

Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Limbah Cair Sagu dengan Gen 16S rRNA

Pauline Destinugrainy Kasi¹, Ariandi¹, Eka Pratiwi Tenriawaru¹
¹Program Studi Biologi, Fakultas Sains, Universitas Cokroaminoto Palopo
Email: destinugrainy@gmail.com.

Abstract

Lactic Acid Bacteria (LAB) have been isolated from sago wastewater which is obtained directly from the traditional sago processing industry in West Malangke, South Sulawesi. Pure LAB isolate were obtained from sago wastewater samples, each from sago wastewater stored for 1 day (F1). This study aims to identify LAB isolate from sago wastewater using the 16S rRNA gene. DNA extraction was performed using Genaid Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit GBB100, then the sample was amplified using 16S rRNA primers (16sRNA-F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' and 16S RNA-R 5'-GTTTACCTTGTACGACTT-3') with a base length of 1300 base pair. The amplified sample is then sequenced to 1st Base, and analyzed further with Clustal W and MEGA6 program to construct phylogenetic tree. Based on phylogeny analysis, neighbour-joining method, the F1 isolate was *Lactobacillus mali* which showed 100% similarity with *Lactobacillus mali* DSM 20444.

Key Words : Lactic Acid Bacteria, Sago Wastewater, *Lactobacillus mali*. Phylogeny, 16S rRNA.

Abstrak

Bakteri Asam Laktat (BAL) telah diisolasi dari limbah cair sagu yang diperoleh langsung dari industri pengolahan sagu tradisional di Malangke Barat, Sulawesi Selatan. Isolat murni BAL diperoleh dari sampel limbah cair sagu, masing-masing dari limbah cair sagu yang disimpan selama 1 hari (F1). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi BAL dari limbah cair sagu dengan menggunakan gen 16S rRNA. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan Genaid Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit GBB100, kemudian sampel diamplifikasi menggunakan primer 16S rRNA (16sRNA-F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' dan 16S RNA-R 5'-GTTTACCTTGTACGACTT-3') dengan panjang basa 1300 bp. Sampel yang telah diamplifikasi kemudian disekuensing ke 1st Base. Hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa isolat F1 merupakan spesies *Lactobacillus mali* dengan similaritas 100% dengan *Lactobacillus mali* DSM 20444.

Kata kunci : Bakteri Asam Laktat, Limbah Cair Sagu, *Lactobacillus mali*, filogeni, 16S rRNA

Pendahuluan

Indonesia merupakan salah satu negara penghasil sagu terbesar di dunia. Secara alami, sagu tersebar hampir di setiap kepulauan di Indonesia dengan luasan terbesar di Papua, sedangkan semi budidaya terdapat di Maluku, Sulawesi, Kalimantan dan Sumatera. Sekitar 4-5% (210.000 ton/h) dari produksi sagu di Indonesia digunakan sebagai bahan pangan dalam negeri (Syakir & Karmawati, 2013). Tahapan proses ekstraksi tepung sagu secara umum meliputi: penebangan pohon, pemotongan dan pembelahan, penokokan atau pamarutan, pemerasan, penyaringan, pengendapan dan pengemasan. Proses pengolahan tepung sagu biasanya dilakukan dekat sumber air seperti di pinggir sungai ataupun anak sungai, karena di dalam proses ini dibutuhkan banyak air (Awg-Adeni *et al.*, 2010). Pengolahan sagu secara tradisional dan semi mekanis masih kurang memperhatikan aspek kebersihan, sehingga memungkinkan masuknya berbagai jenis bakteri selama proses pengolahan. Hal tersebut menyebabkan kualitas pati sagu pun menjadi rendah (Ahmad *et al.*, 1999). Banu *et al.* (2006) mengemukakan bahwa dari hasil pengolahan tepung sagu, terdapat limbah yang dihasilkan yaitu limbah cair sagu. Dalam produksi tepung

sagu dibutuhkan 20.000 liter air per ton sagu, jadi dapat diperkirakan air yang dibutuhkan 9.000.000 kl air/tahun, yang mana 94% air tersebut akan menjadi limbah cair. Awg-Adeni *et al.* (2010) menyebutkan bahwa limbah cair yang dihasilkan dalam produksi sagu sekitar 8.460.000 kl air/tahun. Limbah cair sagu yang bersifat asam langsung dialirkan ke sungai sehingga dapat mengganggu aliran sungai dan menyebabkan pencemaran (Zaimah & Prihastanti, 2012). Sejauh ini limbah cair sagu belum banyak dimanfaatkan, baik sebagai sumber mikroorganisme potensial maupun pemanfaatan lainnya. Di samping itu, informasi mengenai bakteri potensial di dalam limbah cair sagu masih terbatas.

