

**Isolasi dan Identifikasi Mikroba pada Ragi Alami dari Fermentasi Kismis Sebagai Kandidat Probiotik**

 <b>Peneliti</b>	 <b>Ringkasan Eksekutif</b>
<p>Ketua : Seprianto, S.Pi, M.Si</p> <p>Anggota : Febriana Dwi Wahyuni, S.Pd, M.Si Dr.Titta Novianti S.Si, M.Biomed</p>	<p>Ragi alami merupakan ragi yang dibuat dari bahan alami hasil fermentasi buah- buahan dan sayuran. Penelitian sebelumnya telah membuktikan penggunaan ragi alami dalam fermentasi roti menghasilkan roti yang mempunyai kadar gizi yang lebih tinggi. Prospek penelitian fermentasi asam laktat dari fermentasi buah-buahan dan sayuran dalam pencarian kandidat probiotik berkenaan dengan nutrisi dan kesehatan manusia. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi jenis yeast yang terdapat pada ragi alami dari fermentasi kismis dan memetakan keragaman genetik mikroba dengan mengaplikasikan daerah <i>Internal Transcribed Spacer</i> (ITS). Hasil penelitian diperoleh tiga kandidat yeast potensial yaitu Isolat RG-PK1, RG-PT1 dan RG-PS1 berdasarkan perbedaan secara morfologi dan uji biokimia selnya. Ketiga Isolat memiliki kemurnian DNA yang baik dengan rasio A260/280 masing – masing isolat RG- PK1 sebesar 2,00 dan isolat RG- PT1 sebesar 1,87 dan Isolat RG-PS1 sebesar 1,69. Hasil amplifikasi sekuen <i>Internal Transcribed Spacer</i> (ITS) menggunakan primer ITS1 dan ITS4 pita DNA berhasil teramplifikasi dengan ukuran <math>\pm</math> 600 bp. Hasil Penelusuran BLAST isolat RG-PK1 teridentifikasi sebagai <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> dengan homologi 99 % Sedangkan Isolat RG-PS1 teridentifikasi sebagai <i>Candida orthopsilosis</i> dengan homology 97% . Hal ini juga diperkuat dengan hasil analisis filogenetik, dimana masing – masing isolat memiliki kekerabatan terdekat dengan satu percabangan yang sama. Konsorsia mikroba yang terdapat pada ragi alami dapat dikembangkan sebagai kandidat probiotik untuk perbaikan kualitas pangan fungsional, terutama pangan fermentasi</p> <p>Keyword: Ragi alami, yeast, ITS, Probiotik, fermentasi</p>
 <b>HKI dan Publikasi</b>	

