

## Identifikasi Molekular Bakteri Glukanolitik Indigenous KE-B6 dari Saluran Pencernaan Bekicot (*Achatina fulica*)

WIJANARKA\*, SRI PUJIYANTO, BUDI RAHARJO

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang, Jawa Tengah

Diterima: 30 Mei 2019 - Disetujui: 04 September 2019  
© 2019 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Cenderawasih

### ABSTRACT

Glucanolytic bacteria are bacteria that have the ability to break down glucan into glucose monomer units. The ability of the bacteria is caused by the presence of glucanase enzymes. The choice of glucanase derived from bacteria is based on the ability and speed of bacterial growth in terms of producing glucanase enzymes. The presence of bacteria and protozoa in the digestive tract symbiotic with each other to digest cellulose or concomitant materials. Based on the ability of the way of life to digest forage and leaf litter, it is suspected that snails (*Achatina fulica*) have the ability to produce glucanase biocatalysts, especially in the digestive tract. To find out the characteristics and characteristics of indigenous bacteria snail canals, identification of KE-B6 bacteria is carried out molecularly so that accurate and accurate results are obtained. The *Basic Alignment Search Tools* BLAST results of KE-B6 bacterial isolates based on 16S rDNA sequence data with 27F (Forward) and 1492R (Reverse) primers showed that these bacterial isolates had homology of 99.64% to *Serratia marcescens*.

**Key words:** bacteria, glucanolytic, *A. fulica*, *Serratia marcescens*.

### PENDAHULUAN

Bekicot (*Achatina fulica* Ferussac) merupakan hewan avertebrata yang digolongkan sebagai hewan lunak dan berjalan dengan perutnya serta termasuk dalam Klas Moluska. Menurut Berniyanti (2007) mengatakan bahwa Glycosaminoglycans (GAGs) atau yang dikenal sebagai glikoprotein sebagai penyusun *achasin* yang terdapat dalam lendir bekicot (*A. fulica*). Menurut Ezeronye and Okerentugba (2001) bahwa usus

pada saluran bekicot menghasilkan enzim  $\beta$  glukoronidase, endo dan  $\beta$  glukonase dan arylsulphatase. Enzim-enzim tersebut secara normal ada di dalam saluran pencernaan (usus) dan mampu digunakan untuk isolasi protoplas (Wijanarka, 2013).

Bakteri glukanolitik merupakan bakteri yang mampu menghasilkan enzim (biokatalis) glukonase, baik sebagai ekso- $\beta$ -1-3-glukanase (EC.3.2.1.58) dan endo- $\beta$ -1-3-glukanase (EC. 3.2.1.39) (Sena *et al.*, 2011). Adanya enzim tersebut dapat dan mampu memecah atau menghilangkan dinding sel mikroba khususnya khamir (*yeast*) yang sebagian besar didominasi oleh glukon. Dengan demikian maka akan didapatkan protoplas sesuai yang diinginkan.

Bakteri glukanolitik merupakan salah satu bakteri yang mampu menghasilkan enzim glukonase. Enzim ini mampu memecah dinding

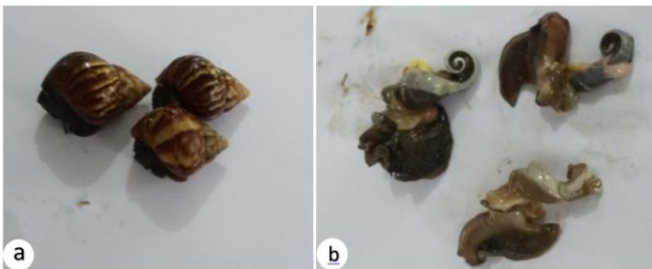
---

\* Alamat korespondensi:

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika  
Universitas Diponegoro. Jl. Prof. Soedarto SH, Kampung  
Tembalang Semarang, Jawa Tengah. 50275.  
E-mail : wikasmara@yahoo.co.id.  
Telp./HP: +62 82220937946

Tabel 1. Keragaman isolat bakteri yang ditemukan pada saluran pencernaan bekicot (*A. fulica*).

