

Identifikasi dan Keragaman Genetik Bakteri Asam Laktat dari Tapai Singkong berdasarkan Sekuen Gen 16S rRNA

Identification and Genetic Diversity of Lactic Acid Bacteria from Cassava Tapai Based on 16S rRNA Gene

Tati Barus*, Saint Chalista, Bibiana Widiyati Lay

Fakultas Teknobiologi, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya
Jalan Jenderal Sudirman 51, Jakarta, Indonesia 12930
E-mail: tati.barus@atmajaya.ac.id *Penulis untuk korespondensi

Abstract

Lactic acid bacteria (BAL) is a group of gram-positive bacteria that do not form spores and can change carbohydrates to lactic acid. BAL is important in the fermentation of food and is important for health. Tapai is one type of Indonesian fermented food containing BAL. However, information about the BAL from Tapai is still limited. Therefore, the aim of this study was to identify and assess the genetic diversity of BAL from Tapai based on the 16S ribosomal ribonucleic acid (rRNA) gene sequence. DeMan Rogosa and Sharp Agar (MRSA) media were used to grow the BAL. Pair of primer 63f and 1387r was used to amplify the 16S rRNA gene sequence. A total of 31 isolates of BAL were isolated. Based on the 16S rRNA gene sequence, a total of 31 BAL isolates consisted of *Lactobacillus fermentum* (21 isolates), *Weissella cibaria* (3 isolates), *W. confusa* (6 isolates), and *W. paramesenteroides* (1 isolate) with similarity 95%-100%. The phylogenetic tree constructed based on the 16S rRNA gene sequence can show the relationship of BAL diversity to the species level, but cannot differentiate the BAL to the strain level.

Key words: BAL, Tapai singkong, 16S rDNA

Abstrak

Bakteri asam laktat (BAL) adalah kelompok bakteri gram-positif yang tidak membentuk spora dan dapat memfermentasikan karbohidrat untuk menghasilkan asam laktat. BAL berperan penting pada fermentasi bahan pangan dan penting bagi kesehatan. Tapai merupakan salah satu jenis pangan fermentasi tradisional Indonesia yang mengandung BAL. Namun, informasi tentang BAL dari Tapai masih terbatas. Oleh karena itu, tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi dan mengkaji keragaman genetik BAL pada Tapai berdasarkan sekuen gen 16S ribosomal ribonucleic acid (rRNA). Media *DeMan Rogosa and Sharp Agar* (MRSA) digunakan untuk menumbuhkan BAL. Pasangan primer 63f dan 1387r digunakan untuk mengamplifikasi sekuen gen 16S rRNA. Sebanyak 31 isolat BAL telah berhasil diisolasi. Berdasarkan sekuen gen 16S rRNA, 31 isolat BAL tersebut terdiri atas *Lactobacillus fermentum* (21 isolat), *Weissella cibaria* (3 isolat), *W. confusa* (6 isolat), dan *W. paramesenteroides* (1 isolat) dengan similaritas 95%-100%. Pohon filogenetik yang dikonstruksi berdasarkan sekuen gen 16S rRNA dapat menunjukkan hubungan keragaman BAL hingga tingkat spesies, namun tidak dapat membedakan hingga tingkat *strain*.

Kata kunci: BAL, Tapai singkong, 16S rDNA

Diterima: 3 Maret 2017, disetujui: 30 April 2017

Pendahuluan

Tapai merupakan salah satu jenis pangan fermentasi tradisional yang terkenal di Indonesia sesudah tempe. Tapai merupakan bahan pangan yang disukai karena cita rasanya yang enak.

Jenis Tapai yang umum diproduksi adalah Tapai singkong dan Tapai ketan, tetapi yang paling banyak diproduksi adalah Tapai singkong. Proses pembuatan Tapai singkong melalui tahapan pengupasan, pencucian, pengukusan hingga singkong menjadi matang, kemudian

pencampuran dengan starter yang umum disebut sebagai "Ragi Tapai", dan selanjutnya difermentasi sekitar 48 jam. "Ragi Tapai" merupakan sumber mikrob yang berperan selama proses fermentasi berlangsung.