Kasi *et al.*, (2017) telah melakukan isolasi dan karakterisasi Bakteri Asam Laktat (BAL) *indigenous* dari limbah cair sagu yang diperoleh langsung dari industri pengolahan sagu tradisional di Malangke Barat, Sulawesi Selatan. Sampel limbah cair sagu disimpan selama 1 hari dan mengalami fermentasi spontan. Morfologi koloni isolat F1 adalah berwarna putih susu dan berbentuk bulat dengan tepian rata. Isolat F1 merupakan bakteri gram positif, non motil dan bersifat katalase negatif. Selanjutnya dilakukan uji antibakteri terhadap bakteri patogen *Escherichia coli* (bakteri gram negatif) dan *Staphylococcus*

aureus (bakteri gram positif) menunjukkan terbentuknya zona penghambatan pada kedua bakteri uji. Hal ini menunjukkan bahwa isolate BAL tersebut mempunyai potensi sebagai antagonis terhadap *E. coli* dan *S. aureus*. Isolat BAL tersebut akan diidentifikasi secara genotipik dengan melakukan analisis molekuler menggunakan gen 16S rRNA, sehingga diketahui jenis dan hubungan kekerabatannya dengan Bakteri Asam Laktat lainnya.

Identifikasi genotipik pada bakteri menghasilkan reproduktibilitas yang tinggi dan informasi lebih akurat dibandingkan dengan identifikasi fenotipik. Hubungan filogenitas bakteri dapat ditentukan pada daerah gen 5S, 16S, 23S rRNA. RNA ribosomal merupakan penanda molekuler yang paling banyak digunakan dalam analisis genomik (Pangastuti, 2006). 16s rRNA memiliki keakuratan tinggi dalam menentukan taksonomi suatu bakteri dan memiliki urutan basa 1500-1550 pasang basa. Alasan lain yang menyebabkan penggunaan 16S rRNA karena molekul tersebut memiliki beberapa daerah yang memiliki urutan basa yang relatif konservatif dan beberapa daerah lainnya variatif. Perbandingan urutan basa yang konservatif berguna untuk mengkonstruksi pohon filogenetik universal karena mengalami perubahan relatif lambat dan mencerminkan kronologi evolusi bumi. Urutan basa yang bersifat variatif dapat digunakan untuk melacak keragaman dan menempatkan galur-galur dalam satu spesies. Gen penyandi 16S rRNA juga bersifat unik sehingga dapat dirancang primer universal untuk seluruh kelompok (Pangastuti, 2006). Analisis 16S rRNA digunakan untuk melihat hubungan di antara spesies-spesies pada banyak kelompok bakteri apabila sekuen nukleotida dari gen 16s rRNA antara dua tipe organisme yang mirip atau memiliki sedikit perbedaan basa dalam rRNA, maka ditinjau dari kedekatan secara evolusinya kemungkinan dua organisme tersebut memiliki kekerabatan yang dekat (*common ancestor*). Hubungan kekerabatan antara organisme dapat disajikan melalui pohon filogenetik atau pohon evolusi. Dalam mengkonstruksi pohon filogenetik dapat menggunakan beberapa metode, antara lain *maximum likelihood* dan *neighbor-joining* (Dharmayanti, 2011).

Analisis filogenetik terdiri atas tiga tahapan penting yaitu *sequence alignment*, rekonstruksi pohon filogenetik, dan evaluasi pohon filogenetik dengan uji statistik (Hidayat & Pancoro, 2008). *Sequence alignment* adalah proses penyusunan/pengaturan dua atau lebih urutan sehingga persamaan urutan-urutan tersebut tampak nyata. *Sequence alignment* dapat dilakukan dengan menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), Clustal W, dan Clustal X (Fatchiyah, 2015). Rekonstruksi pohon filogenetik dapat dilakukan dengan

menggunakan program komputer *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) 6 (Tamura *et al.*, 2013).

