dengan morfotipe IV tersebut. Bakteri morfotipe IV adalah bakteri yang berdasarkan uji fisiologis mampu membentuk pelikel dari selulosa dan konsisten muncul pada sampel nata tebal dan tipis. Maka diduga kuat bahwa bakteri dengan morfotipe IV merupakan bakteri utama pembentuk nata. Ke depannya, bakteri ini dapat dijadikan kultur utama pada perancangan kultur starter utama.

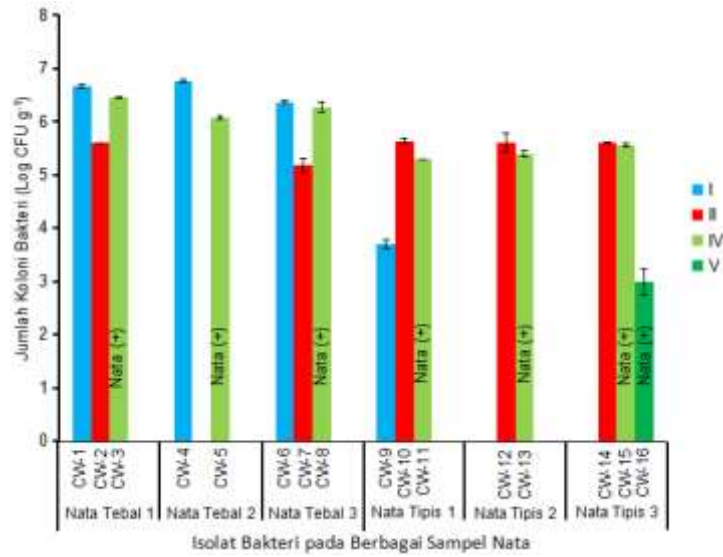
Hasil pengamatan isolat khamir di media APDA menunjukkan bahwa secara umum nata tebal memiliki jumlah khamir (morfotipe VI) lebih banyak (5–5,4 log CFU g⁻¹) dibandingkan nata tipis (2,7–4,18 log CFU g⁻¹) (Gambar 4). Dari hasil enumerasi diketahui bahwa jumlah khamir (morfotipe VI) pada sampel nata tebal lebih banyak dibandingkan pada nata tipis. Galur khamir tertentu diketahui memiliki enzim invertase (Abdul *et al.* 2017). Enzim invertase dapat memecah gula pasir (sukrosa) yang digunakan sebagai substrat pada fermentasi NDC menjadi molekul gula yang lebih sederhana, yaitu glukosa dan fruktosa. Dengan lebih banyaknya molekul glukosa yang tersedia di media fermentasi, lebih banyak pula jumlah sel bakteri dan selulosa yang terbentuk karena glukosa digunakan sebagai sumber energi dalam metabolisme sel bakteri dan juga sebagai monomer pembentuk selulosa.



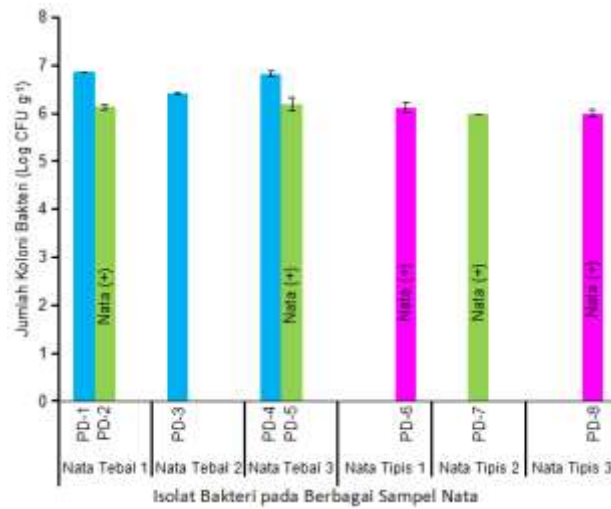
Gambar 1 Pembentukan nata isolat mikroba *nata de coco*. Isolat yang membentuk nata ditandai dengan tanda panah kuning. a) Isolat bakteri dan b) Isolat khamir.