Mikrob berperan penting dalam pembentukan cita rasa bahan pangan fermentasi (Hagedorn dan Kaphamer, 1994). Peran mikrob dalam menentukan kualitas pangan fermentasi telah banyak dilaporkan, seperti *Lactococcus lactis* pada keju (Broadbent *et al.*, 2002), bakteri asam laktat pada anggur (Rodas *et al.*, 2003), dan *Staphylococcus xylosus* pada sosis (Stahnke, 1994). Barus dan Wijaya (2011) melaporkan bahwa penggunaan kombinasi *Pseudomonas fragi* dengan *Saccharomyces cereviceae* pada fermentasi Tapai singkong menghasilkan cita rasa yang tidak enak dan tidak disenangi oleh panelis. Sebaliknya, penggunaan kombinasi *Lactobacillus plantarum* dengan *S. cereviceae* paling disenangi oleh panelis karena menghasilkan cita rasa yang manis keasaman dan tekstur yang lembut.

L. plantarum termasuk ke dalam kelompok bakteri asam laktat (BAL). BAL merupakan kelompok bakteri yang dapat mengubah glukosa menjadi asam laktat. Selain berperan dalam fermentasi bahan pangan, BAL juga telah dilaporkan penting bagi kesehatan, seperti membantu sistem pencernaan (Gilliland 1990), mengendalikan kolesterol (Kusmiati *et al.*, 2015), dan membantu digesti laktosa (Sreekumar dan Hosono, 1998). Selain itu, BAL juga telah dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri penghasil enzim-enzim yang dapat mengkonversi senyawa prokarsinogen menjadi karsinogen (Pato, 2003). Namun informasi tentang BAL pada Tapai masih terbatas sehingga perlu dikaji lebih lanjut.

Sejalan dengan perkembangan ilmu dan teknologi, saat ini telah tersedia beberapa metode yang dapat digunakan untuk menganalisis komunitas mikrob yang terdapat pada habitat tertentu. Salah satu adalah melalui analisis gen 16S rRNA. Alasan penggunaan sekuen gen 16S rRNA adalah karena bersifat universal, *highly conserved*, dan ada di semua bakteri. Teknik ini lebih mudah untuk dilakukan, cepat, dan memungkinkan untuk analisis hubungan filogenetik dengan *taxa* yang cukup jauh (Větrovský dan Baldrian, 2013). Dengan

demikian gen 16S rRNA telah banyak digunakan untuk mendeteksi dan mengkaji keragaman genetik kelompok bakteri pada suatu habitat (Drancourt *et al.*, 2000). Oleh sebab itu, penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengkaji keragaman genetik BAL dari Tapai berdasarkan sekuen gen 16S rRNA. Informasi ini akan menjadi dasar penelitian lebih lanjut tentang peran BAL dalam menentukan kualitas Tapai dan perannya dalam kesehatan.

Metode Penelitian

Isolasi Bakteri Asam Laktat

Isolasi BAL dilakukan dari Tapai yang diperoleh dari Alam Sutera, Bumi Serpong Damai, Serpong, Kelapa Gading, dan Tanjung Duren. Isolasi BAL dilakukan mengikuti metode Pisol *et al.*, (2015). Sebanyak 25g Tapai dihomogenkan dengan 225 mL garam fisiologis 0.85%. Pengenceran secara bertahap dilakukan dari 10^{-1} hingga 10^{-6} . Selanjutnya, 100 μ L pengenceran 10^{-4} – 10^{-6} disebar dengan metode *spread* pada media *DeMan Rogosa and Sharp agar* (MRSA) yang mengandung 0.8% CaCO_3 lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama dua hari. Koloni dengan zona bening selanjutnya dikarakterisasi menggunakan pewarnaan gram dan uji katalase. BAL yang telah terkarakterisasi disimpan pada suhu minus 80°C hingga akan digunakan kembali.

Isolasi Genom

Isolasi genom BAL dilakukan mengikuti metode Barus dan Wijaya (2011). Isolat bakteri ditumbuhkan pada media *Luria Broth* (LB) dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 18 jam di *waterbath shaker*. Selanjutnya isolasi genom BAL dilakukan menggunakan *Fermentas® Genomic DNA Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific, Lithuania) sesuai dengan prosedur kit dengan sedikit modifikasi. Modifikasi tersebut adalah penambahan 25 μ L *lysozyme* terlebih dahulu sebelum isolasi genom dilakukan. Genom yang diperoleh dicampur dengan *nuclease free water* (NFW) dan disimpan pada suhu -20°C sampai akan digunakan kembali.