Metode Penelitian

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan Juli 2018. Isolat BAL diperoleh dari limbah cair sagu yang telah difermentasi selama 1 hari. Sebanyak 1 ml limbah cair sagu, masing-masing dimasukkan ke dalam 9 ml larutan garam fisiologis (NaCl) 0,85%. Selanjutnya dibuat pengenceran bertingkat 10^{-1} – 10^{-6} lalu diinokulasikan pada media MRSA (de Man Rogosa Sharpe Agar) dan CaCO₃ 0,5% serta diinkubasi dalam *anaerobic jar* pada suhu ruang selama 48 jam. Isolat yang membentuk zona bening pada media kemudian dimurnikan. Isolat murni yang diperoleh dinokulasikan pada media agar miring MRS sebagai stok. Sampel isolat BAL yang menunjukkan karakteristik koloni berwarna putih susu, berbentuk bulat dengan tepian rata, katalase negatif dan gram positif, dan memiliki daya hambat terhadap *E. coli* dan *S. aureus* dimurnikan untuk dianalisis lebih lanjut secara molekuler (Kasi *et al.*, 2017). Sampel isolat murni BAL dikultivasi di Laboratorium Sel dan Jaringan Fakultas Sains, Universitas Cokroaminoto Palopo. Selanjutnya isolasi DNA, amplifikasi PCR dan sekuensing oleh 1st base dilakukan di Laboratorium Pengujian Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Bogor.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah isolat F1 dari limbah cair sagu yang diambil dari pengolahan sagu tradisional di Kecamatan Malangke Barat, Kab. Luwu Utara, medium MRS padat, medium MRS cair, kit Presto Mini gDNA Bacteria Geneaid GBB100, primer 16sRNA-F = 5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 dan 16sRNA-R=5-GTTTACCTTGTTACGACTT-3, serbuk agarosa, TAE Buffer dan Etidium bromide.

Alat yang digunakan antara lain tabung reaksi, tabung Eppendorf, shaker, waterbath, collection tube, sentrifus, micropipette, neraca analitik, spektrofotometer, mesin PCR, tangki elektroforesis, tip supply, perangkat lampu UV, dan *software* MEGA6.

Ekstraksi DNA dan Amplifikasi DNA dengan Metode PCR

Kultur murni isolate BAL F1 diremajakan pada media agar MRS dan diinkubasikan selama 24-48 jam sebelum diekstraksi. Sebelum dilakukan ekstraksi DNA, isolat BAL F1 dikulturkan pada media MRS Broth. Ekstraksi DNA genom dilakukan dengan mengikuti protokol ekstraksi

DNA yang terdapat di dalam Presto Mini gDNA Bacteria kit Geneaid. Sampel dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuge kemudian ditambahkan larutan gram+buffer, enzim lysozyme dan proteinase. Pengikatan DNA menggunakan etanol absolut dalam kolom GD dan dilanjutkan dengan pencucian menggunakan buffer. Tahapan akhir dalam ekstraksi DNA adalah elusi menggunakan *elution buffer*.

Selanjutnya sampel DNA diamplifikasi dengan metode PCR menggunakan gen 16S rRNA. Sekuen untuk primer adalah 16sRNA-F = 5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 dan 16sRNA-R = 5-GTTTACCTTGTACGACTT-3. Amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus dengan setiap siklus terdiri atas Pre-denaturasi 95°C selama 3 menit 1 siklus, denaturasi 95°C selama 15 detik, annealing 50°C selama 15 detik, ekstensi 72°C selama 15 detik, dan ekstensi akhir 72°C selama 1 menit.

Deteksi Produk PCR dengan elektroforesis

Gel agarosa 1,5% dibuat dengan mencampurkan 1,5 g serbuk agarosa ke dalam 100 mL TAE Buffer di Erlenmeyer kemudian dipanaskan ke dalam microwave selama 2 menit hingga mendidih, lalu ditambahkan 8 µL Ethidium Bromida. Cairan gel lalu didinginkan di suhu kamar. Setelah agak dingin, cairan gel dituang ke cetakan gel elektroforesis dengan menggunakan sisir gel. Masing-masing 5µL produk amplifikasi dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 1,5% yang terendam dalam langki yang berisi TAE Buffer. Selanjutnya elektroforesis dijalankan selama 50 menit dengan tegangan konstan 100 volt. Setelah 50 menit elektroforesis dihentikan dengan gel diangkat untuk diamati di bawah sinar UV. Hasil positif jika terdapat pita DNA yang sejajar dengan marker 1300 bp dan negative jika tidak terdapat pita pada gel.