No.	Kode Isolat	Ciri-ciri	Aktivitas enzim (IU)
1.	KE-B1	Ireguler, bulat, putih, mengkilat, diameter 0,1 mm	0,17
2.	KE-B2	Reguler, bulat, putih, mengkilat, diameter 0,09 mm	0,23
3.	KE-B3	Bulat, putih, tranparan, mengkilat, diameter 0,12 mm	0,15
4.	KE-B4	Ireguler, putih susu, mengkilat, diameter 0,11 mm	0,24
5.	KE-B5	Ireguler, putih, agak suram, diameter 0,12 mm	0,29
6.	KE-B6	Ireguler, bulat, merah, mengkilat, diameter 0,15 mm.	0,39



Gambar 1. Morfologi *Achatina fulica* (a) dan bagian saluran pencernaan (b).

sel khamir, sehingga diperoleh protoplas. Protoplas merupakan kunci penting dalam proses fusi. Arom (2017) telah menemukan bakteri glukanolitik KE-B6 dan berpotensi menghasilkan enzim glukanase, oleh karena itu perlu dilakukan identifikasi secara molekular.

Identifikasi khamir berdasarkan sekuen *Internal Transcribed Spacer* (ITS). Sekuen ITS mengacu pada *spacer* yang merupakan sekuen

target untuk dilakukannya identifikasi bakteri secara molekular. Berdasarkan uraian tersebut, pada penelitian ini akan melakukan identifikasi bakteri dari saluran pencernaan bekicot (*A. fulica*) secara molekular.

## METODE PENELITIAN

### Ekstraksi DNA

Sampel yang didapat di tambah bufer ke eppendorf sebanyak 500 µl kemudian di vortex selama 30 detik dan dibolak balik selanjutnya diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Ditambahkan 200 µl etanol dingin (30 detik dan disentrifugasi 8000 rpm selama 30 menit. Tambahkan bufer AW 1 sebanyak 500 µl sentrifus selama 1 menit (8000 rpm), selanjutnya ditambahkan bufer AW2 sentrifus selama 3 menit. Selanjutnya ditambahkan bufer AE sebanyak 100 µl dan sentrifus 1 menit.

### Amplifikasi

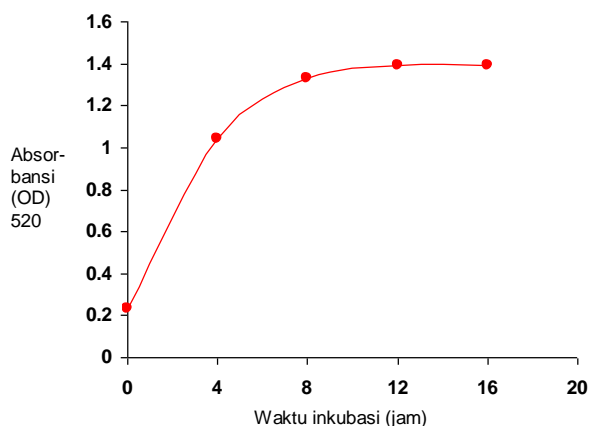
Amplifikasi DNA dilakukan dengan metode PCR. Amplifikasi ini dilakukan dengan menggunakan *DNA thermal cycler*. Visualisasi produk PCR 16S rRNA dilakukan menggunakan analisis elektroforesis dengan cara memasukkan 4 µl produk PCR pada sumuran gel agarose 1% yang telah direndam larutan bufer TAE 0.5x. Gel selanjutnya dielektroforesis dengan voltase sebesar 100 Volt selama 40 menit. Sekuen yang didapat disejajarkan dengan gen bank (program MEGA 6.0) kemudian dianalisis dengan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) untuk menentukan kesamaan pasangan basa dengan isolat referensi yang terdapat di *gen bank*.

### Elektroforesis

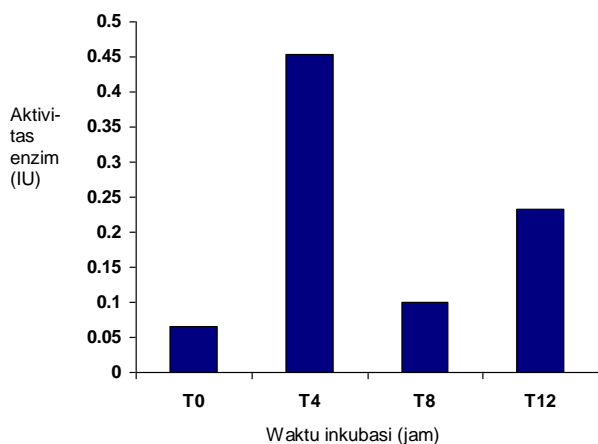
Proses PCR yang telah selesai selanjutnya dilakukan elektroforesis untuk mengetahui panjang pita DNA target yang diinginkan. Keberhasilan PCR diuji melalui elektroforesis dengan gel agarose 1%. Elektroforesis dilakukan dengan cara gel agarosa 1% yang terdiri dari 0,3 gram agarosa dilarutkan dalam 30 ml TBE 1X, kemudian dididihkan pada *microwave* hingga larut,



Gambar 2. Ragam isolat bakteri dari saluran pencernaan bekicot (*A. fulica*).