Amplifikasi Sekuen Gen 16S rRNA

Amplifikasi sekuens 16S rDNA dilakukan menggunakan GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Komposisi *mastermix* PCR mengikuti Marchesi *et al.*, (1998) yang terdiri atas 12,5 µL GoTag Green MasterMix, masing-masing 1 µL primer *forward* dan *reverse*, 1 µL DNA template dan 9,5 µL ddH₂O. Untuk mengamplifikasi sekuens 16S rRNA digunakan pasangan primer 63f (5'- CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') dan 1387r (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3'). Mesin PCR dijalankan dengan pengaturan : pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 57°C selama 1 menit, *extension* pada suhu 72°C selama 1 menit, *post-extension* pada suhu 72°C selama 10 menit, dan *hold* 4°C hingga selesai 30 siklus (Barus dan Wijaya 2011). Hasil PCR kemudian divisualisasi dengan melakukan elektroforesis (BioRad Laboratories, CA, USA) pada 1% gel SeaKem® Agarose (Cambrex, IA, USA). Hasil elektroforesis *distaining* dalam etidium bromida selama 15 menit lalu *didestaining* selama 5 menit. Setelah itu dilakukan visualisasi. Sekuensing 16S rDNA BAL dilakukan di MacroGen Inc, Korea Selatan. Sekuen gen 16S rRNA yang diperoleh dari proses sekuensing selanjutnya dianalisis menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada situs NCBI untuk melihat similaritas dengan sekuens acuan yang terdapat pada *GeneBank*. Selanjutnya pohon filogenetik dikonstruksi berdasarkan sekuens gen 16S rRNA menggunakan program MEGA7 dengan metode *Maximum Likelihood*.

Hasil dan Pembahasan

Sebanyak 31 isolat BAL telah berhasil disolasi dari Tapai singkong dengan jumlah yang beragam pada setiap sampel (Tabel 1). Semua isolat BAL tersebut menunjukkan hasil positif pada pewarnaan gram (warna ungu) dan hasil negatif untuk uji katalase karena tidak terbentuk gelembung udara setelah ditetesi reagen uji katalase (hidrogen peroksida). Hal ini sesuai dengan yang telah dilaporkan oleh Kannan

(2016) bahwa BAL merupakan bakteri gram positif dan katalase negatif.

Genom semua isolat BAL telah berhasil diisolasi menggunakan *Fermentas® Genomic DNA Purification Kit*. Sekuen gen 16S rRNA dari masing-masing isolat juga telah berhasil diamplifikasi dengan menghasilkan fragmen pita sekitar 1300 bp (Gambar 1) sebagai contoh. Fragmen ampikon yang berukuran 1300 bp diperoleh karena menggunakan pasangan primer 63f dan 1387r yang mengamplifikasi sekuens rDNA pada posisi basa ke 43-63 hingga basa 1387-1370 (Marchesi *et al.*, 1998).