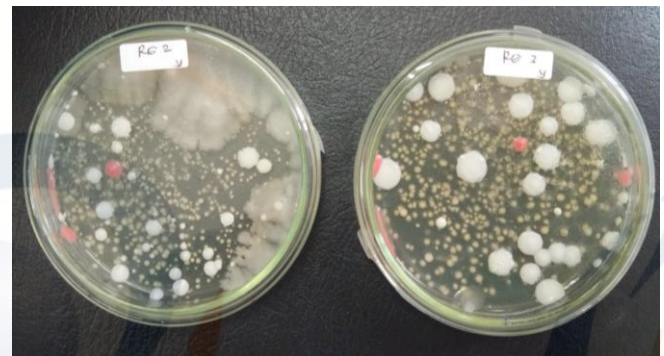
 Latar Belakang	 Hasil dan Pembahasan
<p>Usaha pengembangan pangan fungsional secara alamiah maupun telah mengalami proses, memiliki satu atau lebih senyawa untuk mendapatkan pangan yang berkualitas baik berdasarkan kajian ilmiah dianggap memiliki fungsi fisiologis tertentu yang bermanfaat bagi kesehatan (Herlina dan Nuraini, 2014). Salah satu cara untuk meningkatkan nilai nutrisi dan efek kesehatan suatu produk pangan adalah dengan memberikan tambahan probiotik. Probiotik merupakan mikroba baik yang dapat menstimulasi pertumbuhan mikrobiota dalam sistem gastrointestinal. Berbagai macam penelitian telah membuktikan luasnya potensi probiotik dalam bidang farmakologi, pakan, dan pangan, khususnya pada efeknya dalam mempromosikan kesehatan konsumennya seperti menjaga kesehatan mikrobiota usus, menghambat kanker, menghilangkan kolesterol, dan meningkatkan produksi bakteriosin yang dapat membantu melawan bakteri patogen (Rizal et al., 2016).</p> <p>Produksi pangan probiotik pada dasarnya melibatkan teknik fermentasi. Makanan dan minuman fermentasi memiliki heterogenitas tradisi dan preferensi budaya berbeda disetiap daerah. Fermentasi telah dikenal dari zaman leluhur dalam proses perpanjang daya simpan pangan untuk bertahan hidup pada saat paceklik. Fermentasi adalah proses dekomposisi zat organik yang disebabkan oleh mikroorganisme atau enzim yang pada dasarnya mengubah karbohidrat menjadi alkohol atau asam organik (Swain et al., 2014). Produk probiotik telah menjadi bidang yang berkembang pesat baik di Indonesia maupun global, menjadikan probiotik memberi prospek pasar yang luas dan nilai-nilai sosial. Namun, sumber daya probiotik belum sepenuhnya berkembang. Pembentukan industrialisasi probiotik dan keberadaan produksi skala kecil seperti</p>	<p><b>Ragi Alami dari Fermentasi Kismis</b></p> <p>Ragi alami diperoleh dari hasil fermentasi buah kismis dengan menggunakan madu sebagai substrat. Kismis yang digunakan adalah kismis organik tanpa ada kandungan zat lilin. Jika pada kismis masih terdapat zat lilin akan mempengaruhi hasil fermentasi dan umumnya terjadi kontaminasi dari kapang. Hasil percobaan menggunakan kismis yang dibeli di pasar tradisional dengan waktu inkubasi 5 hari menghasilkan fermentasi dengan bau yang tidak terlalu asam serta adanya kontaminasi yang ditandai warna hitam pekat pada cairan. Sedangkan ragi alami dengan menggunakan kismis organik menghasilkan fermentasi yang baik dengan bau asam yang pekat serta warna kecoklatan dengan derajat keasaman (pH) 3</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div data-bbox="826 976 1150 1256">  </div> <div data-bbox="1182 976 1506 1256">  </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <div data-bbox="874 1294 1110 1323"> <p><b>A. Ragi dengan kismis</b></p> </div> <div data-bbox="1203 1294 1485 1323"> <p><b>B. Ragi dengan kismis</b></p> </div> </div> <p><b>Karakteristik Morfologi dan Uji Biokimia</b></p> <p>Sampel cairan ragi alami di ambil sebanyak 1 mL sebagai stock dalam pengenceran bertingkat. Hasil isolasi yeast diperoleh dengan metode pengenceran bertingkat yang diambil beberapa koloni tunggal dari pengenceran <math>10^{-3}</math>, <math>10^{-4}</math>, <math>10^{-5}</math>. Tujuan dari pengenceran bertingkat yaitu memperkecil atau mengurangi jumlah mikroba yang tersuspensi dalam cairan. Penentuan besarnya atau banyaknya tingkat pengenceran tergantung kepada perkiraan jumlah mikroba dalam sampel (Seprianto, 2017). Dari hasil inokulasi pada dua media yang berbeda yaitu Nutrient Agar (NA) dengan tujuan penapisan terhadap bakteri yang terdapat pada</p>

industri rumah tangga dan kebersihan lingkungan pada umumnya tidak memenuhi persyaratan produk. Dalam banyak contoh, metode produksi makanan fermentasi tradisional yang berbeda tidak diketahui dan diturunkan ke generasi berikutnya sebagai tradisi keluarga. Pengerinan dan penggaraman adalah praktek fermentasi yang umum di Indonesia sebagai metode pelestarian makanan tertua. Proses fermentasi diyakini telah dikembangkan untuk mengawetkan buah-buahan dan sayur-sayuran dalam mempertahankan makanan melalui proses asam organik dan alkohol sehingga memberikan cita rasa dan tekstur yang khas pada makanan, serta mengurangi toksisitas (Rolle dan Satin, 2002).