Sekuensing DNA

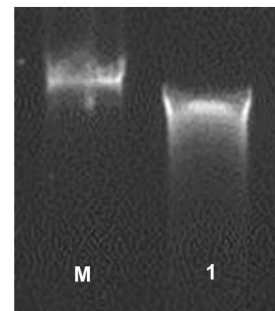
Produk PCR dari sampel yang menunjukkan hasil elektroforesis positif dilakukan sekuensing DNA oleh 1st Base. Proses sekuensing DNA dilakukan menggunakan metode Sanger dideoksi.

Analisis Urutan DNA Pengkode 16S rRNA

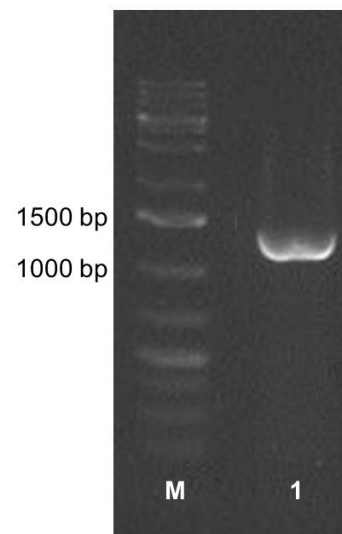
Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan menggunakan BLAST urutan nukleotida dari hasil sekuensing 16S rRNA dengan data base yang tersedia di situs www.ncbi.nlm.nih.gov. yang digunakan untuk mencari similiaritas suatu sekuens nukleotida atau protein. Pensejajaran dan visualisasi kekerabatan menggunakan pohon filogenetik berdasarkan "neighbor-joining method" dilakukan dengan menggunakan program MEGA 6.

Hasil dan Pembahasan

Upaya identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dengan menggunakan metode genotipik merupakan metode yang dianggap lebih akurat dibandingkan metode fenotipik. Identifikasi genotipik diawali dengan melakukan isolasi DNA genom dari BAL menggunakan Presto Mini gDNA Bacteria Geneaid GBB100. Visualisasi genom DNA BAL disajikan dalam Gambar 1, sedangkan visualisasi produk PCR menggunakan elektroforesis, dimana isolat F1 menunjukkan pita DNA pada panjang kurang lebih 1300 pasangan basa (Gambar 2).



Gambar 1. Profil DNA *whole genom* Bakteri BAL. (M) Marker λ -DNA, (1) DNA F1



Gambar 2. Hasil PCR DNA BAL menggunakan primer 16s rRNA. (M) Marker 1 kb plus ladder, (1) isolat F1

Komposisi nukleotida penyusun DNA pengkode 16S rRNA setiap isolat BAL berbeda sehingga dilakukan analisis kekerabatan menggunakan program BLAST-N (*Basic Local Alignment Search Tool-Nucleotide*) yang dapat diakses secara *online* dari website NCBI. Berdasarkan analisis program BLAST-N diketahui homologi spesies isolat F1 sebagaimana pada Tabel 1. *Query cover* adalah presentasi dari panjang nukleotida yang selaras dengan database yang terdapat di BLAST. Sedangkan identitas maksimal adalah nilai tertinggi dari

persentasi identitas atau kecocokan antara sekuen *query* dengan sekuen database yang tersejajarkan (Miller *et al.*, 1990). Isolat F1 memiliki kemiripan/similaritas dengan *Lactobacillus mali* DSM20444 (89%), *Lactobacillus satsumensis* (89%), *Lactobacillus nagelii* (88%), *Lactobacillus algidus* (88%), *Lactobacillus ruminus* (87%) dan *Lactobacillus acidifarinae* (87%). Masing-masing memiliki *query cover* di atas 80%.

Hasil analisis kekerabatan dengan BLAST-N dilanjutkan dengan analisis pohon filogenetik menggunakan program MEGA 6. Analisis pohon filogenetik bertujuan untuk mengkonstruksi dengan tepat hubungan antara organisme dan mengestimasi perbedaan yang terjadi dari satu nenek moyang kepada keturunannya (Li *et al.*, 1999). Gen 16S rRNA banyak digunakan untuk konstruksi pohon filogenetik karena urutan basa nukleotida di antara molekul-molekul rRNA dapat dibandingkan dengan tepat, sehingga memudahkan untuk mengidentifikasi keragamannya (Madigan *et al.*, 2010).

