

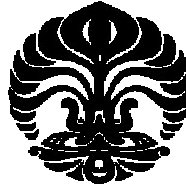
UNIVERSITAS INDONESIA

**STUDI KERAGAMAN GENETIK BAKTERI ASAM LAKTAT
INDIGENOS INDONESIA YANG RESISTAN TERHADAP
CHLORAMPHENICOL DAN *ERYTHROMYCIN***

SKRIPSI

**MARIDHA NORMAWATI
0706264040**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JANUARI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**STUDI KERAGAMAN GENETIK BAKTERI ASAM LAKTAT
INDIGENOS INDONESIA YANG RESISTAN TERHADAP
CHLORAMPHENICOL DAN *ERYTHROMYCIN***

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**MARIDHA NORMAWATI
0706264040**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JANUARI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Maridha Normawati

NPM : 0706264040

Tanda Tangan : 

Tanggal : 5 Januari 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Maridha Normawati
NPM : 0706264040
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul Skripsi : Studi Keragaman Genetik Bakteri Asam Laktat
Indigenos Indonesia yang Resistan terhadap
Chloramphenicol dan *Erythromycin*

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Abinawanto (.....)

Pembimbing II : A. Zaenal Mustopa, M. Si (.....)

Penguji I : Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M. Sc (.....)

Penguji II : Dra. Setiorini, M. Kes (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 5 Januari 2012

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahil'abidin. Puji syukur Penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga Penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Shalawat serta salam semoga senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan para sahabat. Skripsi ini dapat diselesaikan dengan tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Penulis sangat mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Dr. Abinawanto selaku Pembimbing I dan Bapak A. Zaenal Mustopa, M. Si selaku Pembimbing II atas ilmu, bimbingan, nasihat, dan motivasi yang diberikan selama penelitian dan proses penulisan skripsi.
- (2) Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M. Sc selaku Penguji I serta Koordinator Seminar dan Dra Setiorini, M. Kes selaku Penguji II, Koordinator Seminar, serta Penasihat Akademik yang telah memberikan ilmu, kritik, saran, masukan, perhatian, dan perbaikan kepada Penulis.
- (3) Dr.rer.nat. Mufti Petala Patria, M.Sc selaku Ketua Departemen Biologi, Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc selaku Sekertaris Departemen Biologi, Dra. Titi Soedjiarti, S.U. selaku Koordinator Pendidikan, seluruh dosen, Ibu Ida, Mbak Asri, dan seluruh karyawan Departemen Biologi FMIPA UI atas bimbingan, ilmu pengetahuan, dan bantuan kepada Penulis.
- (4) Dr.Ir. Witjaksono, M.Sc selaku Kepala Puslit Bioteknologi LIPI yang telah memberikan kesempatan kepada Penulis untuk melakukan penelitian di Laboratorium Bakteriologi dan Virologi Molekuler. Bu Emmi atas izin penggunaan isolat bakteri asam laktat. Mas Ridwan, Mbak Linda, Reni, Maya, Bowo, Fatur, Bang Bobby, Meita, dan Mas Ace yang telah banyak membantu, memberikan keceriaan, canda tawa, dan tempat berbagi suka duka kepada Penulis selama penelitian.
- (5) Mama Nanik Listiyaningsih, Bapak Mudakir Marzuki, Adik Rizqi Addinul Falah dan seluruh keluarga besar yang telah memberikan doa, masukan, nasihat, dorongan motivasi, dan kasih sayang tak ternilai.
- (6) Ikrimah Muzdalifah selaku *partner* setia Penulis yang telah banyak

membantu, memberikan masukan, tempat berbagi cerita, suka, duka, dan ilmu. Desi, teman-teman Blossom 2007, Kiki, Fika, Tiwi, Karno, Kimbod, Bayu, Indah, Fajar, Tewe, Putsan, Gitaw, Ade, dan teman-teman asisten Praktikum Genetika lainnya yang telah memberikan masukan, ilmu, semangat, keceriaan, dan tempat berbagi cerita. Tami dan Kak Rama Dhenni (Baliveau'04) yang telah berbagi pengalaman dan ilmunya dalam konstruksi pohon filogenetik.

Akhir kata, Penulis menyadari masih banyak kekurangan dari skripsi ini. Oleh karena itu, kritik dan saran sangat Penulis harapkan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan menambah wawasan pengetahuan kepada para pembaca.

Depok, 5 Januari 2012

Penulis

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Maridha Normawati
NPM : 0706264040
Program Studi : S1 Reguler
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul: *Studi Keragaman Genetik Bakteri Asam Laktat Indigenos Indonesia yang Resistan terhadap Chloramphenicol dan Erythromycin* beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 5 Januari 2012
Yang menyatakan



(Maridha Normawati)

ABSTRAK

Nama : Maridha Normawati
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul : Studi Keragaman Genetik Bakteri Asam Laktat Indigenos Indonesia yang Resistan terhadap *Chloramphenicol* dan *Erythromycin*

Studi keragaman genetik dilakukan untuk mengetahui hubungan kekerabatan bakteri asam laktat indigenos Indonesia yang memiliki kemampuan resistansi terhadap *chloramphenicol* dan *erythromycin*. Hasil uji resistansi menunjukkan bahwa isolat DH1, DH7, dan S34 resistan terhadap *chloramphenicol* (5 µg/ml), sedangkan isolat T8 resistan terhadap *erythromycin* (15 µg/ml). Isolat D2, S23, dan T8 diketahui resistan terhadap kombinasi *chloramphenicol* dan *erythromycin* (1 µg/ml). Analisis BLAST menunjukkan bahwa isolat bakteri asam laktat terdiri atas *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *Pediococcus acidilactici*, dan *P. pentosaceus*. Analisis pohon filogenetik diketahui bahwa isolat D2, S12, S34, T3, dan T8 memiliki kekerabatan yang dekat dengan *L. plantarum*. Isolat R31 dan DH1 memiliki kekerabatan yang dekat dengan *L. fermentum*. Isolat LK14, S23, R24, DH7, DS13, GR3, HB3 memiliki kekerabatan yang dekat dengan genus *Pediococcus*.

Kata kunci : Bakteri asam laktat indigenos Indonesia, gen resistan, *chloramphenicol*, *erythromycin*, keragaman genetik

xiii + 82 halaman; 23 gambar; 11 lampiran; 6 tabel

Daftar Referensi : 76 (1938—2011)

ABSTRACT

Name : Maridha Normawati
Study Program: Biology S1 Regular
Title : Genetic Diversity of Indigenous Indonesia Lactic Acid Bacteria
that Resistant to Chloramphenicol and Erythromycin

Study on genetic diversity was useful to determine the kinship of Indigenous Indonesia lactic acid bacteria which have the capability of resistance to chloramphenicol and erythromycin. The resistance test showed isolates DH1, DH7, and S34 that were resistant to chloramphenicol (5 µg/ml), whereas T8 was resistant to erythromycin (15 µg/ml). Isolates D2, S23, and T8 were remain resistant to the combination of chloramphenicol and erythromycin (1 µg/ml). The results of BLAST analysis showed that there were four different species of lactic acid bacteria, such as *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *Pediococcus acidilactici*, and *P. pentosaceus*. The results of phylogenetic trees analysis showed that isolates D2, S12, S34, T3, and T8 have a close kinship with *L. plantarum*, whereas isolates R31 and DH1 have a close kinship with *L. fermentum*. Moreover, isolates LK14, S23, R24, DH7, DS13, GR3, HB3 have a close kinship to the genus *Pediococcus*.

Key Words : Indigenous Indonesia lactic acid bacteria, resistance gene, chloramphenicol, erythromycin, genetic diversity

xiii + 82 pages; 11 appendixes; 23 pictures; 6 tables

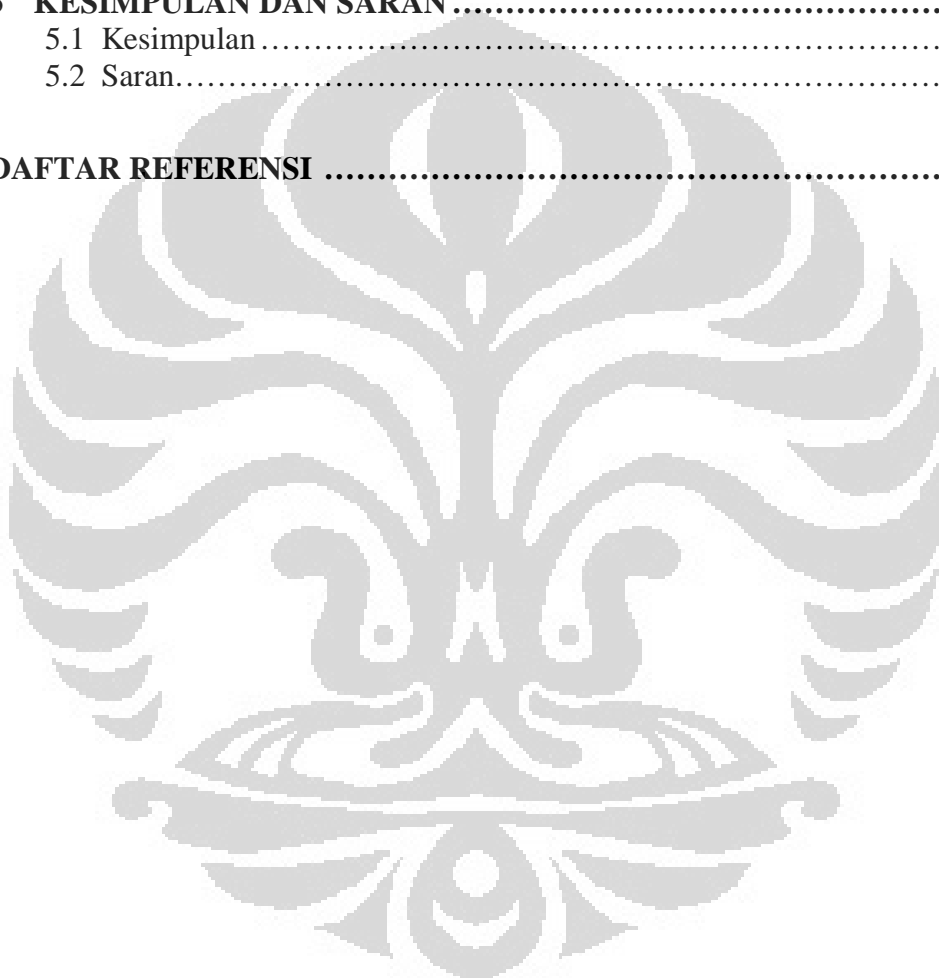
Bibliography : 76 (1938—2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS.....	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
1. PENDAHULUAN.....	1
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Bakteri asam laktat.....	4
2.1.1 Karakteristik bakteri asam laktat.....	4
2.1.2 Bakteri asam laktat indigenos Indonesia.....	5
2.2 <i>Chloramphenicol</i>	6
2.2.1 Karakteristik <i>chloramphenicol</i>	6
2.2.2 Mekanisme resistansi bakteri terhadap <i>chloramphenicol</i>	7
2.2.3 Bakteri asam laktat yang resistan terhadap <i>chloramphenicol</i>	9
2.3 <i>Erythromycin</i>	9
2.3.1 Karakteristik <i>erythromycin</i>	9
2.3.2 Mekanisme resistansi bakteri terhadap <i>erythromycin</i>	11
2.3.3 Bakteri asam laktat yang resistan terhadap <i>erythromycin</i>	12
2.4 Uji resistansi bakteri dengan metode <i>viable cell count</i>	12
2.5 Keragaman genetik.....	13
2.5.1 Gen 16S rRNA.....	13
2.5.2 Analisis filogenetik.....	14
2.5.3 Keragaman genetik bakteri asam laktat.....	15
2.6 Teknik biologi molekuler.....	16
2.6.1 Isolasi genom bakteri asam laktat.....	16
2.6.2 Elektroforesis.....	16
2.6.3 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	17
2.6.4 <i>DNA sequencing</i>	18
2.6.5 Analisis hasil <i>sequencing</i>	19
3. METODE PENELITIAN.....	20
3.1 Lokasi dan waktu penelitian.....	20
3.2 Bahan.....	20

3.2.1	Sampel	20
3.2.2	Bahan kimia	20
3.2.3	Primer.....	21
3.3	Peralatan	21
3.4	Cara kerja	22
3.4.1	Pembuatan larutan, <i>buffer</i> , dan medium	22
3.4.2	Penapisan isolat potensial resistan <i>chloramphenicol</i> (2 µg/ml) dan <i>erythromycin</i> (1 µg/ml) dalam medium MRS/M17 cair	23
3.4.3	Penapisan isolat potensial resistan <i>chloramphenicol</i> (5 µg/ml), <i>erythromycin</i> (5 µg/ml), serta kombinasi <i>chloramphenicol</i> dan <i>erythromycin</i> dalam medium MRS/M17 Cair.....	23
3.4.4	Uji resistansi bakteri asam laktat dalam berbagai konsentrasi <i>chloramphenicol</i> dan <i>erythromycin</i> dengan metode <i>viable cell count</i> pada medium MRS/M17 Agar.....	23
3.4.5	Isolasi genom	24
3.4.6	Penghitungan konsentrasi dan kemurnian DNA dengan spektrofotometer	25
3.4.7	Identifikasi gen 16S rRNA dengan <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	26
3.4.8	Elektroforesis dan visualisasi	27
3.4.9	Purifikasi produk PCR.....	27
3.4.10	DNA <i>sequencing</i>	28
3.4.11	Penyusunan, pengolahan, dan analisis data	28
4	HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1	Hasil.....	29
4.1.1	Hasil penapisan isolat potensial resistan <i>chloramphenicol</i> (2 µg/ml) dan <i>erythromycin</i> (1 µg/ml) dalam medium MRS/M17 Cair	29
4.1.2	Hasil penapisan isolat potensial resistan <i>chloramphenicol</i> (5 µg/ml), <i>erythromycin</i> (5 µg/ml), serta kombinasi <i>chloramphenicol</i> dan <i>erythromycin</i> dalam medium MRS/M17 Cair.....	30
4.1.3	Uji resistansi bakteri asam laktat dalam berbagai konsentrasi <i>chloramphenicol</i> dan <i>erythromycin</i> dengan metode <i>viable cell count</i> pada medium MRS/M17 Agar.....	31
4.1.4	Isolasi genom dan pengukuran konsentrasi serta kemurnian DNA.....	39
4.1.5	Identifikasi gen 16S rRNA dengan <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) dan elektroforesis hasil PCR	39
4.1.6	Hasil purifikasi produk PCR.....	41
4.1.7	Hasil analisis DNA <i>sequencing</i>	42
4.2	Pembahasan	46
4.2.1	Kemampuan resistansi bakteri asam laktat terhadap <i>chloramphenicol</i>	46

4.2.2 Kemampuan resistansi bakteri asam laktat terhadap <i>erythromycin</i>	48
4.2.3 Kemampuan resistansi bakteri asam laktat terhadap kombinasi <i>chloramphenicol</i> dan <i>erythromycin</i>	50
4.2.4 Analisis hasil isolasi genom, konsentrasi, dan kemurnian DNA.....	50
4.2.5 Analisis identifikasi bakteri asam laktat terhadap sumber isolat.....	51
4.2.6 Analisis keragaman genetik bakteri asam laktat.....	53
5 KESIMPULAN DAN SARAN.....	57
5.1 Kesimpulan.....	57
5.2 Saran.....	57
DAFTAR REFERENSI	58



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.1	Morfologi bakteri asam laktat	5
Gambar 2.2.1	Struktur <i>chloramphenicol</i>	7
Gambar 2.2.2	Mekanisme resistansi bakteri asam laktat terhadap <i>chloramphenicol</i>	8
Gambar 2.3.1.1	Struktur <i>erythromycin</i>	10
Gambar 2.3.1.2	Mekanisme kerja <i>erythromycin</i>	10
Gambar 2.3.2	Mekanisme resistansi bakteri terhadap <i>erythromycin</i>	11
Gambar 2.5.1	Gen 16S rRNA	14
Gambar 2.6.3	Tahapan reaksi PCR	18
Gambar 3.4	Skema kerja penelitian	22
Gambar 3.4.4.1	Metode <i>viable cell count</i>	24
Gambar 3.4.4.2	Rumus penghitungan jumlah bakteri asam laktat	24
Gambar 3.4.6	Penghitungan konsentrasi DNA untai ganda	26
Gambar 4.1.3.1	Hasil uji resistansi isolat T3 terhadap <i>chloramphenicol</i>	32
Gambar 4.1.3.2	Data resistansi bakteri asam laktat terhadap <i>chloramphenicol</i> (1)	33
Gambar 4.1.3.3	Data resistansi bakteri asam laktat terhadap <i>chloramphenicol</i> (2)	34
Gambar 4.1.3.4	Hasil uji resistansi isolat D2 terhadap <i>erythromycin</i>	35
Gambar 4.1.3.5	Data resistansi bakteri asam laktat terhadap <i>erythromycin</i> ..	36
Gambar 4.1.3.6	Hasil uji resistansi isolat terhadap kombinasi <i>chloramphenicol</i> dan <i>erythromycin</i>	37
Gambar 4.1.3.7	Hasil uji resistansi bakteri asam laktat terhadap kombinasi <i>chloramphenicol</i> dan <i>erythromycin</i>	38
Gambar 4.1.5.1	Hasil identifikasi gen 16S rRNA dengan PCR (1)	40
Gambar 4.1.5.2	Hasil identifikasi gen 16S rRNA dengan PCR (2)	41
Gambar 4.1.6	Hasil purifikasi produk PCR dari isolat R31 dan DS13	42
Gambar 4.1.7	Pohon Filogenetik bakteri asam laktat yang resistan terhadap <i>chloramphenicol</i> dan <i>erythromycin</i>	45