Ragi alami merupakan salah satu produk fermentasi buah – buahan dan sayuran. Kandungan mikroba dalam ragi alami didominasi oleh mikroba baik dari kelompok bakteri dan yeast. Ragi alami, selain didominasi oleh khamir jenis *Saccharomyces cerevisiae*, serta dari genus yang sama seperti *Saccharomyces exigous*, *Saccharomyces fibuligera*, dan genus lain seperti *Candida milleri*, sedangkan dari kelompok organisme prokariotik seperti bakteri asam laktat yang berasal dari genus *Lactobacillus* dan bakteri dari genus *Acetobacter* yang saling bekerjasama dalam suatu simbiosis yang saling menguntungkan (mutualisme) atau saling tidak merugikan satu sama lain (netralisme). Ragi alami dapat diekstrak dan dikembangkan dari kismis organik. Penggunaan ragi alami ini memiliki banyak manfaat dibandingkan dengan ragi komersil, dimana ragi alami ini dapat menambah kandungan gizi dan karakteristik organoleptik pangan seperti kue dan roti (Poutanen et al, 2009)

Penelitian ini berfokus pada mengidentifikasi serta melihat keragaman genetik konsorsia mikroba yang diisolasi dari ragi alami

ragi alami, akan tetapi tidak ada satupun koloni bakteri yang tumbuh. Hal ini di indikasikan ketidakmampuan bakteri hidup pada pH asam. Hal ini juga diperkuat dengan hasil NGS dimana tidak terdapat DNA bakteri dari sampel metagenomik dengan amplifikasi amplicon 16S rRNA (V3-V4) yang ditargetkan tidak lolos QC (*quality control*). Inokulasi pada media media PDA (Patato Dextrose Agar) yang spesifik untuk yeast dari hasil pengamatan morfologi dari semua koloni yang tumbuh terdapat 3 koloni yang berbeda dengan kode isolat RG-PK1, RG-PT1 dan RG-PS1



Gambar 2. Koloni yeast pada media PDA

### Isolasi DNA Genom Yeast

Isolasi DNA genom ketiga isolat yeast menggunakan *Presto mini gDNA Bacteria Kit* (Geneaid) dengan mengambil sebanyak 3 mL kultur yeast dalam medium *Yeast Malt Broth* (YMB). Hasil isolasi DNA selanjutnya dilakukan pengukuran kemurnian dan konsentrasi masing – masing DNA menggunakan *Nanoquant (TECAN Multimode Reader)*. Tujuan pengukuran ini untuk membandingkan ekstrak DNA dalam satuan nano gram per satu mikroliter pada panjang gelombang A260/280 (ng/μL) berdasarkan nilai absorbansi. Nilai absorbansi berguna untuk mendeteksi kontaminan seperti protein, garam dan polisakarida yang dapat menghambat amplifikasi DNA (Kurniawati dan Hartati, 2018).

Rasio pada pembacaan panjang gelombang 260/280 nm sebesar 1,8 sampai 2,0 menunjukkan

fermentasi kismis dalam pencarian kandidat probiotik untuk pengembangan kualitas pangan fungsional. Isolasi dan Identifikasi dilakukan secara molekuler dengan mengamplifikasi daerah konservatif DNA genom mikroba dengan teknik 16S rRNA. Identifikasi dengan analisis sekuensing gen 16S rRNA dinilai memberikan hasil yang akurat, dan menunjukkan hasil yang dapat digolongkan pada genus atau spesies tertentu (Seprianto et al., 2018). Identifikasi yeast yang tepat dan akurat dibuat dengan menggunakan teknik sekuensing DNA. Variasi urutan dalam gen 18S ribosomal RNA (rRNA), ITS (Internal Transcribed Spacer). Secara luas digunakan untuk mengkarakterisasi keragaman taksonomi yang disajikan dalam komunitas mikroba (Anggraini et al., 2019)

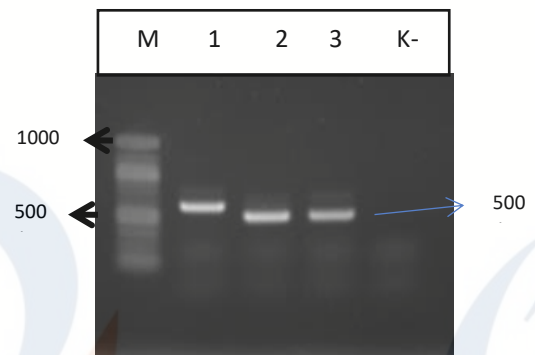
bahwa DNA yang diekstraksi memiliki kemurnian tinggi dengan tidak adanya kontaminasi protein dan fenol (Latif dan Osman, 2017). Hasil pengukuran kemurnian DNA genom menunjukkan kemurnian yang baik dengan rasio A260/280 masing – masing isolat RG- PK1 sebesar 2,00 dan isolat RG-PT1 sebesar 1,87 dan Isolat RG-PS1 sebesar 1,69 (Tabel 2)