Selain itu, spesies khamir tertentu mampu memproduksi etanol yang akan dioksidasi menjadi asam asetat oleh bakteri pembentuk nata (Gomes *et al.*

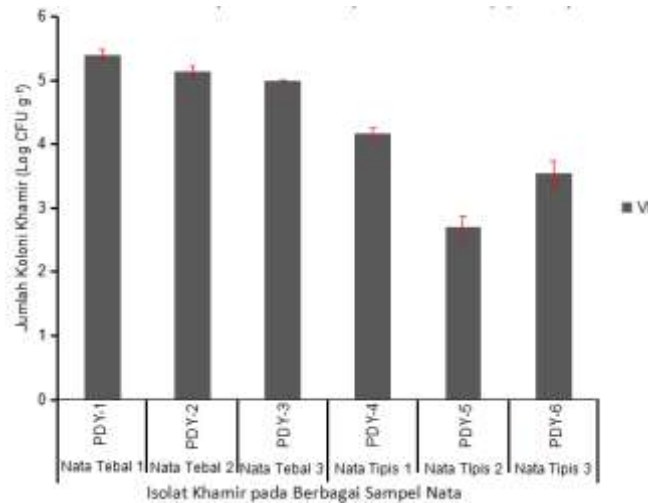
2018). Dengan makin tingginya konsentrasi asam asetat, kondisi media fermentasi lebih cocok untuk pembentukan nata. Lebih jauh lagi, mungkin saja



Gambar 2 Jumlah bakteri terkultur asal sampel nata tebal dan tipis di media CWA. (I, II, IV, V) morfotipe koloni mikroba isolat pembentuk nata (pelikel) ditandai dengan label “Nata (+)”.



Gambar 3 Jumlah bakteri terkultur asal sampel nata tebal dan tipis di media APDA. (I, III, V) morfotipe koloni mikroba. Isolat pembentuk nata (pelikel) ditandai dengan label “Nata (+)”.



Gambar 4 Jumlah khamir terkultur asal sampel nata tebal dan tipis di media APDA. (VI) morfotipe koloni mikroba.

khamir juga menghasilkan metabolit lainnya yang menguntungkan bakteri pembentuk nata sehingga keberadaan khamir dibutuhkan untuk fermentasi nata.

Sementara itu, hanya satu isolat khamir yang tumbuh pada media CWA, berasal dari sampel nata tebal 2 sebesar $5 \log \text{CFU g}^{-1}$. Ini menunjukkan bahwa kandungan nutrisi pada media CWA lebih cocok untuk menumbuhkan bakteri daripada khamir (Gambar 5). Hasil enumerasi bakteri dan khamir mengindikasikan keberadaan dan jumlah mikrob dengan morfologi tertentu memiliki hubungan dengan mutu nata yang dihasilkan.

Ciri Molekuler

- Teknik PCR-RAPD

Profil RAPD untuk kelompok bakteri menunjukkan bahwa primer yang digunakan untuk kelompok bakteri dan khamir cukup kompatibel. Terlihat pita DNA yang muncul cukup jelas dengan polimorfisme mudah untuk dianalisis (Gambar 6). Gambaran visual hasil RAPD pada Gambar 5 secara umum menunjukkan bahwa keragaman profil RAPD pada kelompok bakteri lebih tinggi dibandingkan pada khamir yang hanya terdiri atas dua macam profil saja untuk setiap primer yang digunakan.