Setelah dibandingkan dengan sekuens 16S rDNA *database* di *Genebank* maka hasil BLAST dari sekuens masing-masing isolat menunjukkan similaritas yang tinggi (95%-100%) dengan *Lactobacillus fermentum* (21 isolat), *Weissella cibaria* (3 isolat), dan *W. confusa* (6 isolat) dan *W. paramesenteroides* (1 isolat) (Tabel 2). Kelimpahan jenis masing-masing BAL pada sampel Tapai singkong bervariasi. Tapai singkong dari Alam Sutera (TBTA1-TBTA11) paling banyak mengandung *L. fermentum* (10 isolat) dan hanya 1 isolat *W. confusa*. Kelimpahan *L. fermentum* ditemukan juga pada Tapai singkong dari Serpong dan Tanjung Duren. Sebaliknya, Tapai yang berasal dari Bumi Serpong Damai BAL yang berlimpah adalah *W. confusa* dan *W. cibaria*. *L. fermentum* hanya ditemukan 1 isolat. Perbedaan kelimpahan jenis BAL ini diduga berkontribusi pada kualitas Tapai singkong. Barus dan Wijaya (2011) melaporkan bahwa penggunaan kombinasi *L. plantarum* dengan *S. cereviceae* (mikrob utama Tapai singkong) paling disenangi oleh panelis karena menghasilkan cita rasa yang manis keasaman dan tekstur yang lembut. Sebaliknya, kombinasi *Pseudomonas fragi* dengan *S. cereviceae* pada fermentasi Tapai singkong menghasilkan cita rasa yang tidak enak dan tidak disenangi oleh panelis. Namun, disayangkan *L. plantarum* yang telah dilaporkan menghasilkan cita rasa yang manis keasaman dan tekstur yang lembut tidak ditemukan pada sampel Tapai singkong pada penelitian ini (Barus dan Wijaya, 2011). Selanjutnya kami saat ini sedang mengkaji peran masing-masing BAL yang diperoleh pada penelitian ini dalam menentukan cita rasa Tapai.

Pohon filogenetik berdasarkan sekuen 16S rDNA BAL telah berhasil dikonstruksi dengan metode *Maximum Likelihood* (Gambar 2). Pohon filogenetik menunjukkan bahwa masing-masing BAL membentuk kluster tersendiri, yaitu kluster 1 untuk *L. fermentum*, kluster 2 untuk *W. paramesenteroides*, kluster 3 untuk *W. cibaria*, dan kluster 4 untuk *W. confusa*. Gambar 2 menunjukkan bahwa *L. fermentum* memiliki kekerabatan paling dekat dengan *L. ingluviei*, selanjutnya secara berurutan dengan *W. paramesenteroides*, *W. cibaria*, dan *W. confusa*.

Pohon filogenetik berdasarkan sekuen 16S rDNA BAL dapat menunjukkan kekerabatan antar spesies BAL, dimana kelompok *Weissella* spp. tampak memiliki kluster yang saling berdekatan (kluster 2- kluster 4). Namun, pohon filogenetik berdasarkan sekuen 16S rDNA belum dapat digunakan untuk menentukan hubungan kekerabatan BAL hingga tingkat *strain* (Kampas, 2008). Hal ini dapat dilihat bahwa masing-masing kluster terdiri atas satu spesies dan tidak terbentuk kluster hingga tingkat *strain*.

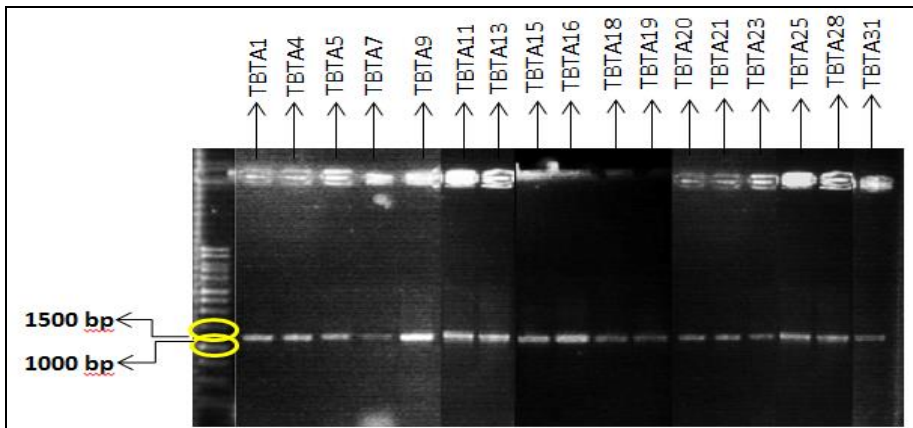
Tabel 1. Lokasi pengambilan Tapai, jumlah isolat BAL, dan Kode isolat BAL

Lokasi pengambilan Tapai	Jumlah Isolat	Kode Isolat
Alam Sutera	11	TBTA1-TBTA11
Bumi Serpong Damai	9	TBTA12-TBTA20
Kelapa Gading	1	TBTA21
Serpong	3	TBTA22-TBTA24
Tanjung Duren	7	TBTA25-TBTA31