Tabel 2. Hasil pengukuran kuantifikasi DNA genom yeast

Kode Isolat	A260 (ng/ $\mu$ l)	A280 (ng/ $\mu$ l)	Konsentrasi (ng/ $\mu$ l)	Kemurnian A260/280
PK20	0,0063	0,0031	6,3	2,00
PT20	0,0029	0,0015	2,9	1,87
PS20	0,005	0,0029	5,0	1,69

Sumber : data primer

Amplifikasi daerah Internal Transcribed Spacer (ITS) dengan primer ITS1 dan ITS4 menggunakan metode Polymerase Chain Reaction (PCR). Hasil PCR berupa pita DNA berhasil teramplifikasi berukuran  $\pm$  600 bp (Gambar 3). Besarnya ukuran pita yang muncul sesuai dengan ukuran yang diharapkan dari amplifikasi primer ITS1 dan ITS4. Menurut Korabecna (2007), bahwa hasil amplifikasi fragmen daerah ITS yeast menggunakan primer ITS1 dan ITS4 memiliki ukuran sekitar 400 hingga 900 bp. Menurut Hidayat et al. (2008) bahwa sekuens ITS memiliki karakteristik unggul yang berukuran kecil (kurang lebih 700 bp). Karakteristik ini menyebabkan sekuens ITS mudah untuk diisolasi, diamplifikasi dan dianalisis.



Gambar 3. Hasil amplifikasi daerah Internal Transcribed Spacer dengan primer ITS1 dan ITS4.

## Metode

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Next Generation Sequencing* Illumina platform Miseq (Illumina, San Diego, US). *thermocycler* PCR, elektroforesis chamber, Gel Doc, mikrosentrifus, mikropipet (0,5-10 $\mu$ l; 10-100  $\mu$ l; 100-1000  $\mu$ l), mikrotub, vortex, inkubator, shaker waterbath, cawan petri, botol steril, tabung reaksi, TECAN multimode reader, autoclaf, laminar air flow dan tips. Sedangkan bahan yang digunakan dalam penelitian ini Ragi alami dari fermentasi kismis, Nutrient Agar (NA), *Yeast Malt Broth* (YMB), *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Presto mini gDNA Bacteria Kit* (Geneaid), PCR mastermixs, Aquabides, Agarose, sybr safe DNA, Ethidium bromide, dan TAE buffer 1x, Marker DNA ladder 1Kb, Sepasang primer universal ITS1-F dengan sekuen (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') dengan

ITS4-R dengan sekuen reverse (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3').

### Pembuatan Ragi Alami Kismis

Sebanyak 100 gr kismis dimasukkan ke dalam toples steril dan ditambahkan 250 ml air yang sudah dimasak (kondisi dingin). Selanjutnya dua sendok madu ditambahkan yang berfungsi sebagai substrat bagi mikroba selama proses fermentasi

### Isolasi Mikroba dari Ragi Alami

Sebanyak 1 ml cairan ragi alami diambil secara aseptis dan dipindahkan kedalam tabung reaksi yang berisi 9 mL akuades steril. Dilakukan pengenceran bertingkat (perbandingan 1:9) dengan  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  dan  $10^{-4}$ . Masing-masing pengenceran diambil sebanyak 0,1 ml untuk dilakukan penanaman pada media padat NA (Nutrient Agar). Sedangkan untuk pertumbuhan yeast menggunakan media *Potato Dextrose Agar* (PDA)

### Pengujian Biokimia

Pengamatan yeast terpilih pada media PDA diidentifikasi secara morfologi seperti pengamatan bentuk sel, warna koloni, ukuran koloni dan tipe koloni. Serangkaian pengujian biokimia juga dilakukan yang meliputi uji pewarnaan Gram, pengamatan bentuk sel, uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), sifat aerobik dan anaerobik, mereduksi nitrat, indole, uji metil red, vages prokauer (MR-VP test), uji cinnamon citrate (CC), hidrolisis urea, uji gula-gula (glukose, celibiose, galaktose, rafinose, salicin, xylose)