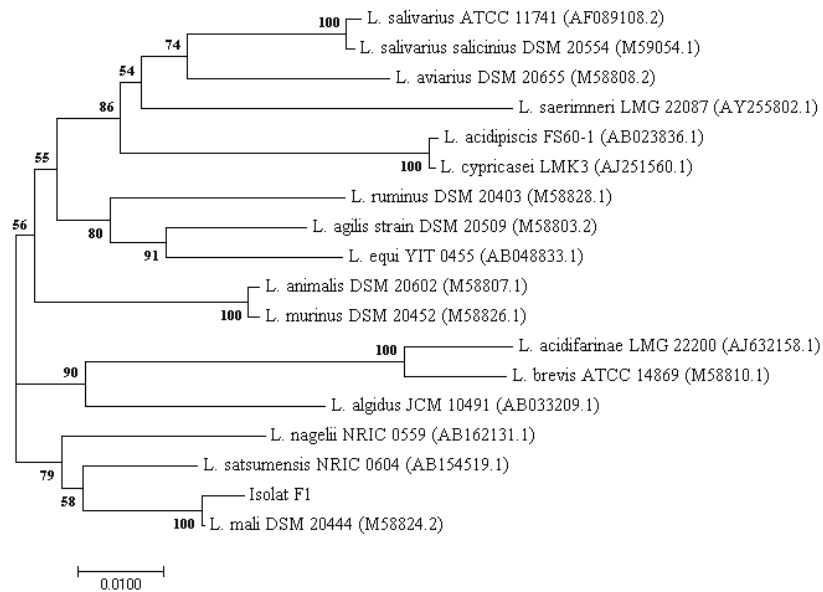
Tahapan pertama adalah melakukan *alignment* sekuen isolat F1 dengan beberapa isolat yang diperoleh dari GenBank menggunakan Clustal W. Selanjutnya dilakukan pembuatan pohon filogeni dengan metode *neighbor-joining*, *bootstrap* 1000x dan metode *p-distance*. Dharmayanti (2011) menyebutkan bahwa metode *neighbor-joining* memiliki sekuen yang jika digabungkan akan memberikan estimasi terbaik dari panjang cabang yang paling dekat merefleksikan jarak nyata di antara sekuen. Pangastuti (2006) mengemukakan bahwa similaritas basa nukleotida kurang dari 97% menunjukkan spesies yang berbeda. Hasil analisis pohon filogenetik menunjukkan bahwa isolat F1 memiliki similaritas 100% dan jarak genetik 0.00 dengan *Lactobacillus mali* DSM 20444 (Gambar 3 dan Tabel 2). *Lactobacillus mali*

merupakan bakteri gram positif yang bersifat anaerobik fakultatif dan motil. Beberapa strain *Lactobacillus mali* kemudian ditemukan, salah satunya adalah *Lactobacillus mali* APS1 yang berperan dalam homeostasis glukosa pada tikus yang mengalami obesitas (Lin *et al.*, 2016). Selain berpotensi sebagai probiotik, *Lactobacillus mali* juga berperan dalam pembentukan selulosa eksternal jika dikulturkan bersama dengan *Gluconacetobacter xylinus* (Sato *et al.*, 2006). Selain *Lactobacillus mali*, isolat F1 juga memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Lactobacillus satsumensis* NRIC 0604 dengan similaritas 98% dan jarak genetik 0,02, serta similaritas 97% dengan jarak genetik 0,03 dengan *Lactobacillus nagelii* NRIC 0559. *Lactobacillus satsumensis* diisolasi dari *sochu*, minuman Jepang hasil fermentasi beras dan beberapa material berpati lainnya. *Lactobacillus satsumensis* merupakan bakteri gram positif, anaerobik fakultatif, katalase negatif dan berbentuk basil dan memiliki flagella peritrichous. (Endo & Okada, 2005). Kedekatan jarak genetik tersebut juga ditunjukkan pada pohon filogeni dimana *Lactobacillus nagelii* NRIC 0559, *Lactobacillus satsumensis* NRIC 0604, *Lactobacillus mali* DSM 20444, dan isolat F1 membentuk klad yang sama dan terpisah dengan spesies pembanding lainnya.