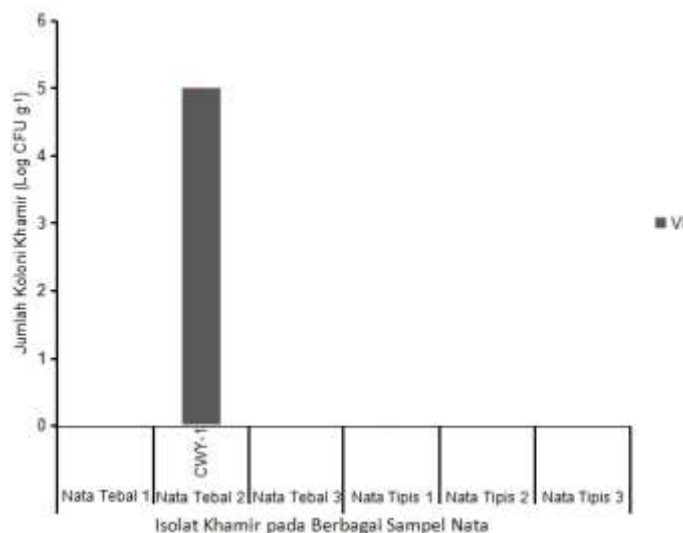
Dari dendrogram yang telah dikonstruksi berdasarkan data RAPD terlihat bahwa isolat bakteri secara keseluruhan memiliki ragam genetik yang cukup tinggi. Keragaman yang tinggi tersebut dapat saja terjadi karena proses transfer genetik secara alami antar-bakteri selama proses pengembangan starter yang dilakukan cukup lama. Proses transfer gen tersebut dapat memunculkan sifat tertentu seperti kemampuan adaptasi dari kultur starter yang lebih baik dengan lingkungannya (Steensels *et al.* 2019). Untuk isolat khamir, ragam genetiknya tidak terlalu tinggi, hanya terdiri atas dua klaster. Indeks kemiripan (similaritas) di antara kedua klaster tersebut di bawah 0,1, yang berarti kedua kelompok khamir tersebut berbeda jauh secara genetik (Gambar 7).

Keragaman genetik, terutama pada bakteri pembentuk nata, berperan penting dalam menjaga kelangsungan fermentasi. Sebagaimana diketahui, pada umumnya fermentasi NDC masih menerapkan cara tradisional (*open fermentation*), yang memungkinkan masuknya kontaminan seperti fage (virus dengan inang bakteri) dari sekitar. Fage dapat saja menginfeksi spesies bakteri pembentuk nata sehingga populasinya punah dan proses fermentasi akan terhenti. Akan tetapi, adanya ragam genetik memungkinkan ada bakteri pembentuk nata dari galur berbeda yang masih dapat selamat. Galur yang berbeda mungkin saja memiliki resistensi yang lebih baik terhadap serangan fage tersebut sehingga fermentasi masih dapat berjalan. Dengan kata lain, keragaman genetik bakteri yang ada pada fermentasi NDC menjadi penting asalkan keseimbangan nisbah populasinya terkendali dengan baik.

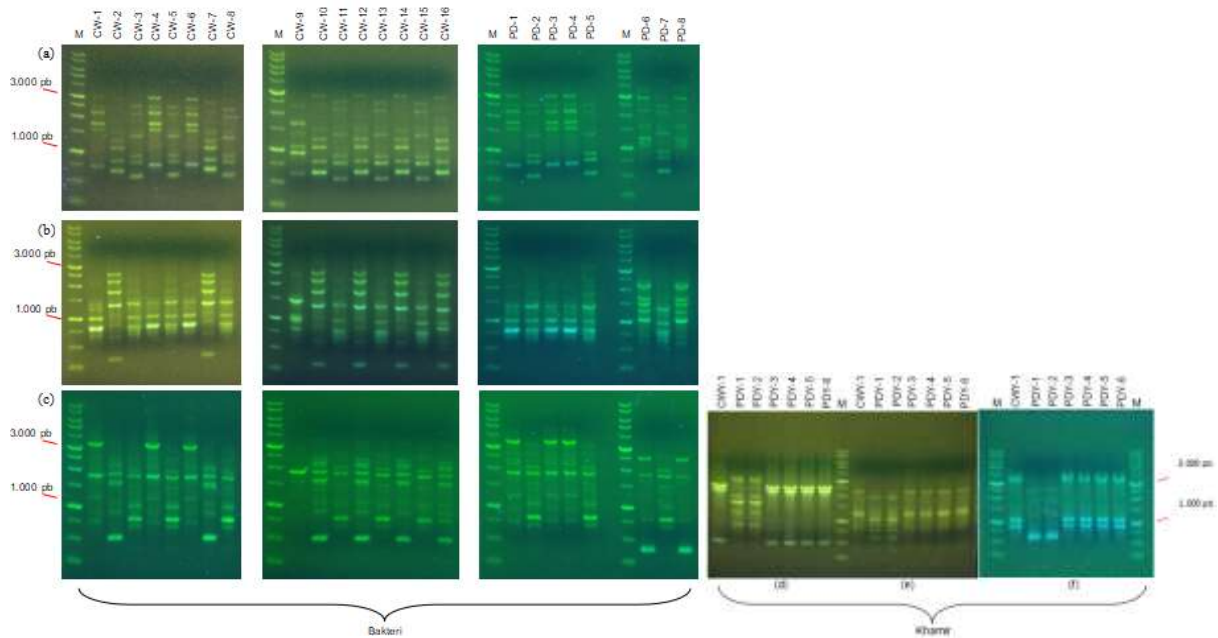
- Identifikasi spesies bakteri dan khamir (Sekuensing gen 16S rRNA dan ITS)