Gambar 3. Pola pertumbuhan isolat bakteri KE-B6.



Gambar 4. Aktivitas enzim (IU) isolat bakteri KE-B6.

kemudian 2  $\mu$ l *Good View Nucleic Acid Stain* ditambahkan dalam agarose dan dihomogenkan secara merata, setelah itu di diamkan beberapa

menit hingga suhu turun kira-kira 50 °C. Sisir elektroforesis (*comb*) dipasang pada salah satu ujung *plate*, kemudian gel agarosa dituang ke dalam baki cetakan secara merata. Gel agarosa didiamkan pada suhu ruang selama beberapa menit hingga gel agarosa mengeras. Gel agarosa yang telah mengeras kemudian dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis, setelah itu dituang dengan larutan buffer TBE 1X hingga seluruh permukaan gel agarosa tertutup rata. Komponen elektroforesis yang digunakan meliputi 5  $\mu$ L produk PCR dan 3 *ladder marker* 100bp dimasukkan ke dalam sumuran *gel agarose* 1 % yang telah direndam larutan buffer TBE 1x. Elektroforesis ditutup dan disambungkan dengan arus listrik. Elektroforesis kemudian dilakukan dengan tegangan 100 volt selama 30 menit. DNA akan bermigrasi dari kutub negatif ke kutub positif. Gel selanjutnya direndam dalam EtBr selama 15 menit dan dibilas dengan aquades steril selama 3 menit. Gel kemudian diambil dan dimasukkan dalam *Gel doc*. Hasil *band-band* DNA akan terlihat berpendar pada layar *gel documentation*.

### Analisis Sekuensing

Produk PCR disekuensing untuk mengetahui jumlah dan urutan basanya melalui jasa PT. Genetika Science Indonesia. Sekuens yang diperoleh dianalisis dengan cara penyejajaran dengan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) untuk menentukan presentase kesamaan pasangan basa dengan referensi yang terdapat di *Genbank* (Sandy *et al.*, 2015).

### Pohon Filogenetik

Pembuatan pohon filogenetik dilakukan menggunakan *software* MEGA 6. *Sequence* isolat dianalisis dan dibandingkan dengan isolat lainnya. Pohon filogenetik direkonstruksi menggunakan *Neighbour joining* dan diuji dengan menggunakan *Bootstrap method* (Sumerta *et al.*, 2017).

### Pengukuran aktivitas enzim

*Crude enzim* yang diperoleh dari fusan terpilih di ambil 0,1 ml dan direaksikan dengan 0,5 ml

substrat inulin dan inkubasi pada suhu 50 °C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan jalan memasukkan tabung sampel kedalam air yang mendidih selama 5 menit. Konsentrasi gula reduksi yang terbentuk dihitung dengan cara memetakan nilai absorbansi yang diperoleh pada kurva standar fruktosa. Aktivitas inulinase ditentukan berdasarkan sejumlah 1 µmol gula reduksi yang dibebaskan permenit pada kondisi tertentu. Gula reduksi yang dihasilkan diukur dengan menggunakan metode *dinitrosalicylic acid* (DNS). Pembacaan absorbansi menggunakan spektrometer dengan panjang gelombang 570 nm (Chaplin, 1994; Xiao *et al.*, 1998; Park & Yun, 2001).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Bakteri glukanolitik pada bekicot (*A. fulica*)