Isolat F1 diidentifikasi sebagai *Lactobacillus mali* karena memiliki kedekatan genetik tertinggi dengan *Lactobacillus mali* DSM 20444 dibandingkan dengan *Lactobacillus nagelii* NRIC 0559 dan *Lactobacillus satsumensis* NRIC 0604. Hal ini ditunjukkan oleh isolat F1 yang membentuk klad terpisah bersama *Lactobacillus mali* DSM 20444 dan dengan similaritas 100% serta nilai *bootstrap* 100 pada percabangannya. Perbedaan antara kedua bakteri ini dengan isolat F1 adalah pada sifat motilitas. Isolat F1 merupakan bakteri dengan sifat non motil.

Tabel 1. Hasil analisis sekuen DNA pengkode gen 16S rRNA dari isolat BAL F1 menggunakan program BLAST-N

Spesies BAL homolog	Query coverage (%)	Identitas maksimal (%)	Kode Akses
<i>Lactobacillus mali</i> DSM20444	90	89	M58824.2
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	87	89	AB154519.1
<i>Lactobacillus nagelii</i>	86	88	AB162131.1
<i>Lactobacillus algidus</i>	87	88	AB033209.1
<i>Lactobacillus salivarius</i> strain ATCC 11741	76	90	AF089108.2
<i>Lactobacillus salivarius salicinii</i>	76	89	M59054.1
<i>Lactobacillus agilis</i> strain DSM 20509	87	86	M58803.2
<i>Lactobacillus ruminus</i>	84	87	M58828.1
<i>Lactobacillus saerimneri</i>	77	89	AY255802.1
<i>Lactobacillus egui</i>	76	89	AB048833.1
<i>Lactobacillus acidifarinae</i>	85	87	AJ632158.1
<i>Lactobacillus animalis</i>	77	88	M58807.1
<i>Lactobacillus sp. LMK3</i>	77	89	AJ251560.1
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14869	75	89	M58810.1
<i>Lactobacillus murinus</i>	77	87	M58826.1
<i>Lactobacillus aviaries</i> strain DSM 20655	77	87	M58808.2
<i>Lactobacillus sp. FS60-1</i>	73	88	AB023836.1



Gambar 3. Pohon filogenetik berdasarkan sekuen DNA pengkode 16S rRNA isolat F1 dibandingkan dengan sekuen DNA pengkode 16S rRNA bakteri asam laktat dari genus *Lactobacillus*. Angka menunjukkan nilai *bootstrap*.

Tabel 2. Hasil pensejajaran (*alignment*) isolat F1 dengan beberapa spesies BAL dari genus *Lactobacillus* menggunakan metode *neighbor-joining*.

Spesies BAL homolog	Jarak	Similiaritas
<i>L. mali</i> DSM 20444 (M58824.2)	0.00	100
<i>L. satsumensis</i> NRIC 0604 (AB154519.1)	0.02	98
<i>L. nagelii</i> NRIC 0559 (AB162131.1)	0.03	97
<i>L. agilis strain</i> DSM 20509 (M58803.2)	0.04	96
<i>L. algidus</i> JCM 10491 (AB033209.1)	0.04	96
<i>L. animalis</i> DSM 20602 (M58807.1)	0.04	96
<i>L. aviarius</i> DSM 20655 (M58808.2)	0.04	96
<i>L. equi</i> YIT 0455 (AB048833.1)	0.04	96
<i>L. murinus</i> DSM 20452 (M58826.1)	0.04	96
<i>L. ruminus</i> DSM 20403 (M58828.1)	0.04	96
<i>L. salivarius</i> ATCC 11741 (AF089108.2)	0.04	96
<i>L. salivarius salicinius</i> DSM 20554 (M59054.1)	0.04	96
<i>L. acidifarinae</i> LMG 22200 (AJ632158.1)	0.05	95
<i>L. acidipiscis</i> FS60-1 (AB023836.1)	0.05	95
<i>L. brevis</i> ATCC 14869 (M58810.1)	0.05	95
<i>L. cypricasei</i> LMK3 (AJ251560.1)	0.05	95
<i>L. saerimneri</i> LMG 22087 (AY255802.1)	0.05	95

Simpulan

Identifikasi genotipik berdasarkan sekuen DNA pengkode gen 16S rRNA terhadap Bakteri Asam Laktat isolat F1 yang diisolasi dari limbah cair sagu merupakan bakteri dalam genus *Lactobacillus*. Hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa isolat F1 merupakan spesies *Lactobacillus mali* dengan similaritas 100% dengan *Lactobacillus mali* DSM 20444.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai oleh DIPA Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi berdasarkan Surat Perjanjian Pelaksanaan Program Hibah Penelitian Dosen Pemula Tahun 2017 Nomor 1520/K9/KT.03/2017, dan atasnya diucapkan terima kasih.

