

**MANIPULASI KONDISI TUMBUH GALUR-GALUR *Leuconostoc mesenteroides*  
UNTUK MEMPELAJARI RESPONS TERHADAP BERBAGAI ANTIBIOTIK**

**RIZKI AYU AMALIA**

**0706197736**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI EKSTENSI**

**DEPOK**

**2010**

**MANIPULASI KONDISI TUMBUH GALUR-GALUR *Leuconostoc mesenteroides*  
UNTUK MEMPELAJARI RESPONS TERHADAP BERBAGAI ANTIBIOTIK**

**Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat  
untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi**

**Oleh:**

**RIZKI AYU AMALIA**

**0706197736**



**DEPOK**

**2010**

**SKRIPSI : MANIPULASI KONDISI TUMBUH GALUR-GALUR**  
*Leuconostoc mesenteroides* **UNTUK MEMPELAJARI**  
**RESPONS TERHADAP BERBAGAI ANTIBIOTIK**

**NAMA : RIZKI AYU AMALIA**

**NPM : 0706197736**

**SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI**

**DEPOK, DESEMBER 2009**



**Dr. AMARILA MALIK, MSi**

**PEMBIMBING I**



**Dr. MAKSUM RADJI, M. Biomed**

**PEMBIMBING II**

**Tanggal Lulus Ujian Sidang Sarjana:** 11 Januari 2010 .....

**Penguji I : Dra. Juheini, MSi** .....

**Penguji II : Dra. Azizahwati, MS** .....

**Penguji III : Dr. Herman Suryadi, MS** .....

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillahrabbi'l'amin, segala puji dan syukur kepada Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan anugerah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Skripsi ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu Dr. Amarila Malik, MSi, selaku pembimbing I yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian ini, serta banyak memberikan bimbingan, ilmu, saran, motivasi, dukungan biaya, dan bantuan lainnya yang sangat bermanfaat selama penelitian dan penyusunan skripsi.
2. Bapak Dr. Maksum Radji, M. Biomed selaku pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, ilmu, saran, motivasi, dan bantuan lainnya yang sangat bermanfaat selama penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Ibu Prof. Dr. Atiek Soemiati, MS selaku Kepala Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas selama penelitian berlangsung.
4. Orangtua dan kakak-kakak tercinta yang senantiasa memberikan doa, semangat, pengertian, perhatian, dan kasih sayang, serta seluruh keluarga atas dukungannya kepada penulis selama ini.

5. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS, selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI, yang telah memberikan kesempatan sehingga penulis dapat menimba ilmu di Departemen Farmasi FMIPA UI.
6. Bapak Dr. Abdul Mun'im MS, selaku pembimbing akademis yang telah memberikan bimbingan dan bantuan selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI.
7. Seluruh staf pengajar, karyawan, dan laboran Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah membantu penulis selama masa pendidikan dan penelitian.
8. Rekan-rekan penelitian di laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Farmasi FMIPA UI serta teman-teman Ekstensi Farmasi UI Angkatan 2007 atas kebersamaan, kerjasama, keceriaan, kesediaan berbagi suka duka, dukungan, semangat, dan bantuan yang diberikan kepada penulis.
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah membantu dalam proses penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan dan semua pihak yang membutuhkan.

Penulis

2009

## ABSTRAK

Bakteri asam laktat merupakan bakteri yang memiliki status *GRAS* (*Generally Recognized As Safe*) dan berkontribusi pada kesehatan manusia. *Leuconostoc mesenteroides* merupakan bakteri model yang digunakan dalam penelitian ini. Terdapat 13 galur *Leu. mesenteroides* yang diuji responsnya. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui respons galur-galur *Leu. mesenteroides* terhadap beberapa antibiotik pada beberapa kondisi pertumbuhan yang berbeda. Manipulasi kondisi pertumbuhan dilakukan dengan variasi komposisi dan pH medium pertumbuhan. Medium yang digunakan adalah MRS dan CMG. pH ditetapkan pada pH 4,6 yang mewakili kondisi asam dan pH 9,0 yang mewakili kondisi basa. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode difusi cakram dengan menggunakan enam antibiotik yaitu amoksisilin, kloramfenikol, gentamisin, eritromisin, tetrasiklin dan vankomisin. Inkubasi dilakukan selama 21 jam pada suhu 32°C. Hasilnya yaitu galur-galur *Leu. mesenteroides* ketika ditumbuhkan pada medium MRS asam menunjukkan respons menjadi lebih sensitif terhadap amoksisilin, kloramfenikol dan tetrasiklin namun menjadi lebih resisten terhadap gentamisin dan eritromisin, sementara pada medium CMG asam, hasilnya menunjukkan respons menjadi lebih sensitif terhadap kloramfenikol namun menjadi lebih resisten terhadap gentamisin, eritromisin, dan tetrasiklin. Galur-galur *Leu. mesenteroides* ketika ditumbuhkan pada medium MRS basa menunjukkan respons menjadi lebih sensitif terhadap

amoksisilin, kloramfenikol, gentamisin dan eritromisin namun menjadi lebih resisten terhadap tetrasiklin, sementara pada medium CMG basa, hasilnya menunjukkan respons menjadi lebih sensitif terhadap kloramfenikol, gentamisin, dan eritromisin namun menjadi lebih resisten terhadap tetrasiklin. Galur-galur *Leu. mesenteroides* tidak menghasilkan zona hambat terhadap vankomisin pada semua medium yang digunakan dalam penelitian ini. Semua respons *Leu. mesenteroides* menunjukkan hasil yang signifikan secara statistik kecuali yang diuji terhadap tetrasiklin pada medium CMG asam dan basa.

Kata kunci: antibiotik, asam, basa, *Leu. mesenteroides*, respons, stress.

xiii+95 hal; gbr.; tab.; lamp.

Bibliografi : 34 (1980 – 2009)

## ABSTRACT

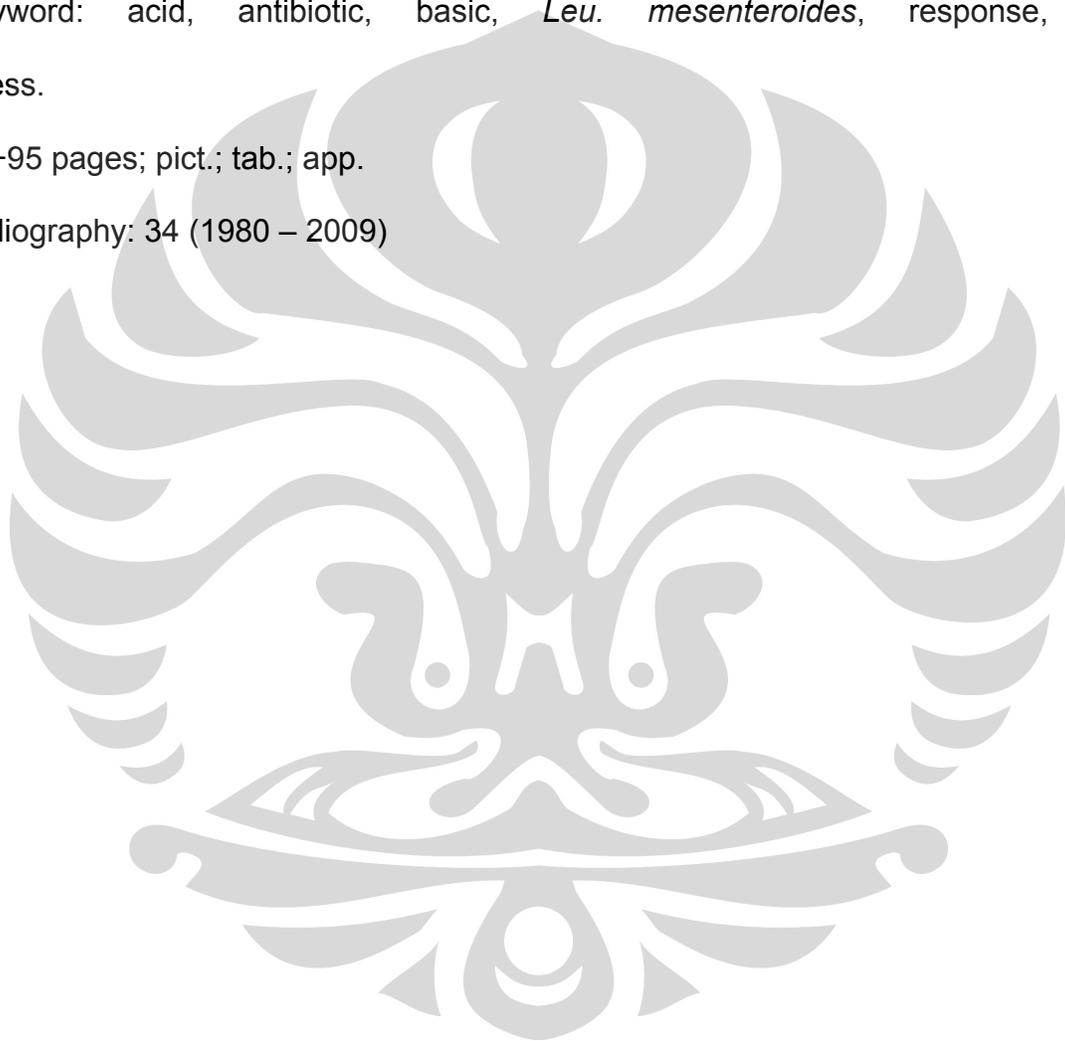
Lactic acid bacteria is bacteria which possess GRAS (Generally Recognized As Safe) status and contributed to human health. *Leuconostoc mesenteroides* is a model bacteria used in this study. There are 13 strains of *Leu. mesenteroides* which were tested for the responses. The aim of this study is to know the responses of *Leu. mesenteroides* strains to antibiotics on several different growth condition. Manipulating growth condition was conducted with variation of growth mediums composition and pH. Mediums used in this study were MRS and CMG. pH was set up under pH 4,6 representing acid condition and pH 9,0 representing basic condition. The method used in this study was disk diffusion method using six antibiotics: amoxicillin, chloramphenicol, gentamicin, erythromycin, tetracycline and vancomycin. Incubation time was 21 hours at 32°C. The result shows that *Leu. mesenteroides* strains when are grown on acid MRS medium respond more sensitive to amoxicillin, chloramphenicol and tetracycline but more resistant to gentamicin and erythromycin, while on acid CMG medium, they respond more sensitive to chloramphenicol, but more resistant to gentamicin, erythromycin, and tetracycline. *Leu. mesenteroides* strains when are grown on basic MRS medium respond more sensitive to amoxicillin, chloramphenicol, gentamicin and erythromycin but more resistant to tetracycline, while on basic CMG medium, they respond more sensitive to chloramphenicol, gentamicin and erythromycin but more resistant to

tetracycline. *Leu mesenteroides* strains did not show any inhibition zone to vancomycin on all mediums used in this study. All *Leu. mesenteroides* responses to antibiotics show significant result statistically except those which were tested to tetracycline on acid and basic CMG medium.

Keyword: acid, antibiotic, basic, *Leu. mesenteroides*, response, stress.

xiii+95 pages; pict.; tab.; app.

Bibliography: 34 (1980 – 2009)



## DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR .....	i
ABSTRAK .....	iii
ABSTRACT .....	v
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	ix
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xii
BAB I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang .....	1
B. Tujuan Penelitian .....	4
C. Hipotesis .....	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Bakteri Asam Laktat .....	5
B. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .....	7
C. Fase Pertumbuhan Bakteri .....	8
D. Persyaratan Pertumbuhan Bakteri .....	10
E. Respons Stress BAL .....	12
F. Mekanisme Kerja Antibiotik .....	14
G. Resistensi Antibiotik .....	17

H. Profil Kepekaan BAL Terhadap Antibiotik .....	19
I. Metode Zona Hambat .....	21
J. Analisis Transkriptomik .....	22
<b>BAB III. BAHAN, ALAT, DAN CARA KERJA</b>	
A. Lokasi dan Waktu Penelitian .....	24
B. Bahan .....	24
C. Alat .....	26
D. Cara Kerja .....	27
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
A. Hasil .....	37
B. Pembahasan .....	41
<b>BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
A. Kesimpulan .....	53
B. Saran .....	54
<b>DAFTAR ACUAN .....</b>	<b>55</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kurva Pertumbuhan Bakteri .....	60
2. Koloni Tunggal Hasil Purifikasi Beberapa Galur <i>Leu. mesenteroides</i> pada Medium MRS .....	61
3. Zona Hambat yang Dihasilkan oleh Galur <i>Leu. mesenteroides</i> MBF 2-2 pada Medium MRS .....	62
4. Zona Hambat yang Dihasilkan oleh Galur <i>Leu. mesenteroides</i> MBF 7-8 pada Medium MRS .....	63
5. Zona Hambat yang Dihasilkan oleh Galur <i>Leu. mesenteroides</i> MBF 2-2 pada Medium CMG .....	64
6. Zona Hambat yang Dihasilkan oleh Galur <i>Leu. mesenteroides</i> MBF 7-8 pada Medium CMG .....	65
7. Grafik Respons Galur-Galur <i>Leu. mesenteroides</i> Terhadap Amoksisilin pada Medium Standar, Modifikasi Asam, dan Modifikasi Basa .....	66
8. Grafik Respons Galur-Galur <i>Leu. mesenteroides</i> Terhadap Kloramfenikol pada Medium Standar, Modifikasi Asam, dan Modifikasi Basa .....	67

9. Grafik Respons Galur-Galur <i>Leu. mesenteroides</i> Terhadap Gentamisin pada Medium Standar, Modifikasi Asam, dan Modifikasi Basa .....	68
10. Grafik Respons Galur-Galur <i>Leu. mesenteroides</i> Terhadap Eritromisin pada Medium Standar, Modifikasi Asam, dan Modifikasi Basa .....	69
11. Grafik Respons Galur-Galur <i>Leu. mesenteroides</i> Terhadap Tetrasiklin pada Medium Standar, Modifikasi Asam, dan Modifikasi Basa .....	70
12. Grafik Rata-Rata Zona Hambat Hasil Respons <i>Leu. mesenteroides</i> Terhadap Beberapa Antibiotik .....	71

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Nama Galur <i>Leuconostoc mesenteroides</i> yang Sudah Teridentifikasi secara Molekular dengan 16S rDNA dan Sumber Asalnya .....	73
2. Diameter Zona Hambat Hasil Respons Galur-Galur <i>Leu. mesenteroides</i> Terhadap Antibiotik pada Medium MRS Standar dan Modifikasi .....	74
3. Diameter Zona Hambat Hasil Respons Galur-Galur <i>Leu. mesenteroides</i> Terhadap Antibiotik pada Medium CMG Standar dan Modifikasi .....	77
4. Rata-rata Diameter Zona Hambat Hasil Respons Galur-Galur <i>Leu. mesenteroides</i> Terhadap Beberapa Antibiotik pada Medium MRS dan CMG .....	80
5. Hasil Analisis Statistik Data Respons Galur-Galur <i>Leu. mesenteroides</i> Terhadap Antibiotik pada Medium Pertumbuhan Hasil Manipulasi .....	81

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Uji Distribusi Normal Terhadap Data Pengamatan Zona Hambat <i>Leu. mesenteroides</i> pada Medium MRS dan CMG .....	83
2. Uji Statistik Respons <i>Leu. mesenteroides</i> Terhadap Amoksisilin pada Medium MRS Standar, MRS Modifikasi Asam, dan MRS Modifikasi Basa .....	84
3. Uji Statistik Respons <i>Leu. mesenteroides</i> Terhadap Kloramfenikol pada Medium MRS Standar, MRS Modifikasi Asam, dan MRS Modifikasi Basa .....	85
4. Uji Statistik Respons <i>Leu. mesenteroides</i> Terhadap Gentamisin pada Medium MRS Standar, MRS Modifikasi Asam, dan MRS Modifikasi Basa .....	86
5. Uji Statistik Respons <i>Leu. mesenteroides</i> Terhadap Eritromisin pada Medium MRS Standar, MRS Modifikasi Asam, dan MRS Modifikasi Basa .....	87
6. Uji Statistik Respons <i>Leu. mesenteroides</i> Terhadap Tetrasiklin pada Medium MRS Standar, MRS Modifikasi Asam, dan MRS Modifikasi Basa .....	88

7. Uji Statistik Respons <i>Leu. mesenteroides</i> Terhadap Kloramfenikol pada Medium CMG Standar, CMG Modifikasi Asam, dan CMG Modifikasi Basa .....	89
8. Uji Statistik Respons <i>Leu. mesenteroides</i> Terhadap Gentamisin pada Medium CMG Standar, CMG Modifikasi Asam, dan CMG Modifikasi Basa .....	90
9. Uji Statistik Respons <i>Leu. mesenteroides</i> Terhadap Eritromisin pada Medium CMG Standar, CMG Modifikasi Asam, dan CMG Modifikasi Basa .....	91
10. Uji Statistik Respons <i>Leu. mesenteroides</i> Terhadap Tetrasiklin pada Medium CMG Standar, CMG Modifikasi Asam, dan CMG Modifikasi Basa .....	92
11. Alur kerja penelitian .....	93

# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. LATAR BELAKANG

Peranan mikroba sebagai agens bioteknologi menunjukkan peningkatan dalam pemanfaatannya. Hal ini dikarenakan antara lain perbanyakannya yang mudah dan dapat dikendalikan, substrat pertumbuhan relatif murah, serta dapat menghasilkan enzim yang cukup banyak sehingga potensial dikembangkan untuk skala industri (1).

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan kekayaan alam mikroba yang banyak tersebar di alam Indonesia. Eksplorasi BAL dari lingkungan alam Indonesia dilakukan untuk meningkatkan koleksi isolat tersebut. BAL diisolasi dari sayuran dan buah busuk, asinan, *sauerkraut*, limbah tahu, feses bayi, feses sapi, susu terkontaminasi dan susu kedelai (1).

BAL yang digunakan dalam proses fermentasi perlu diseleksi untuk memperoleh isolat yang memiliki kemampuan unggul, sehingga memiliki kelebihan diantaranya memiliki kemampuan adaptasi tinggi terhadap kondisi lingkungan sehingga memiliki tingkat efisiensi yang tinggi, ketersediaan mikroba terjamin sebab berasal dari lingkungan alam Indonesia yang dapat diisolasi dari banyak sumber, serta memungkinkan dimanfaatkannya secara luas oleh masyarakat dengan biaya yang relatif murah untuk industri besar maupun industri kecil (1).

BAL termasuk mikroorganisme yang aman jika ditambahkan dalam pangan karena sifatnya tidak toksik dan tidak menghasilkan toksin, maka disebut *food grade microorganism* atau dikenal sebagai mikroorganisme *Generally Recognized As Safe (GRAS)*. BAL bermanfaat untuk peningkatan kualitas higiene dan keamanan pangan melalui penghambatan secara alami terhadap flora berbahaya yang bersifat patogen. Salah satu aplikasinya yaitu sebagai starter kultur pada produksi produk susu fermentasi seperti yogurt. Metabolit BAL yang diproduksi mempunyai efek antimikroba, termasuk asam laktat, asam organik, asam lemak, hidrogen peroksida, diasetil dan bakteriosin. Selain itu, BAL juga berfungsi sebagai probiotik. (2, 3).

Namun, dibalik keuntungan yang diberikan oleh BAL, ternyata bakteri tersebut mempunyai potensi yang merugikan. BAL mempunyai potensi berperan sebagai inang dari gen resisten antibiotik melalui transfer gen pada BAL dan bakteri patogen lainnya (4).

Perkembangan resistensi antibiotik pada bakteri didasarkan pada dua faktor, yaitu adanya gen resisten dan *selective pressure* dengan penggunaan antibiotik (5).

Untuk mengatasi hal tersebut maka dicarikan alternatif pemecahan masalah dengan cara mempelajari mekanisme respons pada berbagai mikroorganisme, dalam hal ini adalah bakteri.

Mekanisme respons terhadap stress dapat dipelajari dengan cara melakukan analisis ekspresi gen berupa analisis transkriptomik maupun proteomik. Salah satu cara untuk menimbulkan respons terhadap stress

adalah dengan memanipulasi kondisi pertumbuhan. Sebagaimana dilaporkan bahwa stress pada medium pertumbuhan akan menimbulkan respons yang dapat diamati terhadap berbagai parameter (6). Parameter yang mudah untuk diamati adalah respons terhadap antibiotik. Antibiotik merupakan substansi yang bukan nutrisi bagi bakteri sehingga diharapkan menimbulkan suatu respons untuk pertahanan diri.

Respons BAL terhadap stress akibat suasana asam pada pertumbuhannya sudah dilaporkan. Respons tersebut diteliti secara molekuler sehingga diperoleh informasi bahwa akibat suasana asam maka BAL yang bersangkutan mengalami perubahan morfologi sel yaitu pengurangan ukuran sel akibat menurunnya aktivitas beberapa transporter sehingga mengurangi ketersediaan substrat yang esensial dan menyebabkan malnutrisi pada BAL (6).

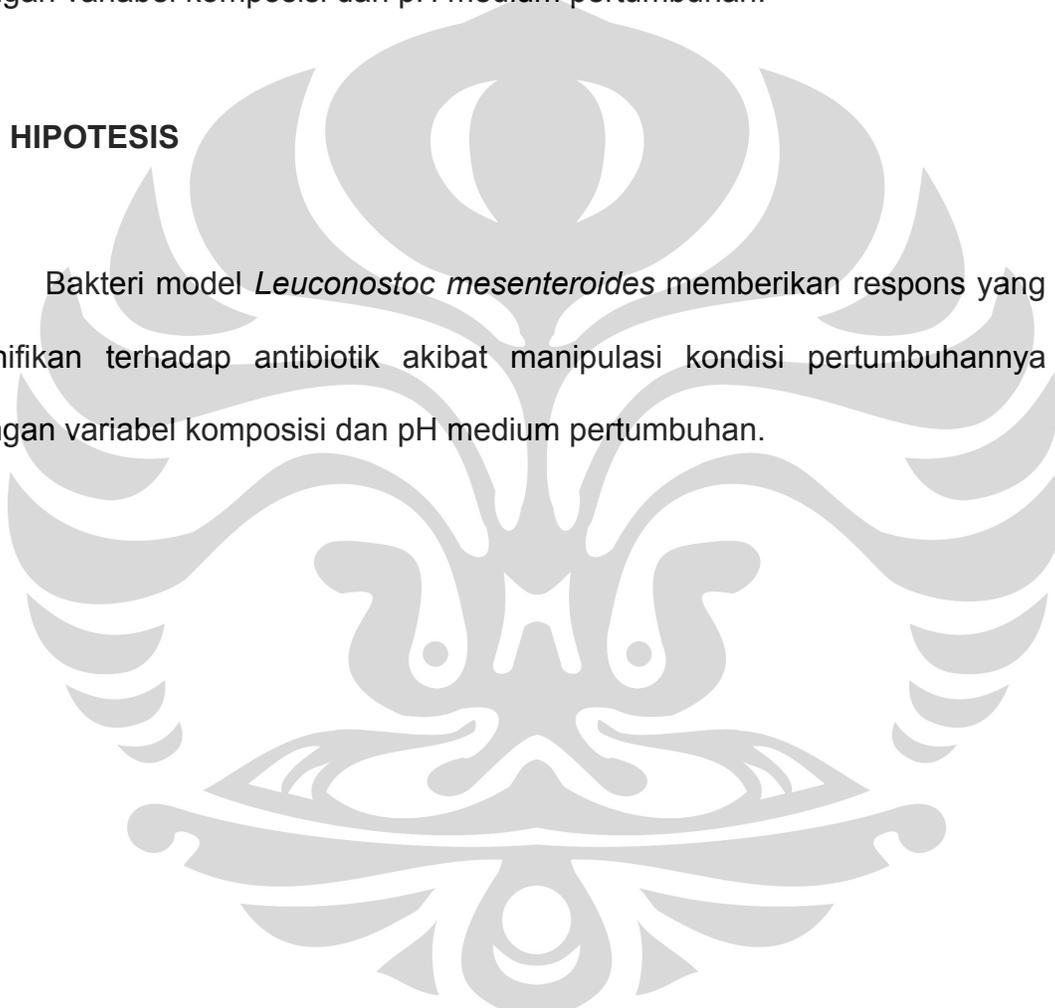
Berdasarkan informasi tersebut, maka pada penelitian ini dilakukan pengujian respons BAL terhadap manipulasi medium pertumbuhan dengan menggunakan parameter antibiotik. BAL merupakan model respons molekuler bakteri pada umumnya dan Gram positif pada khususnya. BAL yang digunakan adalah galur-galur *Leuconostoc mesenteroides*. Dengan dilakukannya penelitian ini, diharapkan dapat diketahui adanya potensi resistensi pada *Leu. mesenteroides* akibat stress kondisi pertumbuhannya yang akan sangat bermanfaat untuk dipelajari lebih lanjut. Selain itu juga, untuk menghindari perkembangan BAL probiotik menjadi pembawa sifat resistensi terhadap antibiotik.