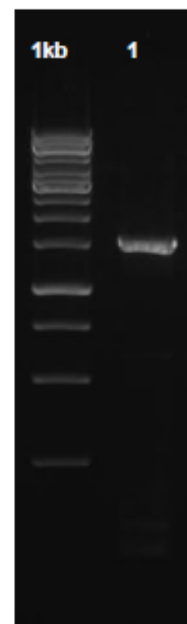
Berdasarkan penelitian yang dilakukan pada saluran pencernaan bekicot (Gambar 1) telah ditemukan 6 isolat bakteri (Tabel 1). Berdasarkan data (Tabel 1), isolat bakteri KE-B6 mampu memproduksi enzim selulase. Hal ini disebabkan bahwa isolat tersebut mampu tumbuh pada medium cair CMC sebagai media selektif dan mampu menghasilkan enzim selulase lebih tinggi dibandingkan dengan isolat lainnya. Bakteri atau mikroba yang ditemukan pada moluska dapat menghasilkan selulase, glukanase (Castro *et al.*, 2002; Al Arif *et al.*, 2012). Castro *et al.* (2002) mengungkapkan bahwa glandula usus tengah Klas Moluska (keong emas) mampu memproduksi enzim selulase yang di dalamnya terdapat ekso glukanase dan endo glukanase. Sedangkan mikroba yang sering ditemukan adalah *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* dan *Zymomonas* (Wenzel *et al.*, 2002). Enam (6) isolat bakteri diketemukan pada saluran pencernaan bekicot (Gambar 2).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, isolat bakteri KE-B6 mempunyai kecenderungan pertumbuhan hiperbola. Isolat tersebut mengalami fase log pada jam ke-0 sampai jam ke-8 dan selanjutnya akan mengalami fase stasioner pada jam ke-8 sampai jam ke-16 (Gambar 3).

Pada pola pertumbuhan fase log, isolat bakteri KE-B6 tidak mengalami fase lag atau adaptasi. Hal ini disebabkan karena pada saat perlakuan ditambahkan starter sebagai pemula untuk pertumbuhan, sehingga isolat tersebut tanpa mengalami fase adaptasi tetapi langsung fase lag. Hal ini sesuai dengan pernyataan Alexander & Jeffries (1990) bahwa starter berfungsi untuk meniadakan fase lag dan diharapkan pertumbuhan mikroba (isolat) dapat langsung menuju fase lag.

Berdasarkan pola pertumbuhan, isolat bakteri KE-B6 secara bersamaan juga menghasilkan enzim glukanase dan selulase (Gambar 4). Jumlah enzim yang dihasilkan oleh mikroba (isolat) dapat ditentukan dengan uji aktivitas enzim (IU).

Berdasarkan gambar 4, enzim glukanase (selulase) dibentuk dan dihasilkan pada jam ke-4, dimana pada jam tersebut masih digolongkan sebagai fase log. Dengan kata lain bahwa enzim tersebut dihasilkan pada fase log. Hal tersebut sangat cocok dengan pendapat Maria *et al.* (2005)



Gambar 5. Hasil amplifikasi bakteri isolat KE-B6 yang diisolasi dari saluran pencernaan *A. fulica* (gel agarose 0,8 %, DNA ladder 0,2 µg, 1 kb DNA ladder (bp), volume sampel 1 µL, 1 = sampel DNA).

bahwa enzim tersebut dibentuk dan dihasilkan pada fase logaritma. Enzim ini digolongkan sebagai hasil metabolit primer (Brock & Madigan, 1994). Bonciu *et al.* (2010) menyatakan bahwa enzim indusibel bersifat ekstraseluler. Pada penelitian ini aktivitas selulase sebesar 0,4539 IU. Menurut Madigan *et al.* (2009) pengaturan sintesis enzim di dalam sel sangat ditentukan oleh suatu mekanisme induksi dan represi pada proses transkripsi. Induser bekerja secara langsung berikatan dengan protein spesifik yang disebut repressor. Represor ini dapat menghentikan proses transkripsi jika menempel pada sisi operator gen. Adanya induser memungkinkan repressor tersebut dapat terikat oleh induser, sehingga tidak dapat menempel pada gen, sehingga RNA polymerase dapat berjalan dan proses transkripsi protein enzim dapat berlangsung/ terbentuk. Enzim ini (glukanase/ selulase) selanjutnya akan digunakan untuk proses pemecahan dinding sel khamir *P. manshurica* DUCC-Y15.

### Identifikasi Molekular Isolat Terpilih

Pada tahap identifikasi molekular untuk isolate terpilih diawali diekstraksi DNA dan uji kemurnian DNA. Dari uji tersebut telah memenuhi standar dengan nilai kemurnian DNA sebesar 1,8. Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Isci *et al.* (2012), bahwa nilai kemurnian DNA berkisar pada 1,8-2,0. Jika rasio lebih dari 2,0 menunjukkan adanya kontaminasi RNA, namun bila rasio di bawah 1,8 menunjukkan adanya kontaminasi protein. Menurut Hikmatyar *et al.* (2015), DNA berkualitas baik berdasarkan uji nanodrop memiliki konsentrasi di atas 100 ng/ $\mu$ L.