Daftar Referensi

- Ahmad, F.B., P.A. Williams, J.L. Doublier, S. Durand, A. Bulb. 1999. Physico-chemical characterization of sago starch. *Carbohydr Polym.* 38:361-370.
- Awg-Adeni, DS., S. Abd-Aziz, K. Bujang & M.A. Hassan. 2010. Bioconversion of Sago Residue Into Value Added Products, *African Journal of Biotechnology*, 14(9): 2016-2021.
- Banu, J.R., S. Kaliappan & D. Beck. 2006. Treatment of Sago Wastewater Using Hybrid Anaerobic Reactor, *Chemical Engineering Journal*, 1(41): 415-421.
- Dharmayanti, N.L.P.I. 2011. Filogenetika molekuler: metode taksonomi organisme berdasarkan sejarah evolusi. *Wartazoa* 21(1): 1-10.
- Endo, A. & S. Okada. 2005. *Lactobacillus satsumensis* sp. nov., isolated from mashes of shochu, a traditional Japanese distilled spirit made from fermented rice and other starchy materials. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 83-85.
- Fatchiyah. 2015. *Prinsip Dasar Bioinformatika*. Universitas Brawijaya Press. Malang.
- Hidayat, T. & A. Pancoro. 2008. Kajian Filogenetika Molekuler dan Peranannya dalam Menyediakan Informasi Dasar untuk Meningkatkan Kualitas Sumber Genetik Anggrek. *Jurnal AgroBiogen*, 4 (1): 35-40.
- Kasi, P.D., Ariandi & H. Mutmainnah, 2017^a. Isolation and Characterization of Indigenous Lactic Acid Bacteria from Sago Wastewater. Proceeding The 4th ISS-2017. Bogor Indonesia. 19-20 Oktober 2017.
- Kasi, P.D., Ariandi & H. Mutmainnah. 2017^b. Uji Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Limbah Cair Sagu Terhadap Bakteri Patogen. *Biotropika* 5(3) : 97-101.
- Lin, Y., Y. Chen, H. Hsieh & M. Chen. 2016. Effect of *Lactobacillus mali* APS1 and *L. kefiranofaciens* M1 on obesity and glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Journal of Functional Foods* 23: 580-589.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko & J. Parker. 2010. *Brock Biology of Microorganism*. Prentice Hall Inc. Upper Saddle River.
- Miller, G.A., R. Baekwith, C. Fellbaum, D. Gross & K. Miller. 1990. Introduction to WordNet: an on-line lexical database. *International Journal of Lexicography* 3: 235-312.
- Pangastuti, A. 2006. Defenisi spesies prokaryota berdasarkan urutan basa gen penyandi 16s rRNA dan gen penyandi protein. *Jurnal Biodiversitas* 7(3): 292-296
- Sato, A., Y. Saito, M. Matsushige, H. Kobayashi, Y. Sasaki, N. Tonouchi, T. Tsuchida, F. Yoshinaga, K. Ueda & T. Beppu. 2006. Effective cellulose production by a coculture of *Gluconacetobacter xylinus* and *Lactobacillus mali*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73 (4) : 915-921.
- Syakir, M & E. Karmawati. 2013. Potensi tanaman sagu (*Metroxylon* spp.) sebagai bahan baku bioenergi. *Perspektif* Vol 12 No. 2 : 57-64.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, & S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (12): 2725-2729.
- Zaimah, F & E. Prihastanti. 2012. Uji Penggunaan Kompos Limbah Sagu terhadap Pertumbuhan Tanaman Strawberry (*Fragaria vesca* L.) di Desa Plajan, Kab. Jepara. *Buletin Anatomi dan Fisiologi* Vol XX (1) : 18-28.