## B. TUJUAN PENELITIAN

Mengetahui respons bakteri model *Leuconostoc mesenteroides* terhadap beberapa antibiotik akibat manipulasi kondisi pertumbuhannya dengan variabel komposisi dan pH medium pertumbuhan.

## C. HIPOTESIS

Bakteri model *Leuconostoc mesenteroides* memberikan respons yang signifikan terhadap antibiotik akibat manipulasi kondisi pertumbuhannya dengan variabel komposisi dan pH medium pertumbuhan.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. BAKTERI ASAM LAKTAT

Bakteri asam laktat termasuk dalam divisi *Firmicutes* yang merupakan golongan bakteri Gram positif dan mempunyai rasio G+C yang rendah yaitu dibawah 50%. BAL mempunyai sel yang berbentuk batang atau bulat yang meliputi genus *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* dan *Streptococcus*. Bakteri ini sangat penting peranannya dalam industri makanan, minuman dan farmasi. BAL merupakan bakteri yang tidak membentuk spora, tidak motil, katalase negatif, sedikit mempunyai porfirin dan sitokrom (7). BAL merupakan organisme kemoorganotrof dan hanya tumbuh pada media yang kompleks. Karbohidrat yang dapat difermentasi dan alkohol tingkat tinggi digunakan sebagai sumber energi terutama untuk membentuk asam laktat. BAL mendegradasi heksosa menjadi laktat (homofermentatif) atau laktat beserta produk tambahan seperti asetat, etanol, dan karbondioksida (heterofermentatif) (8). BAL tumbuh secara anaerob namun tidak mati dengan adanya oksigen (aerotoleran anaerob). Bakteri ini memperoleh energi dari gula dan ditemukan pada lingkungan yang terdapat gula (7).

Karakteristik yang diinginkan dari bakteri asam laktat sebagai mikroorganisme industrial meliputi kemampuannya dalam fermentasi bahan

mentah yang murah secara cepat dan lengkap, persyaratan minimal terhadap senyawa nitrogen, kemampuannya yang tinggi dalam memproduksi asam laktat, kemampuannya berkembang dibawah kondisi pH yang rendah dan suhu yang tinggi, serta kemampuannya dalam memproduksi sejumlah kecil massa sel dan juga produk sampingan (7).

Secara morfologi, bakteri asam laktat dibagi menjadi 2 familia yaitu *Lactobacillus* yang mempunyai bentuk sel batang dan *Streptococcaceae* yang mempunyai bentuk sel bulat. Famili *Lactobacillaceae* meliputi genus *Lactobacillus* sedangkan familia *Streptococcaceae* meliputi genus *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, dan *Lactococcus*.

Secara fisiologi yaitu berdasarkan perbedaan jalur metabolisme pada saat glukosa menjadi sumber karbon utama, terdiri dari dua kelompok bakteri yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. BAL golongan homofermentatif memproduksi asam laktat sebagai produk utama dari hasil fermentasi gula (7, 8). Reaksinya adalah sebagai berikut (9):



glukosa

asam laktat

BAL golongan heterofermentatif seperti *Leuconostoc* dan *Weissella* mengubah satu molekul glukosa menjadi laktat, etanol dan karbondioksida (10, 11). Reaksinya adalah sebagai berikut (9):



glukosa

asam laktat

etanol

karbondioksida

Metodologi terbaru yang digunakan untuk klasifikasi BAL tergantung pada *sequensing* dan analisis 16 rRNA. Berdasarkan teknik ini, bakteri Gram-positif dibagi menjadi dua kelompok tergantung pada kandungan G+C. Actinomycetes mempunyai kandungan G+C diatas 50 mol%. Kelompok ini meliputi genus *Bifidobacterium*, *Corynobacterium*, dan *Propionibacterium*. Sebaliknya, Clostridium mempunyai kandungan G + C dibawah 50 mol% dan meliputi genus *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, dan *Streptococcus* (8).

#### **B. *Leuconostoc mesenteroides***

Bakteri *Leuconostoc mesenteroides* tergolong bakteri asam laktat heterofermentatif dan Gram positif. Karakteristik bentuk sel bulat, bersifat anaerob fakultatif, sel tidak motil. Bakteri ini dikelompokkan katalase negatif, tidak membentuk spora dan kemoorganotrof (2).

Klasifikasi *Leuconostoc mesenteroides* (10):

Kingdom : Bacteria  
Divisi : Firmicutes  
Kelas : Bacilli  
Ordo : Lactobacillales  
Famili : Leuconostocaceae  
Genus : *Leuconostoc*  
Spesies : *Leuconostoc mesenteroides*

### C. FASE PERTUMBUHAN BAKTERI

Pertumbuhan dapat didefinisikan sebagai peningkatan konstituen selular. Pada saat mikroorganisme ini bereproduksi melalui proses seperti pembelahan biner, maka akan terjadi peningkatan jumlah sel (11). Terdapat empat fase pertumbuhan bakteri. Fase-fase tersebut digambarkan pada kurva pertumbuhan bakteri (12) (gambar 1):

#### 1. Fase penyesuaian diri (*lag phase*)

Pada awalnya, mikroorganisme belum beradaptasi pada lingkungan kimianya yang baru sehingga menunjukkan jeda dalam pembelahan sel untuk jangka waktu yang pendek (13). Selama fase lag, sel menyesuaikan diri pada lingkungannya. Sebagian besar sel tidak langsung bereproduksi melainkan secara aktif mensintesis enzim untuk menggunakan nutrisi baru dalam medium. Fase lag berlangsung kurang dari satu jam atau beberapa hari tergantung pada spesies dan kondisi fisika kimia medium (14).

#### 2. Fase pembelahan (*logarithmic/ exponential phase*)

Pada akhirnya, bakteri mensintesis senyawa kimia penting untuk menjalankan metabolisme dalam lingkungan baru kemudian akan memasuki fase replikasi kromosom yang cepat, pertumbuhan dan reproduksi. Fase ini dinamakan fase pembelahan atau fase log. Populasi bakteri meningkat secara logaritma dan laju reproduksi mencapai konstan karena sintesis DNA dan protein maksimal (14). Selain itu juga terjadi peningkatan jumlah sel dan massa sel. Pada tahap ini, mikroorganisme digambarkan dalam kondisi

pertumbuhan seimbang, yaitu semua komponen sel meningkat secara proporsional selama periode waktu yang sama. Dengan demikian, pada saat populasi sel meningkat dua kali, semua komponen sel (DNA, RNA dan protein) juga meningkat dua kali (13). Populasi pada fase log lebih mudah dipengaruhi oleh obat antimikroba yang mengganggu metabolisme seperti eritromisin dan oleh obat yang mengganggu pembentukan struktur sel seperti penghambatan sintesis dinding sel oleh penisilin (14).

### 3. Fase stasioner (*stationary phase*)

Pada fase ini, sel berada pada tahap pertumbuhan yang tidak seimbang. Komponen sel (RNA, DNA, dan protein) disintesis pada laju yang berbeda. Populasi sel bertahan secara konstan dikarenakan jumlah sel yang dihasilkan sama dengan jumlah sel yang mati. Pada saat nutrisi berkurang, sel akan mengambil energi cadangan apapun yang tersedia. Banyak sel yang mati selama periode ini menghasilkan enzim autokatalitik yaitu proteinase dan nuklease yang menyediakan asam amino dan nukleotida yang cukup untuk mendukung pertumbuhan sel viabel (13).

### 4. Fase kematian/ penurunan (*death phase/ decline phase*)

Jika nutrisi tidak ditambahkan dan limbah sel terakumulasi, populasi mencapai titik dimana sel yang mati mempunyai laju yang lebih cepat dibanding sel yang diproduksi. Kultur tersebut memasuki fase kematian (14). Penurunan jumlah total sel viabel bersifat eksponensial dan merupakan kebalikan dari fase log. Laju penurunan eksponensial beragam dari spesies ke spesies lain. Pada beberapa mikroorganisme, jumlah sel viabel setelah 72

jam kemungkinan akan menjadi nol sementara sel viabel spesies lain masih bertahan selama beberapa minggu atau bulan (13).

#### **D. PERSYARATAN PERTUMBUHAN BAKTERI**

Organisme menggunakan berbagai senyawa kimia yang disebut nutrisi untuk kebutuhan energi dan untuk pembentukan molekul organik serta struktur sel. Nutrisi yang dibutuhkan adalah senyawa yang mengandung unsur penting seperti karbon, oksigen, nitrogen, dan hidrogen yang merupakan persyaratan kimia dalam pertumbuhan bakteri (14).

Persyaratan karbon atau energi biasanya dipenuhi oleh karbohidrat, khususnya berasal dari glukosa. Sumber energi tidak hanya diperoleh dari karbohidrat, namun juga bisa diperoleh dari hidrokarbon, alkohol atau bahkan asam organik (7).

Berdasarkan kebutuhan dan toleransinya terhadap oksigen, mikroorganisme dibagi dalam beberapa kelompok. Mikroba yang menggunakan oksigen (aerob) menghasilkan lebih banyak energi dari nutrisi dibandingkan mikroba yang tidak menggunakan oksigen (anaerob). Beberapa organisme disebut fakultatif anaerob yaitu dapat menggunakan oksigen untuk pertumbuhannya, namun pertumbuhan tetap berlanjut melalui fermentasi atau respirasi anaerob jika oksigen tidak tersedia. Aerotoleran anaerob tidak bisa menggunakan oksigen untuk pertumbuhan, namun bakteri ini dapat mentoleransi dengan baik adanya oksigen (15).

Selain karbon, unsur lain dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk sintesis material selular. Sebagai contoh, sintesis protein membutuhkan sejumlah nitrogen dan sulfur. Sintesis DNA dan RNA juga membutuhkan nitrogen dan fosfor. Fosfor juga dibutuhkan untuk sintesis ATP yang sangat penting untuk penyimpanan dan pemindahan energi kimia didalam sel (15).

Mikroba juga membutuhkan unsur mineral dalam jumlah kecil seperti besi, tembaga, molibdenum, dan seng. Sebagian besar unsur ini penting untuk fungsi beberapa enzim dan biasanya berperan sebagai kofaktor (15).

Senyawa organik yang dibutuhkan karena merupakan komponen sel yang penting atau merupakan prekursor beberapa komponen namun tidak dapat disintesis oleh organisme tersebut disebut faktor pertumbuhan (*growth factor*). Terdapat tiga kelas utama faktor pertumbuhan yaitu asam amino, basa purin dan pirimidin, serta vitamin. Asam amino dibutuhkan untuk sintesis protein sementara basa purin dan pirimidin dibutuhkan untuk sintesis asam nukleat. Vitamin merupakan molekul organik kecil yang dibutuhkan dalam jumlah kecil yang biasanya berperan sebagai koenzim (11).

Selain persyaratan kimia, persyaratan fisik juga diperlukan untuk pertumbuhan bakteri. Pertumbuhan bakteri sangat dipengaruhi oleh suhu yang tergantung pada spesies bakteri. Mikroorganisme dibagi menjadi empat kelompok berdasarkan laju pertumbuhannya pada berbagai suhu yaitu psikrofil dengan suhu optimum yang rendah, mesofil dengan suhu optimum yang sedang, termofil dengan suhu optimum yang tinggi dan hipertermofil dengan suhu optimum yang sangat tinggi. Karena proses pertumbuhan

dikontrol oleh reaksi enzimatik, laju pertumbuhan merupakan fungsi langsung dari suhu (13, 16).

Mikroorganisme sensitif terhadap perubahan keasaman (asiditas) karena ion hidrogen dan ion hidroksil merusak ikatan hidrogen dalam molekul protein dan asam nukleat. Oleh karena itu, mikroorganisme mempunyai kisaran keasaman yang dapat ditoleransi (14).

Mikroorganisme membutuhkan air karena harus berada dalam lingkungan yang lembab agar aktif secara metabolik. Air tidak hanya dibutuhkan untuk melarutkan enzim dan nutrisi tapi juga merupakan reaktan yang penting untuk berbagai reaksi metabolisme (14).

#### **E. RESPONS STRESS BAL**

Kemampuan respons secara cepat terhadap kondisi stress penting untuk pertahanan hidup. Seperti bakteri lainnya, BAL mengembangkan mekanisme pertahanan diri dalam melawan stress yang memungkinkan BAL dapat bertahan pada perubahan kondisi lingkungan. Karena gen yang terlibat dalam respons stress beragam, maka regulasi respons antar spesies berbeda. Pertahanan terhadap stress merupakan salah satu contoh sistem regulasi terintegrasi (6).

Pada BAL, toleransi terhadap asam meningkat pada dua fase fisiologis yang berbeda (i) selama fase logaritma, respons adaptif mengacu sebagai L-ATR (*Logarithmic-Acid Tolerance Response*), dapat diinduksi dengan

inkubasi pada pH asam yang bersifat non-lethal; (ii) setelah memasuki fase stasioner, peningkatan toleransi terhadap asam merupakan hasil dari induksi respons stress umum (*General Stress Response* atau *GSR*). Perubahan komposisi asam lemak membran merupakan respons yang umum terhadap stress lingkungan (6, 17).

Kondisi asam yang ekstrim dapat menurunkan aktivitas beberapa transporter sehingga mengurangi ketersediaan substrat yang esensial. Oleh karena itu, kondisi stress secara tidak langsung dapat memicu malnutrisi atau kekurangan energi. Kondisi kekurangan energi atau elemen esensial ini dapat membahayakan viabilitas sel dalam jangka panjang. Banyak bakteri beradaptasi dengan baik dalam pertahanan terhadap malnutrisi dalam waktu jangka panjang. Beberapa bakteri memasuki proses pembentukan spora yang resisten terhadap stress. BAL tidak mempunyai kemampuan tersebut dan mempunyai cara lain menghadapinya. Pada BAL, malnutrisi mengakibatkan penghambatan pertumbuhan yaitu dengan modifikasi morfologi sel. Pembelahan sel pada saat memasuki fase stasioner mengakibatkan pengurangan ukuran sel (6).

Beberapa studi proteomik terhadap L-ATR menunjukkan sejumlah protein diinduksi selama adaptasi terhadap asam pada BAL. Analisis biokimia, proteomik dan genetik mengindikasikan respons BAL terhadap asam merupakan proses rumit yang melibatkan sintesis beragam protein dan beberapa mekanisme (6, 19).

BAL termasuk bakteri Gram positif yang mempunyai keunikan pada selubung selnya dibandingkan bakteri Gram negatif, yaitu hanya mempunyai dua lapisan dengan peptidoglikan yang tebal dan tidak mempunyai ruang periplasmik. Selubung sel bakteri merupakan pertahanan pertama dan esensial terhadap ancaman dari lingkungan. Selubung sel ini juga merupakan sasaran dari kerja beberapa antibiotik. Mekanisme kerja antibiotik yang terkait dengan selubung sel merupakan bagian dari mekanisme respons selubung sel (*Cell Envelope Stress Response* atau *CESR*) menjadi perhatian penting di dalam studi resistensi suatu antibiotik pada bakteri Gram positif. Beberapa antibiotik yang bekerja dengan sasaran selubung sel bakteri adalah golongan fosfomisin, sikloserin, lantibiotik, ramoplanin, vankomisin, basitrasin, penisilin dan antibiotik-antibiotik beta-laktam (19).

## **F. MEKANISME KERJA ANTIBIOTIK**

Antibiotik adalah suatu senyawa yang diproduksi oleh mikroorganisme dalam jumlah kecil yang dapat menghambat mikroorganisme lain. Antimikroba yang baik menunjukkan toksisitas yang selektif. Maksudnya adalah bahwa obat tersebut berbahaya bagi parasit tanpa menjadi berbahaya bagi inang (manusia). Toksisitas selektif bersifat relatif dibandingkan absolut, yaitu obat pada konsentrasi yang dapat ditoleransi oleh inang namun dapat berbahaya bagi mikroorganisme penginfeksi (20). Mekanisme kerja dari antibiotik adalah (16):

## 1. Penghambatan dinding sel

Dinding sel bakteri terdiri dari jaringan makromolekular disebut peptidoglikan. Penisilin dan beberapa antibiotik lain bekerja dengan mencegah sintesis peptidoglikan. Sehingga dinding sel menjadi lemah dan sel akan mengalami lisis. Karena penisilin bertujuan dalam mempengaruhi proses sintesis, hanya sel yang tumbuh secara aktif yang dipengaruhi oleh antibiotik ini. Karena sel manusia tidak mempunyai dinding sel peptidoglikan, maka penisilin mempunyai toksisitas yang sangat kecil pada sel manusia.

## 2. Penghambatan sintesis protein

Karena sintesis protein merupakan karakteristik umum pada semua sel, baik prokariotik maupun eukariotik, maka sepertinya bukan merupakan tujuan untuk toksisitas selektif. Perbedaan yang signifikan antara prokariot dan eukariot adalah struktur ribosomnya. Sel eukariotik mempunyai ribosom 80S, sedangkan sel prokariotik mempunyai ribosom 70S (ribosom 70S dibuat oleh unit 50S dan 30S). Perbedaan struktur ribosom menjelaskan toksisitas selektif antibiotik yang mempengaruhi sintesis protein. Namun, mitokondria (organel penting eukariotik) juga mengandung ribosom 70S yang sama dengan kedua bakteri. Antibiotik yang mengarah pada ribosom 70S dapat menghasilkan efek yang tidak diinginkan pada sel inang. Antibiotik yang mempengaruhi sintesis protein adalah kloramfenikol, eritromisin, streptomisin dan tetrasiklin.

### 3. Penghambatan fungsi membran sel

Beberapa antibiotik, khususnya antibiotik polipeptida, membawa perubahan pada permeabilitas membran plasma. Perubahan ini mengakibatkan kehilangan metabolit yang penting dari sel mikroba. Sebagai contoh, polimiksin B menyebabkan gangguan pada membran plasma dengan ikatannya pada fosfolipid dari membran.

### 4. Penghambatan sintesis asam nukleat

Sejumlah antibiotik mengganggu proses replikasi DNA dan transkripsi pada mikroorganisme. Beberapa obat dengan aksi seperti ini harus sangat dibatasi penggunaannya, karena antibiotik ini juga mengganggu DNA dan RNA mamalia.

### 5. Penghambatan sintesis metabolit esensial

Aktivitas enzim spesifik dari mikroorganisme dapat dihambat secara kompetitif oleh senyawa (antimetabolit) yang mirip dengan substrat normal untuk enzim. Contoh penghambatan kompetitif yaitu antara antimetabolit sulfanilamid dan *para-aminobenzoic acid* (PABA).

Aktivitas antimikroba diukur secara *in vitro* dengan tujuan untuk menentukan potensi dari zat antibakteri, konsentrasinya dalam cairan tubuh atau jaringan, dan penerimaan dari mikroorganisme terhadap konsentrasi obat yang telah diketahui. Faktor yang mempengaruhi aktivitas antimikroba secara *in vitro* adalah pH lingkungan, komponen medium, stabilitas obat,

ukuran inokulum, lamanya inkubasi, dan aktivitas metabolik dari mikroorganismenya (20).

## G. RESISTENSI ANTIBIOTIK

BAL secara luas digunakan sebagai probiotik atau dalam starter kultur, namun BAL mempunyai potensi sebagai inang dari gen resisten antibiotik dengan resiko transfer gen pada bakteri asam laktat dan bakteri patogen lainnya (4).

Perkembangan resistensi antibiotik pada bakteri didasarkan pada dua faktor, adanya gen resisten dan *selective pressure* dengan penggunaan antibiotik (5). Resistensi gen terdiri dari dua jenis yaitu resistensi intrinsik (*intrinsic resistance*) dan resistensi yang diperoleh (*acquired resistance*). Resistensi pada antibiotik dapat bersifat intrinsik pada spesies atau genus bakteri (resistensi inheren atau resistensi alami) yang berakibat pada kemampuan organisme mengatasi adanya antimikroba, hal ini dikarenakan karakteristik inheren dari mikroorganismenya. Resistensi intrinsik bukan merupakan pemindahan gen resisten secara horizontal dan tidak beresiko terhadap bakteri non-patogen. Sebaliknya, resistensi yang diperoleh terdapat pada beberapa galur spesies yang biasanya peka terhadap antibiotik dan menyebar diantara bakteri secara horizontal. Resistensi yang diperoleh terhadap antimikroba dapat terjadi baik dari mutasi pada genom bakteri atau melalui akuisisi gen pengkode tambahan untuk mekanisme resistensi.

Namun, resistensi juga bisa terjadi jauh sebelum penggunaan klinis antibiotik. Gen resisten tersebut berasal dari penghasil antimikroba yang membawa gen resisten untuk melindungi bakteri tersebut dari produk antimikroba yang dihasilkan (4).

Satu antibiotik tidak hanya menimbulkan resistensi pada obat tersebut saja. Namun juga bisa menimbulkan resistensi pada senyawa lain yang berhubungan secara struktur pada kelas yang sama, contohnya yaitu resistensi pada tetrasiklin oleh *tet* (M) juga meliputi resistensi pada oksitetrasiklin, klortetrasiklin, doksisisiklin dan minosiklin. Menurut Roberts et al., ketika antibiotik pada kelas yang berbeda berbagi situs target yang sama, dan situs target ini dimodifikasi oleh produk dari gen resisten, resistensi silang antara struktur antibiotik yang tidak berkaitan dapat terjadi, contoh resistensi kombinasi pada makrolida, linkosamid, dan streptogramin B oleh gen *erm* (4).

Antibiotik membunuh atau menghambat bakteri yang peka namun tidak dengan yang resisten sehingga kemudian dapat berproliferasi. Resistensi antibiotik dapat diperoleh melalui sejumlah mekanisme yang berbeda, termasuk penurunan ambilan antibiotik, peningkatan pengeluaran antibiotik, inaktivasi atau modifikasi target antibiotik, pengenalan terhadap target baru yang resisten terhadap antibiotik, hidrolisis antibiotik, modifikasi antibiotik, dan pencegahan aktivasi antibiotik (21).

## H. PROFIL KEPEKAAN BAL TERHADAP ANTIBIOTIK

Profil resistensi antibiotik dari *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* dan *Bifidobacterium* agak berbeda. Sebagian besar spesies resisten terhadap metronidazol ( $\text{MIC} \geq 30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), karena tidak mempunyai aktivitas hidrogenase. Pada umumnya resisten terhadap sulfonamida ( $\text{MIC} \geq 256 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) dan trimetopim ( $\text{MIC} \geq 30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Mikroorganisme ini mempunyai kemampuan biosintesis yang terbatas dan kekurangan jalur sintesis asam folat, oleh karena itu, BAL resisten terhadap zat ini secara intrinsik (21).