Berdasarkan hasil sekuensing gen 16S rRNA, ketiga isolat bakteri pembentuk nata dengan morfotipe IV, III, dan V masing-masing memiliki kemiripan tertinggi dengan *K. intermedius* sebesar 99,67–99,92%; *K. nataicola* 99,42%; dan *K. sucrofermentans* 98,51% (Tabel 3). Di samping isolat pembentuk nata, ada juga isolat yang tidak membentuk nata, yaitu isolat bakteri dengan morfotipe I dan II. Morfotipe I teridentifikasi menjadi dua spesies, yaitu *K. kakiaceti* (kemiripan 99,83–100%) dan *K. saccharivorans* (kemiripan 99,25%). Morfotipe II teridentifikasi sebagai *Acetobacter tropicalis*. Pada penelitian lain, bakteri ini dilaporkan terdapat dalam usus lalat buah zaitun sebagai simbion (*Bactrocera oleae*) (Kounatidis *et al.* 2009).

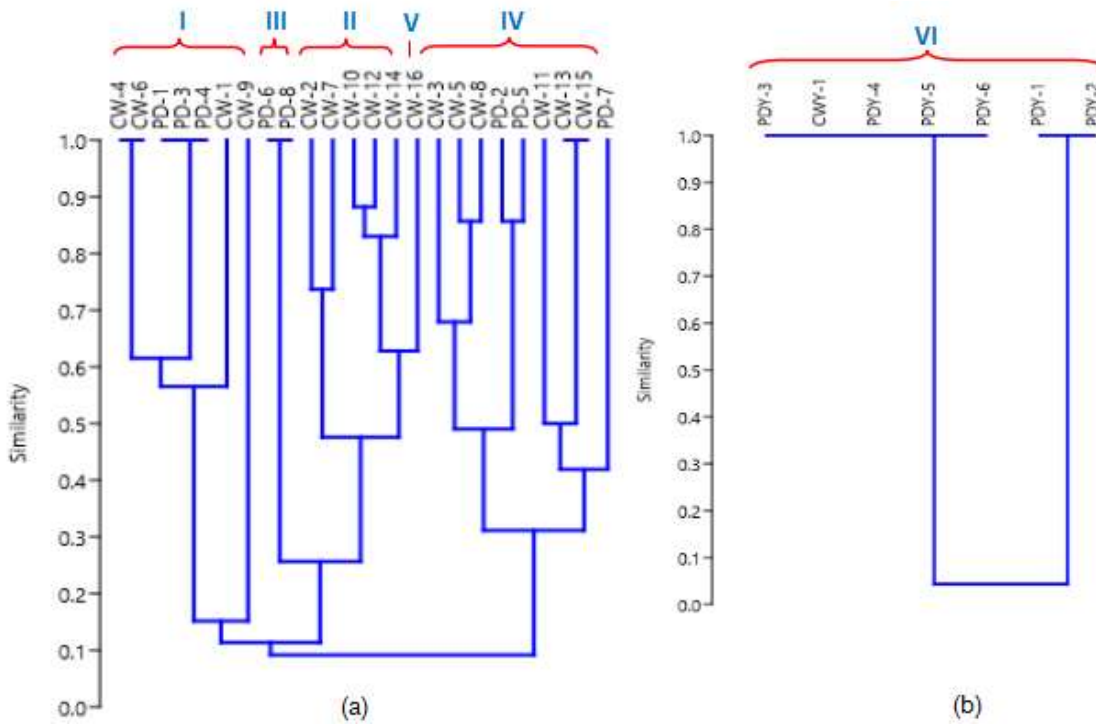
Berdasarkan identifikasi sekuen ITS, semua isolat khamir terbagi menjadi dua spesies, yaitu