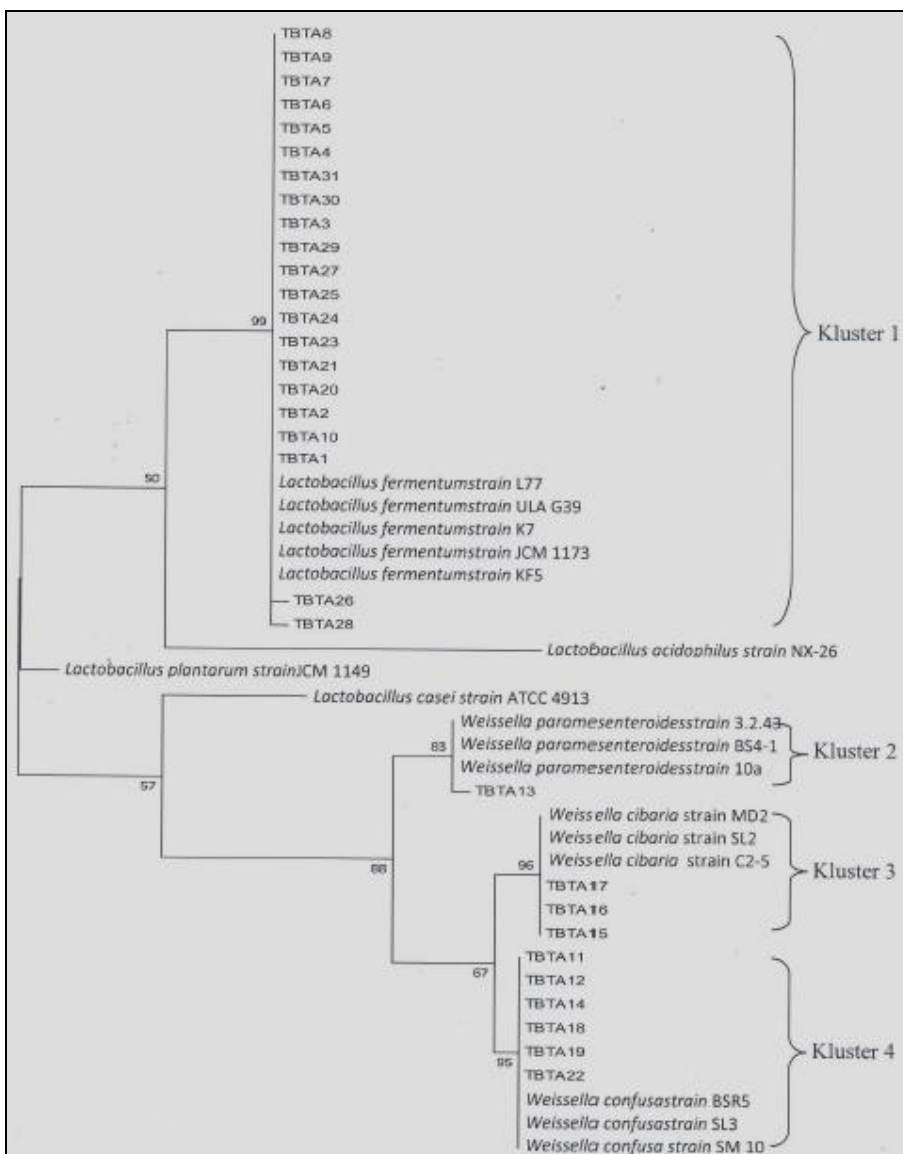
Tabel 2. Kode isolat, Lokasi pengambilan Tapai, Referensi GenBank, dan similaritas (%) hasil BLASTN sekuen gen 16S rRNA BAL dari Tapai