### Amplifikasi daerah ITS pada Yeast

Amplifikasi daerah ITS yeast menggunakan primer ITS1 dan ITS4 dengan

Berdasarkan hasil sekuen daerah *Internal Transcribed Spacer* dan hasil penelusuran BLAST dari data GenBank, isolat RG-PK1 teridentifikasi sebagai *Rhodotorula mucilaginosa* dengan homologi 99 % dan nilai E value sama dengan 0.0. Sedangkan Isolat RG-PS1 teridentifikasi sebagai *Candida orthopsilosis* dengan homology 97% dan nilai E value 0.0. Hagstrom et al (2000) menyatakan bahwa organisme yang mempunyai persamaan sekuen lebih besar dari 97% adalah mewakili spesies yang sama. Sedangkan persamaan sekuen antara 93%-97% dapat mewakili identitas pada tingkat genus tetapi berbeda pada tingkat spesies. Analisis BLAST bertujuan untuk mensejajarkan dan mencocokkan hasil sekuensing yang diperoleh dari sampel penelitian dengan data di GenBank. Analisis hasil BLAST tersebut memberikan informasi mengenai bakteri apa yang mempunyai kesamaan dengan urutan DNA sampel sehingga dapat digunakan untuk identifikasi bakteri. Informasi dari hasil BLAST tersebut berupa *Score*, *Query Coverage*, *E-value* dan *Maximum identity*. *Score* adalah jumlah keselarasan semua segmen dari urutan database yang cocok dengan urutan nukleotida.

### Analisis Kekerbatan Isolat Yeast

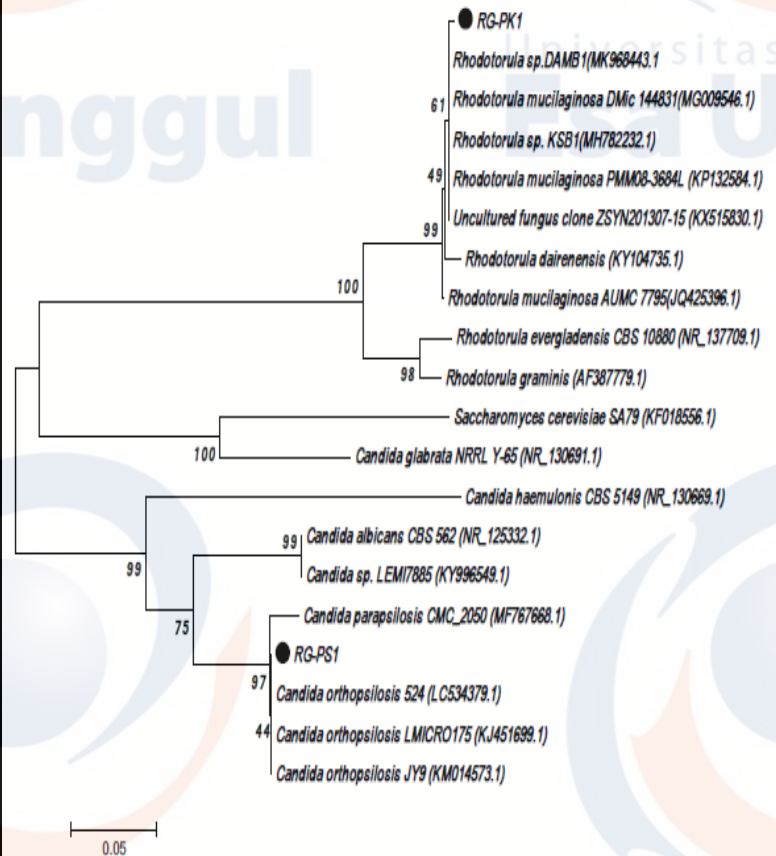
Homologi sekuen daerah *Internal Transcribed Spacer* dari masing-masing isolat yeast dengan sekuens ITS dari database GenBank dapat diketahui bahwa tidak ada sekuens ITS yeast yang identik. Untuk melihat hubungan kekerabatan isolat RG-PK1 dan RG-PS1 dengan beberapa spesies yeast dari hasil BLAST dan beberapa kelompok yeast lain berdasarkan sekens *Internal Transcribed Spacer* sebagai kelompok luar dapat disajikan dalam bentuk pohon filogenetik. Konstruksi pohon filogenetik menggunakan perakat lunak MEGA 7. Hasil analisis pohon filogenetik juga menunjukkan bahwa Isolat RG-PK1 memiliki kekerabatan terdekat dengan *Rhodotorula mucilaginosa* strain DMic 144831 (Acc. MG009546.1) dan Isolat RG-PS1 memiliki kekerabatan terdekat dengan *Candida orthopsilosis* 524 (Acc. LC534379.1).