Profil kepekaan masing-masing BAL yaitu sebagai berikut (21):

### 1. *Lactobacillus*

*Lactobacilli* biasanya resisten terhadap penisilin (piperasilin dan ampisilin) dan inhibitor  $\beta$ -laktamase, namun lebih resisten terhadap oxasilin dan sefalosporin (sefoksitin dan seftriakson). Impermeabilitas dinding sel terlihat sebagai mekanisme utama resistensi. Sebagian besar spesies *Lactobacillus* menunjukkan resistensi tinggi terhadap glikopeptida (vankomisin dan teikoplanin). *Lactobacilli* juga biasanya resisten terhadap sebagian besar inhibitor sintesis asam nukleat, termasuk enoksasin, pefloksasin, norfloksasin, asam nalidixat, sulfametoksazol, trimetoprim, kotrimoksazol dan metronidazol. Sebagian besar resistensi terhadap antibiotik ini bersifat intrinsik.

Secara umum, lactobacilli peka terhadap antibiotik yang menghambat sintesis protein, seperti kloramfenikol, eritromisin, klindamisin, dan tetrasiklin, juga lebih resisten terhadap aminoglikosida (neomisin, kanamisin, streptomisin, dan gentamisin).

## 2. *Lactococcus*

*Lactococcus lactis* biasanya peka terhadap antibiotik spektrum Gram positif (makrolida, basitrasin, eritromisin, linkomisin, novobiosin, teikoplanin dan vankomisin), antibiotik spektrum luas (rifampisin, spektinomisin dan kloramfenikol) dan beta-laktam (penisilin, ampisilin, amoksisilin, tikarsilin dan imipenem). Sebagian besar spesies lactococcal resisten terhadap metronidazol, sefoksitin, trimetoprim, antibiotik spektrum Gram negatif (asam fusidat, asam nalidiksat dan polimiksin B) dan aminoglikosida (gentamisin dan kanamisin). *Lactococcus lactis* menunjukkan resistensi terhadap kloramfenikol, klindamisin, streptomisin, eritromisin dan tetrasiklin.

## 3. *Streptococcus thermophilus*

Dari sekian banyak spesies yang termasuk dalam genus *Streptococcus*, hanya *Streptococcus thermophilus* penting dalam teknologi. *Streptococcus thermophilus* biasanya sensitif terhadap kloramfenikol, tetrasiklin, eritromisin, sefalotin, dan siprofloksasin. *Streptococcus thermophilus* menunjukkan resistensi sedang hingga tinggi terhadap aminoglikosida (gentamisin, kanamisin dan streptomisin), trimetoprim dan sulfadiazin.

#### 4. *Pediococcus*

Data kepekaan *Pediococcus* spp. terhadap antibiotik yang diisolasi dari makanan sangat jarang. Penisilin G, imipenem, gentamisin, netilmisin, eritromisin, klindamisin, rifampisin, kloramfenikol, daptomisin, dan ramoplanin biasanya aktif melawan spesies *Pediococcus*, namun tingkat kepekaannya tergantung pada spesies. Sebaliknya, pediococci resisten secara intrinsik terhadap glikopeptida (vankomisin dan teikoplanin) dan terhadap streptomisin, kanamisin, tetrasiklin (khususnya *Pediococcus acidilactici*), doksisisiklin, siprofloksasin, sulfametoksazol dan trimetoprim-sulfametokazol.

#### 5. *Leuconostoc*

*Leuconostoc* resisten terhadap glikopeptida, sefoksitin dan metronidazol. Selain itu juga, spesies *Leuconostoc* biasanya (atau sebagian) juga resisten terhadap asam nalidixat, gentamisin, kanamisin, streptomisin, nitrofurantoin, sulfadiazin dan trimetoprim. Resistensi terhadap antibiotik karbapenem telah dilaporkan pada strain *Leuconostoc lactis* penyebab infeksi ventrikulitis pada manusia. Sebagian besar spesies *Leuconostoc* peka terhadap rifampisin, kloramfenikol, eritromisin, klindamisin dan tetrasiklin.

### I. METODE ZONA HAMBAT

Ada dua metode zona hambat, yaitu metode difusi cakram dan metode difusi tabung. Metode difusi cakram (*disk diffusion method*) metode yang sederhana, mudah dilakukan, tidak mahal, dan mudah dipahami. Dalam

metode difusi cakram, yang dilakukan pertama kali adalah pembuatan *base layer* (lapisan dasar) dan *seed layer* (lapisan perbenihan) sebagai medium pertumbuhan bakteri pada cawan petri. Setelah medium agar memadat, dilakukan peletakkan disk antibiotik di atas permukaan medium kemudian diinkubasikan pada suhu dan waktu inkubasi sesuai dengan karakteristik bakteri. Setelah itu, dilakukan pengukuran zona hambat (22).

Metode yang kedua yaitu metode dilusi tabung (*tube dilution method*). Metode ini dilakukan dengan membuat suatu deretan pengenceran antibiotik dalam perbenihan cair, kemudian diberikan inokulum bakteri yang akan diperiksa. Kepekaan yang relatif diukur dengan melihat konsentrasi antibiotik yang terendah dimana pertumbuhan bakteri tidak tampak (*Minimal Inhibitory Concentration = MIC* atau Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)) (22).

## **J. ANALISIS TRANSKRIPTOMIK**

Analisis transkriptomik dilakukan dengan menggunakan teknologi RNA sekuens (*RNA-Seq*). Akhir-akhir ini, *RNA-Seq* merupakan pendekatan yang dikembangkan untuk menentukan profil transkriptom menggunakan teknologi *deep-sequencing* dan untuk mempelajari transkriptom pada tingkat nukleotida. *RNA-Seq* juga menyediakan pengukuran dengan presisi yang lebih tinggi terhadap level transkripsi dan isoformnya dibandingkan metode lain. Transkriptom merupakan kumpulan molekul mRNA, atau transkrip, yang dihasilkan oleh satu sel atau satu populasi sel. Karena transkriptom meliputi

semua transkrip mRNA dalam sel, transkriptom merefleksikan gen yang diekspresikan secara aktif pada waktu tertentu. Studi tentang transkriptomik juga ditujukan untuk menentukan profil ekspresi dan memeriksa level ekspresi mRNA pada populasi sel, yang umumnya menggunakan teknik berbasis teknologi *microarray DNA* (23).



## BAB III

### BAHAN, ALAT, DAN CARA KERJA

#### A. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Penelitian ini dilakukan dari bulan Agustus sampai Desember 2009.

#### B. BAHAN

##### 1. Bakteri *Leuconostoc mesenteroides*

Bakteri *Leuconostoc mesenteroides* yang digunakan pada penelitian ini berasal dari kultur stok beku BAL sebanyak 13 galur yang telah teridentifikasi secara molekuler dengan 16S rDNA yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI dari penelitian-penelitian sebelumnya (24, 25, 26). Daftar nama galur *Leuconostoc mesenteroides* dicantumkan pada tabel 1.

## 2. Medium

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium MRS (*de Man Rogosa Sharpe*) Agar, medium CMG (*Chopped Medium Glucose*) Agar, dan medium NA (*Nutrient Agar*) [Difco, USA].

Medium MRS Agar mengandung komposisi per liter terdiri dari pepton [Difco, Perancis] 10 g, LAB-Lemco [Oxoid, Inggris] 8 g, ekstrak khamir [Difco, Perancis] 4 g, dikalium hidrogen fosfat [Merck, Jerman] 2 g, natrium asetat [Merck, Jerman] 5 g, amonium sitrat [Merck, Jerman] 2 g, magnesium sulfat [Merck, Jerman] 0,2 g, mangan sulfat [Merck, Jerman] 0,05 g, agar bakto [Pronadisa, Spanyol] 15 g, tween 80 [Merck, Jerman] 0,5 mL dan dekstrosa [Sigma, USA] 20 g dengan pH medium 6,3 (2). Medium MRS Agar dapat juga dibuat dari MRS broth [Difco, Perancis] dan agar bakto [Pronadisa, Spanyol] dengan komposisi per liter masing-masing 55 gram dan 15 gram.

Medium CMG mengandung komposisi per liter yaitu ekstrak khamir [Difco, Perancis] 5 g, pepton [Difco, Perancis] 5 g, natrium klorida [Merck, Jerman] 5 g, glukosa [Sigma] 10 g, agar bakto [Pronadisa, Spanyol] 15 g dengan pH medium 7,0 (2).

### 3. Antibiotik

Antibiotik yang digunakan adalah amoksisilin (25 µg/ disk), kloramfenikol (30 µg/ disk), gentamisin (10 µg/ disk), eritromisin (15 µg/ disk), tetrasiklin (30 µg/ disk), dan vankomisin (30 µg/ disk). Antibiotik berupa disk (*Susceptibility test disc* Himedia<sup>®</sup> dan Oxoid<sup>®</sup>) yang diletakkan pada permukaan medium pertumbuhan bakteri.

### 4. Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah asam klorida pekat [Merck, Jerman], natrium hidroksida [Merck, Jerman], natrium klorida [Merck, Jerman], dan kalsium karbonat [Merck, Jerman].

### C. ALAT

*Laminar Air Flow* (LAF) cabinet [Esco, Cina], *orbital shaker inkubator*, *pipetting aid* [Gilson], *scanner* [Canoscan 4400F], jangka sorong, ose, dan alat-alat lain yang biasa digunakan dalam Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi.

## D. CARA KERJA

Cara kerja dalam penelitian ini diawali dengan pembuatan medium untuk peremajaan bakteri dan pembuatan kultur kerja serta kultur stok. Selanjutnya, untuk uji kepekaan bakteri *Leu. mesenteroides* terhadap antibiotik dilakukan pembuatan medium lapisan dasar (*base layer*) dan lapisan perbenihan (*seed layer*) serta pembuatan inokulum bakteri. Pengujian kepekaan bakteri terhadap antibiotik dilakukan secara paralel antara pengujian dengan medium standar dan medium modifikasi sehingga dapat dibandingkan respons bakteri *Leuconostoc mesenteroides* pada medium tersebut melalui pengukuran zona hambat yang terbentuk dari masing-masing antibiotik.

### 1. Pembuatan Medium

#### a. Medium MRS Agar (tanpa resep)

MRS Broth dan agar bakto ditimbang masing-masing sebesar 27,5 gram dan 7,5 gram. Keduanya dimasukkan ke dalam labu bulat, ditambahkan akuades secukupnya hingga larut kemudian dicukupkan volumenya hingga 500 mL. Panaskan medium diatas *hotplate* sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga mendidih. Kemudian medium disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit. Sementara itu, *Laminar Air Flow (LAF)* disiapkan. Setelah medium hangat, medium tersebut dituang secara aseptis ke cawan Petri.

Setelah membeku, cawan Petri dibalik dan disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C. Medium MRS Agar ini digunakan untuk peremajaan isolat.

b. Medium MRS untuk Agar Miring

MRS broth, kalsium karbonat, dan agar bakto ditimbang masing-masing sebesar 5,5 gram; 0,5 gram; dan 1,5 gram. Ketiganya dimasukkan ke dalam wadah, ditambahkan akuades secukupnya, dan dipanaskan di atas *hotplate* sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga mendidih. Volumennya dicukupkan hingga 100 mL dengan akuades. Dalam keadaan panas dan masih sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*, medium tersebut dipipet masing-masing sebanyak 5 mL ke dalam tabung reaksi. Kemudian, seluruh tabung disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit. Tabung reaksi dimiringkan hingga membeku dan dimasukkan ke dalam lemari pendingin untuk digunakan keesokan harinya.

c. Medium NA (*Nutrient Agar*)

Bubuk NA ditimbang sebanyak 11,5 g, dimasukkan ke dalam labu bulat dan ditambahkan 500 mL akuades, kemudian dipanaskan hingga mendidih di atas *hotplate* sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Selanjutnya medium disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Sementara itu *Laminar Air Flow* (LAF) disiapkan. Setelah medium hangat, medium tersebut dituang secara aseptis ke cawan Petri. Setelah membeku, cawan Petri dibalik dan disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C.

Medium NA digunakan untuk pengujian kepekaan bakteri terhadap antibiotik sebagai *base layer*.

d. Medium MRS Agar (dengan resep)

Masing-masing bahan ditimbang dengan ukuran sebagai berikut: pepton 2,5 g, LAB-Lemco 2 g, ekstrak khamir 1 g, dikalium hidrogen fosfat 0,5 g, natrium asetat 1,25 g, amonium sitrat 0,5 g, magnesium sulfat 0,05 g dan mangan sulfat 0,0125 g. Semua bahan dimasukkan ke dalam labu bulat. Setelah itu, ditambahkan akuades secukupnya dan dilarutkan dengan diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Selanjutnya ditambahkan 0,125 mL ( $\pm$  2-3 tetes) tween 80 dan diaduk kembali hingga homogen dengan *magnetic stirrer* di atas *hotplate*. Larutan medium ini diatur pH-nya dengan pH meter melalui penambahan asam klorida 1 N hingga pH 6,3 (2). Setelah pengaturan pH, dilakukan penambahan agar bakto sebanyak 3,75 g ke dalam larutan medium, kemudian volume dicukupkan dengan akuades hingga 125 mL. Larutan medium ini diaduk kembali hingga homogen dengan *magnetic stirrer* di atas *hotplate*. Selanjutnya medium ini dipipet sebanyak 2 mL ke dalam tabung reaksi. Sementara itu, dekstrosa ditimbang sebanyak 5 gram kemudian dilarutkan dengan 125 mL akuades di dalam labu bulat. Larutan medium dan larutan dekstrosa disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Medium ini digunakan sebagai *seed layer* untuk pengujian kepekaan bakteri terhadap antibiotik yaitu dengan mencampurkan 2 mL larutan dekstrosa ke dalam tabung berisi larutan medium secara aseptis.

e. Medium CMG

Masing-masing bahan ditimbang dengan ukuran sebagai berikut: ekstrak khamir 1,25 g, pepton 1,25 g, natrium klorida 1,25 g, dan dekstrosa 2,5 g. Semua bahan dimasukkan ke dalam labu bulat. Setelah itu, ditambahkan dengan akuades secukupnya dan dilarutkan dengan diaduk hingga homogen di atas *hotplate* dengan *magnetic stirrer*. Larutan medium ini diatur pH-nya dengan pH meter melalui penambahan natrium hidroksida 1 N hingga pH 7,0. Setelah pengaturan pH, dilakukan penambahan agar bakto sebanyak 3,75 g ke dalam larutan medium, kemudian volume dicukupkan dengan akuades hingga 250 mL. Larutan medium ini diaduk kembali hingga homogen dengan *magnetic stirrer* di atas *hotplate*. Selanjutnya medium ini dipipet sebanyak 4 mL ke dalam tabung reaksi. Larutan medium disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Medium ini digunakan sebagai *seed layer* untuk pengujian kepekaan bakteri terhadap antibiotik.

f. Medium modifikasi

Pembuatan medium modifikasi sama dengan pembuatan medium standar MRS dan CMG. Perbedaannya adalah pengaturan pH medium hingga mencapai pH modifikasi yang ditetapkan dengan penambahan asam klorida 1 N atau natrium hidroksida 1 N.

## **2. Peremajaan, Pembuatan Kultur Kerja dan Kultur Stok serta Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri *Leuconostoc mesenteroides***

Kultur bakteri *Leuconostoc mesenteroides* dari koleksi stok beku yang dimiliki Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI masing-masing diremajakan kembali. Dengan menggunakan ose, isolat bakteri digoreskan pada medium agar MRS secara aseptis, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 32°C. Suhu 32°C merupakan suhu optimum untuk pertumbuhan BAL tersebut (26). Koloni tunggal yang terbentuk kemudian diamati morfologinya dan ditanam kembali pada MRS agar miring dan diremajakan setiap dua hingga tiga minggu sekali dengan cara memindahkan kembali kultur dari agar miring ke cawan Petri. Jika telah diperoleh koloni tunggal pada cawan Petri, maka ditanam kembali pada MRS agar miring dengan pengerjaan duplo, sebagai kultur kerja dan kultur stok.

## **3. Uji Orientasi**

Uji orientasi dilakukan untuk menentukan kondisi manipulasi yang akan ditetapkan pada pengujian selanjutnya. Orientasi dilakukan terhadap 3 variabel yaitu pengurangan konsentrasi salah satu komponen medium, variasi waktu inkubasi, dan variasi tingkat keasaman medium. Pengujian orientasi dilakukan pada 2 kondisi berikut:

- a. Pengurangan konsentrasi salah satu komponen medium dan waktu inkubasi

Uji orientasi pertama dilakukan dengan pengurangan konsentrasi pepton 50% pada medium MRS dengan dua waktu inkubasi yaitu 18 dan 24 jam. Hasilnya menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara kondisi standar dengan manipulasi, sehingga tidak menggunakan pengurangan konsentrasi salah satu komponen medium sebagai variabel pengujian selanjutnya. Sementara itu, waktu inkubasi yang ditetapkan untuk pengujian selanjutnya adalah 21 jam.

- b. Variasi tingkat keasaman medium

Variasi tingkat keasaman dilakukan pada 4 kondisi pH yaitu 2 pH yang mewakili kondisi asam, pada pH 4,3 dan pH 4,6, dan 2 pH yang mewakili kondisi basa, pada pH 8,0 dan pH 9,0. Hasilnya menunjukkan ada perbedaan yang cukup signifikan antara kondisi standar dengan manipulasi, sehingga menjadi salah satu variabel yang digunakan pada pengujian selanjutnya. pH yang ditetapkan pada pengujian selanjutnya adalah pH 4,6 dan pH 9,0.

#### **4. Modifikasi pH Medium**

Modifikasi terhadap kondisi manipulasi telah melalui beberapa percobaan pendahuluan sehingga diformulasi modifikasi media sebagai berikut:

a. Medium MRS

pH normal untuk medium MRS adalah 6,3 (2)

Modifikasi 1: Penambahan asam klorida 1 N hingga mencapai pH 4,6

Modifikasi 2: Penambahan natrium hidroksida 1 N hingga mencapai pH 9,0

b. Medium CMG

pH normal untuk medium CMG adalah 7,0 (2)

Modifikasi 1: Penambahan asam klorida 1 N hingga mencapai pH 4,6

Modifikasi 2: Penambahan natrium hidroksida 1 N hingga mencapai pH 9,0

## 5. Pembuatan Inokulum Bakteri *Leuconostoc mesenteroides*

Bakteri *Leuconostoc mesenteroides* yang terdapat dalam agar miring yang telah diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 32°C diambil dengan ose dan diencerkan dalam 2 mL larutan natrium klorida fisiologis 0,9%, sehingga kekeruhannya sesuai dengan larutan Mc Farland III. Larutan Mc Farland III berisi 0,3 mL barium klorida 0,048 M dan 9,7 mL asam sulfat 0,35 N. Kemudian siapkan 3 tabung steril, masing-masing tabung diisi dengan 9 mL natrium klorida fisiologis. Selanjutnya suspensi bakteri diencerkan 10 kali, 100 kali, dan 1000 kali dengan cara yaitu suspensi bakteri diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung I, dihomogenkan dengan vortex. Sebanyak 1 mL suspensi dari tabung I diambil dan dimasukkan ke dalam tabung II, dihomogenkan dengan vortex. Sebanyak 1 mL suspensi dari tabung II diambil dan dimasukkan ke dalam tabung III, dihomogenkan dengan vortex

sehingga pada pengenceran ini diperoleh 10 kali, 100 kali dan 1000 kali masing-masing pada tabung I, II, dan III. Dari hasil pengenceran tersebut yang digunakan adalah pengenceran 1000 kali atau setara dengan  $10^6$  bakteri/mL. Tabung III yang berisi  $10^6$  bakteri/mL tersebut kemudian dihomogenkan dengan vortex sehingga diperoleh inokulum bakteri *Leuconostoc mesenteroides* (22).

#### **6. Pengujian Kepekaan Galur-Galur Bakteri *Leuconostoc mesenteroides* Terhadap Antibiotik**

Sebanyak 10,0 mL medium NA dituang secara aseptis ke dalam cawan Petri berdiameter 9 cm dan dibiarkan membeku sebagai *base layer*. Inokulum bakteri *Leuconostoc mesenteroides* sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam 4 mL medium *seed layer* di dalam tabung reaksi dan dihomogenkan dengan vortex. Kemudian dituang ke cawan Petri. Setelah memadat, disk antibiotik diletakkan pada permukaan medium *seed layer*, kemudian didiamkan selama 1 jam agar antibiotik dapat berdifusi ke dalam agar, selanjutnya diinkubasikan pada suhu  $32^{\circ}\text{C}$  selama 21 jam. Setelah diinkubasi, zona hambat yang terbentuk diukur dengan jangka sorong. Pengujian ini dilakukan secara duplo (22).

## **7. Pengamatan Zona Hambat Galur-Galur Bakteri *Leuconostoc mesenteroides* Terhadap Antibiotik**

Pengamatan zona hambat dilakukan dengan perbandingan antara medium MRS standar dengan medium modifikasinya, medium CMG standar dengan medium modifikasinya, medium MRS standar dengan medium CMG standar, dan medium MRS modifikasi dengan medium CMG modifikasi. Hal ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pH dan komposisi medium terhadap zona hambat bakteri yang terbentuk.

## **8. Analisis Data Pengamatan Zona Hambat secara Statistik**

Setelah diperoleh data pengamatan zona hambat hasil pengukuran, data tersebut diuji statistik dengan program SPSS 15.0. Tujuan dari analisis data secara statistik adalah mengetahui ada tidaknya perbedaan respons *Leu. mesenteroides* yang signifikan terhadap antibiotik pada medium standar, modifikasi asam, dan modifikasi basa.

Ada dua hipotesa yang dibuat yaitu  $H_0$  = data respons antara medium standar dengan modifikasi asam (atau medium standar dengan modifikasi basa) tidak berbeda secara signifikan dan  $H_1$  = data respons antara medium standar dengan modifikasi asam (atau medium standar dengan modifikasi basa) berbeda secara signifikan.

Uji statistik yang digunakan adalah uji T sampel berpasangan (*paired samples T-test*) dengan level signifikansi 0,025 (analisis *2-tailed* dengan tingkat kepercayaan 95%). Kriteria pengujiannya yaitu  $H_0$  ditolak jika level signifikansi kurang dari 0,025. Sebelum dilakukan analisis dengan uji T sampel berpasangan, data pengamatan zona hambat dianalisis dengan uji Kolmogorof-Smirnov (dengan level signifikansi 0,025) untuk mengetahui apakah data tersebut terdistribusi secara normal atau tidak. Uji tersebut merupakan salah satu syarat utama untuk analisis parametrik. Uji T sampel berpasangan merupakan analisis parametrik. Jika data respons terdistribusi secara normal, maka uji T sampel berpasangan dapat dilakukan (27).

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. HASIL**

##### **1. Hasil Pengamatan Morfologi Koloni Galur-Galur *Leuconostoc mesenteroides***

Bakteri *Leuconostoc mesenteroides* sebanyak 13 galur dipurifikasi pada medium MRS agar dalam cawan Petri sehingga diperoleh koloni tunggal bakteri. Ketigabelas galur bakteri tersebut menunjukkan morfologi koloni yang sama, yaitu koloni tunggal bakteri berwarna putih dengan permukaan halus. Koloni tunggal hasil purifikasi beberapa galur *Leuconostoc mesenteroides* ditunjukkan pada gambar 2.

##### **2. Hasil Uji Orientasi Terhadap Zona Hambat yang Terbentuk Pada Medium Standar dan Medium Manipulasi dengan Beberapa Parameter**

Kondisi manipulasi yang pertama kali dilakukan adalah dengan pengurangan konsentrasi salah satu komponen medium. Pada medium MRS, komponen medium yang dikurangi konsentrasinya adalah pepton. Pengurangan konsentrasi pepton dilakukan sebanyak 50%. Orientasi juga

dilakukan berdasarkan variabel lain yaitu waktu inkubasi. Orientasi dilakukan terhadap waktu inkubasi 18 dan 24 jam dengan kondisi manipulasi pengurangan konsentrasi pepton sebanyak 50%. Namun, hasil orientasi ini menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan antara kondisi manipulasi dengan standar pada waktu inkubasi 18 dan 24 jam. Dari hasil orientasi ini, ditetapkan satu waktu inkubasi untuk kondisi selanjutnya adalah 21 jam.