DAFTAR TABEL

Tabel 3.2.3	Primer yang digunakan untuk identifikasi spesies 16S rRNA....	21
Tabel 3.4.7	Komposisi <i>reaction mixture</i> PCR.....	26
Tabel 4.1.1	Hasil penapisan isolat potensial resistan <i>chloramphenicol</i> dan <i>erythromycin</i>	29
Tabel 4.1.2	Data isolat potensial resistan <i>chloramphenicol</i> (5 µg/ml) dan <i>erythromycin</i> (5 µg/ml).....	31
Tabel 4.1.3	Hasil uji resistansi bakteri asam laktat terhadap <i>chloramphenicol</i> dan <i>erythromycin</i>	38
Tabel 4.1.7	Hasil identifikasi isolat bakteri asam laktat dengan program BLAST.....	43

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Cara pembuatan larutan, <i>buffer</i> , dan medium.....	66
Lampiran 2	Data penapisan isolat pada <i>chloramphenicol</i> (2 µg/ml) dan <i>erythromycin</i> (1 µg/ml).....	69
Lampiran 3	Penapisan pada <i>chloramphenicol</i> , <i>erythromycin</i> , dan kombinasi kedua antibiotik (5 µg/ml).....	74
Lampiran 4	Penghitungan jumlah koloni dari isolat T3.....	75
Lampiran 5	Hasil uji resistansi isolat bakteri asam laktat terhadap berbagai konsentrasi <i>chloramphenicol</i> pada medium agar.....	76
Lampiran 6	Hasil uji resistansi isolat bakteri asam laktat terhadap berbagai konsentrasi <i>erythromycin</i> pada medium agar.....	77
Lampiran 7	Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA hasil isolasi genom.....	78
Lampiran 8	Basa nukleotida gen 16S rRNA dari isolat T8.....	79
Lampiran 9	Data elektroferogram hasil analisis DNA <i>sequencing</i> isolat T8 dengan menggunakan primer F1.....	80
Lampiran 10	Data elektroferogram hasil analisis DNA <i>sequencing</i> isolat T8 dengan menggunakan primer R1.....	81
Lampiran 11	Homologi isolat T8 dengan data dari GenBank.....	82

BAB 1 PENDAHULUAN

Chloramphenicol dan *erythromycin* merupakan antibiotik yang banyak digunakan untuk pengobatan karena dapat menghambat sintesis protein pada bakteri Gram positif dan negatif (Guilfoile 2007: 34). Namun, penggunaan dan penyalahgunaan *chloramphenicol* dan *erythromycin* sebagai zat antimikroba menyebabkan bakteri asam laktat menjadi resistan terhadap kedua antibiotik tersebut (Dang dkk. 2009: 987). Kemampuan resistansi bakteri asam laktat terhadap antibiotik menjadi meningkat akibat paparan antibiotik secara terus-menerus sehingga dapat memengaruhi mekanisme resistansi pada bakteri asam laktat (Teuber dkk. 2003: 317).

Beberapa penelitian telah mempelajari kemampuan resistansi bakteri asam laktat terhadap *chloramphenicol* dan *erythromycin*. Penelitian D' Aimmio dkk. (2007: 38) melaporkan bahwa bakteri asam laktat yang resistan terhadap *erythromycin* dan *chloramphenicol* antara lain *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, dan *Streptococcus thermophilus*. Pan dkk. (2011: 1316) juga telah melaporkan bahwa makanan fermentasi tradisional China yang terbuat dari daging Babi dan acar, mengandung bakteri asam laktat yang resistan terhadap *chloramphenicol* dan *erythromycin*. Bakteri asam laktat tersebut antara lain *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. mali*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. namurensis*, dan *Enterococcus faecium* (Pan dkk. 2011: 1318—1319).

Kemampuan resistansi bakteri asam laktat terhadap *chloramphenicol* dan *erythromycin* dapat dimanfaatkan dalam rekayasa genetik. Plasmid yang berasal dari bakteri asam laktat yang resistan terhadap *chloramphenicol* dan *erythromycin* dapat dimanfaatkan sebagai vektor dalam proses pengklonan (Desmond dkk. 2005: 161; Fons dkk. 1997: 199; Normark & Normark 2002: 99). Plasmid tersebut memiliki gen resistan yang dapat digunakan sebagai *selectable markers* dalam manipulasi genetik bakteri asam laktat, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai *food grade vector* (Teuber dkk. 2003: 317). *Food grade vector* merupakan vektor yang dapat diaplikasikan dalam industri makanan karena berasal dari mikroorganisme

yang tidak berbahaya bagi tubuh manusia (Johansen 2003: 112). *Food grade vector* yang telah dikembangkan antara lain pNP40 dari *Lactococcus lactis* DRC3 dan pSF01 dari *Lc. Lactis* strain 10.088 (Morelli *dkk.* 2004: 289).

Beberapa peneliti telah mengembangkan plasmid yang memiliki kemampuan resistansi terhadap *chloramphenicol* dan *erythromycin*. Plasmid yang diketahui resistan terhadap *erythromycin* serta telah dikembangkan sebagai vektor antara lain pLEM3 dari *Lactobacillus fermentum*. Plasmid pLEM3 merupakan plasmid yang stabil dan memiliki *multiple cloning site* yang sangat berpotensi untuk vektor pengklonaan (Fons 1997: 201). Lee *dkk.* (2007: 4417) juga telah mengembangkan plasmid pDOJ1 yang resistan terhadap *chloramphenicol* dari *Lactobacillus delbrueckii* sebagai *shuttle cloning vector*. *Shuttle cloning vector* tersebut berhasil diintroduksi pada *E. coli*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus*, *Lc. coccus* (Lee *dkk.* 2007: 4417).

Pencarian kandidat isolat potensial yang akan digunakan sebagai *host* yang memiliki kompatibilitas dengan vektor juga sangat diperlukan dalam rekayasa genetik. Beberapa penelitian mengenai pengembangan *host* telah dilakukan. Helmark *dkk.* (2004: 3695) telah mengembangkan *Leuconostoc carnosum* 4010 sebagai *host*. Pengembangan *Lactobacillus casei* sebagai *host* juga telah dilakukan oleh Berthier *dkk.* (1996: 1273).

Penelitian pendahuluan untuk mendapatkan vektor pengklonaan yang memiliki gen resistan dan memiliki kompatibilitas dengan *host* dapat dilakukan dengan cara studi keragaman genetik. Studi keragaman genetik berguna untuk melihat kekerabatan yang dekat di antara isolat potensial. Beberapa penelitian mengenai studi keragaman genetik bakteri asam laktat telah dilakukan. Albano *dkk.* (2009: 389) meneliti keragaman genetik bakteri asam laktat pada Alheira, sedangkan Chao *dkk.* (2009: 203) meneliti keragaman genetik bakteri asam laktat pada makanan fermentasi China, yaitu *suan-tsai* dan *fu-tsai*. Penelitian studi keragaman genetik bakteri asam laktat asal Indonesia juga telah dilakukan oleh Sujaya *dkk.* (2010: 239) yang meneliti keragaman genetik bakteri asam laktat dari ragi tape.

Berbagai penelitian mengenai studi keragaman genetik bakteri asam laktat tersebut, masih terbatas untuk mengetahui data keragaman jenis bakteri. Namun,

berbagai penelitian tersebut belum digunakan untuk tujuan rekayasa genetik khususnya untuk melihat potensi resistansi terhadap *chloramphenicol* dan *erythromycin* serta hubungan kompatibilitas antara isolat yang akan dimanfaatkan sebagai *host* dan vektor.

Penelitian utama Laboratorium Bakteriologi dan Virologi Molekuler Puslit Bioteknologi LIPI bertujuan untuk memproduksi protein rekombinan *plantaricin* untuk anti *thyposa*. Penelitian utama tersebut memerlukan data isolat potensial yang dapat digunakan untuk pengembangan vektor dan *host*. Oleh karena itu, Laboratorium Bakteriologi dan Virologi Molekuler Puslit Bioteknologi LIPI ingin mengembangkan plasmid bakteri asam laktat yang memiliki gen resistan *chloramphenicol* dan *erythromycin* serta mendapatkan *host* yang memiliki kompatibilitas dengan vektor.

Studi keragaman genetik yang dilakukan pada penelitian dibatasi sebagai penelitian awal dalam proses pengembangan konstruksi vektor yang memiliki kemampuan resistansi terhadap *chloramphenicol* dan *erythromycin*. Studi keragaman genetik diharapkan dapat memberikan informasi mengenai kandidat isolat potensial yang resistan terhadap *chloramphenicol* dan *erythromycin* serta dapat digunakan sebagai acuan untuk mendeteksi gen resistan untuk pengembangan vektor. Oleh karena itu, penelitian bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik bakteri asam laktat yang resistan terhadap *chloramphenicol* dan *erythromycin*. Hipotesis penelitian adalah terdapat keragaman genetik di antara isolat bakteri asam laktat indogenos Indonesia yang resistan terhadap *chloramphenicol* dan *erythromycin*.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri asam laktat

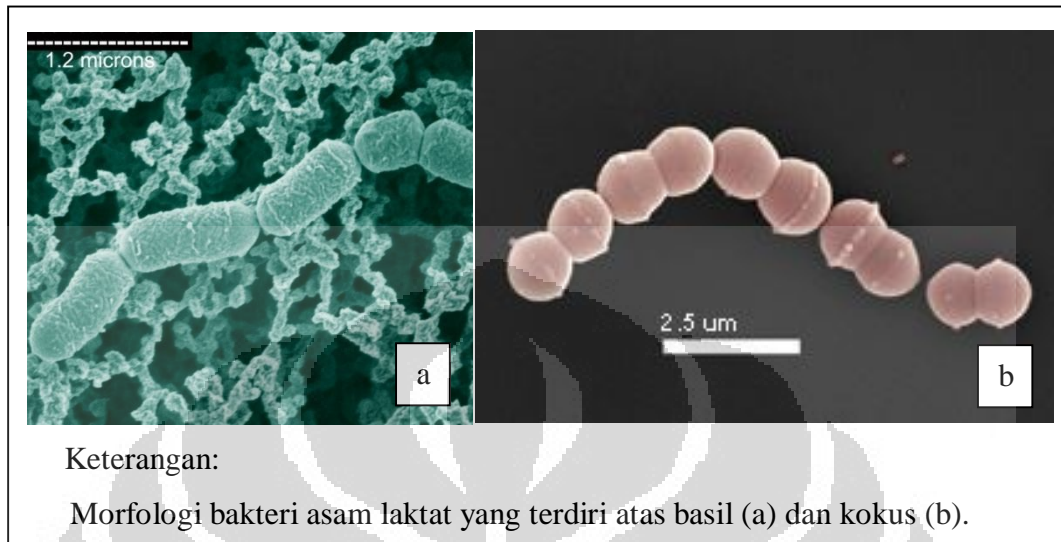
2.1.1 Karakteristik bakteri asam laktat

Bakteri asam laktat merupakan bakteri Gram positif yang memiliki ciri-ciri nonmotil, berbentuk basil atau kokus, tidak berspora, bersifat anaerob *aerotolerant* dan menghasilkan asam laktat sebagai produk utama dari hasil metabolisme fermentatif (Axelsson 2004: 1; Brock & Madigan 1991: 771—772). Bakteri asam laktat membutuhkan asam amino dan vitamin B untuk dapat tumbuh. Beberapa bakteri asam laktat dapat hidup pada suhu 5°C—45°C. Kebanyakan bakteri asam laktat tumbuh pada lingkungan dengan pH 4,0—4,5 (Jay *dkk.* 2005: 153).

Bakteri asam laktat diklasifikasikan berdasarkan pada morfologi, tipe fermentasi glukosa, suhu pertumbuhan, produksi asam laktat, kemampuan hidup pada konsentrasi garam tinggi, asam, atau alkalin (Axelsson 2004: 1). Bakteri asam laktat terdiri atas tiga belas genus, yaitu *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, dan *Weissella* (Jay *dkk.* 2005: 150—153).

Bakteri asam laktat terbagi atas dua kelompok berdasarkan produk akhir dari metabolisme glukosa. Kelompok *homofermentative* atau *homolactic* memproduksi asam laktat sebagai produk utama dari fermentasi glukosa. Bakteri asam laktat yang termasuk ke dalam kelompok *homofermentative* adalah *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, dan *Lactococcus*. Kelompok *heterofermentative* atau *heterolactic* memproduksi asam laktat, karbon dioksida, dan etanol dalam jumlah yang relatif sama. Kelompok *heterofermentative* atau *heterolactic* lebih berperan penting dalam memproduksi rasa dan aroma dibandingkan dengan *homolactic*. Bakteri asam laktat yang termasuk ke dalam kelompok *heterofermentative* adalah *Leuconostoc* dan

Lactobacillus (Jay dkk. 2005: 150—153; Madigan dkk. 2000: 504). Morfologi bakteri asam laktat dapat diamati pada gambar 2.1.1.



Gambar 2.1.1. Morfologi bakteri asam laktat
[Sumber: Brehm-Stecher & Johnson 2003: 1; Hutkins 2011: 1.]

2.1.2 Bakteri asam laktat indigenos Indonesia

Bakteri asam laktat dapat ditemukan pada berbagai produk makanan hasil fermentasi. Indonesia memiliki berbagai macam produk makanan fermentasi yang telah lama dikonsumsi oleh masyarakat. Kebanyakan makanan fermentasi tersebut diproduksi secara spontan tanpa penambahan *starter* mikroorganisme (Rahayu 2003: 75).

Berbagai produk makanan hasil fermentasi tradisional Indonesia terdiri atas dadih, tape ketan, dan bekasam. Salah satu makanan fermentasi tradisional dari Sumatera Barat adalah dadih. Dadih merupakan produk susu kerbau fermentasi dan disimpan dalam tabung-tabung bambu. Fermentasi dadih terjadi secara spontan selama dua sampai tiga hari pada suhu ruang (Ibrahim 2008: 2; Usman 2003: 163). Bakteri asam laktat yang memengaruhi fermentasi dadih antara lain *Lactobacillus brevis*, *L. casei* subsp. *casei*, *L. casei* subsp. *rhamnosus*, *L. plantarum*, *Streptococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*, *Leuconostoc*

mesentroides, dan *Lactococcus casei* subsp. *diacetylactis* (Usman 2003: 163; Surono *dkk.* 2008: 502).

Tape ketan merupakan makanan fermentasi yang berasal dari beras ketan yang dikukus dan diinokulasikan dengan ragi tape. Fermentasi tape ketan berlangsung selama satu sampai dua hari (Rahayu 2003: 77). Bakteri asam laktat yang ditemukan pada tape adalah *Lactobacillus plantarum* (Rahayu 2003: 80), *Pediococcus*, *Weissella*, dan *Enterococcus* (Sujaya *dkk.* 2010: 239). Bakteri asam laktat yang ditemukan pada ragi tape adalah *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum* (Rahayu 2003: 80), *Weissella* spp., *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus* spp., dan *Enterococcus* spp. (Sujaya *dkk.* 2010: 239).

Bekasam merupakan produk makanan hasil fermentasi yang dapat terbuat dari daging sapi, domba, ikan, atau udang. Bekasam dapat ditemukan pada berbagai desa di Kabupaten Way Kanan, Propinsi Lampung (Mustopa *dkk.* 2010: 679—680). Bakteri asam laktat yang memengaruhi proses pembuatan bekasam antara lain *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, dan *Pediococcus acidilactici* (Yahya *dkk.* 1997: 116). Bakteri asam laktat yang diisolasi dari berbagai produk pangan fermentasi Indonesia, secara umum didominasi oleh *L. plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, dan *Pediococcus pentosaceus* (Rahayu 2003: 83).

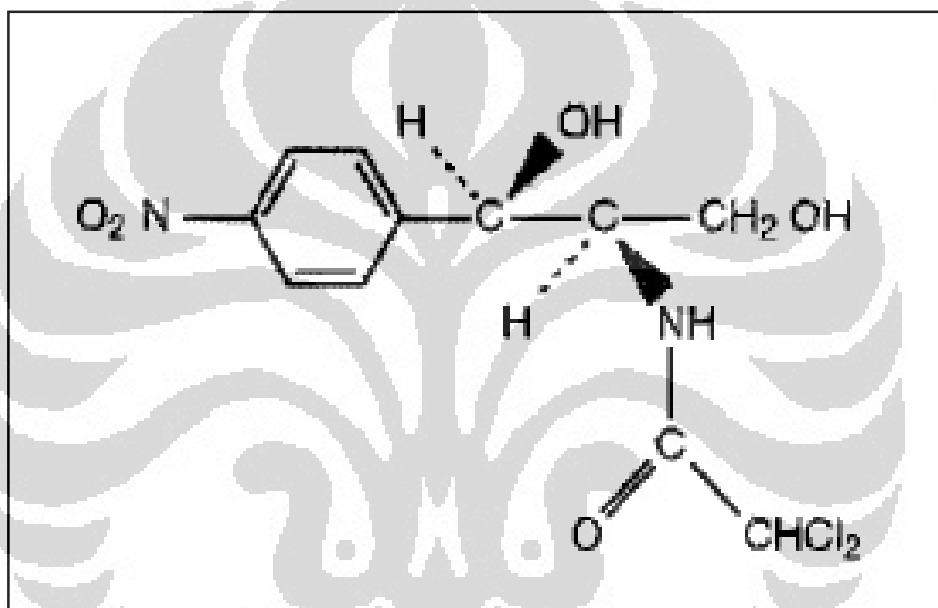
2.2 *Chloramphenicol*

2.2.1 Karakteristik *chloramphenicol*

Salah satu antibiotik yang dihasilkan oleh mikroorganisme adalah *chloramphenicol*. *Chloramphenicol* mulai diperkenalkan pertama kali sejak tahun 1947 dan merupakan antibiotik yang pertama kali diisolasi dari kultur *Streptomyces venezuelae* (Botsoglou & Fletouris 2001: 38; Guilfoile 2007: 20). *Chloramphenicol* diklasifikasikan sebagai antibiotik aromatik turunan *benzene* (Brock & Madigan 1991: 361). Fungsi *chloramphenicol* adalah menghambat sintesis protein inang, tetapi tidak memengaruhi proses replikasi plasmid (Sambrook & Russell 2001a: 1.143). Mekanisme kerja *chloramphenicol* adalah

menghambat biosintesis protein dengan target *peptidyl transferase* pada subunit ribosomal 50S (Long & Porse 2003: 7208).