Gambar 5 Jumlah khamir terkultur asal sampel nata tebal dan tipis di media CWA. (VI) morfotipe koloni mikrob.



Gambar 6 Hasil *random amplified polymorphic DNA* isolat bakteri dan khamir pada hasil fermentasi nata tebal dan tipis. (M) 1 kb DNA *Ladder*.a) primer AAB1, (b) primer AAB2, (c) primer OPA 18; (1-24) Isolat bakteri (d) primer 24, (e) primer 28, (f) primer OPA11; (M) 1 kb DNA *Ladder*.



Gambar 7 Dendrogram kekerabatan. (a) isolat bakteri dan (b) khamir. (I-V) Morfotipe koloni bakteri; (VI) Morfotipe koloni khamir.

Zygosaccharomyces bisporus dan *Pichia manshurica* dengan masing-masing kemiripan terhadap spesies pembandingan di GenBank adalah 99,41% dan 99,78%. Keragaman spesies mikrob pada fermentasi NDC dapat berasal dari bahan baku (kelapa), terbawa oleh serangga, maupun lingkungan sekitar, karena fermentasi tidak dikerjakan dalam kondisi aseptis.

KESIMPULAN

Lembaran NDC dengan kategori tebal memiliki jumlah bakteri pembentuk nata *K. intermedius* lebih banyak dibandingkan dengan nata tipis. Terdapat lebih dari satu pola keragaman komunitas mikrob terkultur pada NDC dari satu kondisi mutu yang sama (tebal

Tabel 3 Identitas spesies bakteri (gen 16S rRNA) dan khamir (region ITS)

Isolat	Tipe	Hasil BLAST	Kemiripan (%)	No. akses
CW-1		<i>Komagataeibacter kakiaceti</i> JCM 25156 strain G5-1	99,83	NR_113301.1
CW-4 ^a		<i>Komagataeibacter kakiaceti</i> JCM 25156 strain G5-1	100	NR_113301.1
CW-6 ^a		-	-	-
PD-1 ^b	I	<i>Komagataeibacter kakiaceti</i> JCM 25156 strain G5-1	100	NR_113301.1
PD-3 ^b		-	-	-
PD-4 ^b		-	-	-
CW-9		<i>Komagataeibacter saccharivorans</i> strain LMG 1582	99,25	NR_118189.1
CW-2		<i>Acetobacter tropicalis</i> strain NBRC 16470	100	NR_113846.1
CW-7		<i>Acetobacter tropicalis</i> strain NBRC 16470	100	NR_113846.1
CW-10	II	<i>Acetobacter tropicalis</i> strain NBRC 16470	99,75	NR_113846.1
CW-12		<i>Acetobacter tropicalis</i> strain NBRC 16470	99,92	NR_113846.1
CW-14		<i>Acetobacter tropicalis</i> strain NBRC 16470	99,75	NR_113846.1
PD-6 ^c	III	<i>Komagataeibacter nataicola</i> strain LMG 1536	99,42	NR_118184.1
PD-8 ^c		-	-	-
CW-3		<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain DSM 11804	99,92	NR_118180.1
CW-5		<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain DSM 11804	99,75	NR_118180.1
CW-8		<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain DSM 11804	99,67	NR_118180.1
CW-11		<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain DSM 11804	99,75	NR_118180.1
CW-13 ^d	IV	<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain DSM 11804	99,83	NR_118180.1
CW-15 ^d		-	-	-
PD-2		<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain DSM 11804	99,67	NR_118180.1
PD-5		<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain DSM 11804	99,67	NR_118180.1
PD-7		<i>Komagataeibacter intermedius</i> strain DSM 11804	99,92	NR_118180.1
CW-16	V	<i>Komagataeibacter sucrofermentans</i> DSM 15973 strain BPR 2001	98,51	NR_114695.1
PDY-1 ^e		<i>Zygosaccharomyces bisporus</i> CBS 702	99,41	NR_138188.1
PDY-2 ^e		-	-	-
PDY-3 ^f	VI	<i>Pichia manshurica</i> CBS 209	99,78	NR_138211.1
PDY-4 ^f		-	-	-
PDY-5 ^f		-	-	-
PDY-6 ^f		-	-	-
CWY-1 ^f		-	-	-