Orientasi lainnya dilakukan berdasarkan variabel pH. Pada kondisi manipulasi dilakukan modifikasi pH pada pH asam dan pH basa. Sebelum orientasi, dilakukan uji konfirmasi pertumbuhan bakteri pada medium dengan kondisi pH ekstrim. Pada uji konfirmasi pertumbuhan dengan medium MRS dan CMG, dilakukan pemilihan angka pH meliputi 4 pH yaitu pH ekstrim asam yang diuji pada pH 4,3 dan 4,6 serta pH ekstrim basa yang diuji pada pH 8,0 dan 9,0.

Hasil pengamatan uji konfirmasi pertumbuhan yang dilakukan terhadap beberapa galur bakteri pada medium MRS dan CMG menunjukkan bahwa bakteri masih dapat tumbuh pada pH 4,6, sementara pada pH 4,3 bakteri tidak tumbuh. Pada pengujian dengan pH basa yaitu pada pH 8,0 dan 9,0, bakteri masih dapat tumbuh pada kedua kondisi tersebut. Adanya pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan penampakan medium yang terlihat lebih keruh dibandingkan dengan kontrol negatif dari masing-masing medium yang tidak dicampur dengan inokulum bakteri.

Pada uji orientasi dengan pH basa yaitu pada pH 8,0 dan 9,0, keduanya menunjukkan zona hambat bakteri terhadap antibiotik. Namun, dari kedua pH basa tersebut, pH 9,0 memberikan respons paling signifikan jika dibandingkan dengan pH 8,0.

Dari percobaan orientasi tersebut, kondisi yang akan ditetapkan pada pengujian selanjutnya adalah kondisi manipulasi dengan pH 4,6 dan pH 9,0 serta kondisi standar dengan pH 6,3 sebagai pH standar MRS dan pH 7,0 sebagai pH standar medium CMG, dengan waktu inkubasi 21 jam.

### **3. Hasil Pengamatan Zona Hambat Terhadap Galur-Galur *Leuconostoc mesenteroides* pada Kondisi Standar dan Manipulasi**

Hasil pengamatan zona hambat terhadap 13 galur bakteri secara umum menunjukkan adanya perbedaan respons. Namun, ada beberapa galur bakteri yang tidak menunjukkan perubahan respons secara signifikan jika dibandingkan dengan kondisinya. Pada umumnya, medium MRS dan CMG dengan kondisi pH basa menunjukkan perluasan diameter zona hambat yang cukup signifikan dibandingkan dengan standarnya. Namun, terdapat juga respons beberapa galur bakteri terhadap antibiotik yang menghasilkan pengurangan diameter zona hambat baik pada kondisi medium pH asam maupun pH basa.

Respons beberapa galur *Leu. mesenteroides* terhadap antibiotik pada medium MRS dan CMG ditunjukkan pada gambar 3-6. Hasil pengamatan

zona hambat ketigabelas galur bakteri terhadap masing-masing antibiotik pada medium MRS dan CMG dapat dilihat pada tabel 2 dan 3. Hasil pengamatan juga dibuat dalam bentuk grafik respons galur-galur *Leu. mesenteroides* terhadap antibiotik pada medium standar, modifikasi asam, dan modifikasi basa yang ditunjukkan pada gambar 7-11.

#### **4. Hasil Analisis Statistik Data Respons *Leu. mesenteroides* Terhadap Antibiotik**

Uji distribusi normal dengan analisis Kolmogorof-Smirnov menunjukkan semua data pengamatan zona hambat dari masing-masing antibiotik pada medium MRS dan CMG terdistribusi secara normal. Hasil uji nya dapat dilihat pada lampiran 1.

Dari hasil analisis statistik dengan uji T sampel berpasangan, respons *Leu. mesenteroides* terhadap amoksisilin yaitu berupa perluasan diameter zona hambat secara signifikan baik pada medium modifikasi MRS asam maupun basa. Sementara pada medium CMG, analisisnya tidak dapat ditentukan secara statistik.

Respons terhadap kloramfenikol juga memberikan perluasan diameter zona hambat secara signifikan pada medium modifikasi MRS dan CMG baik asam maupun basa.

Respons *Leu. mesenteroides* pada gentamisin dan eritromisin yaitu berupa pengurangan diameter zona hambat secara signifikan pada medium

modifikasi MRS dan CMG asam serta perluasan diameter zona hambat secara signifikan pada medium modifikasi MRS dan CMG basa.

Respons *Leu. mesenteroides* terhadap antibiotik tetrasiklin pada medium modifikasi MRS asam mengalami perluasan diameter zona hambat secara signifikan dan pada medium modifikasi MRS basa mengalami pengurangan diameter zona hambat secara signifikan. Sementara respons pada medium modifikasi CMG asam dan basa yaitu pengurangan diameter zona hambat namun tidak signifikan.

Hasil rata-rata zona hambat *Leu. mesenteroides* terhadap antibiotik pada medium MRS dan CMG standar, asam dan basa dapat dilihat pada tabel 4 dan gambar 12. Sementara itu, hasil analisis statistik beserta nilai signifikansinya dapat dilihat pada tabel 5 dan lampiran 2-10.

## **B. PEMBAHASAN**

Tahap awal dari penelitian ini adalah purifikasi terhadap galur-galur *Leu. mesenteroides* dari stok beku koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI sebanyak 13 galur yang telah teridentifikasi secara molekuler dengan 16S rDNA (24, 25, 26). Pemilihan bakteri *Leu. mesenteroides* sebagai bakteri model dalam penelitian ini dikarenakan telah dilaporkan sekuens genomnya dengan lengkap sehingga bisa digunakan untuk mempelajari ekspresi gen yang dalam hal ini adalah respons terhadap antibiotik.

Stok beku 13 galur *Leu. mesenteroides* masing-masing digoreskan pada agar MRS dalam cawan Petri, kemudian diinkubasi pada suhu 32°C selama 18-24 jam. Suhu 32°C merupakan suhu optimum untuk pertumbuhan BAL (26). Medium MRS merupakan medium yang digunakan untuk kultivasi BAL (28). Medium MRS telah digunakan pada penelitian sebelumnya untuk menumbuhkan koleksi BAL yang ada (24, 26). Selanjutnya dilakukan purifikasi galur *Leu. mesenteroides* yang sudah tumbuh, dengan cara mengambil koloni tunggal dari cawan Petri hasil goresan stok beku, kemudian menggoreskannya kembali pada agar MRS dalam cawan Petri yang lain (29). Cawan Petri tersebut selanjutnya diinkubasi pada suhu 32°C selama 18-24 jam. Purifikasi isolat bertujuan untuk memastikan tidak terjadi kontaminasi dengan anggapan bahwa satu koloni tunggal terdiri dari satu spesies bakteri. Dari hasil purifikasi tersebut, diambil satu koloni tunggal untuk digoreskan pada agar miring MRS dalam tabung reaksi. Agar miring ini digunakan sebagai kultur kerja.

Agar miring MRS dibuat dengan menambahkan kalsium karbonat ke dalam medium agar MRS. Kalsium karbonat biasa ditambahkan ke dalam medium jika kultur yang ditanam akan disimpan digunakan dalam jangka waktu cukup lama sebagai kultur kerja atau kultur stok. Fungsi kalsium karbonat ini adalah untuk menjaga pH agar tidak terlalu asam akibat asam laktat yang dihasilkan oleh BAL. Produksi asam laktat menyebabkan pH medium dapat turun mencapai pH 2 yang kemudian dapat menyebabkan kematian BAL. Reaksi yang terjadi antara kalsium karbonat dengan asam

laktat merupakan reaksi penetralan yang membentuk garam kalsium laktat sehingga pH medium tetap terjaga dan bakteri dapat tumbuh lebih lama (30).

BAL memproduksi asam yang dapat mempengaruhi pertumbuhannya sendiri. Untuk menetralkan asam dan menjaga pH yang seharusnya, dapat kimia disertakan dalam medium pertumbuhan. Pepton, asam amino, dan garam fosfat pada medium dapat berperan sebagai dapar selain sebagai penyedia nutrisi yang esensial (15).

Antibiotik yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak enam antibiotik yaitu amoksisilin, kloramfenikol, gentamisin, eritromisin, tetrasiklin, dan vankomisin. Berdasarkan mekanisme kerjanya, keenam antibiotik tersebut tergolong dalam dua kelompok yaitu antibiotik yang menghambat sintesis dinding sel mikroba (amoksisilin dan vankomisin) dan antibiotik yang menghambat sintesis protein sel mikroba. Antibiotik yang menghambat sintesis protein sel mikroba dibagi menjadi dua kelompok yaitu antibiotik yang berikatan pada subunit ribosom 30S (gentamisin dan tetrasiklin) dan antibiotik yang berikatan pada subunit ribosom 50S (kloramfenikol dan eritromisin) (31).

Antibiotik-antibiotik tersebut dipilih karena merupakan antibiotik yang telah banyak digunakan. Selain itu, vankomisin merupakan antibiotik yang telah diketahui bahwa bakteri *Leu. mesenteroides* mempunyai sifat resisten terhadap antibiotik tersebut (32), sehingga diuji untuk mengetahui apakah ada perubahan respons jika dikondisikan pada medium yang dimanipulasi.

Antibiotik yang digunakan mempunyai konsentrasi yang berbeda yaitu amoksisilin 25 µg/ disk, kloramfenikol 30 µg/ disk, gentamisin 10 µg/ disk, eritromisin 15 µg/ disk, tetrasiklin 30 µg/ disk, dan vankomisin 30 µg/ disk. Konsentrasi pada masing-masing antibiotik tersebut merupakan konsentrasi minimum antibiotik dalam memberikan hambatan terhadap pertumbuhan bakteri yang disebut dengan konsentrasi hambat minimum (KHM).

Medium yang digunakan dalam penelitian ini yaitu MRS dan CMG. Penggunaan dua jenis medium ini ditujukan untuk mengetahui apakah ada perbedaan respons bakteri yang ditimbulkan terhadap perbedaan komposisi diantara kedua medium tersebut.

Medium dibuat dengan menyesuaikan pH yang telah ditetapkan yaitu pada pH normal masing-masing medium, 6,3 untuk medium MRS dan 7,0 untuk medium CMG (2) serta pH modifikasi asam yaitu 4,6 dan pH modifikasi basa yaitu 9,0 sebagai kondisi manipulasinya. Penetapan angka pH tersebut berdasarkan hasil uji konfirmasi pertumbuhan dan orientasi dimana bakteri masih dapat tumbuh dan memberikan respons dengan menghasilkan zona hambat terhadap antibiotik. Dasar pertimbangan dipilihnya kisaran pH tersebut yaitu karena bakteri *Leuconostoc mesenteroides* merupakan BAL yang tidak hidup pada kondisi pH ekstrim. BAL bukan merupakan bakteri asidofil yang mampu hidup pada pH kurang dari 2 dan juga bukan merupakan bakteri alkalofil yang dapat hidup pada pH lebih dari 10 (14).

Inokulum dibuat dengan mensuspensikan bakteri yang telah diinkubasi pada suhu 32°C selama 18-24 jam. Inokulum diencerkan 1000 kali sehingga

setara dengan  $10^6$  bakteri/mL. Selanjutnya, inokulum dicampurkan dengan medium perbenihan pada berbagai pH dan dihomogenkan, kemudian dituang ke atas medium NA sebagai *base layer*. Setelah membeku, dilakukan peletakkan disk antibiotik dengan jarak tertentu agar zona hambat yang dihasilkan tidak bertabrakan satu sama lain. Setelah itu, diinkubasi pada suhu  $32^{\circ}\text{C}$  selama 21 jam. Pengujian ini dilakukan secara duplo. Hasil pengukuran zona hambat merupakan rata-rata dari kedua pengujian.

Dari hasil pengukuran diameter zona hambat, didapatkan data yang kemudian dilakukan pengolahan secara statistik dengan menggunakan uji T sampel berpasangan (*paired-samples T-test*). Hal ini bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan respons *Leu. mesenteroides* yang signifikan terhadap antibiotik antara medium MRS dan CMG standar dengan medium modifikasi asam maupun modifikasi basa. Dari hasil olah data secara statistik, diperoleh nilai signifikansi yang akan menentukan apakah hipotesis yang telah dibuat diterima atau ditolak.

Prosedur uji T sampel berpasangan ini digunakan untuk membandingkan rata-rata zona hambat dari dua variabel (yaitu variabel pada medium pH normal dan pH asam atau medium pH normal dan pH basa) dalam satu grup data (yaitu data satu antibiotik pada satu medium) (34).

Sebelum dilakukan analisis dengan uji T sampel berpasangan, data diuji kenormalan distribusinya dengan analisis Kolmogorof-Smirnov dengan level signifikansi 0,025 (27). Hasilnya yaitu semua data pengamatan zona

hambat terhadap masing-masing antibiotik terdistribusi secara normal, sehingga dapat dilakukan analisis dengan uji T sampel berpasangan.

Uji T sampel berpasangan dengan level signifikansi 0,025 menunjukkan hasil analisis respons *Leu. mesenteroides* yang bervariasi terhadap beberapa antibiotik antara medium standar dengan medium yang dimanipulasi.

Respons *Leu. mesenteroides* terhadap amoksisilin pada medium modifikasi MRS asam ditunjukkan dengan perluasan diameter zona hambat secara signifikan ( $\alpha=4,81 \times 10^{-5}$ ) dibandingkan dengan standarnya. Sementara pada medium CMG asam, respons yang muncul sangat bervariasi antara perluasan dan pengurangan diameter zona hambat, sehingga tidak ditentukan analisisnya secara statistik, begitu juga pada medium modifikasi CMG basa. Pada medium modifikasi MRS basa, *Leu. mesenteroides* menunjukkan respons perluasan diameter zona hambat yang signifikan ( $\alpha=0,001$ ).

Bakteri *Leu. mesenteroides* menunjukkan respons menjadi lebih sensitif terhadap amoksisilin pada medium MRS asam dan basa dibandingkan dengan standar. Hal ini mungkin dikarenakan pertumbuhan bakteri *Leu. mesenteroides* pada medium modifikasi MRS asam dan basa terganggu yang menyebabkan responsnya terhadap amoksisilin menjadi lebih sensitif.

Respons *Leu. mesenteroides* terhadap kloramfenikol pada medium modifikasi MRS dan CMG asam menunjukkan hasil yang berbeda secara

signifikan ( $\alpha=0,0002$  dan  $0,013$ ) dibandingkan dengan standar yaitu berupa perluasan diameter zona hambat dan merupakan respons paling ekstrim dibandingkan respons pada medium modifikasi MRS dan CMG basa ( $\alpha=0,001$  dan  $0,015$ ) yang juga berupa perluasan diameter zona hambat. Bakteri *Leu. mesenteroides* menunjukkan respons menjadi lebih sensitif terhadap kloramfenikol pada medium MRS dan CMG asam maupun basa dibandingkan dengan standar.

Sebagian besar spesies *Leuconostoc* diketahui peka terhadap kloramfenikol (21). Pada kondisi medium pertumbuhan yang dimanipulasi menjadi asam dan basa, pertumbuhannya menjadi terganggu yang menyebabkan bakteri *Leu. mesenteroides* menjadi lebih sensitif terhadap kloramfenikol sehingga menunjukkan perluasan diameter zona hambat dibandingkan dengan standar.

Respons *Leu. mesenteroides* terhadap gentamisin pada medium modifikasi MRS dan CMG asam menunjukkan hasil yang berbeda signifikan ( $\alpha=0,0001$  dan  $8,25 \times 10^{-6}$ ) dibandingkan dengan standar yaitu berupa pengurangan diameter zona hambat. Sementara respons pada medium modifikasi MRS dan CMG basa menunjukkan perluasan diameter zona hambat yang signifikan ( $\alpha=2,01 \times 10^{-6}$  dan  $83,4 \times 10^{-6}$ ).

Sama halnya dengan gentamisin, respons *Leu. mesenteroides* terhadap eritromisin pada medium modifikasi MRS dan CMG asam juga menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $\alpha=3,92 \times 10^{-7}$  dan  $8,25 \times 10^{-6}$ ) dibandingkan dengan standar yaitu berupa pengurangan diameter zona

hambat. Sementara respons pada medium modifikasi MRS dan CMG basa menunjukkan hasil yang berbeda secara signifikan berupa perluasan diameter zona hambat ( $\alpha=4,49 \times 10^{-7}$  dan  $2,76 \times 10^{-7}$ ).

Bakteri *Leu. mesenteroides* menunjukkan respons menjadi lebih resisten terhadap gentamisin dan eritromisin pada medium MRS dan CMG asam. Sementara pada medium MRS dan CMG basa, responsnya menjadi lebih sensitif.

Sebagian spesies *Leuconostoc* diketahui mempunyai potensi resisten terhadap gentamisin (21). Pada kondisi medium asam, respons yang ditunjukkan berupa pengurangan diameter zona hambat yang berarti menjadi lebih resisten dibandingkan dengan kondisi standar. Hal ini mungkin dikarenakan adanya regulasi respons dari *Leu. mesenteroides* yang menyebabkan bakteri tersebut mempunyai pertahanan diri melawan kondisi stress terhadap lingkungan asam.

Sebagian besar spesies *Leuconostoc* diketahui peka terhadap eritromisin (21). Hal ini dapat ditunjukkan pada zona hambat yang terbentuk pada kondisi standar cukup luas. Namun, respons yang timbul pada kondisi medium asam adalah pengurangan ukuran diameter zona hambat. Hal ini mungkin disebabkan karena adanya degradasi eritromisin yang dikatalis oleh asam sehingga terjadi reaksi dehidrasi yang menyebabkan aktivitas antibiotiknya menjadi berkurang (33).

Respons *Leu. mesenteroides* terhadap tetrasiklin menunjukkan respons yang beragam. Pada medium modifikasi MRS asam, responsnya

secara signifikan menunjukkan perluasan diameter zona hambat ( $\alpha=0,0002$ ). Sementara pada medium modifikasi CMG asam dan medium modifikasi MRS dan CMG basa menunjukkan pengurangan diameter zona hambat. Namun, pengurangan diameter zona hambat secara signifikan terjadi hanya pada medium modifikasi MRS basa ( $\alpha=0,002$ ), sementara pada medium CMG asam dan basa, respons yang dihasilkan tidak signifikan ( $\alpha=0,044$  dan  $0,027$ ).

Pada antibiotik amoksisilin, kloramfenikol, gentamisin dan eritromisin, respons *Leu. mesenteroides* terhadap basa memberikan respons perluasan diameter zona hambat dikarenakan adanya hambatan pertumbuhan bakteri pada kondisi medium basa (15). Sementara pada tetrasiklin, respons yang ditunjukkan adalah sebaliknya yaitu pengurangan diameter zona hambat pada medium modifikasi basa.

Galur-galur *Leu. mesenteroides* memberikan respons yang beragam pada kondisi medium yang berbeda-beda. Dari keenam antibiotik yang telah diuji, terdapat satu antibiotik yang tidak menghasilkan zona hambat baik pada kondisi medium pertumbuhan yang standar maupun yang dimanipulasi, yaitu vankomisin.

Sebagian besar spesies *Leuconostoc* diketahui resisten secara intrinsik terhadap antibiotik golongan glikopeptida, namun mekanisme resistensinya belum secara jelas diketahui. Selain *Leuconostoc*, *Pediococcus* dan beberapa spesies *Lactobacillus* juga resisten secara intrinsik terhadap senyawa glikopeptida (32). Karena tidak ada zona hambat yang terbentuk

dari antibiotik vankomisin, maka tidak diperoleh data untuk dilakukan analisis secara statistik.

Perbedaan respons *Leu. mesenteroides* pada medium MRS dan CMG mungkin dikarenakan adanya perbedaan komposisi. Pada medium MRS, yang merupakan salah satu medium kaya, terdapat unsur mineral dalam jumlah kecil seperti magnesium dan mangan yang penting untuk fungsi beberapa enzim dan biasanya berperan sebagai kofaktor (15). Namun, kandungan logam-logam dalam medium MRS kemungkinan dapat berperan sebagai katalis yang menyebabkan terjadinya reaksi degradasi antibiotik sehingga efektivitas antibiotik berkurang dan menghasilkan respons bakteri yang lebih sensitif dengan menunjukkan zona hambat yang lebih besar dibandingkan dengan medium CMG.

Faktor pH pada medium juga dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri. Pada umumnya, mikroorganisme sensitif terhadap perubahan keasaman karena ion hidrogen dan ion hidroksil merusak ikatan hidrogen dalam molekul protein dan asam nukleat. Oleh karena itu, mikroorganisme mempunyai kisaran keasaman yang dapat ditoleransi (14).

Pada BAL, toleransi terhadap asam meningkat pada dua fase fisiologis yang berbeda yaitu selama fase logaritma, respons adaptif dapat diinduksi dengan inkubasi pada pH asam yang bersifat non-letal (*Logarithmic-Acid Tolerance Response* atau *L-ATR*) dan setelah memasuki fase stasioner, peningkatan toleransi terhadap asam merupakan hasil dari induksi respons stress umum (*General Stress Response* atau *GSR*). Perubahan komposisi

asam lemak membran merupakan respons yang umum terhadap stress lingkungan (6, 17).

Kondisi asam yang ekstrim dapat menurunkan aktivitas beberapa transporter sehingga mengurangi ketersediaan substrat yang esensial. Oleh karena itu, kondisi stress secara tidak langsung dapat memicu malnutrisi atau kekurangan energi. Kondisi kekurangan energi atau elemen esensial ini dapat membahayakan viabilitas sel dalam jangka panjang (4). Begitu juga dengan kondisi basa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (15).

Keasaman dan kebasaan medium tidak hanya mempengaruhi kemampuan bakteri untuk tumbuh, tapi juga mempengaruhi aktivitas antibiotik. Pengaruh pH terhadap antibiotik bisa berdampak pada penurunan aktivitas antibiotik. Hal ini dikarenakan asam dan basa dapat berperan sebagai katalis dalam reaksi degradasi senyawa antibiotik (33).

Antibiotik merupakan substansi yang bukan nutrisi bagi bakteri sehingga diharapkan menimbulkan suatu respons untuk pertahanan diri. BAL mengembangkan mekanisme pertahanan diri dalam melawan stress yang memungkinkan BAL dapat bertahan pada perubahan kondisi lingkungan yang ekstrim. Karena gen yang terlibat dalam respons stress beragam, maka regulasi respons antar spesies berbeda (6).

Respons galur-galur *Leu. mesenteroides* terhadap parameter antibiotik setelah mengalami manipulasi medium pertumbuhan, selanjutnya akan dianalisis secara molekular pada tahap transkripsi yaitu dengan analisis transkriptomik.

Dengan analisis transkriptomik tersebut, akan diketahui penyebab terjadinya perbedaan respons yang terjadi pada kondisi medium yang normal dengan kondisi medium yang dimanipulasi.



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### A. KESIMPULAN

1. Galur-galur *Leu. mesenteroides* pada medium MRS pH 4,6 menunjukkan respons menjadi lebih sensitif terhadap amoksisilin, kloramfenikol dan tetrasiklin namun menjadi lebih resisten terhadap gentamisin dan eritromisin. Sementara pada medium CMG pH 4,6, menunjukkan respons menjadi lebih sensitif terhadap kloramfenikol namun menjadi lebih resisten terhadap gentamisin, eritromisin, dan tetrasiklin.
2. Galur-galur *Leu. mesenteroides* pada medium MRS pH 9,0 menunjukkan respons menjadi lebih sensitif terhadap amoksisilin, kloramfenikol, gentamisin dan eritromisin namun menjadi lebih resisten terhadap tetrasiklin. Sementara pada medium CMG pH 9,0 menunjukkan respons menjadi lebih sensitif terhadap kloramfenikol, gentamisin, dan eritromisin namun menjadi lebih resisten terhadap tetrasiklin.
3. Galur-galur *Leu. mesenteroides* tidak menghasilkan zona hambat terhadap vankomisin pada medium MRS dan CMG standar, asam maupun basa.