Chloramphenicol telah menjadi obat penting yang banyak digunakan dalam bidang kesehatan karena sangat spesifik terhadap bakteri (Long & Porse 2003: 7208). Pemberian *Chloramphenicol* untuk pengobatan hewan ternak, seperti sapi, kambing, domba, babi, dan ikan dapat dilakukan secara oral, intramuskular, dan intravena dengan dosis 2—4 mg/kg (Botsoglou & Fletouris 2001: 38). Struktur *chloramphenicol* dapat diamati pada gambar 2.2.1.



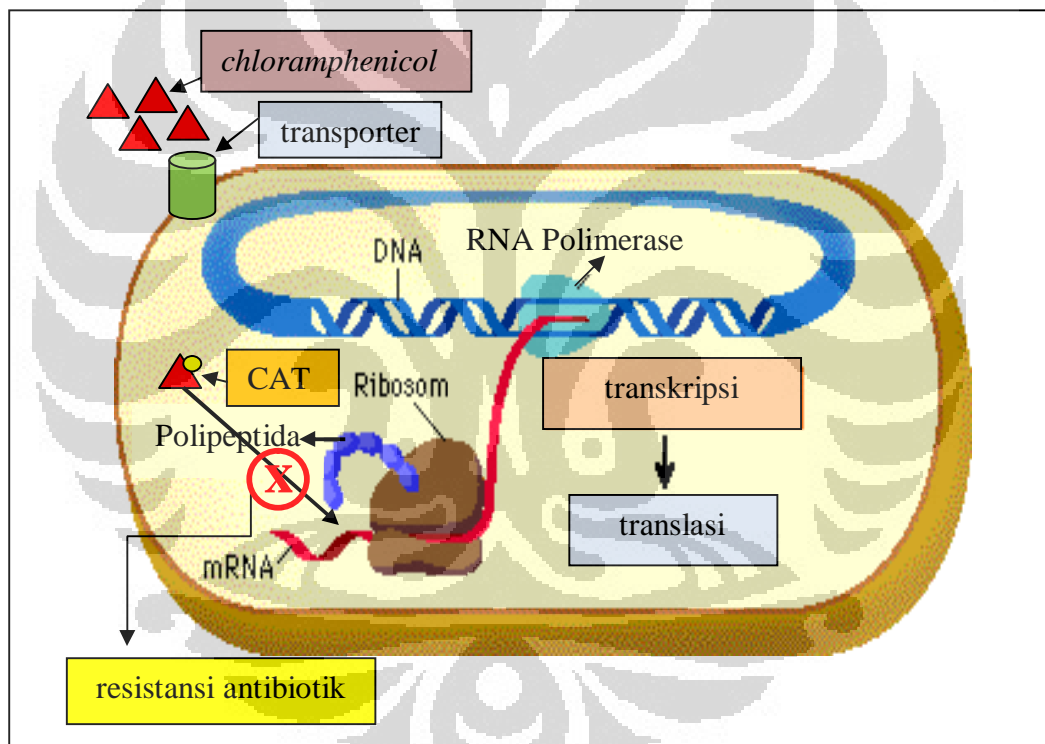
Gambar 2.2.1. Struktur *chloramphenicol*
[Sumber: Sambrook & Russell 2001a: 1.143.]

2.2.2 Mekanisme resistansi bakteri terhadap *chloramphenicol*

Mekanisme resistansi bakteri terhadap *chloramphenicol* berupa proses modifikasi antibiotik. Perkembangan mekanisme resistansi terhadap *chloramphenicol* telah terjadi sejak tahun 1959 (Guilfoile 2007: 20). Resistansi terhadap *chloramphenicol* dapat terjadi akibat beberapa faktor. Faktor pertama yang memengaruhi resistansi terhadap *chloramphenicol* dipengaruhi oleh adanya enzim *chloramphenicol acetyltransferase* (CAT). *Chloramphenicol acetyltransferase* (CAT) merupakan efektor yang akan mengkatalisis *acetyl-CoA*

untuk mengalami proses asetilasi sehingga dapat menginaktivasi antibiotik (Shaw *dkk.* 1985: 101).

Faktor kedua yang memengaruhi resistansi terhadap *chloramphenicol* adalah mekanisme penembusan *chloramphenicol* lewat membran khusus yang berasosiasi dengan transporter. Faktor ketiga yang memengaruhi resistansi terhadap *chloramphenicol* adalah mutasi yang akan mengurangi ekspresi protein membran bagian luar, mutasi pada gen 23S rRNA, inaktivasi *chloramphenicol* oleh 3-O-phosphotransferase atau pada modifikasi wilayah target metilasi gen 23S rRNA (Roberts & Schwarz 2009: 183). Mekanisme resistansi bakteri asam laktat terhadap *chloramphenicol* dapat diamati pada gambar 2.2.2.



Gambar 2.2.2. Mekanisme resistansi bakteri asam laktat terhadap *chloramphenicol*

[Sumber: Roberts & Schwarz 2009: 183; Pearson education 2011: 1, telah diolah kembali.]

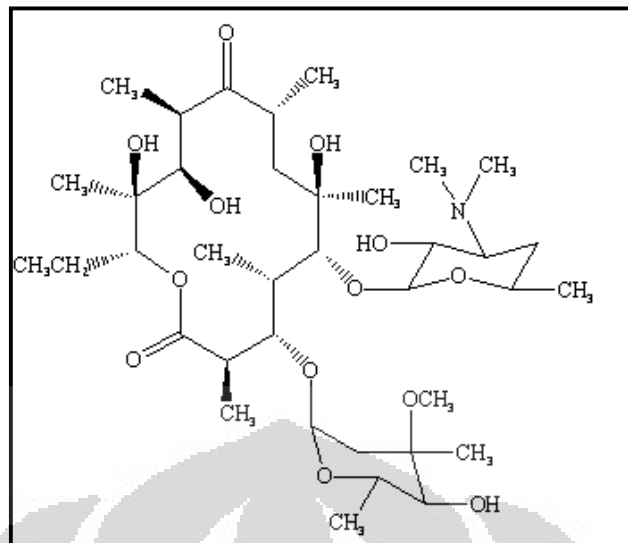
2.2.3 Bakteri asam laktat yang resistan terhadap *chloramphenicol*

Beberapa penelitian telah memelajari bakteri asam laktat yang resistan terhadap *chloramphenicol*. Penelitian Pan *dkk.* (2011: 1319) melaporkan bahwa bakteri asam laktat yang resistan terhadap *chloramphenicol* terdapat pada makanan fermentasi China yang terbuat dari daging babi dan acar sayuran. Bakteri tersebut antara lain *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. mali*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. namurensis*, dan *Enterococcus faecium* (Pan *dkk.* 2011: 1318—1319). Penelitian D' Aimmo *dkk.* (2007: 38) melaporkan bahwa bakteri asam laktat yang resistan terhadap *chloramphenicol*, yaitu *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, dan *Streptococcus thermophilus*. Ammor *dkk.* (2007: 561) juga melaporkan bahwa *L. plantarum*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus lactis*, dan *Streptococcus thermophilus* diketahui memiliki resistansi terhadap *chloramphenicol*.

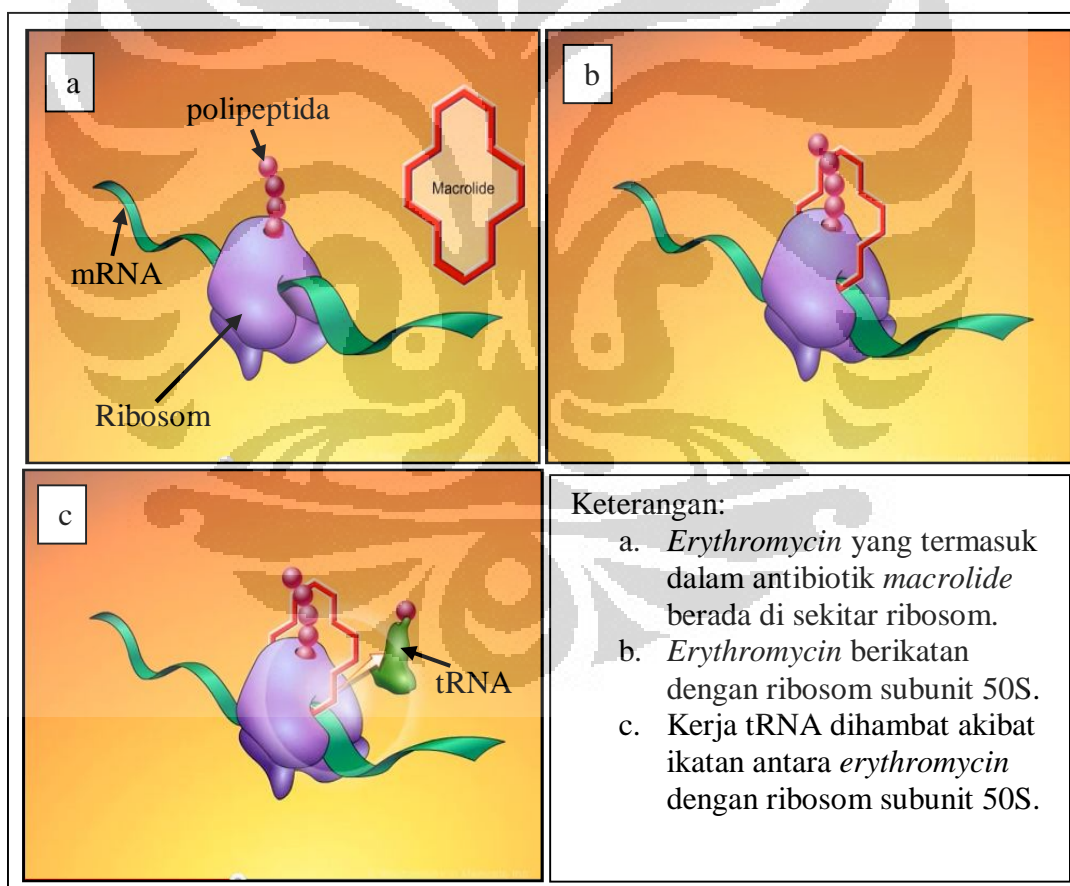
2.3 *Erythromycin*

2.3.1 Karakteristik *erythromycin*

Erythromycin merupakan antibiotik yang termasuk dalam golongan *macrolide* dan telah diperkenalkan sejak tahun 1952 (Guilfoile 2007: 20). Struktur *erythromycin* dapat dilihat pada gambar 2.3.1. Produksi *erythromycin* diketahui berasal dari kultur *Streptomyces erythreus* (Botsoglou & Fletouris 2001: 65). Fungsi *erythromycin* adalah menghambat sintesis protein pada ribosom subunit 50S. Pemanfaatan *erythromycin* yaitu digunakan untuk mengobati beberapa penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Mycoplasma* dan *Staphylococcal* pada berbagai kasus resistansi terhadap penisilin. *Erythromycin* biasa digunakan secara klinis untuk pasien yang alergi terhadap penisilin atau antibiotik (Botsoglou & Fletouris 2001: 65; Madigan *dkk.* 2000: 761). Mekanisme kerja *erythromycin* adalah menghentikan sintesis protein secara prematur sehingga protein fungsional yang diproduksi oleh sel berjumlah sedikit (Guilfoile 2007: 26). Mekanisme kerja *erythromycin* dapat diamati pada gambar 2.3.1.2.

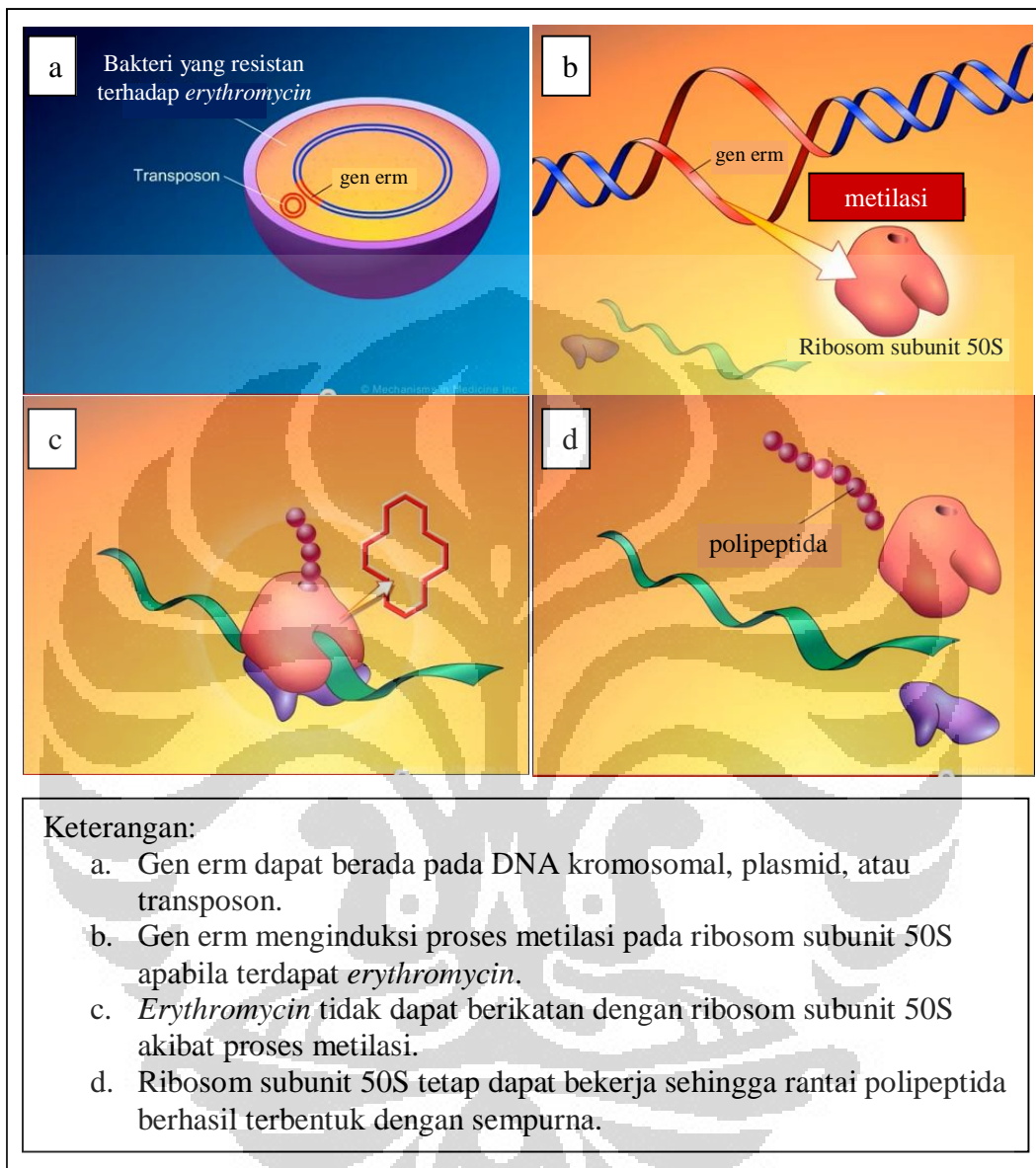


Gambar 2.3.1.1. Struktur *erythromycin*
[Sumber: Heritage 2006: 1.]



Gambar 2.3.1.2. Mekanisme kerja *erythromycin*
[Sumber: Mechanisms in medicine 2011: 2, telah diolah kembali.]

2.3.2 Mekanisme resistansi bakteri terhadap *erythromycin*



Gambar 2.3.2. Mekanisme resistansi bakteri terhadap *erythromycin*
[Sumber: Mechanisms in medicine 2011: 3, telah diolah kembali.]

Mekanisme resistansi terhadap *erythromycin* telah dimulai sejak tahun 1988 (Guilfoile 2007: 20). Mekanisme resistansi terhadap *erythromycin* terdiri atas dua tipe, yaitu ribosomal metilase dan *macrolide efflux pump* (*mef*). Mekanisme ribosomal metilase terjadi akibat pengaruh *erythromycin ribosomal methylase* (*erm*). Bakteri yang resistan terhadap *erythromycin* memiliki gen

resistan yang akan berfungsi setelah penempelan gugus metil (CH₃) pada daerah residu adenin 23S rRNA. Mekanisme penempelan gugus metil (CH₃) pada RNA ribosom akan melindungi sel dari *erythromycin*. Hal tersebut akan mengurangi efisiensi proses sintesis protein. Mekanisme resistansi terhadap *erythromycin* hanya akan terjadi apabila di lingkungan sekitar terdapat *erythromycin* (Babic & Bonomo 2009: 70; Guilfoile 2007: 51). Mekanisme resistansi bakteri asam laktat terhadap *erythromycin* dapat diamati pada gambar 2.3.2.