50  $\mu$ L volume total reaksi PCR. Adapun komponen reaksi PCR yaitu, 1  $\mu$ L DNA genom 30  $\mu$ g/mL, 25  $\mu$ L PCR Taq Green Master Mix2x (Thermo Scientific), 2  $\mu$ L masing-masing primer ITS1 dan ITS4 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O. Amplifikasi PCR dilakukan sebanyak 35 siklus menggunakan Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystem).

### Analisis Kekerabatan Yeast

Hasil PCR disekuon menggunakan Genetic Analyzer (Applied Biosystem) dan hasil sekuen dianalisis menggunakan software bioedit, ClustalX dan MEGA7. Hasil analisis dibandingkan dengan sekuens didata GenBank pada situs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) dengan menggunakan perangkat lunak BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tools for nucleotide*).

Kekerabatan ini dibuktikan dengan terbentuknya pada satu percabangan yang sama seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Konstruksi pohon filogenetik isolat yeast berdasarkan sekuens Internal Transcribed Spacer dengan beberapa spesies yeast lainnya sebagai outgroup

Analisis filogenetik menggunakan metode *Neighbour Joining* yaitu pasangan nukleotida yang mengalami perubahan terkecil diantara sekuen yang telah dibandingkan. Nilai jarak dilambangkan oleh garis skala yang menunjukkan jumlah substitusi nukleotida untuk tiap posisi sekuen. Nilai jarak sebesar 0.05 pada hasil konstruksi pohon filogenetik menunjukkan rendahnya substitusi nukleotida pada sekuen *Internal Transcribed Spacer* pada masing-masing pengelompokan berdasarkan tingkat spesies. Metode Bootstrap digunakan untuk menguji keakuratan suatu titik cabang pohon filogenetik. Stabilitas

	<p>pengelompokkan (robustness) diperhitungkan menggunakan bootstrap dengan 1000 kali ulangan (Xi et al., 2015). Nilai bootstrap sebesar 61 dari 100 kali untuk titik percabangan antara isolat RG-PK1 dengan <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> menunjukkan tingkat kepercayaan yang cukup rendah berdasarkan atas kemiripan kedua sekuen <i>Internal Transcribed Spacer</i> pada yeast tersebut. Rendahnya nilai tersebut kemungkinan disebabkan kurang banyak spesies acuan dari strain yang ada di GenBank (Seprianto et al, 2018). Sedangkan nilai bootstrap sebesar 97 dari 100 kali untuk titik percabangan antara isolat RG-PS1 dengan <i>Candida orthopsilosis</i> mengambarkan cukup tinggi similaritas kedua sekuen yeast tersebut.</p> <p>Dari analisis molekuler dan identifikasi secara morfologi bahwa isolat RG-PK1 teridentifikasi <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> yang ditandai warna koloni merah muda. Yeast ini termasuk sebagai yeast probiotik yang dapat ditemukan pada fermentasi buah dan sayur. Cisse et al, (2019) melaporkan <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> adalah yeast yang banyak digunakan dalam fermentasi pangan terutama berbahan susu dan buah. Sedangkan Isolat RG-PS1 secara analisis molekuler teridentifikasi sebagai spesies <i>Candida orthopsilosis</i>. Menurut Menezes et al (2020). <i>Candida orthopsilosis</i> mampu beradaptasi dengan baik dengan media garam empedu dan toleran terhadap pH rendah (pH 2). Ketahanan terhadap garam empedu sangat penting karena sebagai agen pengemulsi lipid yang dilepaskan ke duodenum setelah menelan makanan, garam empedu garam ini juga memiliki aktivitas antimikroba. Kemampuan inilah dianggap sebagai prasyarat untuk strain probiotik yang memiliki peranan efek menguntungkan pada usus manusia.</p>
<p> <b>Ucapan Terima Kasih</b></p> <p>Terima kasih kepada Universitas Esa Unggul yang telah mendanai dan memfasilitasi penelitian ini lewat skema Hibah Internal LPPM 2020.</p>	<p> <b>Kesimpulan</b></p> <p>Penapisan terhadap mikroba probiotik yang diisolasi dari fermentasi kismis diperoleh tiga kandidat yeast potensial yaitu Isolat RG-PK1, RG-PT1 dan RG-PS1 berdasarkan perbedaan secara morfologi dan uji biokimia selnya. Ketiga Isolat memiliki kemurnian</p>