## B. SARAN

1. Kondisi ekstrim dapat diciptakan mulai dari pembuatan inokulum kemudian dicampur dengan medium perbenihan yang dimodifikasi untuk meningkatkan stress pada bakteri.
2. Perlu dilakukan pengujian pada spesies BAL lain yang belum teruji pada penelitian ini untuk mengetahui adanya kesamaan ataupun perbedaan respons yang muncul dengan *Leu. mesenteroides*.
3. Perlu dilakukan pengujian pada medium lain yang mempunyai jenis dan jumlah komposisi yang berbeda untuk mengetahui adanya pengaruh komposisi medium terhadap respons yang ditimbulkan.
4. Perlu dipelajari lebih lanjut mengenai penyebab perbedaan respons melalui pengujian secara molekular dengan analisis transkriptomik.

## DAFTAR ACUAN

1. Misgiyarta, Widowati S. Seleksi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (BAL) Indigenus. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, 2003: 374-387.
2. Kusmiati, Malik A. Aktivitas Bakteriosin dari Bakteri *Leuconostoc mesenteroides* Pbac1 pada Berbagai Media. *Makara (Seri Kesehatan)* **6**, 2002: 1-7.
3. Soomro AH, Masud T, Anwar K. Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health – A Review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2002: 20-42.
4. Mathur S, Singh R. Antibiotic Resistance in Food Lactic Acid Bacteria – A Review. *International Journal of Food Microbiology* **105**, 2005: 281-295.
5. Olofsson SK, Cars O. Optimizing Drug Exposure to Minimize Selection of Antibiotic Resistance. *Infectious Diseases Society of America* **45**, 2007: S129-136.
6. Guchte M, Serror P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich S, Maguin E. Stress Responses in Lactic Acid Bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**, 2002: 187-216.
7. Okafor N. *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*. Departement of Biological Sciences. USA: Science Publishers, 2007: 24-25, 54.
8. Savadogo A, Ouattara CAT, Bassole IHN, Traore SA. Bacteriocins and Lactic Acid Bacteria – A Minireview. *African Journal of Biotechnology* **5** (9), 2006: 678-683.
9. Battcock M, Azam-Ali S. Fermented Fruits and Vegetables A Global Perspective – Chapter 5: Bacterial Fermentation. *FAO Agricultural Services Bulletin*, 1998. <http://www.fao.org/docrep/x0560e/x0560e10.htm>. 26 Juni 2009, pk 23.14.

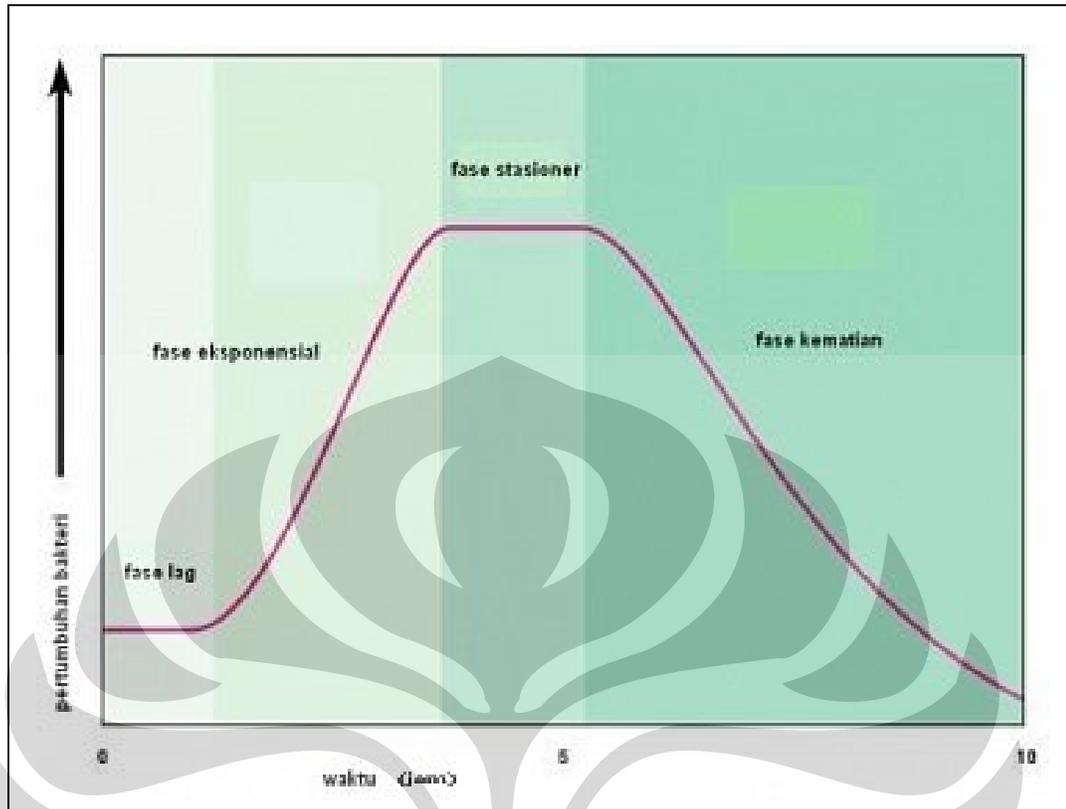
10. Anonim. Genus *Leuconostoc*. <http://www.uniprot.org/taxonomy/1243>. 26 Juni 2009, pk 23.26.
11. Prescott LM, Harley, Klein. *Microbiology, Fifth Edition*. New York: McGraw-Hill, 2002: 98-99.
12. Anonim. Bacteria Growth Curve. <http://www.microvet.arizona.edu/Courses/MIC205/Exams/05Exams/05Ex2key.htm>. 31 Agustus 2009, pk 00.25.
13. Boyd RF, Marr JJ. *Medical Microbiology*. Boston: Little, Brown and Company, 1980: 50, 55-56.
14. Bauman RW. *Microbiology*. San Fransisco: Pearson Benjamin Cummings, 2004: 168, 174, 188-189.
15. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Brock Biology of Microorganisms, Eight Edition*. New Jersey: Prentice Hall, 1996: 159, 162, 164.
16. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiology An Introduction, Seventh Edition*. USA: Benjamin Cummings Publishing Inc, 2002: 162, 551-554.
17. Hartke A, Bouché S, Giard JC, Benachour A, Boutibonnes P, and Auffray Y. The Lactic Acid Stress Response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Current Microbiology* **33**, 1996: 194–199.
18. Champomier-Verges MC, Maguin E, Mistou MY, Anglade P, Chich JF. Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. *Journal of Chromatography Vol 771* **14**, 2002: 329-342.
19. Jordan S, Hutchings MI, Mascher T. Cell Envelope Stress Response in Gram-Positive Bacteria. *FEMS Microbiology Review* **32**, 2007: 107-146.
20. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. *Jawetz, Melnick, dan Adelberg's Medical Microbiology, Twenty Second Edition*. USA: McGraw-Hill, 2002: 144, 150.
21. Ammor MS, Florez AB, Mayo B. Antibiotic Resistance in Non-Enterococcal Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Food Microbiology* **24**, 2007: 559-570.

22. Radji M. *Penuntun Praktikum Mikrobiologi Farmasi*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI, 2004: 11, 15-16, 18.
23. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: A Revolutionary Tool for Transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* **10**, 2009: 57–63.
24. Malik A, Felicia, Radji M, dan Oetari A. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Asal Sumber Lokal Menggunakan Gen Penyandi 16S rRNA. *Sains Indonesia* **12** (2), 2007: 1-6.
25. Mahardhika. *Isolasi Bakteri Asam Laktat Dari Berbagai Makanan dan Minuman Tradisional dan Identifikasi Isolat-Isolatnya Secara Molekular Menggunakan DNA Ribosomal 16S*. Skripsi Departemen Farmasi UI. Depok: Universitas Indonesia, 2007.
26. Malik A, Radji M, Kralj S, and Dijkhuizen L. Screening of Lactic Acid Bacteria from Indonesia Reveals Glucansucrases and Fructansucrases genes by Two Different *Weissella Confusa* Strains from Soya. *FEMS Microbiology Letters* **300**, 2009: 131-138.
27. Achyar A. *Analisa Statistik dengan Software SPSS untuk Bisnis dan Manajemen*. Depok: Departemen Manajemen Fakultas Ekonomi Universitas Indonesia, 2005: 25-28, 36-39.
28. Corry JEL, Curtis GDW, Baird RM. *Handbook of Culture Media for Food Microbiology*. Amsterdam: Elsevier Science, 2003: 511.
29. Harley JP, Prescott LM. *Laboratory Exercise in Microbiology*. Boston: Mc. Graw Hill Companies, 1999: 25-28.
30. Pery JJ, Staley JT. *Microbiology Dynamics and Diversity*. USA: Saunders College Publishing, 1997: 169-171.
31. Setiabudy R, Gan VHS. Pengantar Antimikroba. *Dalam: Ganiswarna SG, editor. Farmakologi dan Terapi, Edisi Empat*. Jakarta: Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 1995: 572-573.

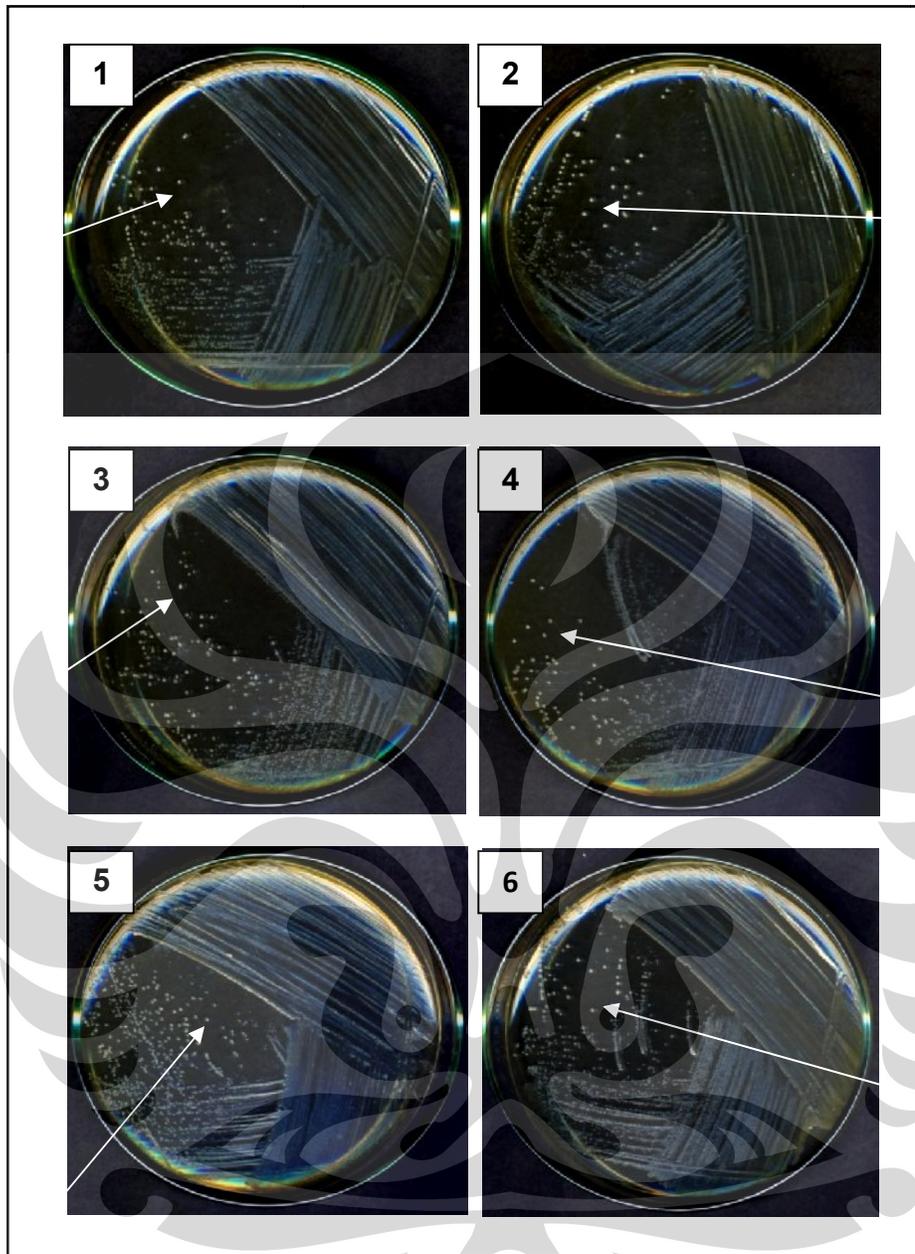
32. Handwerger S, Pucci MJ, Volk KJ, Liu J, Lee MS. Vancomycin-Resistant *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei* Synthesize Cytoplasmic Peptidoglycan Precursors That Terminate in Lactate. *Journal of Bacteriology* **176**, 1994: 260-264.
33. Yoshioka S, Stella VJ. *Stability of Drugs and Dosage Forms*. New York: Kluwer Academic Publishers, 2002: 10-12, 18-20.
34. Triyuliana, AH. *Panduan Praktis: Pengolahan Data Statistik dengan SPSS 15.0*. Yogyakarta: Penerbit Andi, 2007: 158



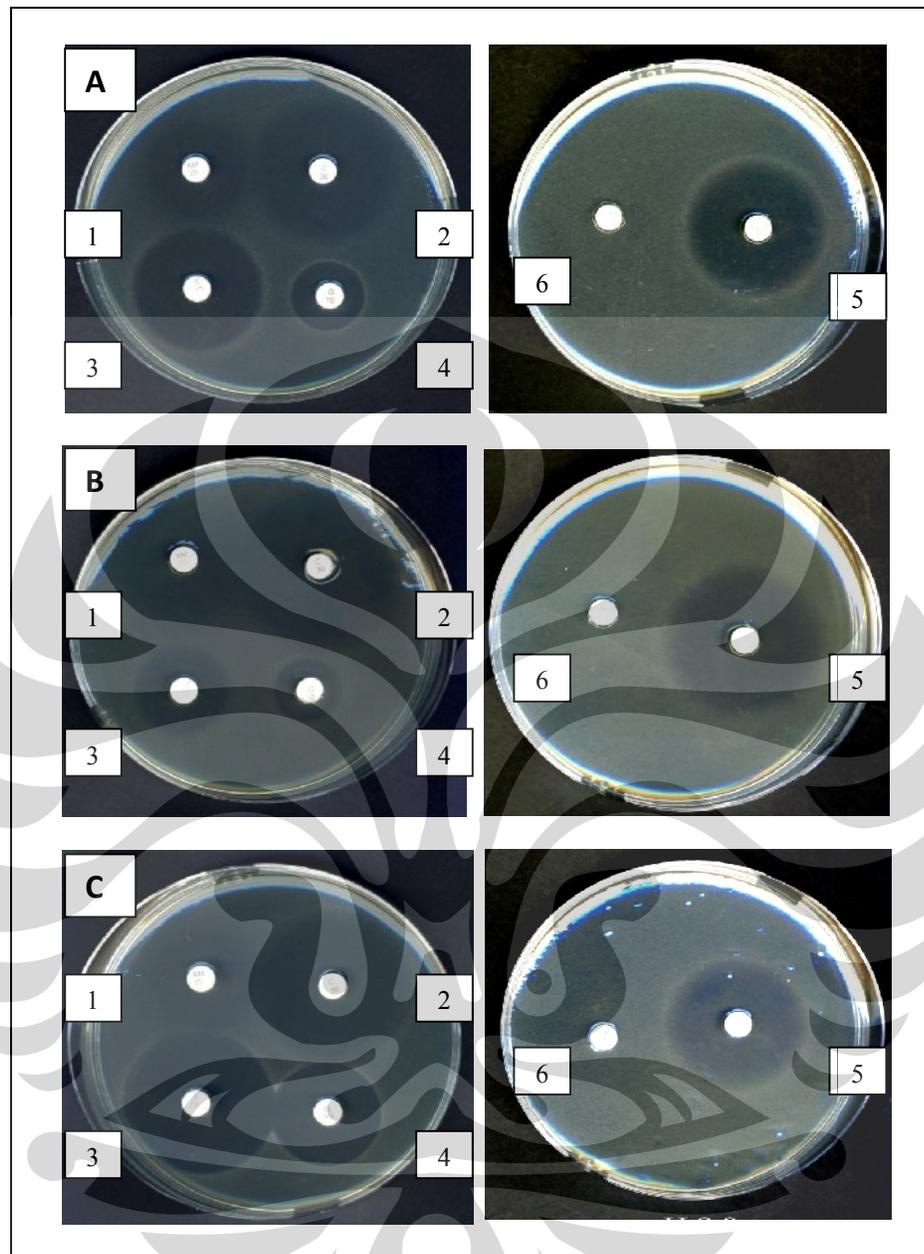




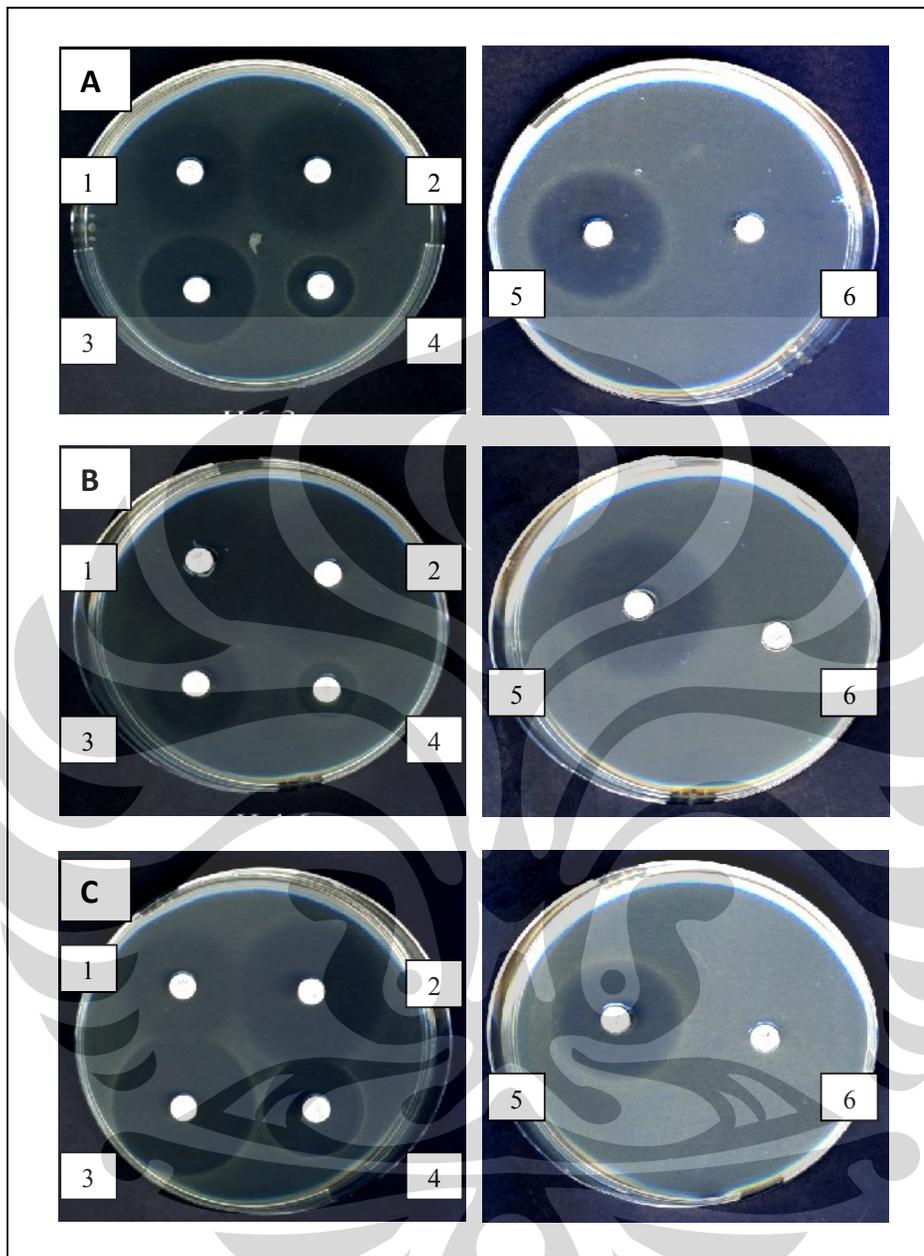
Gambar 1. Kurva Pertumbuhan Bakteri (17)



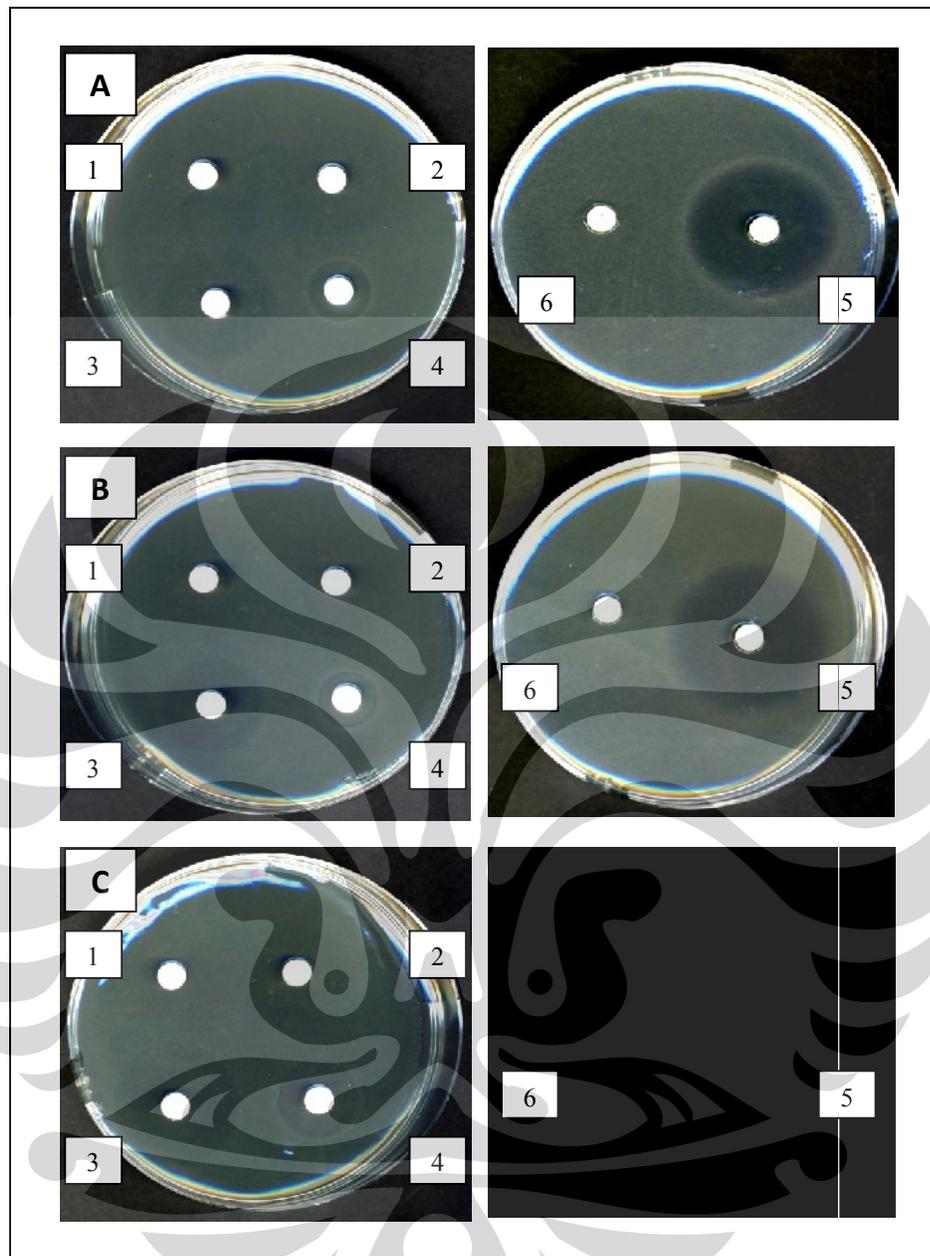
Gambar 2. Koloni Tunggal Hasil Purifikasi Beberapa Galur *Leu. mesenteroides* pada Medium MRS. 1. MBF 2-5; 2. MBF 3-5; MBF 5-9; 4. MBF 7-5; 5. MBF 7-17; 6. MBF 11-2