2.3.3 Bakteri asam laktat yang resistan terhadap *erythromycin*

Beberapa penelitian telah mempelajari bakteri asam laktat yang resistan terhadap *erythromycin*. Penelitian Pan *dkk.* (2011: 1319) melaporkan bahwa bakteri asam laktat yang resistan terhadap *erythromycin* terdapat pada makanan fermentasi China yang terbuat dari daging babi dan acar sayuran. Bakteri tersebut antara lain *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. mali*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. namurensis*, dan *Enterococcus faecium* (Pan *dkk.* 2011: 1318—1319). Penelitian D'Aimmo *dkk.* (2007: 38) melaporkan bahwa bakteri asam laktat yang resistan terhadap *erythromycin* antara lain *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, dan *Streptococcus thermophilus*. Ammor *dkk.* (2007: 561) juga melaporkan bahwa *L. plantarum*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus lactis*, dan *Streptococcus thermophilus* diketahui memiliki resistansi terhadap *erythromycin*.

2.4 Uji resistansi bakteri dengan metode *viable cell count*

Metode *viable cell count* merupakan metode yang digunakan untuk menghitung jumlah sel hidup berupa koloni pada medium. Metode *viable cell count* dilakukan dengan cara menyebar volume suspensi sel pada medium agar dan menghitung jumlah koloni setelah inkubasi dilakukan. Volume suspensi sel yang akan disebar ditentukan berdasarkan serial pengenceran. Serial pengenceran dilakukan untuk mendapatkan jumlah koloni yang sesuai (Hogg 2005: 91—93; Madigan *dkk.* 2000 :142).

Volume suspensi sel yang sudah diencerkan biasanya tidak lebih dari 0,1 ml. Volume suspensi sel tersebut disebar pada seluruh permukaan medium agar. Inkubasi dilakukan hingga koloni mulai terlihat. Volume suspensi sel yang lebih dari 0,1 ml akan menyebabkan cairan suspensi sel tidak dapat menyerap pada medium sehingga jumlah koloni akan sulit dihitung. Koloni yang terdapat pada medium sebaiknya berjumlah antara 30 sampai 300. Jumlah sel hidup dari suatu sampel ditentukan berdasarkan *colony forming unit* (cfu) per volume (Hogg 2005: 91—93; Madigan *dkk.* 2000 :142).

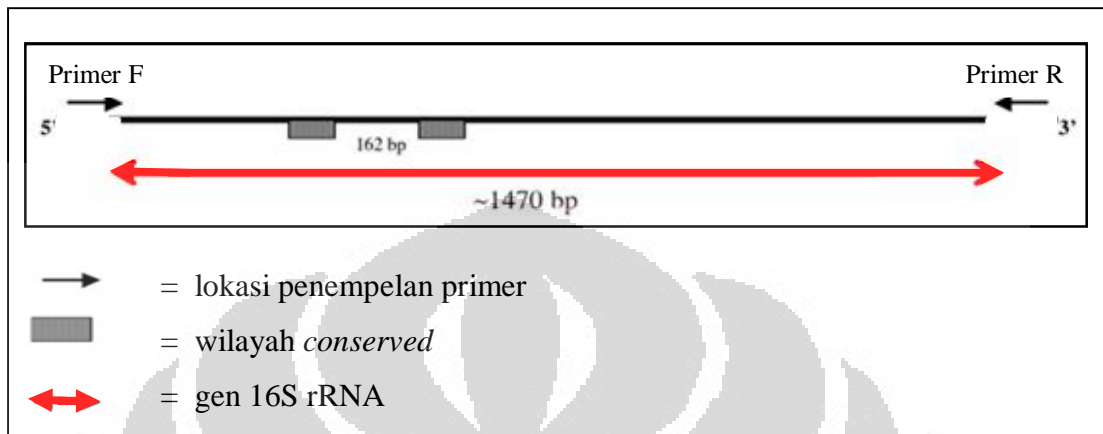
2.5 Keragaman genetik

2.5.1 Gen 16S rRNA

Gen ribosomal RNA memiliki wilayah yang sangat lestari, terdapat di semua bakteri, dan terdapat variasi kecil pada basa sekuen dari satu spesies ke spesies lain. Variasi yang terdapat pada gen 16S rRNA tidak hanya membedakan antarspesies, tetapi juga mengindikasikan derajat perbedaan (*degree of difference*). Penghitungan jumlah basa yang berbeda di antara dua spesies berguna untuk menghitung jarak evolusi yang membatasi antarspesies tersebut. Pohon filogenetik dapat dibuat dengan membandingkan basa sekuen sehingga akan menunjukkan kemungkinan rute spesies yang beragam dan berasal dari nenek moyang yang sama (Dale & Park 2004: 265). Gen 16S rRNA dapat diamati pada gambar 2.5.1.

Beberapa wilayah gen 16S rRNA memiliki sifat lestari yang tinggi. Primer PCR dapat digunakan untuk mengenali sekuen lestari yang memiliki wilayah variasi (*variable region*). Oleh karena itu, primer PCR dapat memperbanyak wilayah yang mengandung perbedaan tersebut (Dale & Park 2004: 265). Salah satu pasangan primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA adalah Primer 8F dan primer 15R. Primer 8F akan mengenali wilayah gen 16S rRNA dengan posisi 8 sampai 27, sedangkan primer 15R akan mengenali wilayah gen 16S rRNA dengan posisi 1541 sampai 1522 (Chao *dkk.* 2008: 136). Produk amplifikasi tersebut kemudian dapat dilanjutkan ke tahapan

DNA *sequencing*. Hasil DNA *sequencing* kemudian dapat dibandingkan dengan sekuen rRNA dari organisme yang telah diketahui identitasnya, sehingga hubungan antarspesies tersebut dapat ditentukan (Dale & Park 2004: 265).



Gambar 2.5.1. Gen 16S rRNA
[Sumber: Rice 2006: 1, telah diolah kembali.]

2.5.2 Analisis filogenetik

Analisis filogenetik dari suatu keluarga berdasarkan sekuen asam nukleat atau protein merupakan penentuan bagaimana suatu keluarga mungkin diturunkan selama proses evolusi. Hubungan evolusi berdasarkan sekuen digambarkan dengan menempatkan sekuen sebagai *outer branches* pada suatu pohon filogenetik. Hubungan percabangan pada bagian dalam pohon menggambarkan derajat perbedaan sekuen yang berhubungan. Dua sekuen yang memiliki banyak kemiripan akan ditempatkan sebagai tetangga di luar percabangan dan akan ditempatkan dalam cabang yang sama di bawahnya. Analisis filogenetik bertujuan untuk menemukan semua hubungan percabangan dari suatu pohon berdasarkan panjang cabang (Mount 2001: 238).

Program yang digunakan untuk menganalisis analisis filogenetik adalah ClustalX. ClustalX merupakan program yang digunakan untuk membuat *multiple sequence alignment* secara cepat dan dapat dipercaya. Program ClustalX digunakan untuk mengidentifikasi pola sekuen dan motif dari protein atau asam

nukleat. Pohon filogenetik dapat dikonstruksi dengan menggunakan ClustalX berdasarkan *multiple sequence alignment* (Aiyar 2000: 221).

Program ClustalX dijalankan dengan empat tahapan utama. Tahap pertama adalah mengumpulkan semua *pairwise alignments* dari semua sekuen. Tahap kedua adalah menghitung nilai *similarity (percent identity) pairwise alignments* dari *unrooted tree* dengan metode *Neighbor Joining*. Jarak panjang cabang pada *unrooted tree* digunakan untuk mengestimasi divergensi dari setiap cabang nodus. Tahap ketiga adalah melakukan konversi dari *unrooted tree* menjadi *rooted tree* berdasarkan metode *mid-point*. Tahap keempat adalah *rooted tree* digunakan untuk membuat *multiple sequence alignment* (Aiyar 2000: 222).

Multiple sequence alignment merupakan prediksi spesifik dari penanda untuk anggota-anggota dari kelompok yang sama atau keluarga dari sekuen yang sama dari suatu organisme yang sama atau berbeda. *Multiple sequence alignment* dari suatu set sekuen berguna untuk memberikan informasi dari kebanyakan wilayah pada set sekuen tersebut. Set sekuen dapat berupa wilayah *conserved* fungsional atau domain struktural (Mount 2001: 142). Dua tujuan dasar dari *multiple sequence alignment* adalah untuk mengidentifikasi motif yang umum pada sekuen seperti wilayah *conserved* dan motif baru pada sekuen sehingga diketahui fungsi biologisnya (Aiyar 2000: 221).

2.5.3 Keragaman genetik bakteri asam laktat

Keragaman genetik bakteri asam laktat dipengaruhi oleh berbagai faktor fisik, kimiawi, dan mekanisme pengaturan secara biologis (Ballongue 2004: 108). Berbagai genus bakteri asam laktat dapat dibedakan berdasarkan pada morfologi sel, komposisi basa nukleotida, dan tipe metabolisme fermentatif. Anggota dari genus *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, dan *Pediococcus* memiliki sedikit perbedaan rasio komposisi basa nukleotida. Hal tersebut menyebabkan variasi di antara galur memiliki sedikit perbedaan. Genus bakteri asam laktat memiliki anggota dengan keragaman genetik komposisi basa nukleotida yang terbesar (Madigan *dkk.* 2000: 504).

2.6 Teknik biologi molekuler

2.6.1 Isolasi genom bakteri asam laktat

Isolasi genom bakteri asam laktat menggunakan metode dari *Molecular Cell Biology Vrije Universiteit Amsterdam* (2002: 1--3). Optimasi protokol isolasi genom dengan metode *Molecular Cell Biology Vrije Universiteit Amsterdam* telah dilakukan oleh para peneliti Laboratorium Bakteriologi dan Virologi Molekuler dengan penambahan CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) dan Lisozim. *Cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) merupakan detergen kationik yang berfungsi untuk presipitasi asam nukleat dan asam polisakarida. *Cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) digunakan untuk purifikasi DNA dari organisme yang memproduksi polisakarida dalam jumlah relatif banyak. *Cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) biasa digunakan untuk prosedur presipitasi dasar untuk DNA genom, DNA plasmid, serta DNA bakteriofag (Sambrook & Russell 2001a: 6.62). Lisozim berfungsi untuk membantu melisis sel bakteri (Sambrook & Russell 2001b: 14.28).

2.6.2 Elektroforesis

Elektroforesis merupakan teknik yang berguna untuk memisahkan molekul-molekul berdasarkan bentuk, muatan, dan berat molekul dalam suatu medan listrik (Elrod & Stansfield 2002: 270). Teknik elektroforesis digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan memurnikan fragmen DNA. Teknik elektroforesis merupakan teknik yang sederhana dan cepat untuk memisahkan fragmen DNA (Sambrook & Russell 2001a: 5.3).

Teknik elektroforesis memanfaatkan muatan listrik yang terdapat pada molekul. Molekul DNA memiliki muatan negatif sehingga apabila dilewatkan pada suatu medium dan dialiri arus listrik maka molekul akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif. Kecepatan gerak molekul dipengaruhi oleh bentuk molekul dan rasio muatan terhadap massa molekul. Molekul DNA berukuran

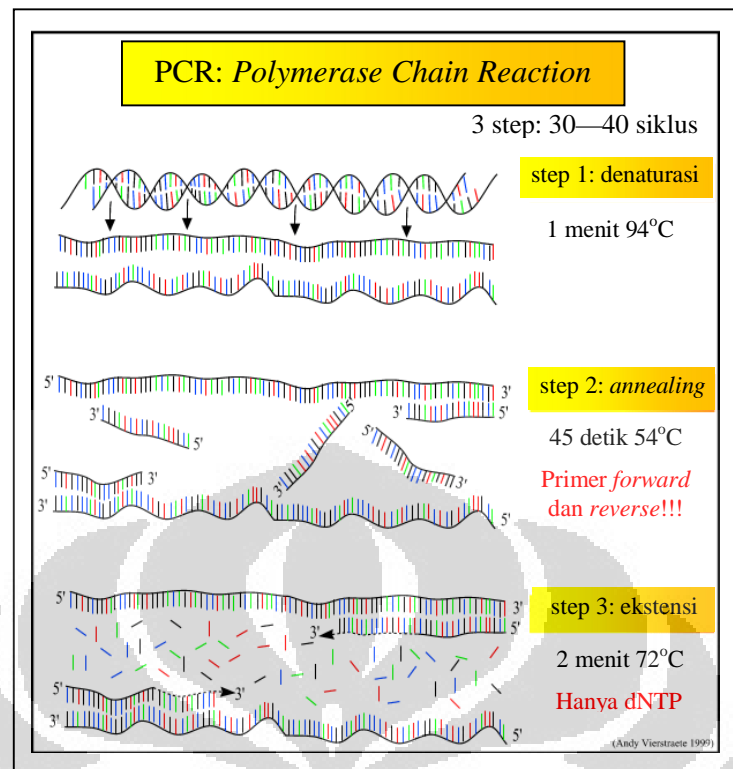
besar akan bermigrasi lebih lambat daripada molekul berukuran kecil. (Sambrook & Russell 2001a: 5.4; Yuwono 2005: 35).

Elektroforesis dilakukan untuk memisahkan fragmen DNA pada gel agarosa atau gel akrilamid (Dale & Park 2004: 62). Gel agarosa merupakan polisakarida yang diekstraksi dari rumput laut (Yuwono 2005: 36). Gel agarosa tersebut kemudian diberikan etidium bromida untuk visualisasi DNA. Etidium bromida akan membuat fragmen DNA dapat terlihat di bawah sinar ultraviolet (Dale & Park 2004: 63).

2.6.3 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu metode enzimatik yang berguna untuk melipatgandakan sekuen nukleotida secara *in vitro*. Teknik PCR banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisis genetik. Komponen utama PCR adalah DNA cetakan, oligonukleotida primer, deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), enzim *Taq* DNA polimerase. Komponen DNA cetakan merupakan fragmen DNA yang akan dilipatgandakan. Oligonukleotida primer merupakan sekuen oligonukleotida pendek (15—25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA (Yuwono 2006: 1--2).

Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP. Enzim DNA polimerase merupakan enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Reaksi PCR dibagi menjadi tiga macam tahapan. Reaksi pelipatgandaan suatu fragmen DNA dimulai dengan melakukan denaturasi DNA cetakan sehingga rantai DNA beruntai ganda terpisah menjadi beruntai tunggal. Denaturasi DNA dilakukan dengan menggunakan panas dengan suhu 95°C selama 1—2 menit. Tahap *annealing* terjadi ketika suhu diturunkan menjadi 55°C sehingga primer akan menempel pada DNA cetakan yang terpisah. Primer akan membentuk jembatan hidrogen pada cetakan sekuen yang komplementer dengan sekuen primer (Yuwono 2006: 2). Tahapan reaksi PCR dijelaskan pada gambar 2.6.3.



Gambar 2.6.3. Tahapan reaksi PCR

[Sumber: Vierstraete 1999: 4, telah diolah kembali.]

2.6.4 DNA sequencing

DNA sequencing merupakan metode yang digunakan untuk menentukan urutan nukleotida DNA (Elrod & Stansfield 2002: 290). Salah satu tujuan biologi molekuler adalah untuk mengerti struktur DNA dan mengetahui bagaimana informasi ditranslasikan di dalam sel. Informasi tersebut dapat diketahui apabila basa sekuen dapat ditentukan. Metode DNA sequencing secara kimiawi dikembangkan oleh Allan Maxam dan Walter Gilbert. Metode DNA sequencing secara terminasi dikembangkan oleh Fredrick Sanger (Lodge *dkk.* 2007:174). Fred Sanger pada tahun 1977 mengembangkan prosedur terminasi rantai enzimatis yang memungkinkan pertama kali sekuen untai DNA dapat diuraikan (Dale & Park 2004: 279--281).

Metode DNA sequencing yang dikembangkan oleh Sanger dalam sintesis DNA menggunakan DNA polimerase dan 2',3'-*dideoxynucleotides*. Kekurangan jumlah gugus 3'OH akan menyebabkan sintesis DNA menjadi berhenti. Sintesis DNA untai baru akan diinisiasi oleh primer yang akan menghibridisasi posisi 3'

pada wilayah yang akan dilakukan tahapan DNA *sequencing* (Dale & Park 2004: 281).

Automated DNA Sequencing merupakan suatu teknik menggunakan metode terminasi rantai *dideoxy* dengan reaksi enzimatik dalam suatu pelarut air pada suhu tertentu. Metode *automated DNA sequencing* menggunakan molekul DNA yang telah dilabel dengan pewarna *fluorescent*. Sinyal *fluorescent* akan teramplifikasi dan terdeteksi sehingga setiap basa akan teridentifikasi berdasarkan warna yang dipengaruhi oleh emisi panjang gelombang yang berbeda. Hasil identifikasi setiap basa dapat diamati sesuai dengan bentuk puncak *fluorescent* dan jarak antara puncak tersebut (Sambrook & Russell 2001b: 12.94).