Keterangan: Isolat dengan tanda huruf superskrip yang sama (a, b, c, d, e, dan f) merupakan isolat yang memiliki profil RAPD dengan kemiripan 100%. Kode isolat yang menjorok ke dalam adalah isolat khamir yang tidak disekuensing. Tipe (I–V) adalah kelompok bakteri. Tipe (VI) adalah kelompok khamir. *E-value* semua data sekuen bernilai 0.

atau tipis). Penggunaan teknik molekuler PCR-RAPD yang dilengkapi analisis sekuens 16S rRNA dan ITS menunjukkan bahwa isolat bakteri dan khamir asal NDC dengan morfologi koloni yang sama dapat berbeda secara genetik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ucapkan terima kasih kepada PT Niramas Utama, Bekasi, yang telah sepenuhnya menyediakan dana dan fasilitas berupa alat-alat untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alsulami AMH, Abu-zeid M, Mattar EH, Abo-aba SEM. 2019. Genetic fingerprinting and plasmid content of *Acetobacter xylinum* strains producing bio-cellulose. *World Journal of Medical Sciences*. 16(2): 53–58.
- Babu KN, Rajesh MK, Samsudeen K, Minoo D, Suraby EJ, Anupama K, Ritto P. 2014. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Derived Techniques. Di dalam: Besse P, editor. *Molecular Plant Taxonomy. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. 1115. Totowa (NJ): Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-767-9_10
- Baleiras Couto MM, Eijmsa B, Hofstra H, Huis In'T Veld JHJ, Van der Vossen JMBM. 1996. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(1): 41–46. <https://doi.org/10.1128/aem.62.1.41-46.1996>
- Beneduzi A, Moreira F, Costa PB, Vargas LK, Lisboa BB, Favreto R, Baldani JI, Passaglia LMP. 2013. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Applied Soil Ecology*. 63: 94–104. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.08.010>