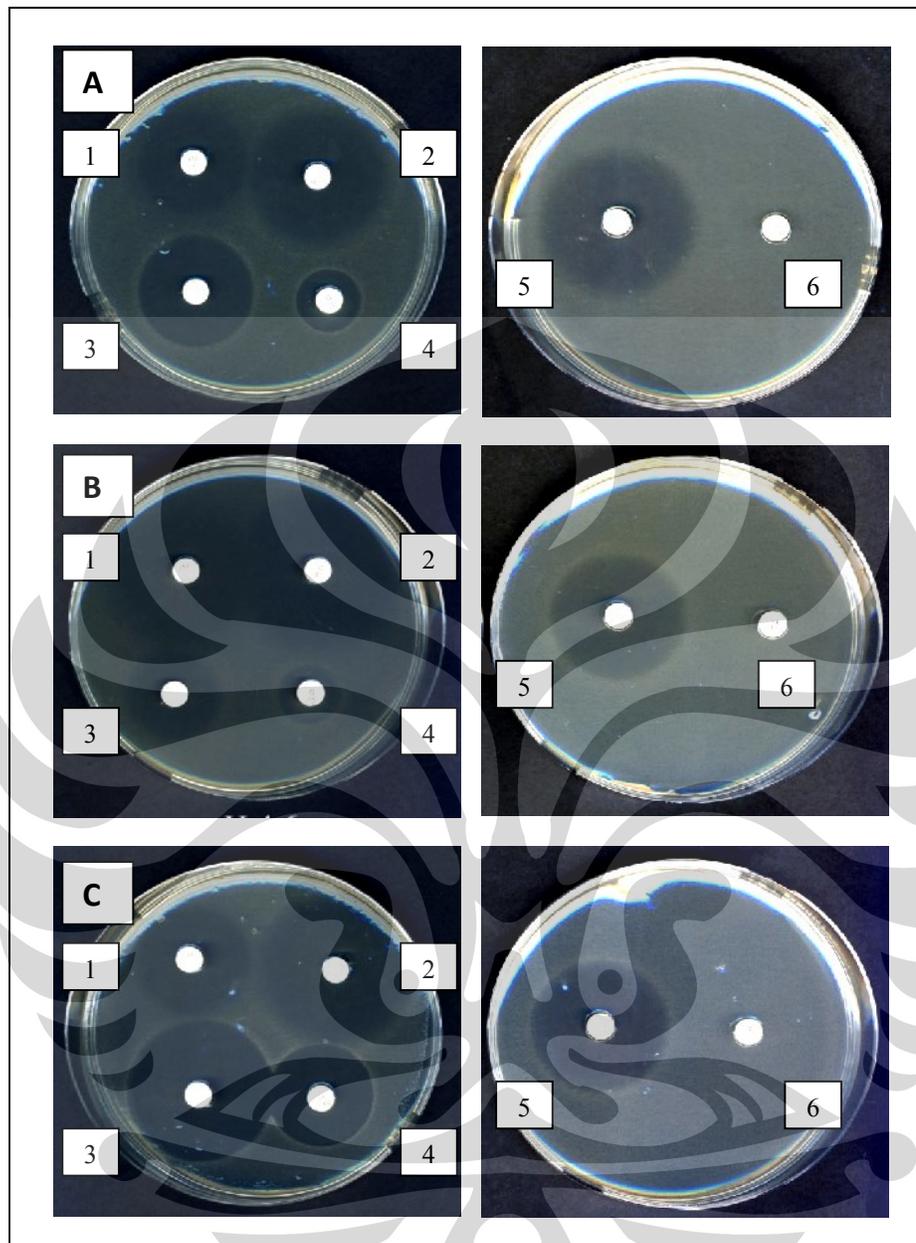
Gambar 3. Zona Hambat yang Dihasilkan oleh Galur *Leu. mesenteroides* MBF 2-2 pada Medium MRS.  
 A. Standar pH 6,3; B. Asam pH 4,6; C. Basa pH 9,0;  
 1. Amoksisilin; 2. Kloramfenikol; 3. Eritromisin;  
 4. Gentamisin; 5. Tetrasiklin; 6. Vankomisin.



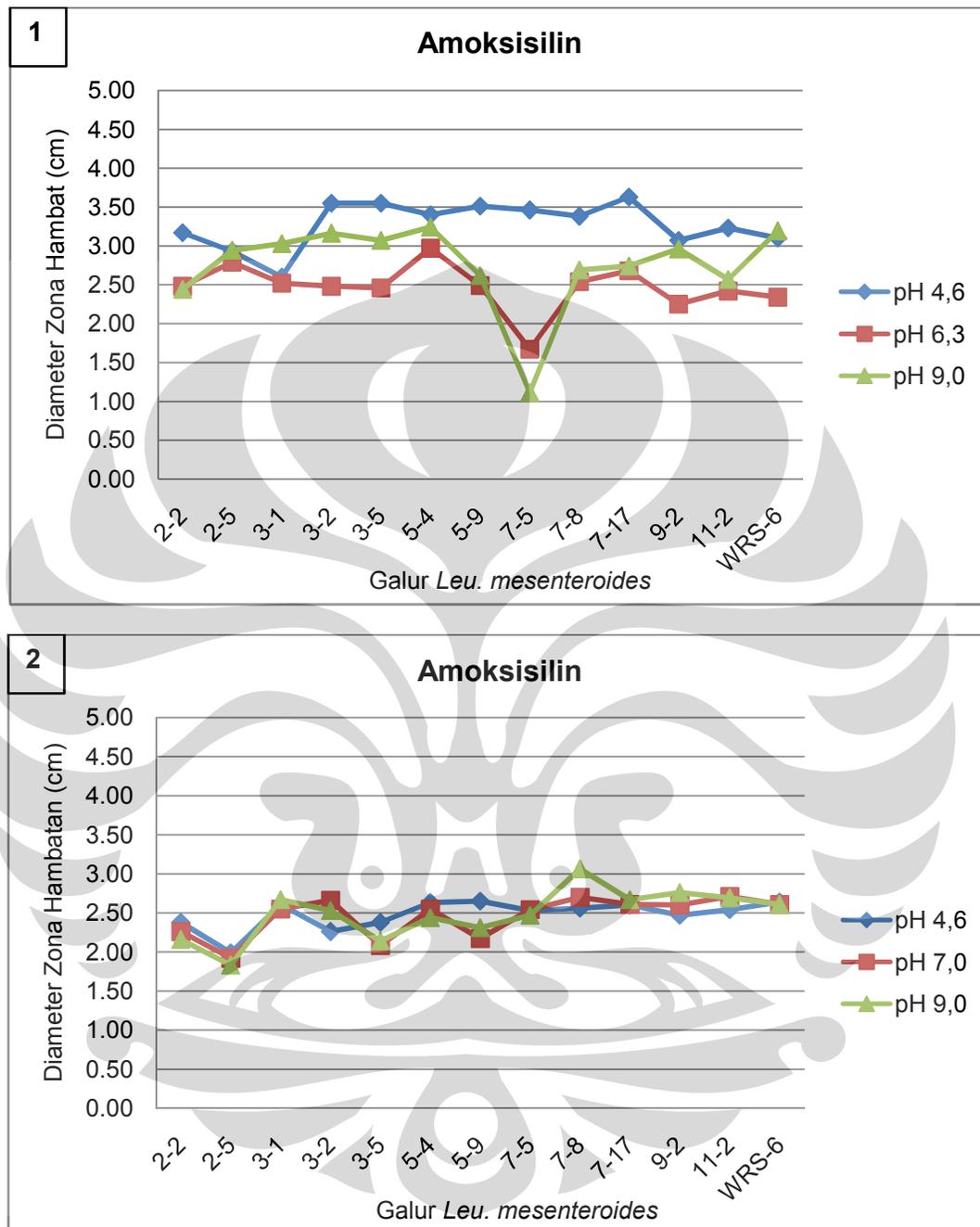
Gambar 4. Zona Hambat yang Dihasilkan oleh Galur *Leu. mesenteroides* MBF 7-8 pada Medium MRS.  
 A. Standar pH 6,3; B. Asam pH 4,6; C. Basa pH 9,0;  
 1. Amoksisilin; 2. Kloramfenikol; 3. Eritromisin;  
 4. Gentamisin; 5. Tetrasiklin; 6. Vankomisin.



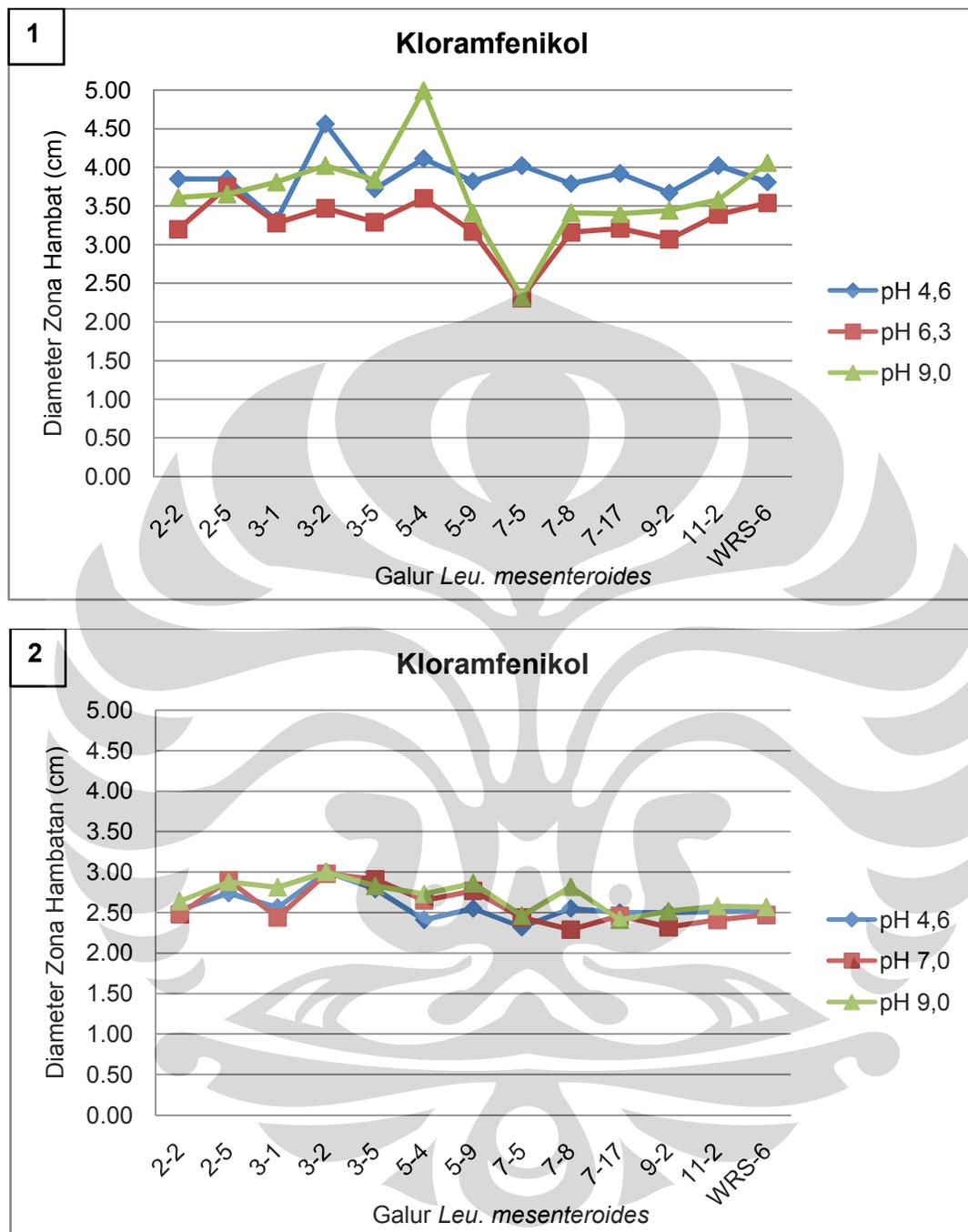
Gambar 5. Zona Hambat yang Dihasilkan oleh Galur *Leu. mesenteroides* MBF 2-2 pada Medium CMG.  
 A. Standar pH 7,0; B. Asam pH 4,6; C. Basa pH 9,0;  
 1. Amoksisilin; 2. Kloramfenikol; 3. Eritromisin;  
 4. Gentamisin; 5. Tetrasiklin; 6. Vankomisin.



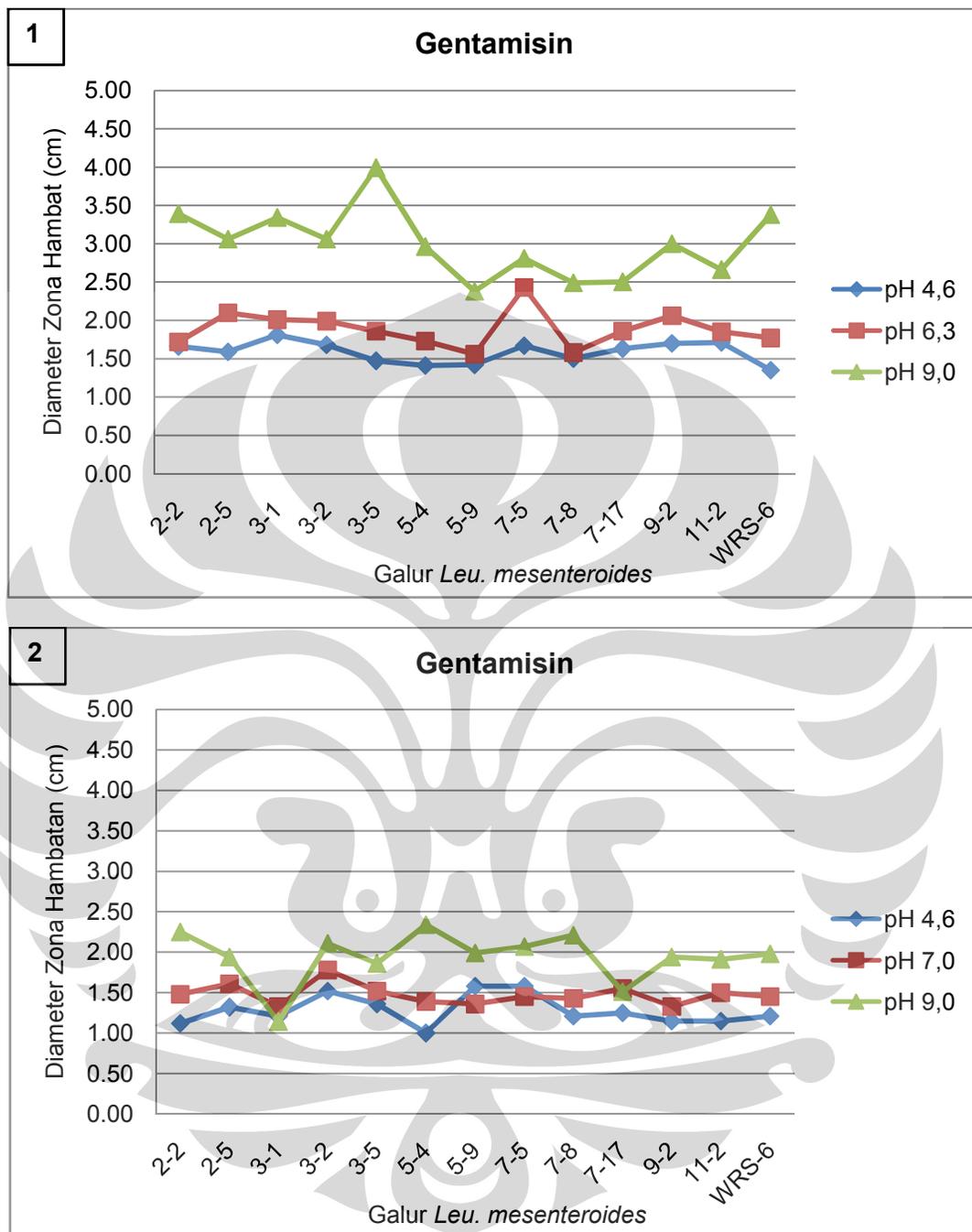
Gambar 6. Zona Hambat yang Dihasilkan oleh Galur *Leu. mesenteroides* MBF 7-8 pada Medium CMG.  
A. Standar pH 7,0; B. Asam pH 4,6; C. Basa pH 9,0;  
1. Amoksisilin; 2. Kloramfenikol; 3. Eritromisin;  
4. Gentamisin; 5. Tetrasiklin; 6. Vankomisin.



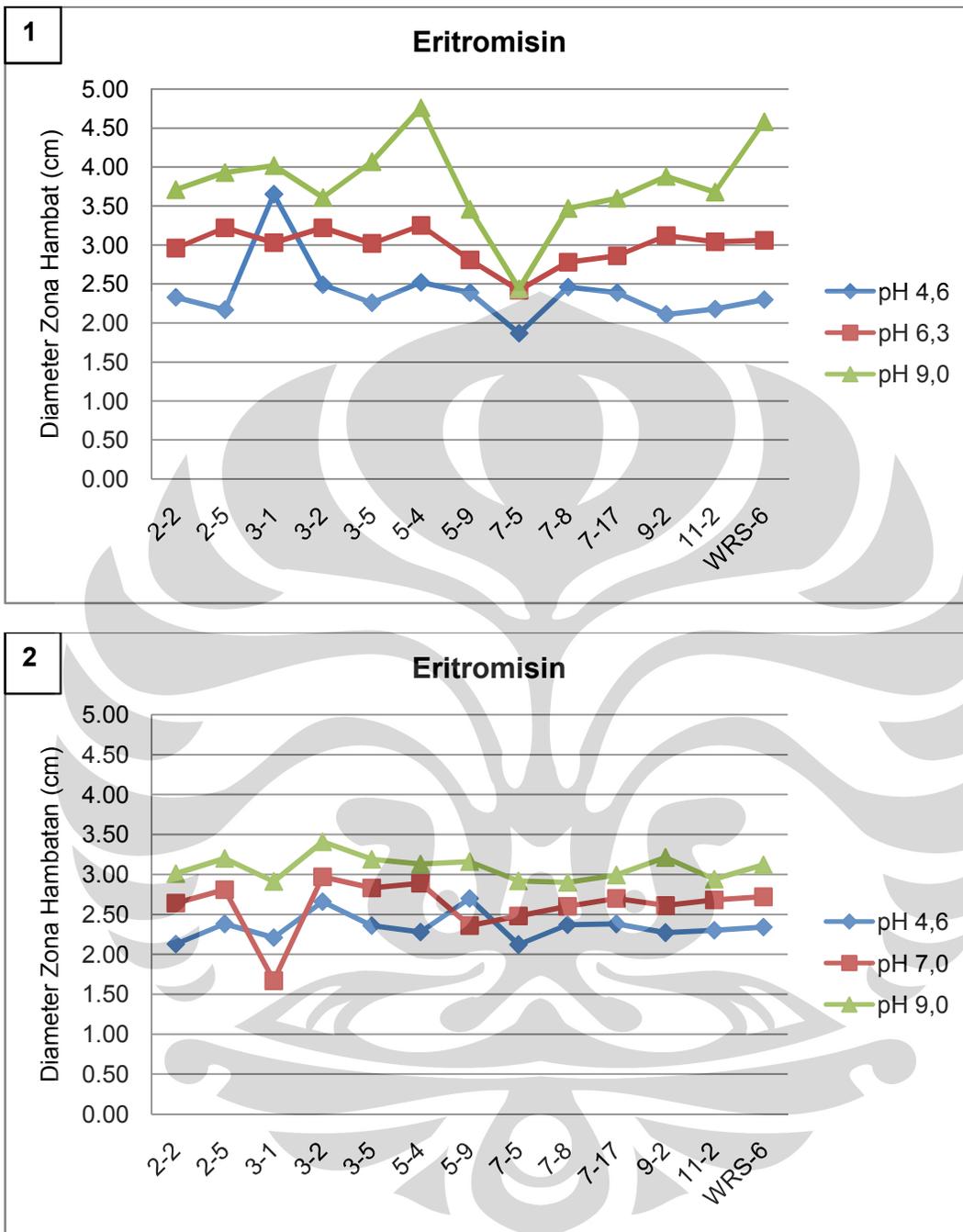
Gambar 7. Grafik Respons Galur-Galur *Leu. mesenteroides* Terhadap Amoksisilin pada Medium Standar, Modifikasi Asam, dan Modifikasi Basa. 1. Medium MRS; 2. Medium CMG.



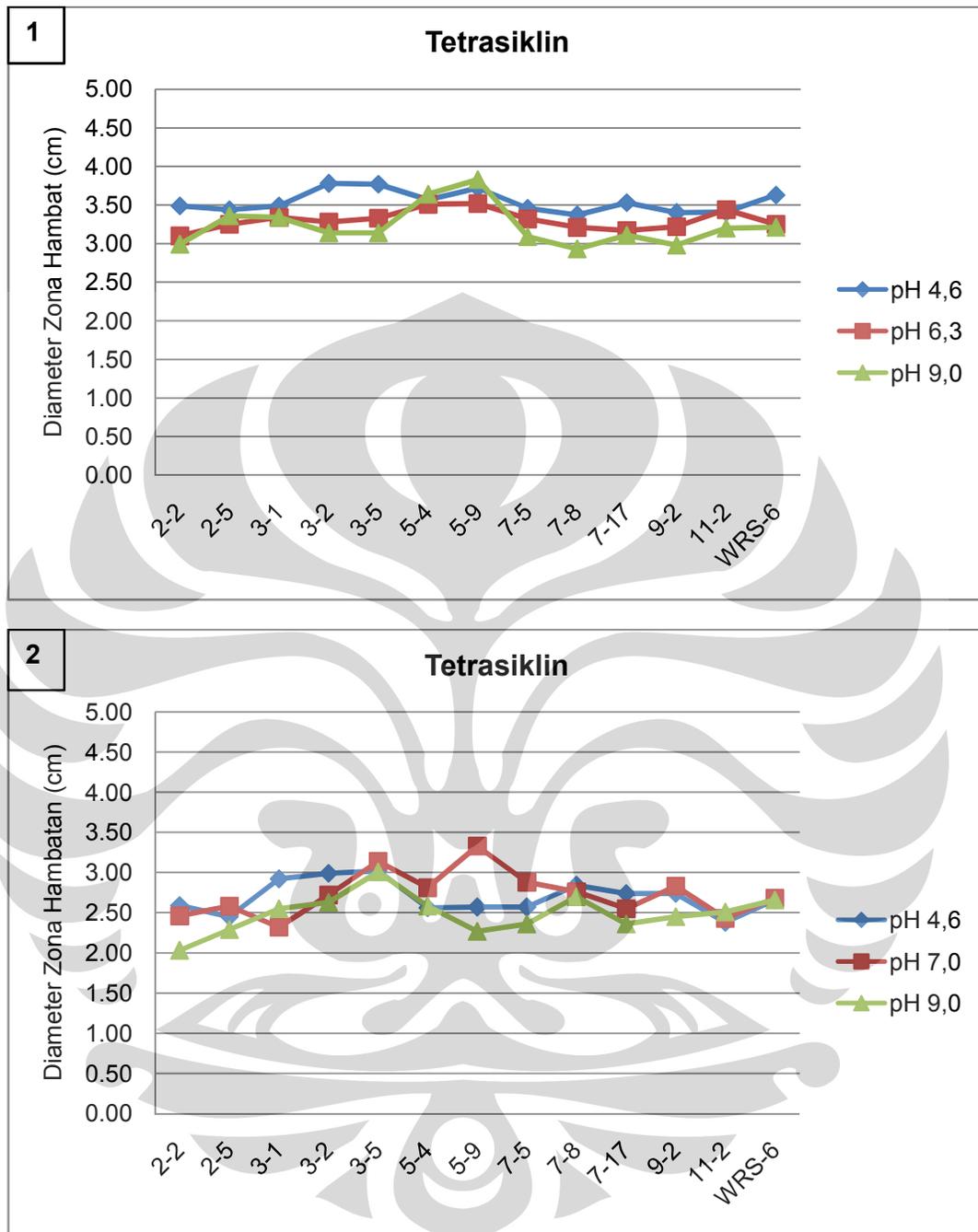
Gambar 8. Grafik Respons Galur-Galur *Leu. mesenteroides* Terhadap Kloramfenikol pada Medium Standar, Modifikasi Asam, dan Modifikasi Basa. 1. Medium MRS; 2. Medium CMG.