2.6.5 Analisis hasil *sequencing*

Hasil *sequencing* berupa elektroferogram dan urutan basa nukleotida dianalisis dengan menggunakan program DNA *Baser* dan BioEdit. BioEdit merupakan program yang digunakan untuk mengedit dan menganalisis *sequence alignment*. BioEdit dirancang untuk mengatasi permasalahan yang berhubungan dengan waktu yang relatif lama dan kesulitan peneliti dalam menganalisis sekuen (Hall 2007: 1).

Hasil *sequencing* berupa urutan basa nukleotida kemudian dianalisis dengan menggunakan program BLAST. Program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) merupakan program yang berguna untuk mencari kesamaan (*similarity*) antara sekuen DNA atau protein yang ingin diketahui dengan database sekuen lain yang terdapat pada GenBank (Bedell *dkk.* 2003:1).

Program BLAST sangat baik digunakan untuk mengidentifikasi sekuen yang tidak diketahui. Program BLAST juga bekerja sangat cepat, dapat dipercaya, dan fleksibel karena dapat diadaptasikan pada berbagai analisis sekuen. Program BLAST merupakan program yang berasal dari *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) dan mulai banyak dikembangkan pada berbagai institusi, baik institusi pendidikan maupun komersial (Bedell *dkk.* 2003: 21).

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi dan Virologi Molekuler Puslit Bioteknologi LIPI. Penelitian berlangsung selama tujuh bulan, terhitung sejak Mei hingga November 2011.

3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain:

3.2.1 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian berjumlah 187 isolat. Sampel merupakan isolat bakteri asam laktat yang berasal dari bekasam (fermentasi daging sapi dan domba), dadih (fermentasi susu kerbau), kotoran luwak, tape ketan, dan fermentasi biji kakao. Sampel merupakan koleksi isolat bakteri asam laktat yang dimiliki oleh Laboratorium Bakteriologi dan Virologi Puslit Bioteknologi LIPI-Cibinong.

3.2.2 Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian antara lain agar *bacteriological* [Oxoid], agarosa [Invitrogen], *chloramphenicol* [Gold Biotechnology], *chloroform* [Merck], *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) [Sigma], *DNA Ladder* 1 kb [Bionexus], ddH₂O [ApliChem], dNTP [Kapa Biosystems], EDTA [Bio Rad], *erythromycin* [Sigma], es, etanol [Merck], etidium bromida [PlusOne Amersham Biosciences], *isoamil-alcohol* [Merck], isopropanol [Merck], lisozim [Sigma], *loading buffer* [Takara], M17 [Oxoid], MgCl₂ [Invitrogen], MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) [Oxoid], NaOH [Merck],

PCR *buffer* [Invitrogen], pH 4, 7, 10 [Eutech], *phenol* [Sigma], *purification kit* [Promega], *RNAse* [Qiagen], *saccharose* [Merck], *sodium azide* [Merck], *sodium chloride* [Bio Basic], *sodium dodecyl sulfate* [Qbiogene], enzim *Taq DNA Polymerase* [Invitrogen], *TBE buffer*, *tissue*, *Tris-Base* [QBiogene], *Tris-HCl* [Bio Basic].

3.2.3 Primer

Tabel 3.2.3. Primer yang digunakan untuk identifikasi spesies 16S rRNA

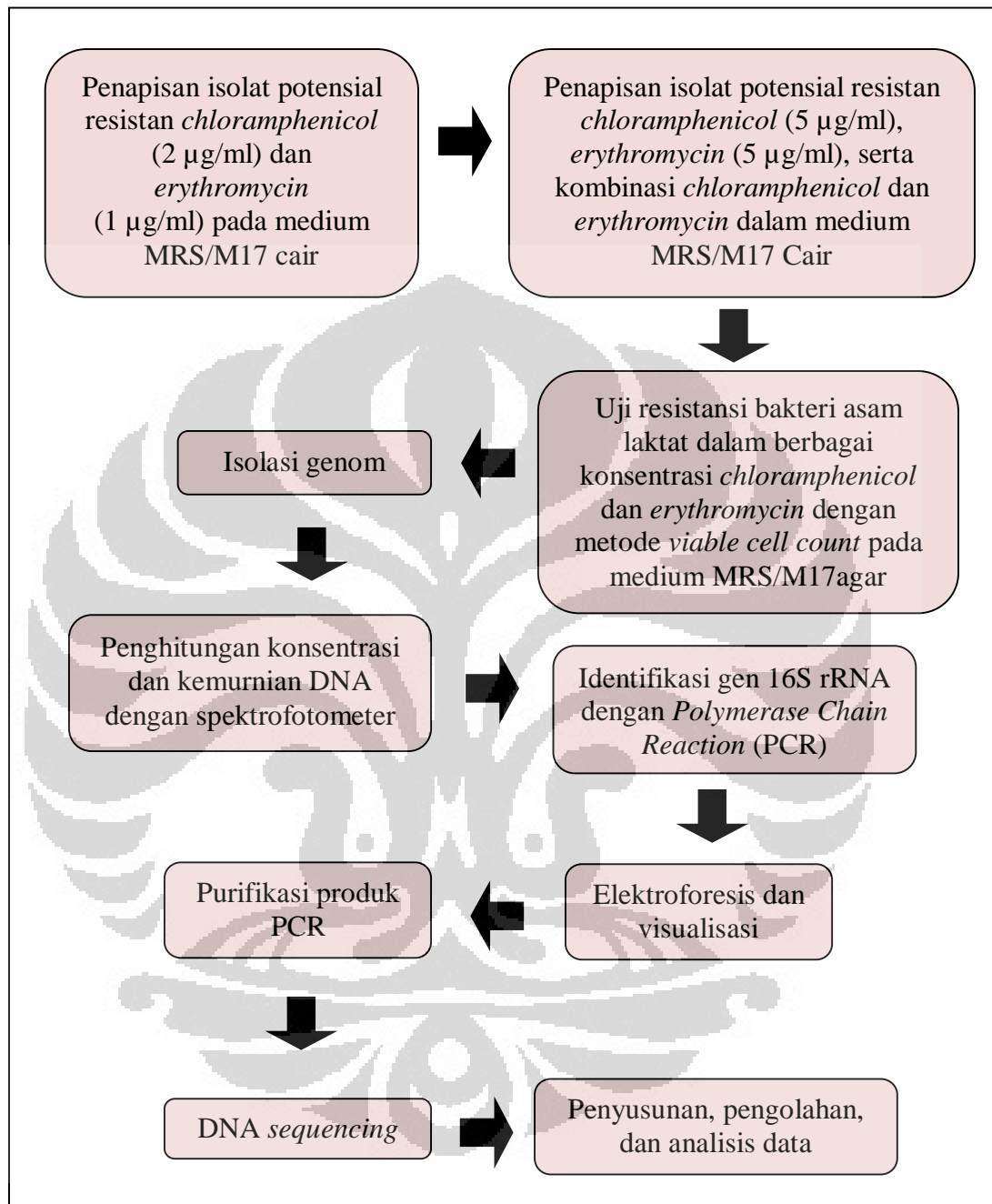
Primer	Sekuen
F1	5' AGAGTTTGATCCTGGCTXAX 3'
R1	5' AAGGAGGTGATCCAXCX 3'

[Sumber: Mustopa *dkk.* 2011: 673.]

3.3 Peralatan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian antara lain *laminar air flow* [Esco], mikropipet 10 μ l, 20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l, 5000 μ l [Pipetman], *tips* 10 μ l [Axygen], *tips* 200 μ l [Biologix], 1 ml [Thermo Scientific], *tube* [Eppendorf], *sentrifuge* [Hermle], *bunsen*, *incubator* [N-Biotek], lemari asam, *ice box*, apparatus *electrophoresis* [Mupid-eXu], *magnetic stirrer*, *hot plate stirrer*, kuvet [Amersham Biosciences], tabung [Schott Duran], tabung reaksi [Pyrex Iwaki], timbangan digital [Acis AD-300H], kamera digital [Samsung], UV *transsiluminator* [Scope WD], parafilm [Pechiney], PCR *thermal cycler* [Applied Biosystems 2720], timbangan [Min OU Brand JPT-1], erlenmeyer [Pyrex-Iwaki], sarung tangan [Sensi], Autoklaf [All American Model 25X-2], *Tissue* [Giant], *timer*, spektrofotometer *genequant* [Amersham Biosciences], mesin DNA *Sequencer* [ABI Prism 3730]

3.4 Cara kerja



Gambar 3.4. Skema kerja penelitian

3.4.1 Pembuatan larutan, *buffer*, dan medium

Cara pembuatan larutan, *buffer*, serta medium yang digunakan dapat dilihat pada lampiran 1.

3.4.2 Penapisan isolat potensial resistan *chloramphenicol* (2 µg/ml) dan *erythromycin* (1 µg/ml) dalam medium MRS/M17 cair

Penapisan isolat potensial resistan *chloramphenicol* dan *erythromycin* dilakukan berdasarkan metode Eguchi *dkk.* (2000: 751). Isolat bakteri asam laktat diinokulasikan pada medium MRS/M17 cair (de Man, Rogosa, Sharpe) yang masing-masing mengandung *chloramphenicol* (2 µg/ml) dan *erythromycin* (1 µg/ml). Isolat bakteri asam laktat kemudian diinkubasi selama 24 jam. Pertumbuhan sel berwarna putih di dasar tabung reaksi dan perubahan warna media MRS/M17 diketahui menjadi indikator positif dari pertumbuhan bakteri asam laktat.

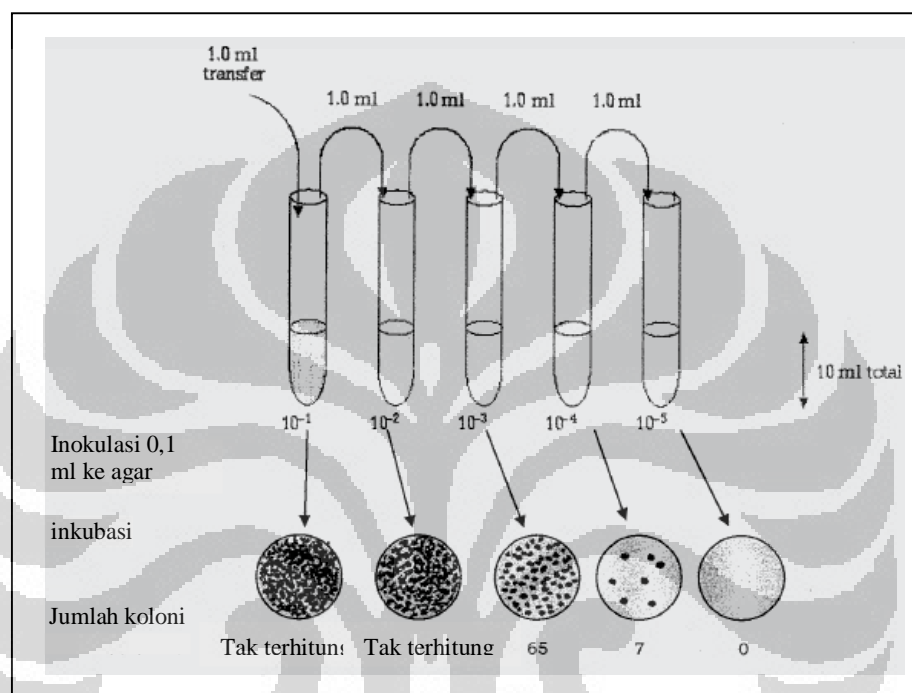
3.4.3 Penapisan isolat potensial resistan *chloramphenicol* (5 µg/ml), *erythromycin* (5 µg/ml), serta kombinasi *chloramphenicol* dan *erythromycin* dalam medium MRS/M17 cair

Isolat yang resistan terhadap *chloramphenicol* (2 µg/ml) dan *erythromycin* (1 µg/ml), kemudian diinokulasikan pada *chloramphenicol* (5 µg/ml), *erythromycin* (5 µg/ml), serta kombinasi *chloramphenicol* dan *erythromycin* dalam medium MRS/M17 cair. Isolat bakteri asam laktat kemudian diinkubasi selama 24 jam. Pertumbuhan sel berwarna putih di dasar tabung reaksi dan perubahan warna media MRS diketahui menjadi indikator positif dari pertumbuhan bakteri asam laktat.

3.4.4 Uji resistansi bakteri asam laktat dalam berbagai konsentrasi *chloramphenicol* dan *erythromycin* dengan metode *viable cell count* pada medium MRS/M17 Agar

Uji resistansi bakteri asam laktat dengan teknik *viable cell count* dilakukan berdasarkan modifikasi metode Miles *dkk.* (1938: 732). Isolat bakteri asam laktat ditumbuhkan dalam medium MRS cair (de Man, Rogosa, Sharpe) selama 24 jam. Medium MRS padat dibuat dengan rasio pengenceran 1:10. Isolat bakteri asam

laktat diencerkan hingga pengenceran 10^{-8} . Isolat yang telah diencerkan kemudian disebar pada medium MRS padat dan diinkubasi selama 48 jam. Pengamatan pertumbuhan bakteri asam laktat dilakukan dengan menghitung jumlah koloni berdasarkan satuan cfu/ml. Rumus penghitungan jumlah bakteri asam laktat dapat dilihat pada gambar 3.4.4.2.



Gambar 3.4.4.1 Metode *viable cell count*
[Sumber: Hogg 2005: 93.]

$$\text{cfu/ml} = \frac{\text{Jumlah koloni terhitung}}{\text{Faktor pengenceran} \times \text{volume inokulasi}}$$

Gambar 3.4.4.2 Rumus penghitungan jumlah bakteri asam laktat
[Sumber: Madigan *dkk.* 2000: 143.]

3.4.5 Isolasi genom

Isolasi genom dilakukan dengan memilih genom bakteri asam laktat yang memiliki resistansi terhadap *chloramphenicol* dan *erythromycin*. Isolasi genom

bakteri asam laktat *minipreparation* dilakukan berdasarkan metode dari *Molecular Cell Biology Vrije Universiteit Amsterdam* (2002: 1—3) dengan modifikasi penambahan CTAB dan lizozim. Optimasi protokol isolasi genom dengan metode tersebut telah dilakukan oleh para peneliti Laboratorium Bakteriologi dan Virologi Molekuler Puslit Bioteknologi LIPI. Bakteri asam laktat diinokulasikan pada media MRS dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Medium yang mengandung sel bakteri sebanyak 1 ml kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Larutan TE sebanyak 500 µl ditambahkan pada pelet yang mengandung sel bakteri. Lizozim 60 mg/ml ditambahkan sebanyak 40 µl dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam. Larutan 10% SDS sebanyak 200 µl, NaCl 5 M sebanyak 100 µl, dan CTAB 10% sebanyak 80 µl kemudian ditambahkan.

Semua larutan kemudian diinkubasi pada suhu 68°C selama 30 menit dengan dilakukan *inverting* setiap 10 menit sekali. Kloroform kemudian ditambahkan sebanyak 1x volume. Sentrifugasi kemudian dilakukan dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipindahkan sebanyak 450 µl pada tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml yang baru. Larutan etanol 96% kemudian ditambahkan sebanyak 2x volume. Sentrifugasi kemudian dilakukan kembali selama 5 menit dengan kecepatan 13.000 rpm.

Supernatan kemudian dibuang dan larutan etanol 70% sebanyak 100 µl ditambahkan pada pelet. Setelah tahap sentrifugasi dilakukan kembali, supernatan dibuang dan dilakukan penguapan etanol. Pelet kemudian diberikan 30 µl larutan antara ddH₂O dengan kandungan 0,1 mg/ml RNAse setelah penguapan selesai dilakukan.

3.4.6 Penghitungan konsentrasi dan kemurnian DNA dengan spektrofotometer

Penghitungan konsentrasi dan kemurnian DNA dengan spektrofotometer dilakukan berdasarkan metode Sambrook & Russell (2001a: 6.11). Kemurnian DNA diukur dengan alat spektrofotometer *genequant*. *Blanko* pertama kali diukur pada alat spektrofotometer. *Blanko* berupa akuabides steril dipipet sebanyak 6 µl. Kemurnian blanko harus menunjukkan nilai 0. Kemurnian DNA setiap sampel

hasil isolasi genom isolat bakteri asam laktat kemudian diukur dan dicatat. Penghitungan konsentrasi DNA dapat diamati pada gambar 3.4.6.

$$\text{Konsentrasi DNA untai ganda } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{faktor pengencer} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

Gambar 3.4.6. Penghitungan konsentrasi DNA untai ganda
[Sumber: Muladno 2010: 19.]

3.4.7 Identifikasi gen 16S rRNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Larutan *reaction mixture* dengan volume total sebesar 50 μl dibuat berdasarkan komposisi pada tabel 3.4.7. Semua larutan *reaction mixture* kemudian dimasukkan ke dalam mesin *thermal cycler* PCR. Mesin *thermal cycler* PCR diatur berdasarkan suhu dan waktu yang telah dioptimasi dengan kondisi predenaturasi 96°C selama 5 menit, denaturasi 96°C selama 1 menit, *annealing* 55°C selama 1 menit, polimerisasi 72°C selama 3 menit, dan polimerisasi akhir 72°C selama 3 menit.