- Bertsch P, Etter D, Fischer P. 2021. Transient in situ measurement of kombucha biofilm growth and mechanical properties. *Food & Function*. 12(9): 4015–4020. <https://doi.org/10.1039/D1FO00630D>
- Chávez-Pacheco JL, Martínez-Yee S, Contreras ML, Gómez-Manzo S, Membrillo-Hernández J, Escamilla JE. 2005. Partial bioenergetic characterization of *Gluconacetobacter xylinum* cells released from cellulose pellicles by a novel methodology. *Journal of Applied Microbiology*. 99(5):1130–1140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02708.x>
- Fan Y, Huang X, Chen J, Han B. 2020. Formation of a mixed-species biofilm is a survival strategy for unculturable lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in Daqu, a Chinese traditional fermentation starter. *Frontiers in Microbiology*. 11(February): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00138>
- Furukawa S. 2015. Studies on formation, control and application of biofilm formed by food related microorganisms. *Biosci Biotechnol Biochem*. 79(7): 1050–1056. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1018126>
- Gomes RJ, Borges MF, Rosa MF, Castro-Gómez RJH, Spinosa WA. 2018. Acetic acid bacteria in the food industry: systematics, characteristics and applications. *Food Technology & Biotechnology*. 56(2): 139–151. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5593>
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. 4(1): 1–9.
- Harrison K, Curtin C. 2021. Microbial composition of SCOBY starter cultures used by commercial kombucha brewers in North America. *Microorganisms*. 9(5): 1–21. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051060>
- Jagannath A, Manjunatha SS, Ravi N, Raju PS. 2011. The effect of different substrates and processing conditions on the textural characteristics of bacterial cellulose (nata) produced by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Food Processing Engineering*. 34(3): 593–608. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2009.00403.x>
- Kounatidis I, Crotti E, Sapountzis P, Sacchi L, Rizzi A, Chouaia B, Bandi C, Alma A, Daffonchio D, Mavragani-Tsipidou P, et al. 2009. *Acetobacter tropicalis* is a major symbiont of the olive fruit fly (*Bactrocera oleae*). *Applied and Environmental Microbiology*. 75(10): 3281–3288. <https://doi.org/10.1128/AEM.02933-08>
- Lebaron P, Ghigliione J-F, Fajon C, Batailler N, Normand P. 1998. Phenotypic and genetic diversity within a colony morphotype. *FEMS Microbiol Letters*. 160: 137–143. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12903.x>
- Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade WG. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(2): 795–799. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.795-799.1998>
- Moore E, Arnscheidt A, Krüger A, Strömpl C, Mau M. 2004. Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. Di dalam: *Molecular Microbial Ecology Manual*. Ed ke-2. Dordrecht (NL): Kluwer Academic Publishers.
- Muchtar L, Rachmania Mubarik N, Suwanto A. 2017. Konsistensi produksi nata dalam media fermentasi yang mengandung hidrolisat ubi kayu. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*. 27(2): 217–227. <https://doi.org/10.24961/j.tek.ind.pert.2017.27.2.217>
- Pavel AB, Vasile CI. 2012. PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics*. 13(9): 1–6. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-9>
- Qureshi AS, Khusk I, Ali CH, Majeed H, Ahmad A. 2017. Production of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* Angel using date syrup as a cost effective carbon source. *African Journal of Biotechnology*. 16(15): 777–781. <https://doi.org/10.5897/AJB2015.15174>
- Sanders ER. 2012. Aseptic laboratory techniques: plating methods. *Journal of Visualized Experiments*. 63: 1-18. <https://doi.org/10.3791/3064-v>
- Seumahu CA, Suwanto A, Hadisutanto D, Thenawijaya Suhartono M. 2007. The dynamics of bacterial communities during traditional nata de coco fermentation. *Microbiology Indonesia*. 1(2): 65–68. <https://doi.org/10.5454/mi.1.2.4>
- Smid EJ, Lacroix C. 2013. Microbe–microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology*. 24(2): 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.11.007>
- Steensels J, Gallone B, Voordeckers K, Verstrepen KJ. 2019. Domestication of industrial microbes. *Current Biology*. 29(10): 381–393. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.025>
- Trček J, Ramuš J, Raspor P. 1997. Phenotypic characterization and RAPD-PCR profiling of *Acetobacter* sp. isolated from spirit vinegar production. *Food Technology & Biotechnology*. 35(1): 63–67.
- Trček J, Raspor P. 1999. Molecular characterization of acetic acid bacteria isolated from spirit vinegar. *Food Technology & Biotechnology*. 37(2): 113–116.

- Valera MJ, Torija MJ, Mas A, Mateo E. 2015. Acetic acid bacteria from biofilm of strawberry vinegar visualized by microscopy and detected by complementing culture-dependent and culture-independent techniques. *Food Microbiology*. 46: 452–462. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.09.006>
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Di dalam: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editor. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. San Diego (CA): Academic Press, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wongjiratthiti A, Yottakot S. 2017. Utilisation of local crops as alternative media for fungal growth. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*. 40(2): 295–304.
- Yamada Y, Yukphan P, Vu HTL, Muramatsu Y, Ochaikul D, Tanasupawat S, Nakagawa Y. 2012. Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). *The Journal of General and Applied Microbiol.* 58(5): 397–404. <https://doi.org/10.2323/jgam.58.397>