Primer yang digunakan adalah primers 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCGA-3'; posisi 8-27 adalah gen 16S rRNA *Escherichia coli*) dan 1494R (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3'; posisi 1510-1494 adalah gen 16S rRNA *Escherichia coli*). Amplifikasi DNA dilakukan dengan PCR sebanyak 30 siklus. Hasil PCR dianalisis menggunakan gel agarosa 1 % dan ladder marker (Gambar 5).

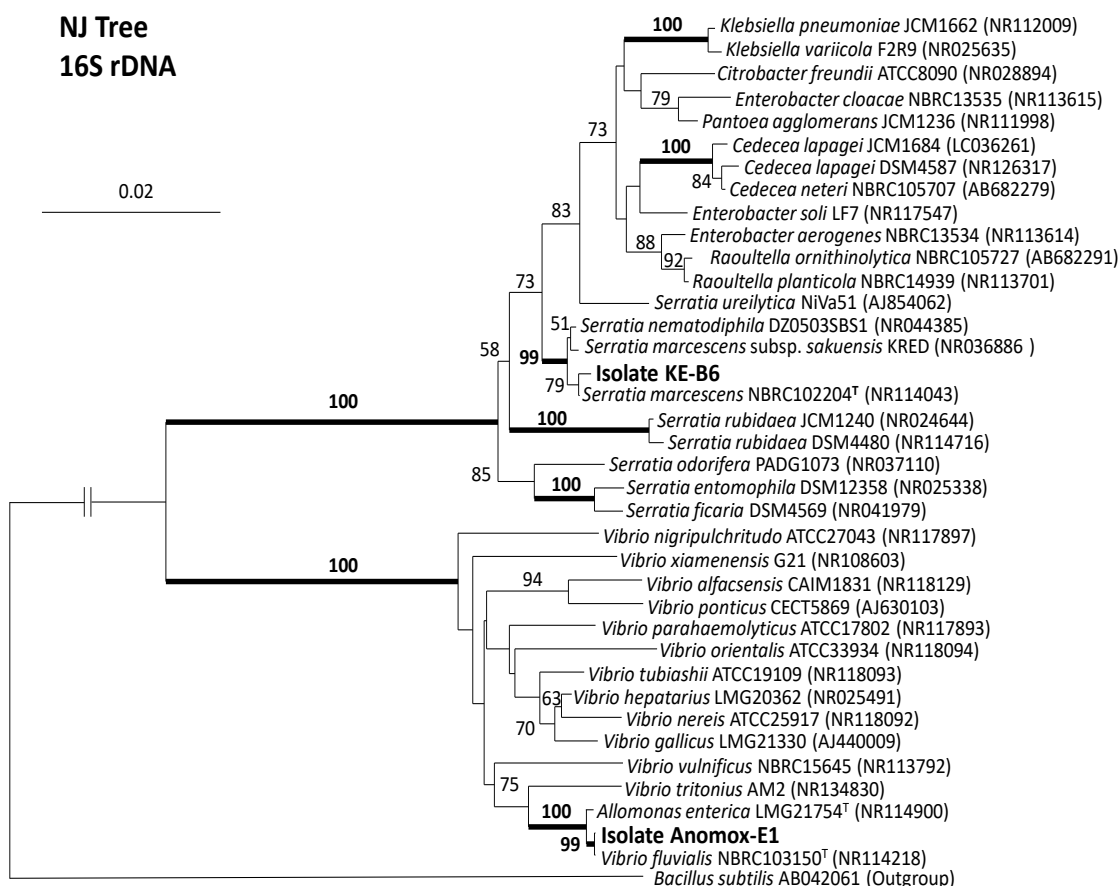
Produk hasil PCR selanjutnya di sekuensing untuk mengetahui urutan nukleotida dari isolat KE-6. Urutan nukleotida hasil sekuensing selanjutnya digabungkan melalui analisis contig (Gambar 6).