Tabel 3.4.7. Komposisi *reaction mixture* PCR

Komposisi	Jumlah Volume
ddH ₂ O	38 μl
10x PCR <i>buffer</i>	5 μl
50 mM MgCl ₂	1,5 μl
10 mM dNTP	1 μl
primer F ₁	0,5 μl
primer R ₁	0,5 μl
5 U/ μl <i>Taq Polymerase</i>	0,5 μl
DNA <i>template</i>	3 μl
Total	50 μl

[Sumber: Laboratorium Bakteriologi dan Virologi Molekular, Puslit Bioteknologi LIPI, 2011.]

3.4.8 Elektroforesis dan visualisasi

Teknik elektroforesis gel agarosa dilakukan berdasarkan metode Sambrook & Russell (2001a: 5.10—5.13). Sampel hasil identifikasi gen 16S rRNA dengan PCR kemudian dipipet sebanyak 5 μ l dan dicampurkan dengan *loading buffer*. Campuran sampel dengan *loading buffer* kemudian dimasukkan satu per satu ke dalam sumur pada gel agarosa 1%. *Running* elektroforesis kemudian dilakukan dengan tegangan 100 V dalam waktu 30 menit. Gel kemudian divisualisasikan dengan etidium bromida. Visualisasi hasil isolasi DNA genom dilakukan dengan menggunakan UV *transilluminator* dan didokumentasikan dengan kamera digital.

3.4.9 Purifikasi produk PCR

Proses purifikasi produk PCR dilakukan dengan mengikuti metode dari Promega (2010: 6). Produk PCR sebanyak 45 μ l ditambahkan dengan *membrane binding solution* sebanyak tiga kali volume (135 μ l). Produk PCR tersebut kemudian dipindahkan ke dalam *minicolumn* dan *collection tube* sebanyak 180 μ l. Sampel kemudian disentrifugasi selama 13.000 rpm selama 1 menit. Hasil penyaringan kemudian dibuang. Sampel kemudian ditambahkan dengan *membrane wash solution* sebanyak 700 μ l.

Sampel disentrifugasi selama 13.000 rpm selama 1 menit. Hasil penyaringan kemudian dibuang. Sampel kemudian ditambahkan dengan *membrane wash solution* sebanyak 500 μ l. Sampel disentrifugasi selama 13.000 rpm selama 2 menit. Tabung *minicolumn* dipindahkan ke tabung minisentrifugasi dan ditambahkan ddH₂O. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit. DNA kemudian diinkubasi pada suhu -20°C.

3.4.10 DNA sequencing

Tahapan DNA *sequencing* dilakukan oleh perusahaan yang menyediakan jasa tersebut. *Sequencing* dilakukan dengan menggunakan sampel produk PCR yang telah dipurifikasi. Sampel dikirim ke perusahaan penyedia jasa DNA *sequencing*.

3.4.11 Penyusunan, pengolahan, & analisis data

Hasil *sequencing* berupa elektroferogram akan diedit dengan menggunakan program DNA *Baser* dan BioEdit. Urutan sekuen basa nukleotida hasil sekuensing kemudian dianalisis dengan program BLAST dengan alamat *website* <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Identifikasi spesies dianalisis berdasarkan persentase homologi dan *similarity* sekuen bakteri asam laktat yang memiliki gen resistan *chloramphenicol* dan *erythromycin*. Persentase homologi dan *similarity* sekuen tertinggi akan menentukan hasil identifikasi spesies.

Sekuen nukleotida hasil DNA *sequencing* kemudian dikumpulkan dalam *notepad*. Kumpulan sekuen nukleotida kemudian dianalisis dengan menggunakan *software* ClustalX 2.0.11. Pohon filogenetik kemudian dibuat dengan menggunakan program NJ Plot.

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Hasil penapisan isolat potensial resistan *chloramphenicol* (2 µg/ml) dan *erythromycin* (1 µg/ml) dalam medium MRS/M17 cair

Penapisan isolat bakteri asam laktat dilakukan untuk mengetahui kandidat isolat potensial yang resistan terhadap masing-masing antibiotik *chloramphenicol* dan *erythromycin*. Isolat tersebut berasal dari dadih, bekasam, tape, kotoran luwak, dan fermentasi biji kakao. Penapisan isolat potensial tahap pertama dilakukan pada masing-masing antibiotik *chloramphenicol* (2 µg/ml) serta *erythromycin* (1 µg/ml). Data isolat potensial yang resistan terhadap *chloramphenicol* dan *erythromycin* dapat dilihat pada lampiran 2.

Tabel 4.1.1. Hasil penapisan isolat potensial resistan *chloramphenicol* dan *erythromycin*

No	Sumber	Total koleksi isolat	Isolat potensial resistan <i>chloramphenicol</i> (2 µg/ml)		Isolat potensial resistan <i>erythromycin</i> (1 µg/ml)	
			Jumlah	%	Jumlah	%
1	Dadiah (fermentasi susu kerbau)	65	30	16,04	2	1,07
2	Bekasam (fermentasi daging)	35	14	7,49	3	1,60
3	Tape ketan	19	5	2,67	9	4,81
4	Kotoran luwak	61	6	3,21	3	1,60
5	Fermentasi biji kakao	7	4	2,14	1	0,53
6	Total	187	59	31,55	18	9,63

Jumlah isolat bakteri asam laktat paling banyak berasal dari dadiah yaitu 65 dari total 187 isolat. Hasil penapisan resistansi *chloramphenicol* menunjukkan bahwa 59 isolat bakteri asam laktat diketahui memiliki sifat resistansi terhadap *chloramphenicol* (Tabel 4.1.1). Persentase bakteri asam laktat yang resistan

terhadap *chloramphenicol* paling tinggi berasal dari dadih, yaitu 16,04%. Hasil penapisan resistansi *erythromycin* menunjukkan bahwa 18 isolat bakteri asam laktat diketahui memiliki sifat resistansi terhadap *erythromycin* (Tabel 4.1.1). Persentase bakteri asam laktat yang resistan terhadap *erythromycin* paling tinggi berasal dari tape, yaitu sebesar 4,81%.

4.1.2 Hasil penapisan isolat potensial resistan *chloramphenicol* (5 µg/ml), *erythromycin* (5 µg/ml), serta kombinasi *chloramphenicol* dan *erythromycin* dalam medium MRS/M17 cair

Kandidat isolat potensial yang resistan terhadap masing-masing antibiotik, yaitu *chloramphenicol* (2 µg/ml) dan *erythromycin* (1 µg/ml) kemudian dilakukan penapisan tahap kedua. Penapisan tahap kedua bertujuan untuk mengetahui kandidat isolat potensial yang tahan terhadap masing-masing antibiotik *chloramphenicol* dan *erythromycin*. Penapisan tahap kedua dilakukan pada masing-masing antibiotik *chloramphenicol* (5 µg/ml) dan *erythromycin* (5 µg/ml). Data penapisan tahap kedua dapat dilihat pada lampiran 3.

Hasil penapisan dari 59 isolat resistan *chloramphenicol* dan 18 isolat resistan *erythromycin* menunjukkan bahwa terdapat 14 isolat resistan *chloramphenicol* (5 µg/ml) dan 4 isolat resistan *erythromycin* (5 µg/ml). Empat belas isolat bakteri asam laktat yang resistan terhadap *chloramphenicol* (5 µg/ml) antara lain D2, DH1, DH7, DS13, GR3, HB3, LK14, R24, R31, S12, S23, S34, T3, dan T8. Empat isolat resistan *erythromycin* (5 µg/ml) antara lain D2, S23, T3, dan T8. Data isolat potensial resistan *chloramphenicol* (5 µg/ml) dan *erythromycin* (5 µg/ml) dapat dilihat pada tabel 4.1.2.

Selain penapisan dilakukan dengan menggunakan masing-masing antibiotik *chloramphenicol* dan *erythromycin*, penapisan isolat potensial juga dilakukan dengan cara melakukan kombinasi dari kedua antibiotik tersebut. Data isolat potensial terhadap kombinasi kedua antibiotik *chloramphenicol* dan *erythromycin* dapat dilihat pada tabel 4.1.2. Hasil penapisan dengan kombinasi *chloramphenicol* dan *erythromycin* (1 µg/ml) menunjukkan bahwa 4 isolat bakteri asam laktat diketahui memiliki sifat resistansi terhadap kedua antibiotik (Tabel

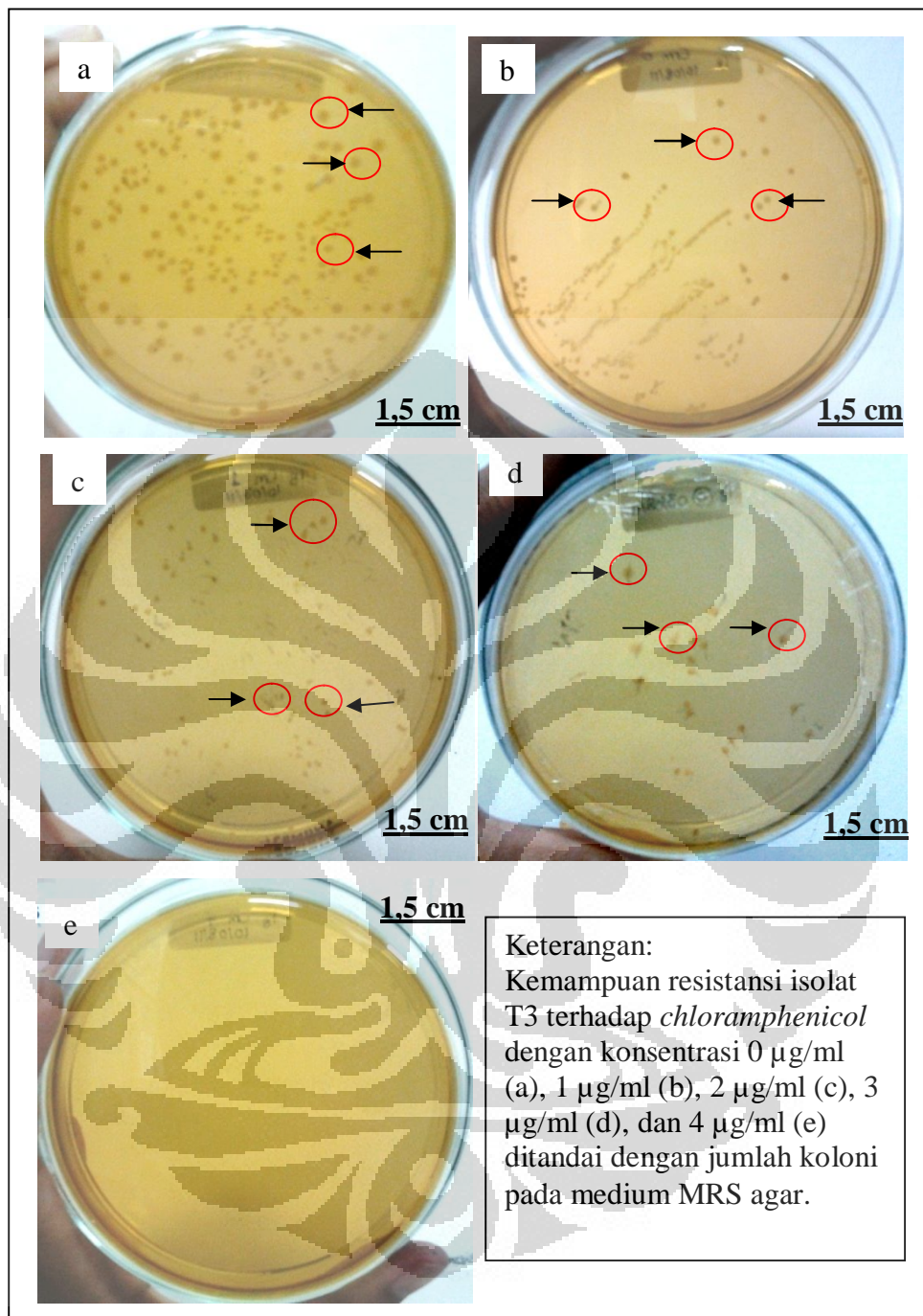
4.1.2). Isolat potensial resistan terhadap kedua antibiotik tersebut antara lain D2 yang berasal dari bekasam daging domba, S23 yang berasal dari daging sapi, serta T3 dan T8 yang berasal dari tape ketan.

Tabel 4.1.2. Data isolat potensial resistan *chloramphenicol* (5 µg/ml) dan *erythromycin* (5 µg/ml)

No	Sumber	Isolat potensial resistan <i>chloramphenicol</i> (5 µg/ml)		Isolat potensial resistan <i>erythromycin</i> (5 µg/ml)		Isolat potensial resistan kombinasi <i>chloramphenicol</i> dan <i>erythromycin</i> (1 µg/ml)	
		Jumlah	Isolat	Jumlah	Isolat	Jumlah	Isolat
1	Dadih	3	DH1, DH7, DS13	-	-	-	
2	Bekasam	4	D2, S23, S34, S12	2	D2, S23	2	D2, S23
3	Tape	2	T3, T8	2	T3, T8	2	T3, T8
4	Kotoran luwak	1	LK14	-	-	-	
5	Fermentasi biji kakao	4	GR3, HB3, R24, R31	-	-	-	
6	Total	14		4		4	

4.1.3 Uji resistansi bakteri asam laktat dalam berbagai konsentrasi *chloramphenicol* dan *erythromycin* dengan metode *viable cell count* pada medium MRS/M17 Agar

Kandidat isolat bakteri asam laktat dari hasil penapisan tahap kedua (Tabel 4.1.2.), kemudian diuji daya resistansi terhadap *chloramphenicol* dan *erythromycin* pada medium MRS/M17 agar. Hasil uji resistansi bakteri asam laktat diamati setelah 48 jam inkubasi. Hasil penghitungan jumlah koloni pada medium MRS/M17 agar merupakan indikator kemampuan resistansi dari setiap isolat bakteri terhadap *chloramphenicol* dan *erythromycin*.



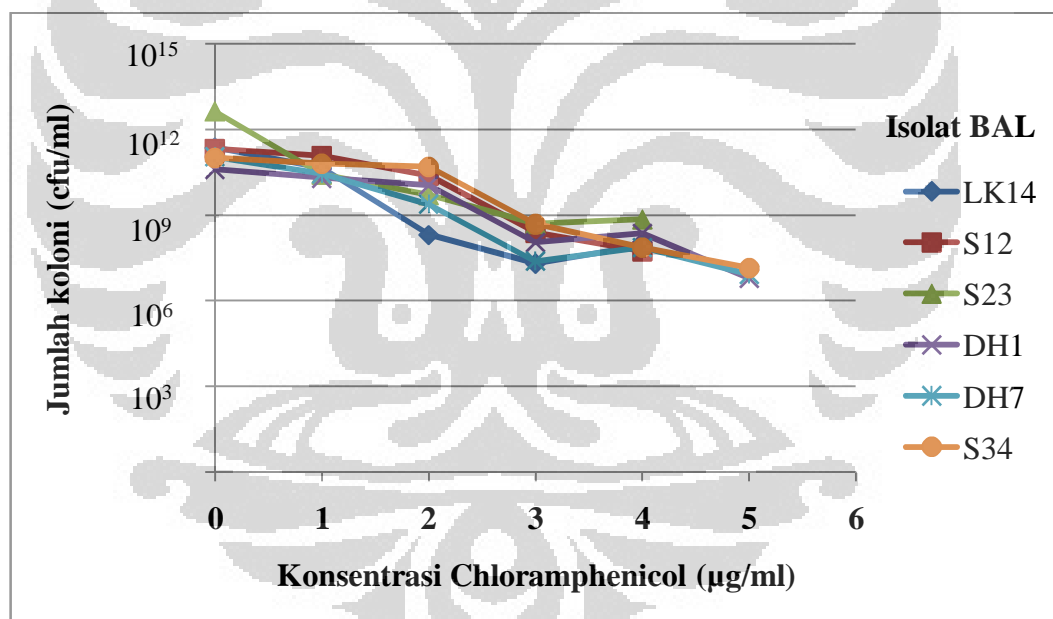
Gambar 4.1.3.1. Hasil uji resistansi isolat T3 terhadap *chloramphenicol*

Setiap isolat bakteri asam laktat potensial memiliki kemampuan resistansi yang berbeda setelah dilakukan uji resistansi pada medium agar. Hasil pengamatan setelah inkubasi selama 48 jam menunjukkan pertumbuhan jumlah koloni yang berbeda dengan hasil penapisan pada setiap isolat bakteri asam laktat

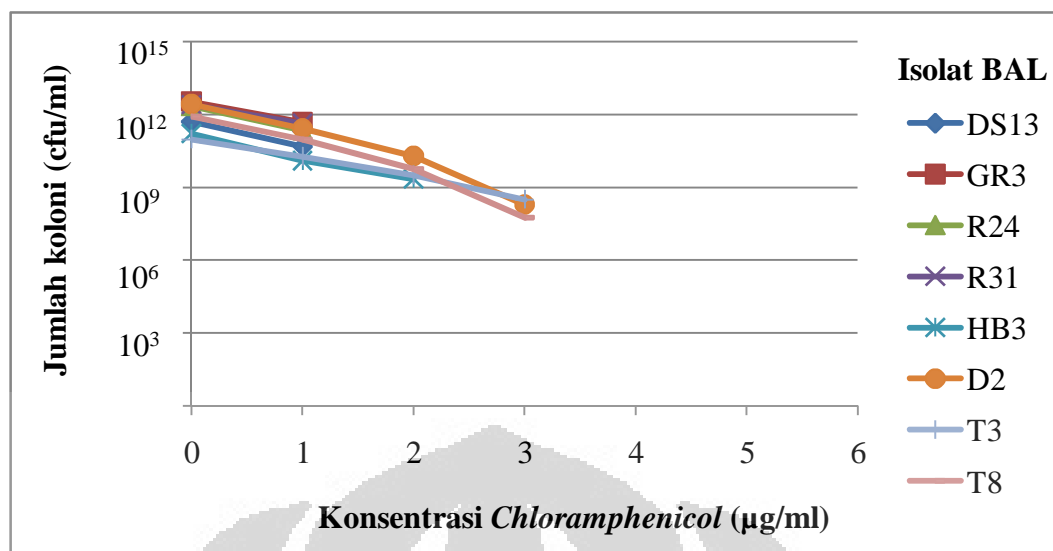
dengan medium cair. Hasil uji resistansi bakteri asam laktat terhadap *chloramphenicol* pada berbagai tingkat konsentrasi dapat diamati pada lampiran 5.