	<p>DNA yang baik dengan rasio A260/280 masing – masing isolat RG- PK1 sebesar 2,00 dan isolat RG-PT1 sebesar 1,87 dan Isolat RG-PS1 sebesar 1,69. Hasil amplifikasi sekuen <i>Internal Transcribed Spacer</i> (ITS) menggunakan primer ITS1 dan ITS4 pita DNA berhasil teramplifikasi dengan ukuran <math>\pm</math> 600 bp. Hasil Penelusuran BLAST isolat RG-PK1 teridentifikasi sebagai <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> dengan homologi 99 % Sedangkan Isolat RG-PS1 teridentifikasi sebagai <i>Candida orthopsilosis</i> dengan homology 97%</p>
--	--

#### DAFTAR PUSTAKA

- Altschul SF, Gertz EM, Agarwala R, Schäffer AA, Yu YK. 2009. PSI-BLAST: psedocount and the minimum description length principle. *Nucleic Acid Res.* vol 37(3): 815-824. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn981>.
- Anggraini, I., Ferniah, R.S. and Kusdiyantini, E., 2019. Isolasi Khamir dari Batang Tanaman Tebu dan Identifikasinya berdasarkan Sekuens Internal Transcribed Spacer. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBI)*, 6(1), pp.39-52.
- Anandharaj M, Sivasankari B, and Rani RP. 2014. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on hypercholesterolemia: a review,” *Chinese Journal of Biology*, vol. 2014, Article ID 572754, 7 pages. <https://doi.org/10.1155/2014/572754>
- Bachy, C., Dolan, J.R., López-García, P., Deschamps, P. and Moreira, D., 2013. Accuracy of protist diversity assessments: morphology compared with cloning and direct pyrosequencing of 18S rRNA genes and ITS regions using the conspicuous tintinnid ciliates as a case study. *The ISME journal*, 7(2), pp.244-255.
- Battcock M and Azam-Ali S. 2001. *Fermented Fruits and Vegetables: A Global Perspective*, vol. 134
- Boyd AR, Gunasekera TS, Attfield PV, Simic K, Vincent SF, Veal DA (2003) A flow-cytometric method for determination of yeast viability and cell number in a brewery. *FEMS Yeast Res* 3:11-16. <https://doi:10.1111/j.1567-1364.2003.tb00133.x>
- Bower GC., Wright MCH., Falcke H. and Backer DC. 2003. Linear and Circular Polarization from Sagittarius A\* and M81\*. *Astrophysics and Space Science* 288, 69–76 <https://doi.org/10.1023/B:ASTR.0000004995.36315.39>
- Cissé, H., Kagambèga, B., Sawadogo, A., Tankoano, A., Sangaré, G., Traoré, Y., Ouoba, I.I.L. and Savadogo, A., 2019. Molecular characterization of Bacillus, lactic acid bacteria and yeast as potential probiotic isolated from fermented food. *Scientific African*, 6, p.e00175. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00175>
- Chanchaichaovivat, A., Ruenwongsa, P. and Panijpan, B., 2007. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). *Biological Control*, 42(3), pp.326-335. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.05.016>