#### >KE-B6-Contig 16S rDNA (1419 nt)

```
GCTTACCATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGGGGAGCTTGCTCCCTGGGTGACGAGCGGGG
ACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAG
CTAATACCCGCATAACGTCGCAAGACCAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTGCCATCAGA
TGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGTGGGTAATGGCTCACCTAGGCGCAGCATCCCTA
GCTGGTCTGAGAGGATGACCCAGCCACTGGAAGTGGAGACGGTCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGGCTGATGCAGCCATGCCCGGTGTG
TGAGAAGGCGCTTCGGGTTGAAAAGCACTTTCAGGAGGAGGAAGGTGGTGAACCTAATA
CGTTCAATTCAGCTTACTCGCAGAAGAAGCAGCCGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCG
GGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGGCGCAGCCAGCGGG
TTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTCAACTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCA
AGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGTGAATTCAGGTTAGCGGTGAATGCGTAGAGATC
TGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGGCGCCCTGACGAGGAGGAGTGCAGCTCAGGTGGCAA
GGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTCGTGTAGTCCAGCTGTAACAGATGTCGATTT
GGAGTTGTCCCTTGAGCGGTGGCTCCGGAGCTAACCGTTAATCGACCCGCTGGGG
AGTACGGCGCAAGGTGAAAACCTAAATGAATGACGGGGCGCCGCAAGCGGTGGAGC
ATGTGGTTTAATTCGATGCAACCGCAAGAACCTTACTACTCTTGACATCCAGAGAACTT
TCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTGAGACAGGTCGCTGATGGGTGTCGTCAG
CTCGTTGTGAAATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCATTATCCTTTGTTC
CAGCGTTTCGGCGGAACTCAAAGGAGACTCCAGTGAATAACTGGAGGAAGCGTGGGA
TGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATA
CAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCAAAAATGATGCTGATCCGGATT
GGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCCGGAATCGCTAGTAATCGATGATGAGAATGTA
CGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACAGACCCCGCTCACACCATGGGAGTGGGTTGCA
AAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTACCA
//
```

Gambar 6. Urutan nukleotida hasil contig DNA isolat KE-B6.

Hasil sekuensing yang telah diketahui urutan nukleotida selanjutnya dianalisis dengan menggunakan BLAST. Analisis BLAST bertujuan untuk mendapatkan dan mengetahui tingkat hubungan spesies (homologi) isolat KE-B6. Menurut Haddad *et al.* (2014), bahwa penggunaan BLAST untuk mencari sekuens terkait yang tersedia dalam database *Gen Bank*. Semua *sequence* yang berhubungan dibandingkan, sehingga akan ditemukan kesamaan atau kemiripan *sequence* dengan nilai yang tinggi. Hasil BLAST isolat bakteri KE-B6 berdasarkan data *sequence* 16S rDNA dengan primer 27F dan primer 1492R menunjukkan bahwa isolat KE-B6 memiliki homologi 99,64% terhadap *Serratia marcescens* dan *S. nematodiphila* 99,37%. Selanjutnya, pohon filogenetik digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan antara isolate-isolat pembandingan dari NCBI dengan isolat KE-B6. Pohon filogenetik tersebut dapat dibuat melalui perangkat lunak *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versi 6.0. (Gambar 7).



Gambar 8. Pohon filogenetik isolat bakteri KE-B6 berdasarkan data sekuen 16S rDNA dengan *Neighbour joining* menggunakan *bootstrap method*.

## KESIMPULAN

Bedasarkan hasil BLAST isolat bakteri KE-B6 berdasarkan data *sequence* 16S rDNA dengan primer 27F (Forward) dan primer 1492R (Reverse) menunjukkan bahwa isolat KE-B6 memiliki homologi 99,64% terhadap *Serratia marcescens* dan *S. nematodiphila* 99,37%. Hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa posisi taksonomi isolat KE-B6 berada di dalam genus *Serratia* (dukungan nilai bootstrap 100%). Isolat tersebut berada satu grup dengan tipe strain *S. marcescens* NBRC102204<sup>T</sup> dengan dukungan nilai bootstrap cukup tinggi, 79%. Aktivitas glukanase yang dihasilkan sebesar 0,39 IU.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahuja, M.R. 1982. Isolation, culture and fusion of protoplast: problems and prospects. *Silvae Genetica*. 31: 66-77.
- Al-Arif, M.A., W. Darmanto dan N.N.T. Nurhajati. 2012. Isolasi dan identifikasi bakteri selulolitik dengan aktivitas tinggi dalam saluran pencernaan keong emas (*Pomacea canaliculata*). *Jurnal JBP Biosains*. 14(2): 86-92.
- Alexander, M.A. and T.W. Jeffries. 1990. Respiratory efficiency and metabolize partitioning as regulatory phenomenon in yeasts. *Enzyme Microbe. Technol.* 12: 2-29.
- Allais, J.J., S. Kammou, P. Blanc, C. Girard and J. Baratti. 1986. Isolation and characteristic of bacterial strains with inulinase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(50): 1086-1090.
- Baltz, R.H. 1996. *Strain Improvement*. In: *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. Demain, A.I., and Solomon, N.A. (Ed). American Society for Microbiology. Washington.