Kode Isolat	Lokasi Pengambilan tapai	Referensi kemiripan	GenBank	Kemiripan (%)
TBTA1	Alam Sutera	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(AF243149.1)	99
TBTA2	Alam Sutera	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(KF030773.1)	100
TBTA3	Alam Sutera	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(KJ690760.1)	100
TBTA4	Alam Sutera	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(KU213668.1)	100
TBTA5	Alam Sutera	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(FJ538527.1)	99
TBTA6	Alam Sutera	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(KY810553.1)	98
TBTA7	Alam Sutera	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(KU213668.1)	100
TBTA8	Alam Sutera	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(EU419591.1)	95
TBTA9	Alam Sutera	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(KU213668.1)	98
TBTA10	Alam Sutera	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(FJ390110.1)	95
TBTA11	Alam Sutera	<i>Weissella confusa</i>	(HF562955.1)	100
TBTA12	Bumi Serpong Damai	<i>Weissella confusa</i>	(KY290603.1)	99
TBTA13	Bumi Serpong Damai	<i>Weissella paramesenteroides</i>	(KY290605.1)	99
TBTA14	Bumi Serpong Damai	<i>Weissella confusa</i>	(KY203672.1)	99
TBTA15	Bumi Serpong Damai	<i>Weissella cibaria</i>	(KX648910.1)	99
TBTA16	Bumi Serpong Damai	<i>Weissella cibaria</i>	(KX648723.1)	100
TBTA17	Bumi Serpong Damai	<i>Weissella cibaria</i>	(HF562958.1)	99
TBTA18	Bumi Serpong Damai	<i>Weissella confusa</i>	(KU324931.1)	97
TBTA19	Bumi Serpong Damai	<i>Weissella confusa</i>	(KF023228.1)	96
TBTA20	Bumi Serpong Damai	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(KU213668.1)	98
TBTA21	Kelapa Gading	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(JN944740.1)	97
TBTA22	Serpong	<i>Weissella confusa</i>	(KF023228.1)	96
TBTA23	Serpong	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(AF243149.1)	99
TBTA24	Serpong	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(KU213668.1)	98
TBTA25	Tanjung Duren	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(KU213668.1)	99
TBTA26	Tanjung Duren	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(CP019030.1)	98
TBTA27	Tanjung Duren	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(KY810538.1)	99
TBTA28	Tanjung Duren	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(KU213668.1)	95
TBTA29	Tanjung Duren	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(KU213668.1)	97
TBTA30	Tanjung Duren	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(KU213668.1)	97
TBTA31	Tanjung Duren	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(KY786098.1)	100

Identifikasi dan Keragaman Genetik Bakteri Asam Laktat



Gambar 1. Visualisasi sekuen gen 16S rRNA bakteri asam laktat dari Tapai.



Gambar 2. Dendrogram dari tiga puluh satu BAL yang diisolasi dari Tapai yang dikonstruksi berdasarkan sekuen gen 16S rRNA menggunakan metode Maximum Likelihood.

Simpulan

Bakteri asam laktat yang paling berlimpah pada Tapai adalah *L. fermentum*, lalu diikuti oleh *W. confusa*, *W. cibaria*, dan *W. paramesenteroides*. *L. fermentum* memiliki kekerabatan paling dekat dengan *W. paramesenteroides*, lalu *W. cibaria*, dan paling jauh dengan *W. confusa*. Sekuen 16S rDNA BAL dapat menunjukkan kekerabatan antar spesies BAL namun belum dapat digunakan untuk menentukan hubungan kekerabatan BAL hingga tingkat *strain*.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada UNIKA Atma Jaya yang telah mendanai penelitian ini melalui hibah Kompetitif 2016.