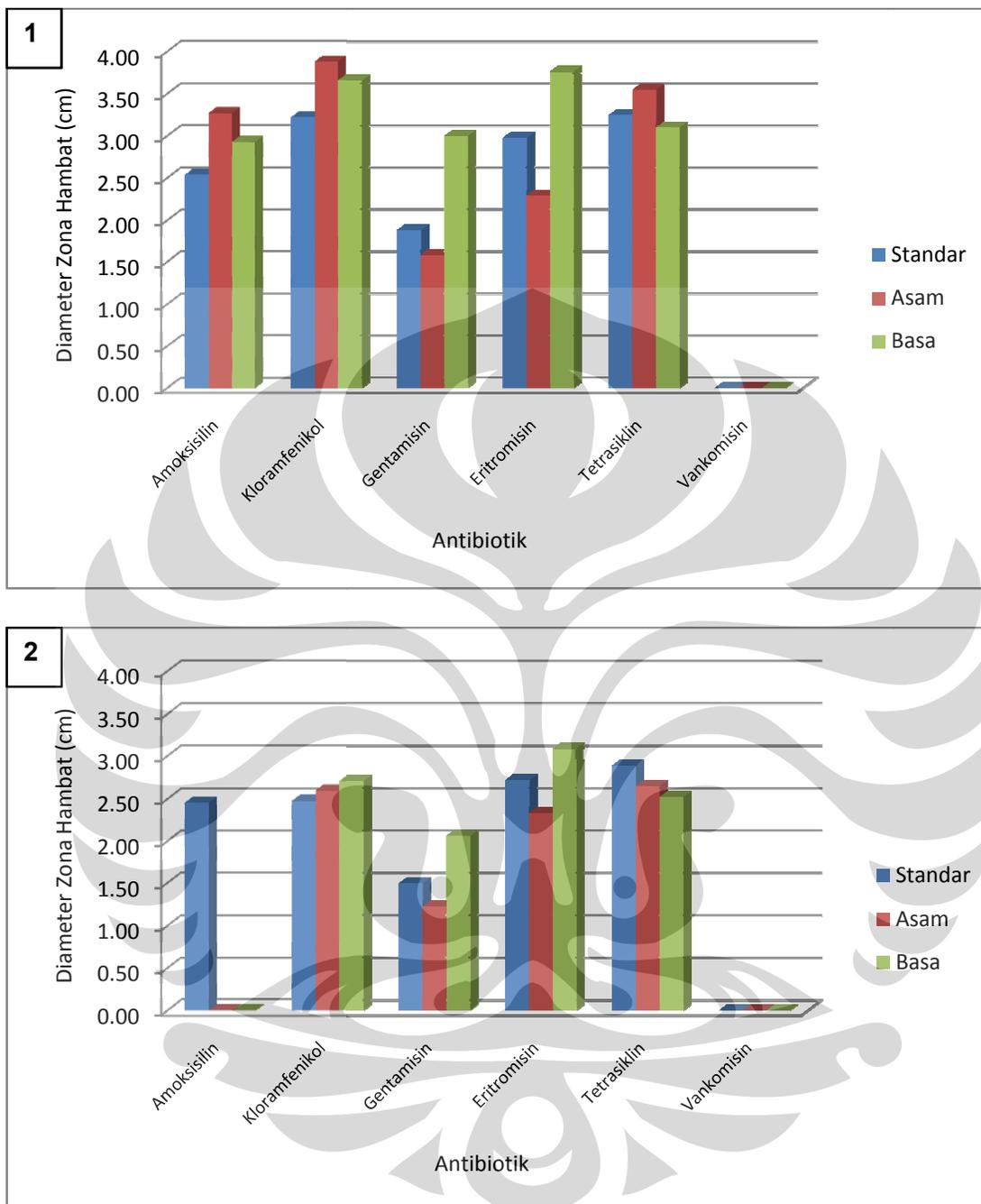
Gambar 9. Grafik Respons Galur-Galur *Leu. mesenteroides* Terhadap Gentamisin pada Medium Standar, Modifikasi Asam, dan Modifikasi Basa. 1. Medium MRS; 2. Medium CMG.



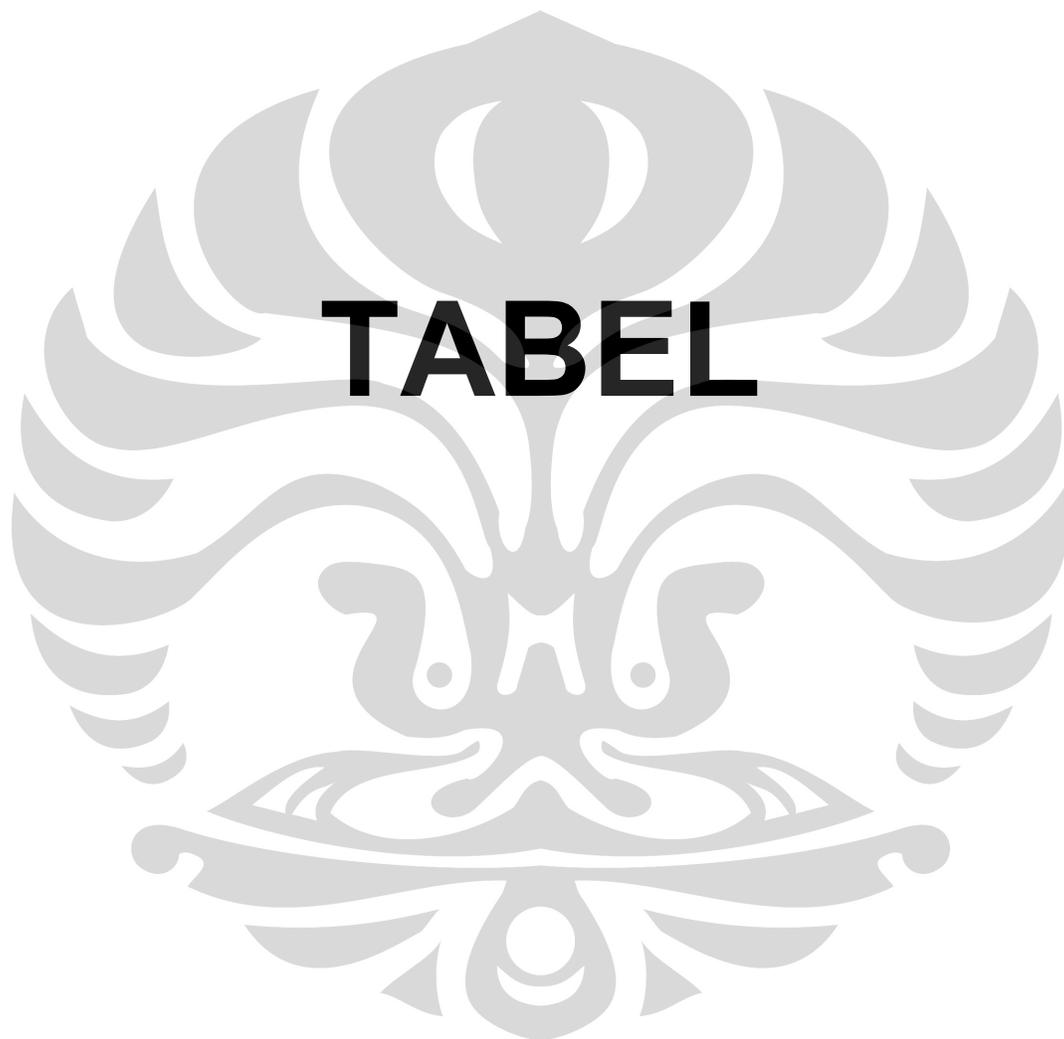
Gambar 10. Grafik Respons Galur-Galur *Leu. mesenteroides* Terhadap Eritromisin pada Medium Standar, Modifikasi Asam, dan Modifikasi Basa. 1. Medium MRS; 2. Medium CMG.



Gambar 11. Grafik Respons Galur-Galur *Leu. mesenteroides* Terhadap Tetrasiklin pada Medium Standar, Modifikasi Asam, dan Modifikasi Basa. 1. Medium MRS; 2. Medium CMG.



Gambar 12. Grafik Rata-Rata Zona Hambat Hasil Respons *Leu. mesenteroides* Terhadap Beberapa Antibiotik. 1. Medium MRS; 2. Medium CMG.



Tabel 1

Nama Galur *Leuconostoc mesenteroides* yang Sudah Teridentifikasi secara Molekular dengan 16S rDNA dan Sumber Asalnya (26, 27, 28)

No.	Nama Galur	Sumber Asal	Kota
1.	MBF 2-2	Asinan	Bogor
2.	MBF 2-5	Asinan	Bogor
3.	MBF 3-1	Asinan	Bogor
4.	MBF 3-2	Sekoteng	Bogor
5.	MBF 3-5	Sekoteng	Bogor
6.	MBF 5-4	Tanah limbah susu	Jakarta
7.	MBF 5-9	Tanah limbah susu	Jakarta
8.	MBF 7-5	Tanah limbah susu	Jakarta
9.	MBF 7-8	Tanah limbah susu	Jakarta
10.	MBF 7-17	Tanah limbah susu	Jakarta
11.	MBF 9-2	Ampas tahu	Ciputat
12.	MBF 11-2	Ampas kecap	Ciputat
13.	MBF – WRS 6	Wedang Ronde	Solo

Tabel 2  
Diameter Zona Hambat Hasil Respons Galur-Galur *Leu. mesenteroides*  
Terhadap Antibiotik pada Medium MRS Standar  
dan Modifikasi (dalam cm)

<b>Antibiotik</b>	<b>Galur <i>Leu. mesenteroides</i></b>	<b>Standar pH 6,3</b>	<b>Modifikasi 1 pH 4,6</b>	<b>Modifikasi 2 pH 9,0</b>
<b>Amoksisilin</b>	MBF 2-2	2,48	3,17	2,44
	MBF 2-5	2,79	2,93	2,94
	MBF 3-1	2,52	2,60	3,03
	MBF 3-2	2,48	3,55	3,16
	MBF 3-5	2,46	3,55	3,07
	MBF 5-4	2,97	3,40	3,24
	MBF 5-9	2,49	3,51	2,62
	MBF 7-5	1,67	3,46	1,11
	MBF 7-8	2,54	3,38	2,69
	MBF 7-17	2,68	3,63	2,74
	MBF 9-2	2,25	3,07	2,96
	MBF 11-2	2,42	3,23	2,57
	MBF WRS-6	2,34	3,10	3,19
<b>Kloramfenikol</b>	MBF 2-2	3,20	3,85	3,61
	MBF 2-5	3,75	3,85	3,65
	MBF 3-1	3,28	3,31	3,81
	MBF 3-2	3,47	4,56	4,02
	MBF 3-5	3,29	3,72	3,84
	MBF 5-4	3,60	4,11	4,99
	MBF 5-9	3,17	3,82	3,41
	MBF 7-5	2,31	4,02	2,32
	MBF 7-8	3,16	3,79	3,41
	MBF 7-17	3,21	3,92	3,40
	MBF 9-2	3,07	3,67	3,44
	MBF 11-2	3,39	4,02	3,58
	MBF WRS-6	3,54	3,81	4,06

Tabel 2 (lanjutan)  
 Diameter Zona Hambat Hasil Respons Galur-Galur *Leu. mesenteroides*  
 Terhadap Antibiotik pada Medium MRS Standar  
 dan Modifikasi (dalam cm)

Antibiotik	Galur <i>Leu. mesenteroides</i>	Standar pH 6,3	Modifikasi 1 pH 4,6	Modifikasi 2 pH 9,0
<b>Gentamisin</b>	MBF 2-2	1,72	1,66	3,39
	MBF 2-5	2,10	1,59	3,06
	MBF 3-1	2,01	1,81	3,34
	MBF 3-2	1,99	1,68	3,06
	MBF 3-5	1,86	1,47	3,99
	MBF 5-4	1,73	1,41	2,96
	MBF 5-9	1,56	1,42	2,38
	MBF 7-5	2,43	1,67	2,81
	MBF 7-8	1,58	1,50	2,49
	MBF 7-17	1,86	1,63	2,50
	MBF 9-2	2,06	1,70	3,00
	MBF 11-2	1,85	1,71	2,66
	MBF WRS-6	1,77	1,35	3,38
<b>Eritromisin</b>	MBF 2-2	2,96	2,33	3,71
	MBF 2-5	3,22	2,17	3,93
	MBF 3-1	3,03	3,65	4,02
	MBF 3-2	3,22	2,49	3,61
	MBF 3-5	3,02	2,26	4,07
	MBF 5-4	3,25	2,52	4,76
	MBF 5-9	2,81	2,39	3,46
	MBF 7-5	2,42	1,87	2,44
	MBF 7-8	2,78	2,46	3,47
	MBF 7-17	2,86	2,39	3,60
	MBF 9-2	3,12	2,11	3,88
	MBF 11-2	3,04	2,18	3,68
	MBF WRS-6	3,06	2,30	4,58

Tabel 2 (lanjutan)  
 Diameter Zona Hambat Hasil Respons Galur-Galur *Leu. mesenteroides*  
 Terhadap Antibiotik pada Medium MRS Standar  
 dan Modifikasi (dalam cm)

Antibiotik	Galur <i>Leu. mesenteroides</i>	Standar pH 6,3	Modifikasi 1 pH 4,6	Modifikasi 2 pH 9,0
<b>Tetrasiklin</b>	MBF 2-2	3,10	3,49	2,99
	MBF 2-5	3,25	3,44	3,36
	MBF 3-1	3,34	3,49	3,34
	MBF 3-2	3,28	3,78	3,14
	MBF 3-5	3,33	3,77	3,14
	MBF 5-4	3,51	3,57	3,64
	MBF 5-9	3,52	3,72	3,83
	MBF 7-5	3,32	3,46	3,09
	MBF 7-8	3,21	3,37	2,93
	MBF 7-17	3,17	3,53	3,11
	MBF 9-2	3,22	3,40	2,98
	MBF 11-2	3,44	3,41	3,20
	MBF WRS-6	3,25	3,63	3,21
<b>Vankomisin</b>	MBF 2-2	-	-	-
	MBF 2-5	-	-	-
	MBF 3-1	-	-	-
	MBF 3-2	-	-	-
	MBF 3-5	-	-	-
	MBF 5-4	-	-	-
	MBF 5-9	-	-	-
	MBF 7-5	-	-	-
	MBF 7-8	-	-	-
	MBF 7-17	-	-	-
	MBF 9-2	-	-	-
	MBF 11-2	-	-	-
	MBF WRS-6	-	-	-

Keterangan:

- : tidak menghasilkan zona hambat

Tabel 3  
 Diameter Zona Hambat Hasil Respons Galur-Galur *Leu. mesenteroides*  
 Terhadap Antibiotik pada Medium CMG Standar  
 dan Modifikasi (dalam cm)

Antibiotik	Galur <i>Leu. mesenteroides</i>	Standar pH 7,0	Modifikasi 1 pH 4,6	Modifikasi 2 pH 9,0
<b>Amoksisilin</b>	MBF 2-2	2,26	2,38	2,16
	MBF 2-5	1,92	1,99	1,83
	MBF 3-1	2,55	2,61	2,67
	MBF 3-2	2,66	2,26	2,53
	MBF 3-5	2,08	2,38	2,14
	MBF 5-4	2,55	2,63	2,44
	MBF 5-9	2,17	2,65	2,31
	MBF 7-5	2,54	2,53	2,47
	MBF 7-8	2,70	2,56	3,06
	MBF 7-17	2,61	2,60	2,67
	MBF 9-2	2,60	2,47	2,76
	MBF 11-2	2,71	2,54	2,69
	MBF WRS-6	2,61	2,64	2,61
	<b>Kloramfenikol</b>	MBF 2-2	2,48	2,53
MBF 2-5		2,90	2,74	2,88
MBF 3-1		2,44	2,56	2,81
MBF 3-2		2,98	3,00	3,00
MBF 3-5		2,91	2,79	2,83
MBF 5-4		2,65	2,41	2,73
MBF 5-9		2,77	2,55	2,86
MBF 7-5		2,44	2,32	2,46
MBF 7-8		2,29	2,55	2,82
MBF 7-17		2,46	2,50	2,41
MBF 9-2		2,32	2,50	2,52
MBF 11-2		2,41	2,51	2,58
MBF WRS-6		2,47	2,52	2,57

Tabel 3 (lanjutan)  
 Diameter Zona Hambat Hasil Respons Galur-Galur *Leu. mesenteroides*  
 Terhadap Antibiotik pada Medium CMG Standar  
 dan Modifikasi (dalam cm)

Antibiotik	Galur <i>Leu. mesenteroides</i>	Standar pH 7,0	Modifikasi 1 pH 4,6	Modifikasi 2 pH 9,0
<b>Gentamisin</b>	MBF 2-2	1,48	1,12	2,25
	MBF 2-5	1,61	1,32	1,94
	MBF 3-1	1,33	1,21	1,14
	MBF 3-2	1,78	1,52	2,11
	MBF 3-5	1,52	1,36	1,86
	MBF 5-4	1,39	1,00	2,34
	MBF 5-9	1,36	1,58	1,99
	MBF 7-5	1,45	1,58	2,07
	MBF 7-8	1,43	1,21	2,21
	MBF 7-17	1,55	1,25	1,51
	MBF 9-2	1,33	1,15	1,94
	MBF 11-2	1,50	1,15	1,91
	MBF WRS-6	1,45	1,21	1,98
<b>Eritromisin</b>	MBF 2-2	2,64	2,13	3,01
	MBF 2-5	2,81	2,38	3,20
	MBF 3-1	1,67	2,21	2,91
	MBF 3-2	2,97	2,66	3,41
	MBF 3-5	2,83	2,36	3,19
	MBF 5-4	2,89	2,28	3,13
	MBF 5-9	2,36	2,70	3,16
	MBF 7-5	2,48	2,12	2,92
	MBF 7-8	2,60	2,37	2,90
	MBF 7-17	2,70	2,38	2,99
	MBF 9-2	2,61	2,27	3,21
	MBF 11-2	2,68	2,30	2,94
	MBF WRS-6	2,72	2,34	3,12

Tabel 3 (lanjutan)  
 Diameter Zona Hambat Hasil Respons Galur-Galur *Leu. mesenteroides*  
 Terhadap Antibiotik pada Medium CMG Standar  
 dan Modifikasi (dalam cm)

Antibiotik	Galur <i>Leu. mesenteroides</i>	Standar pH 7,0	Modifikasi 1 pH 4,6	Modifikasi 2 pH 9,0
<b>Tetrasiklin</b>	MBF 2-2	2,46	2,59	2,03
	MBF 2-5	2,58	2,45	2,29
	MBF 3-1	2,32	2,92	2,55
	MBF 3-2	2,72	2,99	2,63
	MBF 3-5	3,14	3,02	3,01
	MBF 5-4	2,81	2,56	2,58
	MBF 5-9	3,33	2,57	2,27
	MBF 7-5	2,88	2,57	2,36
	MBF 7-8	2,76	2,84	2,70
	MBF 7-17	2,55	2,74	2,36
	MBF 9-2	2,83	2,74	2,45
	MBF 11-2	2,43	2,38	2,51
	MBF WRS-6	2,68	2,66	2,66
<b>Vankomisin</b>	MBF 2-2	-	-	-
	MBF 2-5	-	-	-
	MBF 3-1	-	-	-
	MBF 3-2	-	-	-
	MBF 3-5	-	-	-
	MBF 5-4	-	-	-
	MBF 5-9	-	-	-
	MBF 7-5	-	-	-
	MBF 7-8	-	-	-
	MBF 7-17	-	-	-
	MBF 9-2	-	-	-
	MBF 11-2	-	-	-
	MBF WRS-6	-	-	-

Keterangan:

- : tidak menghasilkan zona hambat

Tabel 4

Rata-Rata Diameter Zona Hambat Hasil Respons Galur-Galur *Leu. mesenteroides* Terhadap Berbagai Antibiotik pada Medium MRS dan CMG

Antibiotik	Standar		Asam		Basa	
	MRS	CMG	MRS	CMG	MRS	CMG
<b>Amoksisilin</b>	2,54	2,46	3,27	*	2,93	*
<b>Kloramfenikol</b>	3,22	2,48	3,88	2,60	3,66	2,71
<b>Gentamisin</b>	1,88	1,50	1,58	1,23	3,00	2,06
<b>Eritromisin</b>	2,98	2,72	2,29	2,33	3,77	3,09
<b>Tetrasiklin</b>	3,25	2,89	3,55	2,65	3,10	2,52
<b>Vankomisin</b>	-	-	-	-	-	-

Keterangan:

\* = tidak dilakukan analisis

- = tidak menghasilkan zona hambat

Tabel 5  
 Hasil Analisis Statistik Data Respons Galur-Galur *Leu. mesenteroides*  
 Terhadap Antibiotik pada Medium Pertumbuhan Hasil Manipulasi

Antibiotik	Asam <sup>1</sup> (signifikansi <sup>2</sup> )		Basa <sup>1</sup> (signifikansi <sup>2</sup> )	
	MRS	CMG	MRS	CMG
Amoksisilin	+ (4,81x10 <sup>-5</sup> )	*	+ (0,025)	*
Kloramfenikol	+ (0,0002)	+ (0,013)	+ (0,001)	+ (0,015)
Gentamisin	- (0,0001)	- (8,25x10 <sup>-6</sup> )	+ (2,01x10 <sup>-6</sup> )	+ (83,4x10 <sup>-6</sup> )
Eritromisin	- (3,92x10 <sup>-7</sup> )	- (2,12x10 <sup>-7</sup> )	+ (4,49x10 <sup>-7</sup> )	+ (2,76x10 <sup>-7</sup> )
Tetrasiklin	+ (0,0002)	- (0,044)	- (0,002)	- (0,027)
Vankomisin	*	*	*	*

Keterangan:

1. Ukuran zona hambat. + = bertambah; - = berkurang.
  2. Signifikansi sebagai hasil analisis *paired samples T- test* dengan level signifikansi < 0,025 (lampiran 1-9)
- \* = tidak dilakukan analisis statistik



Lampiran 1  
Uji Distribusi Normal Terhadap Data Pengamatan Zona Hambat *Leu. mesenteroides* pada Medium MRS dan CMG

Tujuan : Mengetahui apakah data pengamatan zona hambat dari masing-masing antibiotik pada medium MRS dan CMG terdistribusi secara normal atau tidak.

Hipotesa :  $H_0$  = data pengamatan zona hambat terdistribusi secara normal.  
 $H_1$  = data pengamatan zona hambat tidak terdistribusi secara normal.