- Barnet, J.A., R.W. Payne and D. Yarrow. 1990. *Yeast characteristics and identification*. Cambridge University Press.
- Bonciu, C., V. Struta and G. Bahrim. 2010. Isolation and screening of new mould strains able for inulinase biosynthesis and inulin from Jerusalem Artichoke hydrolysis. *Innov. Rom. Food. Biotechnol.* 7: 77-81.
- Castro, V.A., E.A. Albrecht, I.A. Vega, E. Koch and C. Gamarra-Luques. 2002. Pigmented corpuscles in the midgut gland of *Pomacea canaliculata* and other neotropical apple snails (Prosobrancia, Ampullariidae). *Possible Symbiotic Association. Biocell.* 26(1): 101-109.
- Chaplin, M.F and J.F. Kennedy. 1994. *Carbohydrat analysis: A practical approach*. 2<sup>nd</sup> Edition. Oxford University Press. Oxford.
- Ezeronye, O.U and P.O. Okerentugba. 2001. Optimum conditions for yeast protoplast release and regeneration in *S. cerevisiae* and *C. tropicalis* using gut enzyme of the Giant African Snail *Achatina achatina*. *Letters in Applied Microbiology.* 32: 190-193.
- Farahnak, F., T. Seki, Y.R. Dedwey, and D. Ogrydziak. 1986. Construction of lactose-assimilating and high ethanol producing yeast by protoplast fusion. *Applied and environmental microbiology.* 51(2): 362-367.
- Guo, N., F. Gong, Z. Chi, J. Sheng and J. Li. 2009. Enhanced inulinase production in solid state fermentation by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36: 499-507.
- Haddad, R., Alemzadeh, E., Ahmadi, A. R., Hosseini, R., Moezzi, M. 2017. Identification of chlorophyceae based on 18S rDNA sequences from Persian Gulf. *Iran. J Microbiol.* 6(6): 437-442.
- Hikmatyar, M.F., Royani, J.I., and Dasumiati. 2015. Isolasi dan amplifikasi DNA Keladi Tikus (*Thyponium flagelliform*) untuk identifikasi keragaman genetik. *J. Bioteknol. Bios. Indon.* 2(2): 42-48.
- Holz, G., and G. Saunders. 1985. *Genetic modification of industrial microorganisms*. In: *Comprehensive biotechnology. The principles, application and regulation of biotechnology in industry, agryculture and medicine*. Moo-Young, M (Ed) Pergamon Press.
- Isci, B., H.K. Yildirim, and A. Altindisli. 2014. Evaluation of methods for DNA extraction from Must and Wine. *J. Inst. Brew.* 120: 238-243.
- Javadekar, V.S., H.S. Raman, and D. Gokhale. 1995. Industrial yeast strain improvement: Construction of a Highly flocculent yeast with a killer character by protoplast fusion. *Jour. Indst. Microbiology.* 15: 94-102.
- Kierstan, M.P.J. 1980. Production of syrup from inulin containing plants. *J. Biotech. Bioeng.* 20: 447-450.
- Kumar, N. S., and G. Gurusubramanian. 2011. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers and ITS applications. *Sci. Vis.* 11(3): 116-124.
- Li, L., J. Frohlich, P. Pfeiffer, and H. Konig. 2003. Termite gut symbiotic archaezoa are becoming living metabolic fossils. *Eukaryotic Cell.* 2(5): 1091-1098.
- Lunggani, A.T., Wijanarka, dan K. Endang. 2009. Produksi IOS prebiotik berbasis pemanfaatan Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis*) oleh khamir inulinolitik dan pengujian antimikrobanya secara *in vitro*. Penelitian Hibah Multiyears Desentralisasi. Undip Semarang.
- Matsushima, R., and R.H. Baltz. 1986. *Protoplast fusion*. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. American Society for Microbiology. Washington DC.
- Park, J.P and J.W. Yun. 2001. Utilization of chicory roots for microbial endoinulinase production. *Letters In Applied Microbiology.* (33): 183-187.
- Rouwenhorst, R.J., M. Hensing, J. Verbakel, W.A. Scheffer, and J.P. van Dijken. 1990b. Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(11): 3337-3345.
- Rouwenhorst, R.J. L.E. Visser, A.A van Derbaan, W.A. Scheffer and J.P. van Dijken. 1988. Production, distribution and kinetic properties of inulinase in continous culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(5): 1131-1137.
- Sahin, S., I. Osman, and H.H. Biyik. 2013. Purification and characterization of endo- $\beta$ -1-4-glucanase from local isolate *Trichoderma ouroviride*. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatic.* 3(2): 129-132.
- Sandy, Y.A., S. Djauhari, dan A.W. Sektiono. 2015. Identifikasi molekuler jamur antagonis *Trichoderma harzianum* di isolasi dari tanah pertanian di Malang Jawa Timur. *Jurnal HPT* 3(3): 1-8.
- Santiago, C.M. 1982. Protoplast fusion a new technique for genetic manipulation and breeding of industrial microorganism. *I.C. Biotech.* 5: 435-440.
- Santopietro, L.M.D., JFT. Spencer, D.M. Spencer and Sineriz. 1997. Characterization of intergeneric hybrids obtained by protoplast fusion between *Phaffia rhodozyma*, *Cryptococcus laurentii* and *S. cerevisiae*. *Biotechnology technique.* 11(10): 769-771.
- Sena, A., G.L.V. Junior., A.G. Neto., A.G. Taranto, C. P. Pirovani., J.C.M. Cascardo., R.B. Zingali., M.A. Bezerra, and S. Assis. 2011. Production, purification and characterization of a thermostable  $\beta$ -1-3 glucanase (Laminarinase) produced By *Moniliophthora perniciosa*. *An Acad Bras Science.* 83(2): 599-609.
- Stratford, M. 2006. 3374-*Pichia mandshurica*. national collection of yeast cultures. UK. <http://www.ncyc.co.uk/>. 23 Februari 2010.
- Sumerta, I.N., dan A. Kanti. 2017. Keragaman jenis khamir penghasil etanol yang di isolasi dari makanan fermentasi di Kepulauan Riau. *Jurnal Biologi Indonesia* 13(1): 61-69.
- Verma, N., Bansal and K. Vivek. 2004. Protoplast fusion technology and its biotechnology Applications.
- Wei, W., Kunlu Wu, Yan Qin, Zhong Xie and Xinsheng Zhu. 2001. Intergeneric protoplast fusion between *Kluyveromyces* and *S. cerevisiae* to produce sorbitol from Jerusalem Artichokes. *Biotechnology Letters* 23: 799-803.
- Wenzel, M., I. Schonig, M. Berchtold, P. Kamfer, and H. Konig. 2002. Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite

- Zootermopsis angusticollis*. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 32-40.
- Wijanarka, E. Arina T.L. dan H.P. Sakti. 2005. Fusi protoplas interspesifik termostabil *Kluveromyces marxianus* dan *Torulospira pretoriensis* isolat lokal serta aplikasinya pada HFS. Prosiding Workshop/Seminar Hasil Penelitian Propinsi Jawa Tengah. 2005.
- Wijanarka, Endang, dan P.S. Hermin. 2006. Eksplorasi khamir inulinolitik termostabil umbi Dahlia (*Dahlia variabilis* Willd) Jawa Tengah. Laporan Hibah Bersaing.
- Wijanarka. 2016. Eksplorasi bakteri glukanolitik indigenous dari saluran pencernaan Bekicot (*Achatina fulica*) sebagai biokatalis isolasi protoplas dan aplikasinya pada fusi protoplas *Pichia manshurica* DUCC-Y15 untuk meningkatkan produksi inulinase. Laporan Hasil Penelitian Fundamental (Tidak dipublikasikan). Universitas Diponegoro, Semarang.
- Wijanarka., T.L. Arina, dan Y. Emi. 2001. Seleksi khamir dan optimasi produksi enzim inulinase dari tanah sekitar Umbi Ketela Rambat (*Ipomoea batatas*) di daerah Bandungan Ambarawa. Penelitian BBI Dosen Muda Tahun 2001.
- Xiao, R., M. Tanida, and S. Takao. 1998. Inulinase from *Cryosporium pannorum*. *J. Ferment. Technol.* 66(5): 244-248.
- Xiao, R., M. Tanida, and S. Takao. 1989. Purification and some properties of endoinulinase from *Cryosporium pannorum*. *J. Ferment. Bioeng.* 67(4): 244-245.