Daftar Pustaka

- Barus, T. dan Wijaya, L.N. 2011. Mikrobiota dominan dan perannya dalam cita rasa Tapai singkong. *Biota*, 16 (2): 354-361.
- Broadbent, J.R., Barnes, M., Brennand, C., Strickland, M., Houck, K., Johnson, M.E. dan Steele, J.L. 2002. Contribution of *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase specificity to peptide accumulation and bitterness in reduced-fat cheddar cheese. *Appl. Environ Microbiol*, 68: 1778-178.
- Bigelis, R. dan Tsai, S.P. 1995. Microorganisms for organic acid production. Di dalam: Hui YH, Khachatourians GG, editor. *Food Biotechnology: Microorganisms*. Hooboken (US); John Wiley & Son. hlm 239-280.
- Candra, J.I. 2006. Isolasi dan karakterisasi BAL dari produk bekasam ikan bandeng (*Chanos chanos*) [Skripsi]. Bogor: Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Dewi, P.M.P., Besung, I.N.K. dan Mahardika, I.G.N.K. 2015. Keragaman spesies dan genetik bakteri *Staphylococcus* pada ikan tuna dengan analisis sekuen 16S rRNA. *Jurnal Veteriner*, 6 (3): 409-415.
- Dharmayanti, N.L.P.I. 2011. Filogenetika molekuler: metode taksonomi organisme berdasarkan sejarah evolusi. *Wartazoa*, 21 (1): 1-10.
- Drancourt, M., Bollet, C. dan Carlioz, A. 2000. 16S Ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (10): 3623-3630.
- Gilliland, S.E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 7: 175-188.
- Hagedorn, S. dan Kaphammer, B. 1994. Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals. *Ann Rev Microbiol*, 48: 773-800.
- Halasz, A. 2009. Lactic acid bacteria. Di dalam: Lasztity R, editor. *Food quality and standards*, Vol ke-3. Oxford: Eolss.
- Hasanah, H., Jannah, A. dan Fasya, G. 2012. Pengaruh lama fermentasi terhadap kadar alkohol Tapai singkong (*Manihot utilissima* Pohl). *Alchemy*, 2 (1): 68-79.
- Kampas, R. 2008. Keragaan fenotipik morfometrik tubuh dan pendugaan jarak genetik kerbau rawa di Kabupaten Tapanuli Selatan Propinsi Sumatera Utara [Skripsi]. Bogor: Program Studi Teknologi Produksi Ternak, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor.
- Kannan, I. 2016. *Essentials of Microbiology for Nurse*. Haryana: Elsevier.
- Kusmiati, M., Herdiansyah, K.D. dan Nuraeni, S. 2015. Gambaran kadar glukosa dan kolesterol total pada penderita obesitas sebelum dan sesudah mengkonsumsi minuman probiotik. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada*, 14 (1): 48-51.
- Leroy, F. dan Vuyst, L.D. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15: 67-78.
- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J. dan Wade, W.G. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR Primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 64: 795-799.
- Pato, U. 2003. Potensi Bakteri asam laktat yang diisolasi dari dadih untuk menurunkan resiko penyakit kanker. *Jurnal Natur Indonesia*, 592: 162-166.
- Pisol, B., Abdullah, N., Khalil, K.A. dan Nuraida, L. 2015. Isolation and identification of lactic acid bacteria from different stages of traditional Malaysian tempeh production. *Mal J. Microbiol* 11 (4): 358-364.
- Rahayu, W.P., Maoen, S., Suliantari dan Fardiaz, S. 1992. *Teknologi Fermentasi Produk Perikanan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Rodas, A.M., Ferrer, S. dan Pardo, I. 2003. 16S-ARDRA: A tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *J. Syst Appl Microbiol*, 26: 412-422.

Identifikasi dan Keragaman Genetik Bakteri Asam Laktat

- Rukmana, R. dan Yuniarsih, Y. 2007. Aneka olahan ubi kayu. Ed ke-6. Yogyakarta (ID): Kanisius.
- Santosa, A. dan Prakosa, C. 2010. Karakteristik Tapai buah sukun hasil fermentasi penggunaan konsentrasi ragi yang berbeda. *Magistra*, 22 (73): 48-55.
- Stahnke, L.H. 1994. Aroma component from dried sausages fermented with *Stapylococcus xylosus*. *J. Meat Sci*, 38: 39-53.
- Sreekumar, O. dan Hosono, A. 1998. The heterocyclic amine binding receptors of *Lactobacillus gasseri* cells. *Mutat Res.*, 421: 65-72.
- Steinkraus, K. 1996. *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. Ed ke-2. Marcel Dekker Inc. New York.
- Sunjaya, I.N., Amachi, S., Yokota, A., Asano, K. dan Tomita, F. 2001. Identification and characterization of lactic acid bacteria in *ragi Tapai*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17: 349-357.
- Větrovský, T. dan Baldrian, P. 2013. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS ONE*, 8 (2): 1-10.
- Wang, Y. dan Qian, P.Y. 2009. Conseravitive fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS ONE*, 4 (10): 1-9.
- Wiley, E.O. dan Lieberman, B.S. 2011. *Phylogenetics: The Theory and Practice of Phylogenetics Systematics*. John Wiley and Son. New York.