Isolat DH1, DH7, dan S34 merupakan isolat yang masih resistan terhadap *chloramphenicol* (5 $\mu\text{g/ml}$). Isolat LK14, S12, dan S23 merupakan isolat yang masih resistan terhadap *chloramphenicol* (4 $\mu\text{g/ml}$). Isolat D2, T3 dan T8 merupakan isolat yang masih resistan terhadap *chloramphenicol* (3 $\mu\text{g/ml}$). Gambar 4.1.3.1 merupakan salah satu hasil uji resistansi dari isolat T3.

Penghitungan jumlah koloni isolat T3 dapat diamati pada lampiran 4. Isolat HB3 merupakan isolat yang masih resistan terhadap *chloramphenicol* (2 $\mu\text{g/ml}$). Isolat DS13, GR3, R24, dan R31 merupakan isolat yang masih resistan terhadap *chloramphenicol* (1 $\mu\text{g/ml}$). Gambar 4.1.3.2 dan gambar 4.1.3.3 menunjukkan visualisasi dalam bentuk grafik dari data pada lampiran 4.



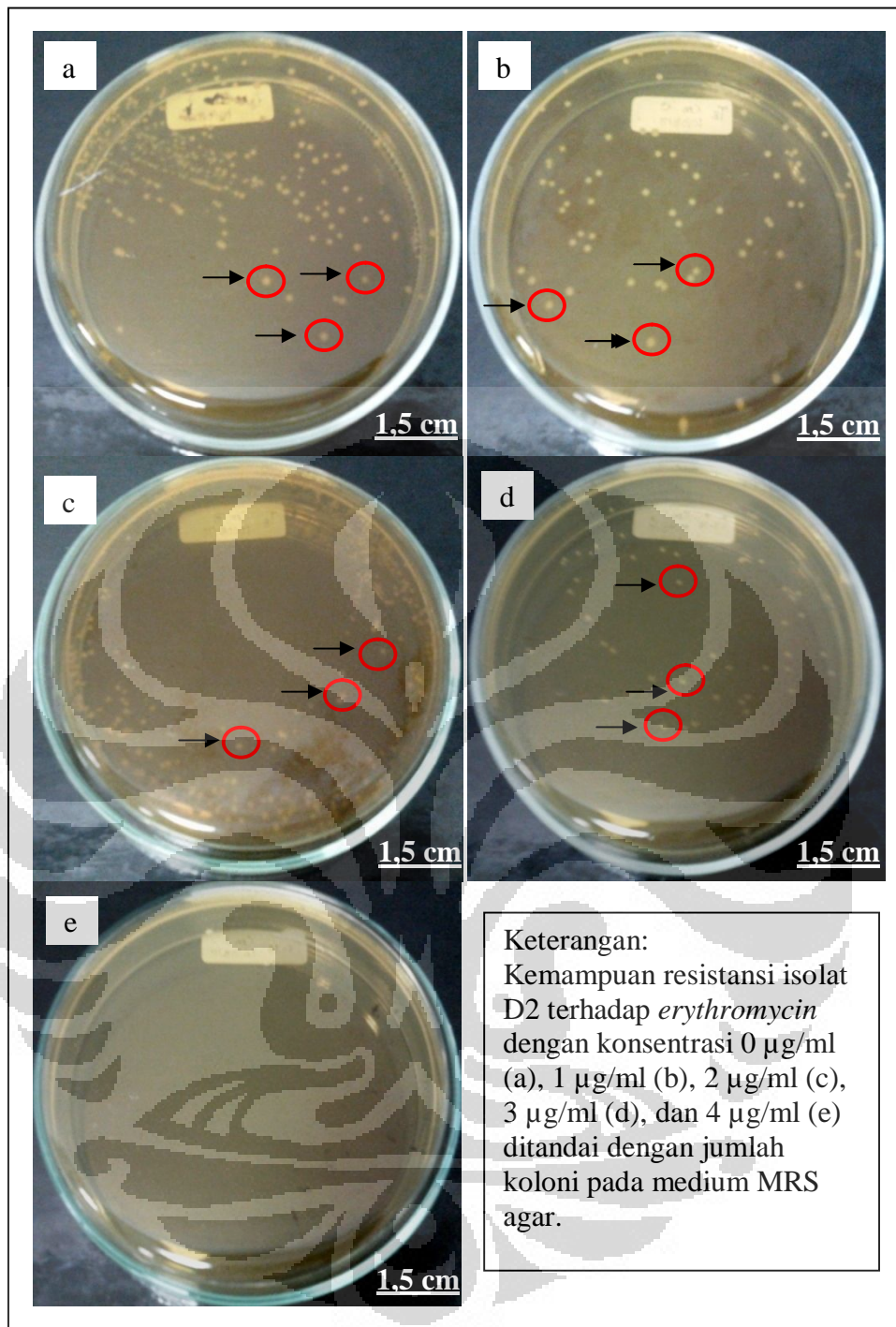
Gambar 4.1.3.2. Data resistansi bakteri asam laktat terhadap *chloramphenicol* (1)



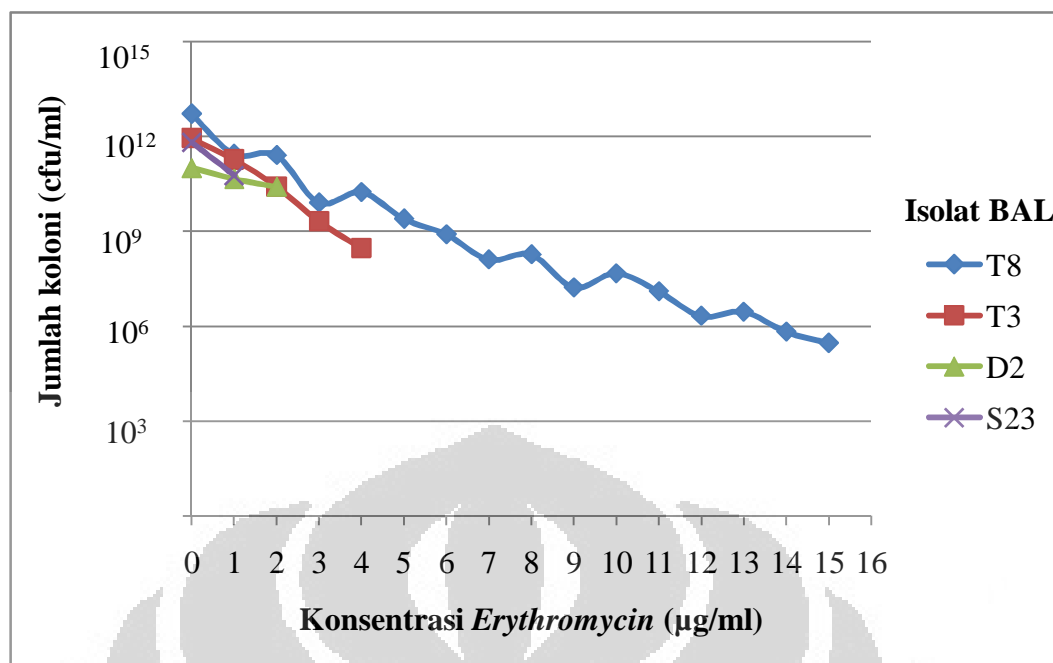
Gambar 4.1.3.3. Data resistansi bakteri asam laktat terhadap *chloramphenicol* (2)

Isolat bakteri asam laktat yang resistan terhadap *erythromycin* (5 µg/ml) pada medium cair, kemudian diuji kemampuan resistansinya pada medium MRS agar. Isolat yang diuji pada medium agar antara lain D2, S23, T3, dan T8. Salah satu contoh hasil pengamatan uji resistansi isolat bakteri asam laktat yaitu pertumbuhan koloni isolat D2 (Gambar 4.1.3.4). Isolat D2 memiliki kemampuan resistansi terhadap *erythromycin* (3 µg/ml). Hasil pengamatan uji resistansi setelah inkubasi 48 jam menunjukkan bahwa jumlah isolat bakteri asam laktat menjadi lebih sedikit seiring dengan penambahan tingkat konsentrasi *erythromycin*.

Gambar 4.1.3.5. merupakan data hasil uji resistansi terhadap *erythromycin* dari empat isolat bakteri asam laktat. Isolat T8 merupakan isolat yang masih resistan terhadap *erythromycin* (15 µg/ml). Isolat T3 merupakan isolat yang masih resistan terhadap *erythromycin* (4 µg/ml). Isolat S23 merupakan isolat yang masih resistan terhadap *erythromycin* (1 µg/ml).



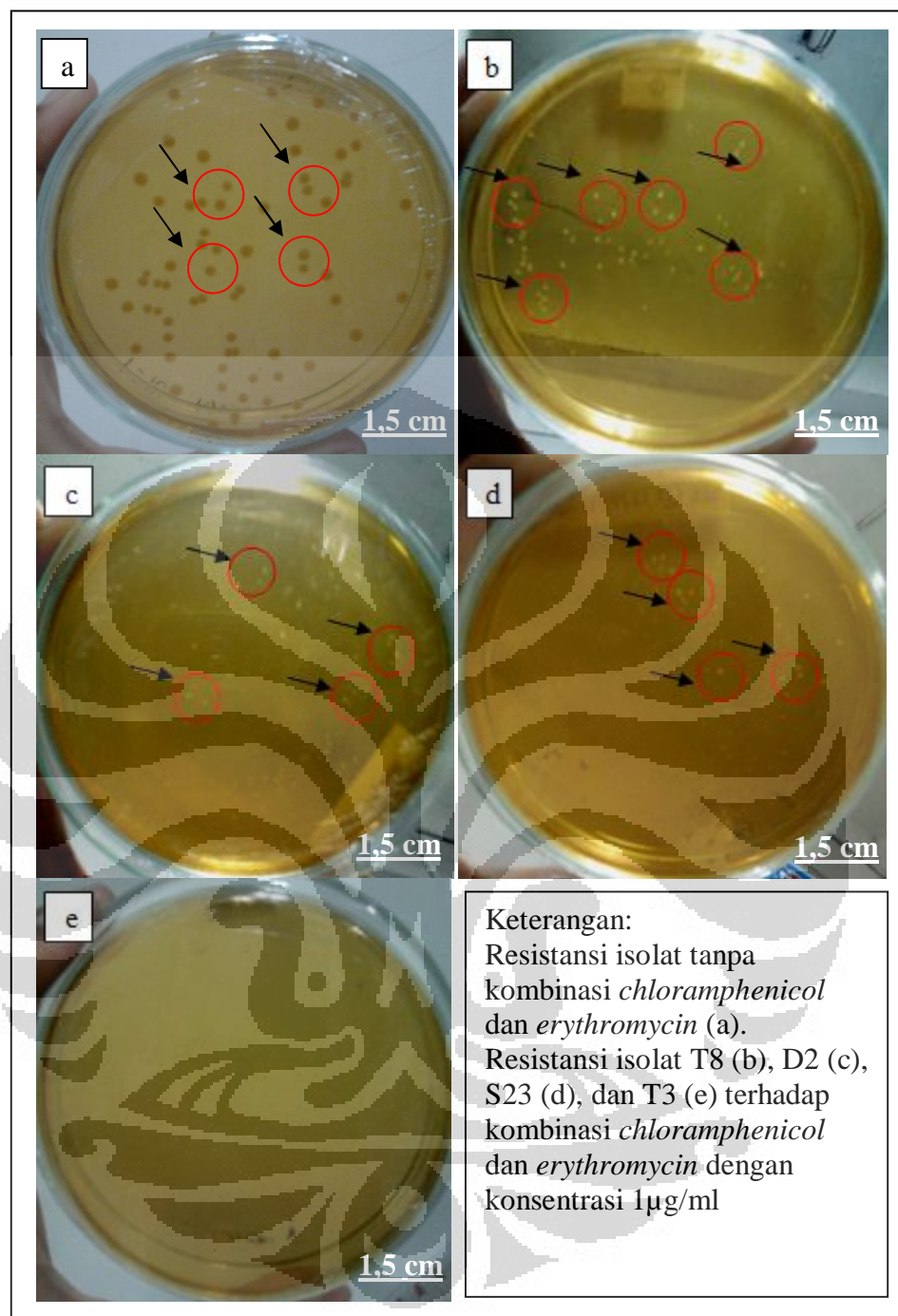
Gambar 4.1.3.4. Hasil uji resistansi isolat D2 terhadap *erythromycin*



Gambar 4.1.3.5. Data resistansi bakteri asam laktat terhadap *erythromycin*.

Uji resistansi dilakukan tidak hanya pada masing-masing antibiotik *chloramphenicol* dan *erythromycin*, tetapi juga pada kombinasi kedua antibiotik tersebut. Hasil uji resistansi terhadap kombinasi *chloramphenicol* dan *erythromycin* (1 µg/ml) menunjukkan bahwa isolat D2, S23, dan T8 masih dapat hidup pada konsentrasi tersebut (Gambar 4.1.3.6 dan Gambar 4.1.3.7). Uji resistansi pada kombinasi antibiotik *chloramphenicol* dan *erythromycin* menyebabkan penurunan kemampuan resistansi pada isolat dibandingkan dengan uji resistansi terhadap masing-masing antibiotik.

Hasil uji resistansi isolat T3 menunjukkan perbedaan dibandingkan dengan hasil uji resistansi terhadap isolat D2, S23, dan T8 (Tabel 4.1.3.). Isolat T3 tidak dapat hidup pada medium yang mengandung kombinasi kedua antibiotik (Gambar 4.1.3.6). Hal tersebut juga tidak sesuai dengan hasil penapisan kombinasi kedua antibiotik pada medium cair. Hasil penapisan kombinasi kedua antibiotik pada medium cair menunjukkan bahwa isolat T3 masih memiliki kemampuan resistansi.



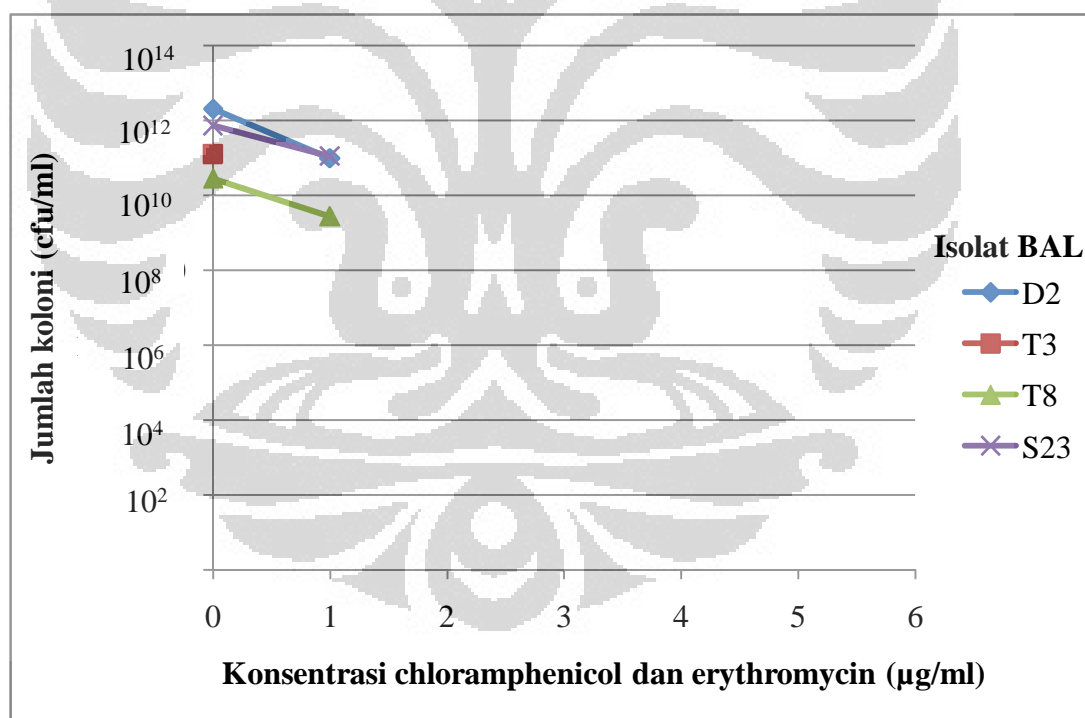
Gambar 4.1.3.6. Hasil uji resistansi isolat terhadap kombinasi *chloramphenicol* dan *erythromycin*

Hasil uji resistansi terhadap kombinasi *chloramphenicol* dan *erythromycin* menunjukkan bahwa pertumbuhan koloni bakteri asam laktat lebih lambat dibandingkan dengan uji resistansi pada masing-masing antibiotik. Pertumbuhan koloni yang lebih lambat dapat diamati pada gambar 4.1.3.6. Ukuran koloni yang

lebih kecil daripada tanpa penambahan antibiotik (Gambar 4.1.3.6), setelah inkubasi 48 jam menjadi indikator bahwa bakteri lebih sulit tumbuh pada medium yang mengandung kombinasi kedua antibiotik.