- Chen YS, Wu HC, Wang CM. 2013. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from pobuzihi (fermented cummingcordia), a traditional fermented food in Taiwan,” *Folia Microbiologica*, vol. 58, no. 2, pp. 103–109, <http://doi:10.1007/s12223-012-0188-4>
- Claverie J, Notredame C. 2003. *Bioinformatics for Dummies*. New York (US). Wiley Publishing Inc
- Cowan and Steel’s. 2004. *Manual for the Identification of Medical Bacteria*. 3<sup>rd</sup> Edition. UK: Cambriage University Press
- Demir N, Bahceci KS, and Acar J. 2006. The effects of different initial *Lactobacillus plantarum* concentrations on some properties of fermented carrot juice,” *Journal of Food Processing and Preservation*, vol. 30, no. 3, pp. 352–363. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2006.00070.x>
- Djide, NJN. and Asri RM, 2019. Skrining Potensi Probiotik Dan Sitotoksik Bakteri *Weisella Confusa* Isolat Dangke Sapi. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, 23(2), pp.58-60.
- Kusumaningati M.A., Nurhatika, S. and Muhibuddin, A., 2013. Pengaruh Konsentrasi Inokulum Bakteri *Zymomonas mobilis* dan Lama Fermentasi Pada Produksi Etanol dari Sampah Sayur dan Buah Pasar Wonokromo Surabaya. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 2(2), pp.E218-E223.
- Kurtzman CP, Fell (2011) *The yeast a taxonomy study. Biodiversity and Ecophysiology of Yeast*. Springer- verlag, Berlin
- Latif, A. and Osman, G., 2017. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods*, 13(1), p.1. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0152-4>
- Menezes, A.G.T., Ramos, C.L., Cenzi, G., Melo, D.S., Dias, D.R. and Schwan, R.F., 2020. Probiotic potential, antioxidant activity, and phytase production of indigenous yeasts isolated from indigenous fermented foods. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(1), pp.280-288. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-9518-z>
- Pervaiz, T., Sun, X., Zhang, Y., Tao, R., Zhang, J. and Fang, J., 2015. Association between Chloroplast and Mitochondrial DNA sequences in Chinese *Prunus* genotypes (*Prunus persica*, *Prunus domestica*, and *Prunus avium*). *BMC plant biology*, 15(1), p.4. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0402-4>
- Poutanen K, Flander L, dan Katina K. 2009. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiology*. 26 (2009). 693–699. <http://doi:10.1016/j.fm.2009.07.011>
- Prado FC, Parada JL, Pandey A, and Soccol CR. 2008. Trends in non-dairy probiotic beverages,” *Food Research International*, vol. 41, no. 2, pp. 111–123 <http://DOI:10.1016/j.foodres.2007.10.010>
- Rismiarti A, Kusumaningrum HP, Zainuri M. Pujiyanto S. 2016. Karakterisasi Dan Identifikasi Molekuler Fusan Hasil Fusi Protoplas Interspesies *Chlorella pyrenoidosa* dan *Chlorella vulgaris* Menggunakan 18SrDNA. *Bioma*. Vol. 18, No. 1, Hal. 30-40 . ISSN: 1410-8801
- Rivero RM, Kojima M, Gepstein M, Blumwald E. 2008. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(49):19631-6 <https://DOI:10.1073/pnas.0709453104>
- Rizal S, Erna M, Nurainy F, dan Tambunan AR. 2016. Karakteristik Probiotik Minuman Fermentasi Laktat Sari Buah Nanas dengan Variasi Jenis Bakteri Asam Laktat.

- J.Kim.Terap.Indones. 8(1). pp. 63-71p-ISSN: 0853-2788, e-ISSN: 2527-7669  
<http://kimia.lipi.go.id/inajac/index.php>
- Rolle R and Satin M. 2002. Basic requirements for the transfer of fermentation technologies to developing countries,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 75, no. 3, pp. 181-187
- Rusilanti. 2006. Aspek Psikososial, Aktivitas Fisik, Konsumsi Makanan, Status Gizi dan Pengaruh Susu Plus Probiotik *Enterococcus faecium* IS-27526 (MEDP) terhadap Respons Imun IgA Lansia.” disertasi, GMK, Sekolah Pascasarjana, IPB, Bogor
- Seprianto. 2017. Isolasi dan Penapisan Bakteri Selulolitik dari Berbagai Jenis Tanah Sebagai Penghasil Enzim Selulase. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 1 (2), 64-70.
- Seprianto, S., Feliatra, F. and Nugroho, T.T., 2018. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik Dari Usus Udang Windu (*Penaeus monodon*) Berdasarkan Sekuens Gen 16S rDNA. *Biogenesis: Jurnal Ilmiah Biologi*, 5(2), pp.83-92.  
<https://doi.org/10.24252/bio.v5i2.3943>
- Větrovský T, Baldrian P. 2013. The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PloS ONE*. vol 8(2): e57923.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057923>.
- Xi Z, Liu L, Davis CC. 2015. Genes with Minimal Phylogenetic Information are Problematic for Coalescent Analyses when Gene Tree Estimation is Biased. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. vol 92: 63-71.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2015.06.009>.
- Wagner, K., Springer, B., Pires, V.P. and Keller, P.M., 2018. Molecular detection of fungal pathogens in clinical specimens by 18S rDNA high-throughput screening in comparison to ITS PCR and culture. *Scientific reports*, 8(1), pp.1-7.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-25129-w>
- Zhao W, Liu Y, Latta M, Ma W, Wu Z and Chen P. 2019. Probiotics database: a potential source of fermented foods, *International Journal of Food Properties*, 22:1, 198-217,  
<https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1579737>