Statistik Uji : Uji Kolmogorof-Smirnov

Level Signifikansi : 0,025

Kriteria Pengujian :  $H_0$  ditolak jika signifikansi < 0,025

Hasil :

Medium	Antibiotik	Level Signifikansi pada pH		
		standar	asam	basa
<b>MRS</b>	Amoksisilin	0,621	0,854	0,951
	Kloramfenikol	0,409	0,933	0,419
	Gentamisin	0,895	0,868	0,959
	Eritromisin	0,949	0,993	0,620
	Tetrasiklin	0,985	0,817	0,969
<b>CMG</b>	Amoksisilin	0,923	0,890	0,988
	Kloramfenikol	0,310	0,140	0,894
	Gentamisin	0,803	0,822	0,706
	Eritromisin	0,984	0,428	0,952
	Tetrasiklin	0,839	0,799	0,985

Kesimpulan : Semua data pengamatan zona hambat mempunyai level signifikansi > 0,025 sehingga  $H_0$  diterima, maka semua data pengamatan zona hambat terdistribusi secara normal.

## Lampiran 2

Uji Statistik Respons *Leu. mesenteroides* Terhadap Amoksisilin pada Medium MRS Standar, MRS Modifikasi Asam, dan MRS Modifikasi Basa

Tujuan : Mengetahui ada tidaknya perbedaan respons *Leu. mesenteroides* yang signifikan terhadap amoksisilin pada medium MRS standar, MRS modifikasi asam, dan MRS modifikasi basa.

Hipotesa :  $H_0$  = data respons antara medium MRS standar dengan MRS asam (atau medium MRS standar dengan MRS basa) tidak berbeda secara signifikan.  
 $H_1$  = data respons antara medium MRS standar dengan MRS asam (atau medium MRS standar dengan MRS basa) berbeda secara signifikan.

Statistik Uji : Uji T Sampel Berpasangan

Level Signifikansi : 0,025

Kriteria Pengujian :  $H_0$  ditolak jika signifikansi < 0,025

Hasil :

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 standar - asam	-.72818	.35578	.10727	-.96720	-.48917	-6.788	10	.000
Pair 2 standar - basa	-.38818	.28715	.08658	-.58109	-.19527	-4.484	10	.001

Kesimpulan :  $H_{01} = 4,81 \times 10^{-5}$  ditolak, maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap amoksisilin antara MRS standar dengan MRS asam berbeda secara signifikan.  
 $H_{02}$  ditolak, maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap amoksisilin antara MRS standar dengan MRS basa berbeda secara signifikan.  
 $H_{01} < H_{02}$  maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap amoksisilin antara MRS standar dengan MRS asam lebih signifikan dibandingkan MRS standar dengan MRS basa.

## Lampiran 3

Uji Statistik Respons *Leu. mesenteroides* Terhadap Kloramfenikol pada Medium MRS Standar, MRS Modifikasi Asam, dan MRS Modifikasi Basa

Tujuan : Mengetahui ada tidaknya perbedaan respons *Leu. mesenteroides* yang signifikan terhadap kloramfenikol pada medium MRS standar, MRS modifikasi asam, dan MRS modifikasi basa.

Hipotesa :  $H_0$  = data respons antara medium MRS standar dengan MRS asam (atau medium MRS standar dengan MRS basa) tidak berbeda secara signifikan.  
 $H_1$  = data respons antara medium MRS standar dengan MRS asam (atau medium MRS standar dengan MRS basa) berbeda secara signifikan.

Statistik Uji : Uji T Sampel Berpasangan

Level Signifikansi : 0,025

Kriteria Pengujian :  $H_0$  ditolak jika signifikansi < 0,025

Hasil :

Paired Samples Test								
	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 standar - asam	-.65917	.41777	.12060	-.92461	-.39373	-5.466	11	.000
Pair 2 standar - basa	-.43333	.34804	.10047	-.65447	-.21220	-4.313	11	.001

Kesimpulan :  $H_{01}$  ditolak, maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap kloramfenikol antara MRS standar dengan MRS asam berbeda secara signifikan.

$H_{02}$  ditolak, maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap kloramfenikol antara MRS standar dengan MRS basa berbeda secara signifikan.

$H_{01} = 0,0002$ ;  $H_{02} = 0,001$ ;  $H_{01} < H_{02}$  maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap kloramfenikol antara MRS standar dengan MRS asam lebih signifikan dibandingkan MRS standar dengan MRS basa.

Lampiran 4  
Uji Statistik Respons *Leu. mesenteroides* Terhadap Gentamisin pada  
Medium MRS Standar, MRS Modifikasi Asam, dan MRS Modifikasi Basa

Tujuan : Mengetahui ada tidaknya perbedaan respons *Leu. mesenteroides* yang signifikan terhadap gentamisin pada medium MRS standar, MRS modifikasi asam, dan MRS modifikasi basa.

Hipotesa :  $H_0$  = data respons antara medium MRS standar dengan MRS asam (atau medium MRS standar dengan MRS basa) tidak berbeda secara signifikan.  
 $H_1$  = data respons antara medium MRS standar dengan MRS asam (atau medium MRS standar dengan MRS basa) berbeda secara signifikan.

Statistik Uji : Uji T Sampel Berpasangan

Level Signifikansi : 0,025

Kriteria Pengujian :  $H_0$  ditolak jika signifikansi  $< 0,025$

Hasil :

**Paired Samples Test**

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 standar - asam	.30154	.19459	.05397	.18395	.41913	5.587	12	.000
Pair 2 standar - basa	-1.11538	.47323	.13125	-1.40135	-.82942	-8.498	12	.000

Kesimpulan :  $H_{01}$  ditolak, maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap gentamisin antara MRS standar dengan MRS asam berbeda secara signifikan.  
 $H_{02}$  ditolak, maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap gentamisin antara MRS standar dengan MRS basa berbeda secara signifikan.  
 $Ho_1 = 0,0001$ ;  $Ho_2 = 2.01 \times 10^{-6}$ ,  $Ho_2 < Ho_1$  maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap gentamisin antara MRS standar dengan MRS basa lebih signifikan dibandingkan MRS standar dengan MRS asam.

## Lampiran 5

Uji Statistik Respons *Leu. mesenteroides* Terhadap Eritromisin pada Medium MRS Standar, MRS Modifikasi Asam, dan MRS Modifikasi Basa

Tujuan : Mengetahui ada tidaknya perbedaan respons *Leu. mesenteroides* yang signifikan terhadap eritromisin pada medium MRS standar, MRS modifikasi asam, dan MRS modifikasi basa.

Hipotesa : Ho = data respons antara medium MRS standar dengan MRS asam (atau medium MRS standar dengan MRS basa) tidak berbeda secara signifikan.  
H1 = data respons antara medium MRS standar dengan MRS asam (atau medium MRS standar dengan MRS basa) berbeda secara signifikan.

Statistik Uji : Uji T Sampel Berpasangan

Level Signifikansi : 0,025

Kriteria Pengujian : Ho ditolak jika signifikansi < 0,025

Hasil :

## Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval of the Difference				
				Mean	Lower			
Pair 1 standar - asam	.69083	.22468	.06486	.54808	.83359	10.651	11	.000
Pair 2 standar - basa	-.78583	.41943	.12108	-1.05232	-.51934	-6.490	11	.000

Kesimpulan : Ho<sub>1</sub> ditolak, maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap eritromisin antara MRS standar dengan MRS asam berbeda secara signifikan.

Ho<sub>2</sub> ditolak, maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap eritromisin antara MRS standar dengan MRS basa berbeda secara signifikan.

Ho<sub>1</sub> = 3,92 x 10<sup>-7</sup>; Ho<sub>2</sub> = 4,49 x 10<sup>-7</sup>; Ho<sub>1</sub> < Ho<sub>2</sub> maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap eritromisin antara MRS standar dengan MRS asam lebih signifikan dibandingkan MRS standar dengan MRS basa.

## Lampiran 6

Uji Statistik Respons *Leu. mesenteroides* Terhadap Tetrasiklin pada Medium MRS Standar, MRS Modifikasi Asam, dan MRS Modifikasi Basa

Tujuan : Mengetahui ada tidaknya perbedaan respons *Leu. mesenteroides* yang signifikan terhadap tetrasiklin pada Medium MRS Standar, MRS Modifikasi Asam, dan MRS Modifikasi Basa.

Hipotesa : Ho = data respons antara medium MRS standar dengan MRS asam (atau medium MRS standar dengan MRS basa) tidak berbeda secara signifikan.  
H1 = data respons antara medium MRS standar dengan MRS asam (atau medium MRS standar dengan MRS basa) berbeda secara signifikan.

Statistik Uji : Uji T Sampel Berpasangan

Level Signifikansi : 0,025

Kriteria Pengujian : Ho ditolak jika signifikansi < 0,025

Hasil :

## Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 standar - asam	-.30000	.14133	.04711	-.40864	-.19136	-6.368	8	.000
Pair 2 standar - basa	.14333	.09811	.03270	.06792	.21875	4.383	8	.002

Kesimpulan : Ho<sub>1</sub> = 0,0002 ditolak, maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap tetrasiklin antara MRS standar dengan MRS asam berbeda secara signifikan.  
Ho<sub>2</sub> ditolak, maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap tetrasiklin antara MRS standar dengan MRS basa berbeda secara signifikan.  
Ho<sub>1</sub> < Ho<sub>2</sub> maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap tetrasiklin antara MRS standar dengan MRS asam lebih signifikan dibandingkan MRS standar dengan MRS basa.

Lampiran 7  
 Uji Statistik Respons *Leu. mesenteroides* Terhadap Kloramfenikol pada  
 Medium CMG Standar, CMG Modifikasi Asam, dan CMG Modifikasi Basa

Tujuan : Mengetahui ada tidaknya perbedaan respons *Leu. mesenteroides* yang signifikan terhadap kloramfenikol pada medium CMG standar, CMG modifikasi asam, dan CMG modifikasi basa.

Hipotesa : Ho = data respons antara medium CMG standar dengan CMG asam (atau medium CMG standar dengan CMG basa) tidak berbeda secara signifikan.  
 H1 = data respons antara medium CMG standar dengan CMG asam (atau medium CMG standar dengan CMG basa) berbeda secara signifikan.

Statistik Uji : Uji T Sampel Berpasangan

Level Signifikansi : 0,025

Kriteria Pengujian : Ho ditolak jika signifikansi < 0,025

Hasil :

**Paired Samples Test**

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 standar - asam	-.11143	.08454	.03195	-.18962	-.03324	-3.487	6	.013
Pair 2 standar - basa	-.22143	.17296	.06537	-.38139	-.06147	-3.387	6	.015

Kesimpulan : Ho<sub>1</sub> ditolak, maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap kloramfenikol antara CMG standar dengan CMG asam berbeda secara signifikan.

Ho<sub>2</sub> ditolak, maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap kloramfenikol antara CMG standar dengan CMG basa berbeda secara signifikan.

Ho<sub>1</sub> < Ho<sub>2</sub>, maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap kloramfenikol antara CMG standar dengan CMG asam lebih signifikan dibandingkan CMG standar dengan CMG basa.

## Lampiran 8

Uji Statistik Respons *Leu. mesenteroides* Terhadap Gentamisin pada Medium CMG Standar, CMG Modifikasi Asam, dan CMG Modifikasi Basa

Tujuan : Mengetahui ada tidaknya perbedaan respons *Leu. mesenteroides* yang signifikan terhadap gentamisin pada medium CMG standar, CMG modifikasi asam, dan CMG modifikasi basa.

Hipotesa :  $H_0$  = data respons antara medium CMG standar dengan CMG asam (atau medium CMG standar dengan CMG basa) tidak berbeda secara signifikan.  
 $H_1$  = data respons antara medium CMG standar dengan CMG asam (atau medium CMG standar dengan CMG basa) berbeda secara signifikan.

Statistik Uji : Uji T Sampel Berpasangan

Level Signifikansi : 0,025

Kriteria Pengujian :  $H_0$  ditolak jika signifikansi < 0,025

Hasil :

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval of the Difference				
				Mean	Lower			
Pair 1 standar - asam	.27222	.08136	.02712	.20968	.33476	10.038	8	.000
Pair 2 standar - basa	-.56111	.23040	.07680	-.73822	-.38401	-7.306	8	.000

Kesimpulan :  $H_{01}$  ditolak, maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap gentamisin antara CMG standar dengan CMG asam berbeda secara signifikan.

$H_{02}$  ditolak, maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap gentamisin antara CMG standar dan CMG basa berbeda secara signifikan.

$H_{01} = 8,25 \times 10^{-6}$ ;  $H_{02} = 83,4 \times 10^{-6}$ ;  $H_{01} < H_{02}$ , maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap gentamisin antara CMG standar dengan CMG asam lebih signifikan dibandingkan CMG standar dengan CMG basa.

## Lampiran 9

Uji Statistik Respons *Leu. mesenteroides* Terhadap Eritromisin pada Medium CMG Standar, CMG Modifikasi Asam, dan CMG Modifikasi Basa

Tujuan : Mengetahui ada tidaknya perbedaan respons *Leu. mesenteroides* yang signifikan terhadap eritromisin pada Medium CMG Standar, CMG Modifikasi Asam, dan CMG Modifikasi Basa.

Hipotesa : Ho = data respons antara medium CMG standar dengan CMG asam (atau medium CMG standar dengan CMG basa) tidak berbeda secara signifikan.  
H1 = data respons antara medium CMG standar dengan CMG asam (atau medium CMG standar dengan CMG basa) berbeda secara signifikan.

Statistik Uji : Uji T Sampel Berpasangan

Level Signifikansi : 0,025

Kriteria Pengujian : Ho ditolak jika signifikansi < 0,025

Hasil :

Paired Samples Test								
	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 standar - asam	.39455	.10539	.03178	.32374	.46535	12.416	10	.000
Pair 2 standar - basa	-.37182	.10216	.03080	-.44045	-.30319	-12.071	10	.000

Kesimpulan : Ho<sub>1</sub> ditolak, maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap eritromisin antara CMG standar dengan CMG asam berbeda secara signifikan.

Ho<sub>2</sub> ditolak, maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap eritromisin antara CMG standar dengan CMG basa berbeda secara signifikan.

Ho<sub>1</sub> = 2,12 x 10<sup>-7</sup>; Ho<sub>2</sub> = 2,76 x 10<sup>-7</sup>; Ho<sub>1</sub> < Ho<sub>2</sub>, maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap eritromisin antara CMG standar dengan CMG asam lebih signifikan dibandingkan CMG standar dengan CMG basa.

Lampiran 10  
Uji Statistik Respons *Leu. mesenteroides* Terhadap Tetrasiklin pada Medium  
CMG Standar, CMG Modifikasi Asam, dan CMG Modifikasi Basa

Tujuan : Mengetahui ada atau tidaknya perbedaan respons *Leu. mesenteroides* yang signifikan terhadap tetrasiklin pada Medium CMG standar, CMG modifikasi asam, dan CMG modifikasi basa.

Hipotesa :  $H_0$  = data respons antara medium CMG standar dengan CMG asam (atau medium CMG standar dengan CMG basa) tidak berbeda secara signifikan.  
 $H_1$  = data respons antara medium CMG standar dengan CMG asam (atau medium CMG standar dengan CMG basa) berbeda secara signifikan.

Statistik Uji : Uji T Sampel Berpasangan

Level Signifikansi : 0,025

Kriteria Pengujian :  $H_0$  ditolak jika signifikansi < 0,025

Hasil :

**Paired Samples Test**

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 standar - asam	.24000	.24927	.09421	.00947	.47053	2.547	6	.044
Pair 2 standar - basa	.37571	.34268	.12952	.05879	.69264	2.901	6	.027

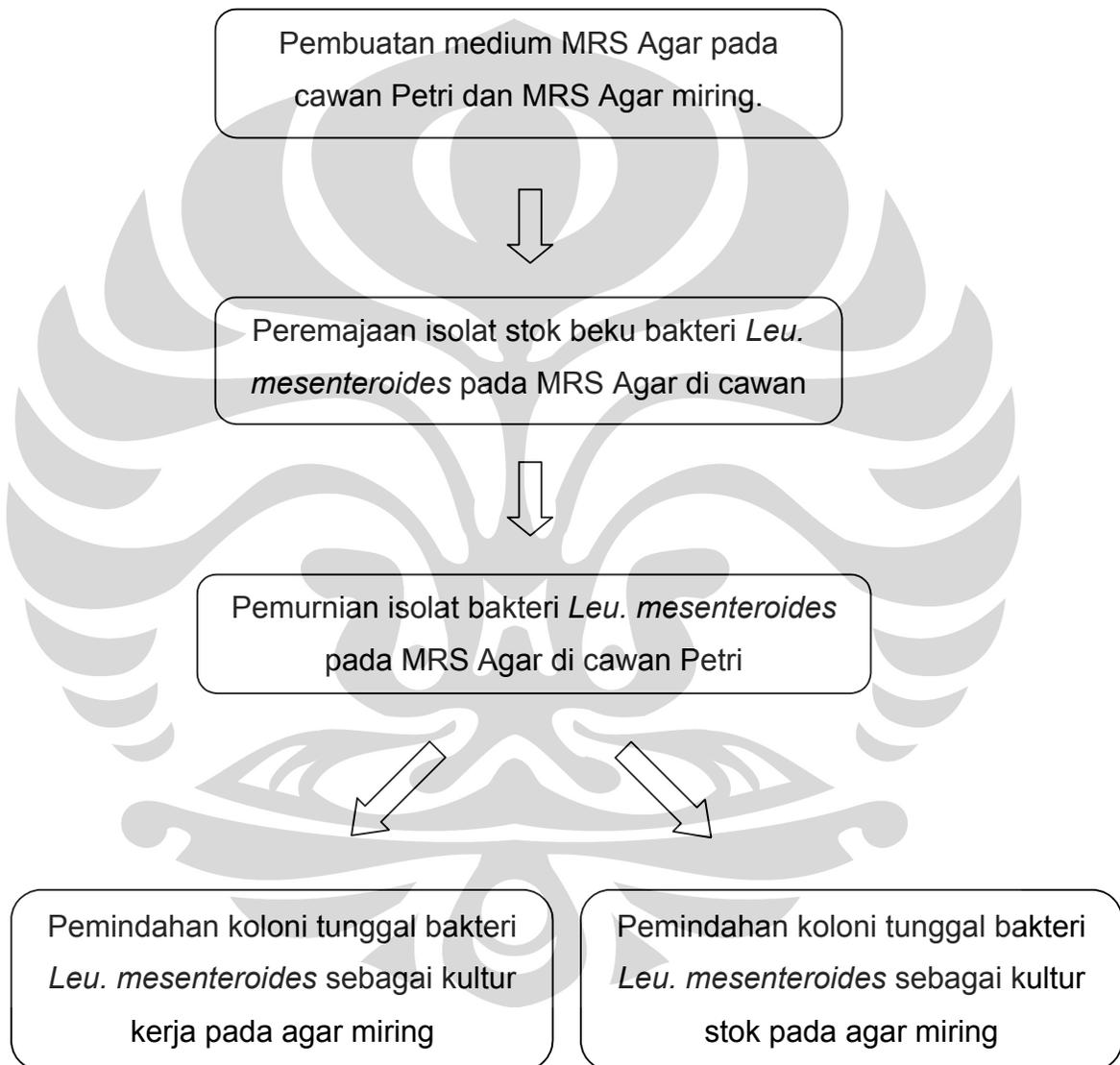
Kesimpulan :  $H_{01}$  diterima, maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap tetrasiklin antara CMG standar dengan CMG asam tidak berbeda secara signifikan.

$H_{02}$  diterima, maka data respons *Leu. mesenteroides* terhadap tetrasiklin antara CMG standar dengan CMG basa tidak berbeda secara signifikan.

## Lampiran 11

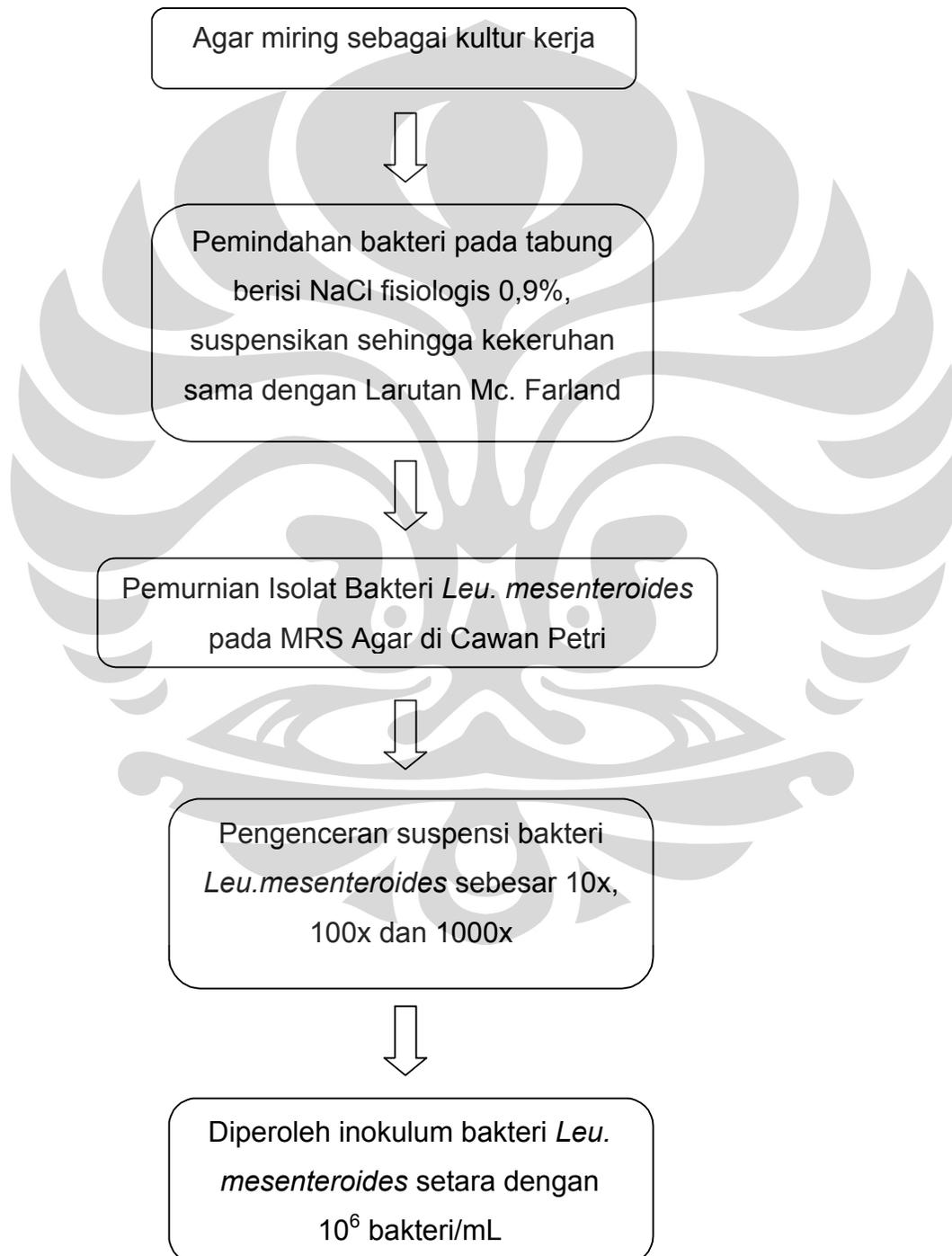
## Alur Kerja Penelitian

## A. Penyiapan Kultur Kerja dan Kultur Stok pada Agar Miring



## Lampiran 11 (lanjutan)

## Alur Kerja Penelitian

B. Pembuatan Inokulum Bakteri *Leuconostoc mesenteroides*

## Lampiran 11 (lanjutan)

## Alur Kerja Penelitian

C. Pengujian Kepekaan Bakteri *Leuconostoc mesenteroides* Terhadap Antibiotik