Tabel 4.1.3. Hasil uji resistansi bakteri asam laktat terhadap *chloramphenicol* dan *erythromycin*

No	Isolat	Jumlah isolat pada berbagai konsentrasi kombinasi <i>chloramphenicol</i> dan <i>erythromycin</i> (cfu/ml)					
		0 μg/ml	1 μg/ml	2 μg/ml	3 μg/ml	4 μg/ml	5 μg/ml
1	D2	$(2,05—2,65) \times 10^{12}$	$(9,8—10,5) \times 10^{10}$	0	0	0	0
2	S23	$(4,27—7,20) \times 10^{11}$	$(1,112,17) \times 10^{11}$	0	0	0	0
3	T3	$(0,90—1,26) \times 10^{11}$	0	0	0	0	0
4	T8	$(0,72—2,80) \times 10^{10}$	$(2,70—2,80) \times 10^9$	0	0	0	0



Gambar 4.1.3.7. Hasil uji resistansi bakteri asam laktat terhadap kombinasi *chloramphenicol* dan *erythromycin*

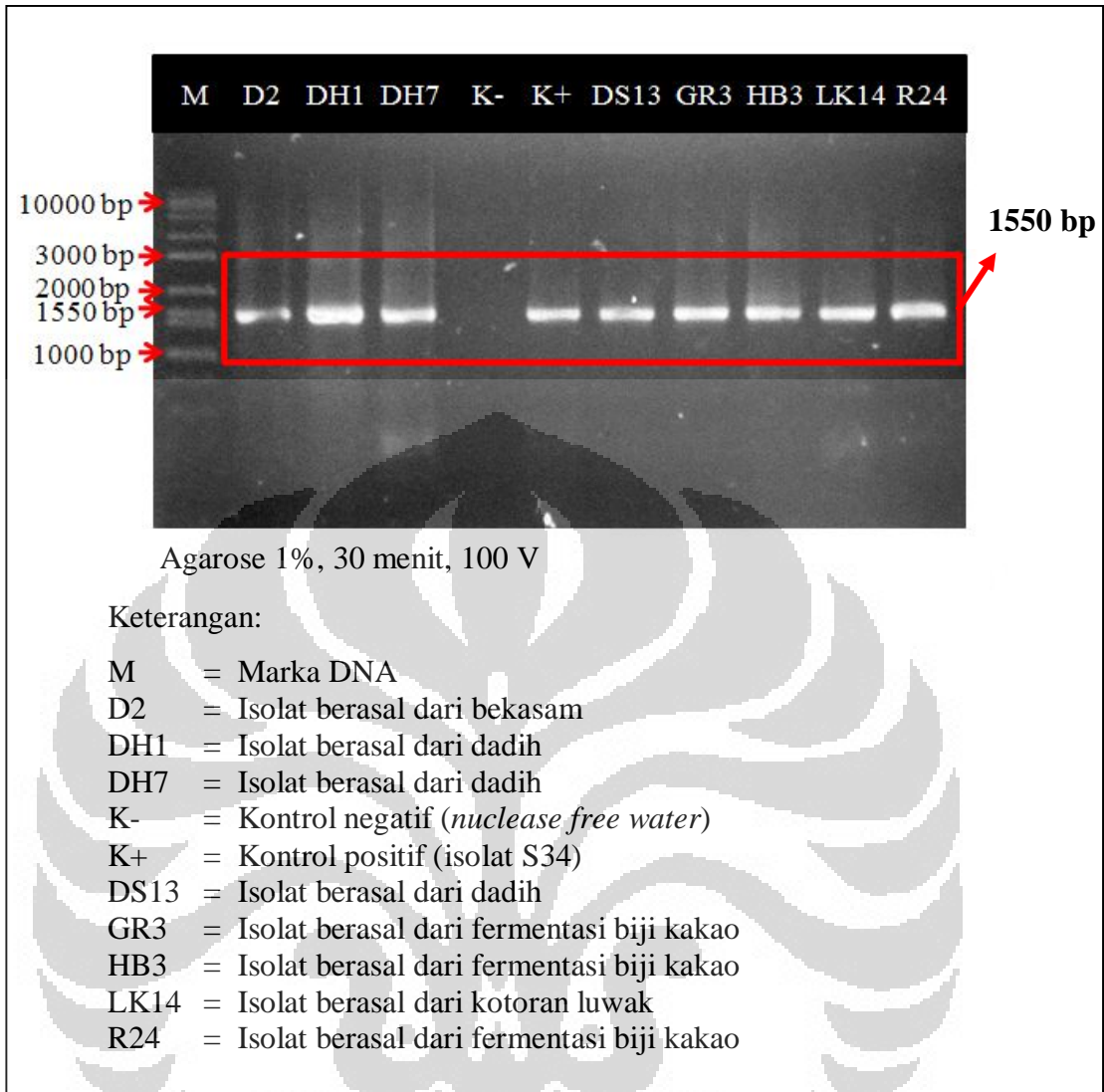
4.1.4 Isolasi genom dan pengukuran konsentrasi serta kemurnian DNA

Hasil isolasi genom yang telah dilakukan kemudian dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA. Hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA dapat dilihat pada Lampiran 5. Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA hasil isolasi genom menunjukkan nilai yang berbeda-beda. Hasil pengukuran konsentrasi DNA menunjukkan bahwa DNA genom dari empat belas isolat memiliki kisaran nilai antara 74,8—269,3 ng/ μ l (Lampiran 5). Hasil pengukuran kemurnian DNA juga menunjukkan nilai di antara 1,114—1,959 (Lampiran 5).

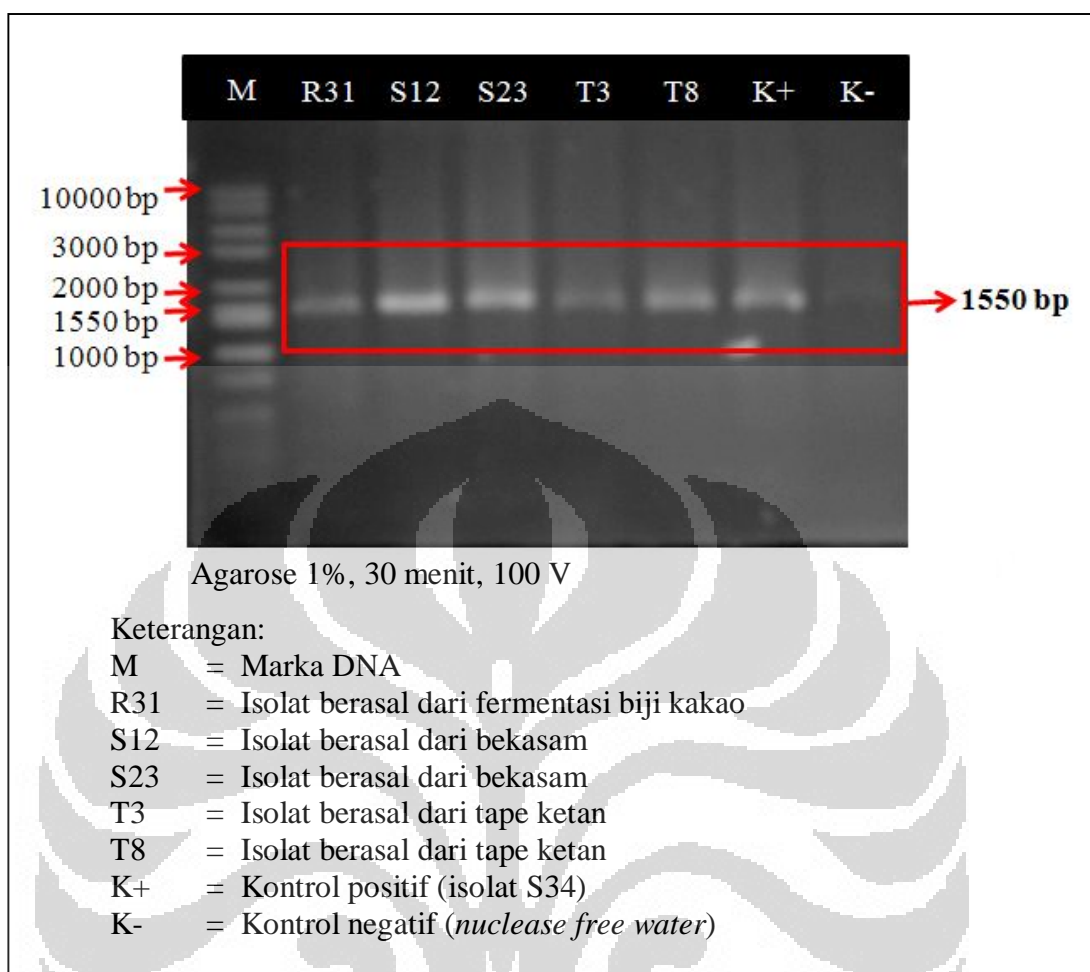
4.1.5 Identifikasi gen 16S rRNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan elektroforesis hasil PCR

Hasil isolasi genom kemudian dijadikan sebagai DNA *template* untuk proses PCR. Identifikasi gen 16S rRNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan untuk tujuan amplifikasi gen 16S rRNA. Hasil identifikasi gen 16S rRNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) divisualisasikan dengan elektroforesis. Gambar 4.1.5.1 dan gambar 4.1.5.2 menjelaskan bahwa gen 16S rRNA dengan ukuran 1550 bp dari seluruh isolat berhasil diamplifikasi dengan metode PCR.

Konsentrasi 1% merupakan konsentrasi yang digunakan untuk visualisasi gen 16S rRNA, karena dapat memisahkan gen dengan ukuran sekitar 250 bp—12 kbp (Sambrook & Russell 2001a: 5.6). Gen 16S rRNA diketahui berukuran sekitar 1550 bp, sehingga konsentrasi 1% dipilih untuk proses visualisasi hasil PCR. Kontrol positif merupakan isolat S34 yang telah diidentifikasi berdasarkan penelitian Putri (2010: 10). Isolat S34 diidentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum* berdasarkan hasil analisis BLAST. Kontrol negatif yang digunakan dalam proses elektroforesis adalah *nuclease free water*.



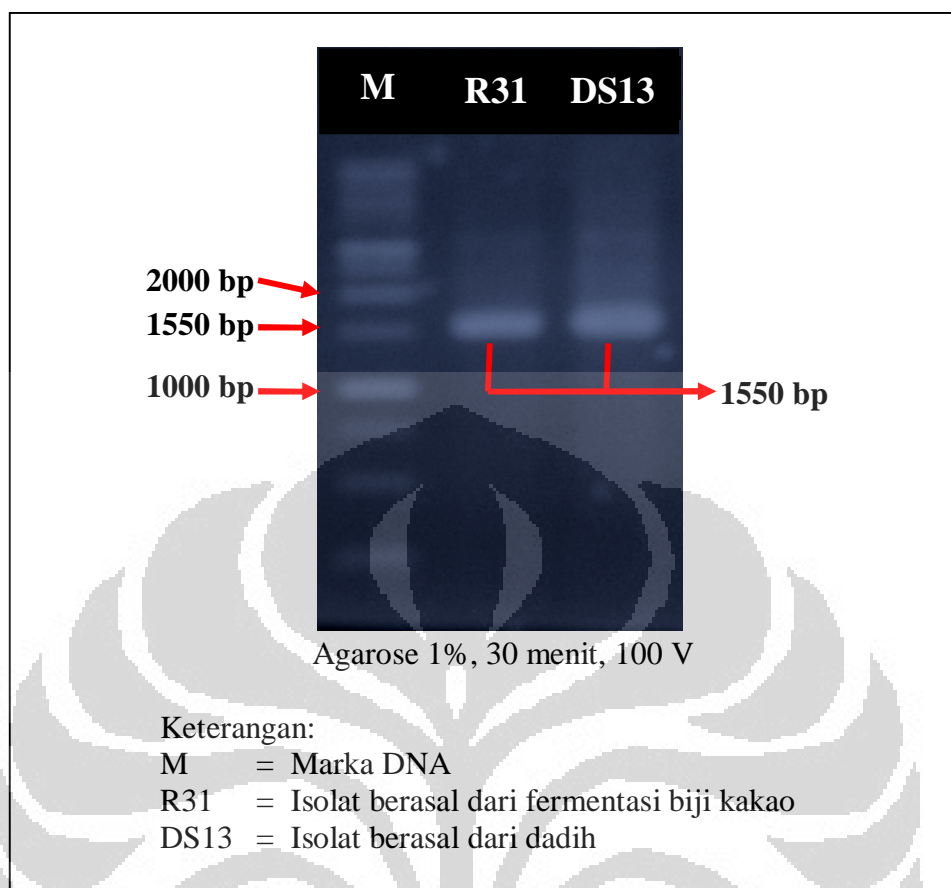
Gambar 4.1.5.1. Hasil identifikasi gen 16S rRNA dengan PCR (1)



Gambar 4.1.5.2. Hasil identifikasi gen 16S rRNA dengan PCR (2)

4.1.6 Hasil purifikasi produk PCR

Gen 16S rRNA hasil PCR dari empat belas isolat bakteri asam laktat kemudian dipurifikasi dengan menggunakan metode dari Promega. Contoh hasil purifikasi produk PCR dari isolat R31 dan DS13 dapat dilihat pada Gambar 4.1.6. Sampel hasil purifikasi kemudian dikirim ke perusahaan penyedia jasa DNA *sequencing*.



Gambar 4.1.6. Hasil purifikasi produk PCR dari isolat R31 dan DS13

4.1.7 Hasil analisis DNA *sequencing*

Hasil analisis DNA *sequencing* berupa data urutan basa nukleotida dan elektroferogram. Urutan basa nukleotida dari salah satu isolat, yaitu T8 dapat dilihat pada lampiran 6, sedangkan elektroferogram hasil DNA *sequencing* dari isolat T8 dapat dilihat pada lampiran 7 dan 8. Data basa nukleotida tersebut kemudian digunakan untuk mengidentifikasi jenis bakteri dengan program BLAST (Tabel 4.1.7). Hasil identifikasi isolat T8 dengan program BLAST dapat dilihat pada lampiran 9. Keseluruhan isolat bakteri asam laktat memiliki nilai *identity* antara 96—100% . Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat-isolat tersebut termasuk spesies bakteri asam laktat.

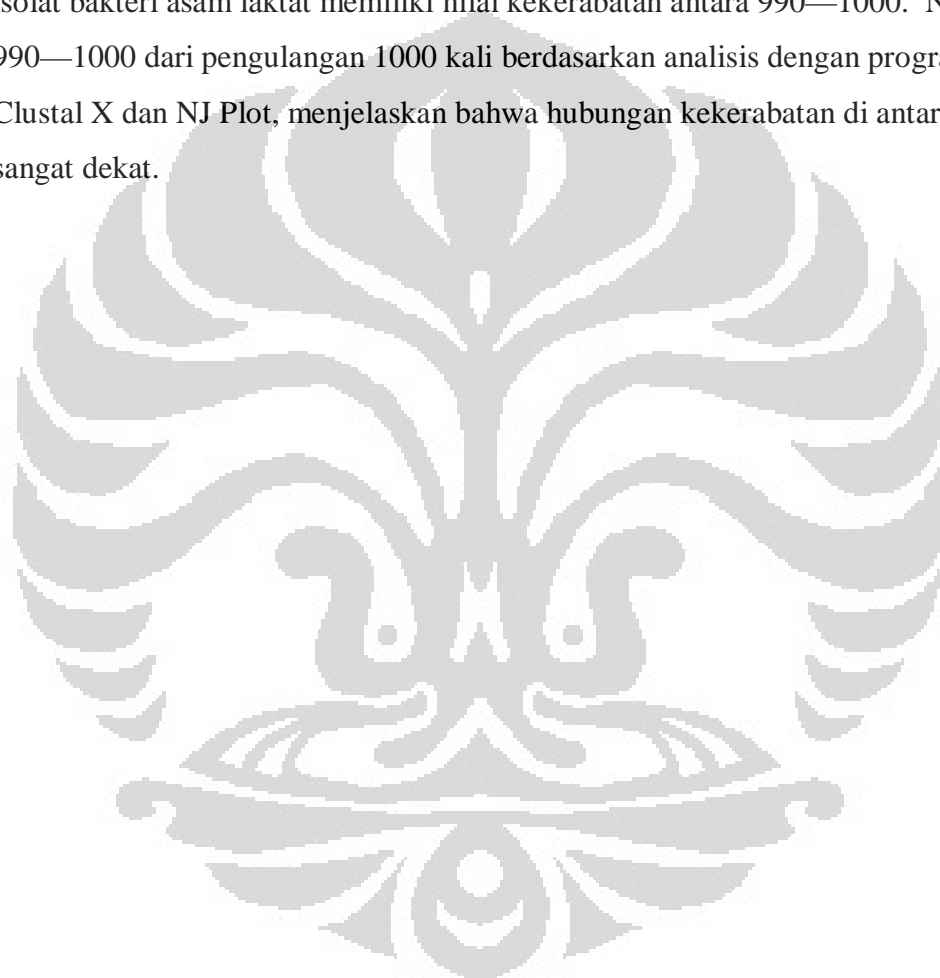
Tabel 4.1.7. Hasil identifikasi isolat bakteri asam laktat dengan program BLAST

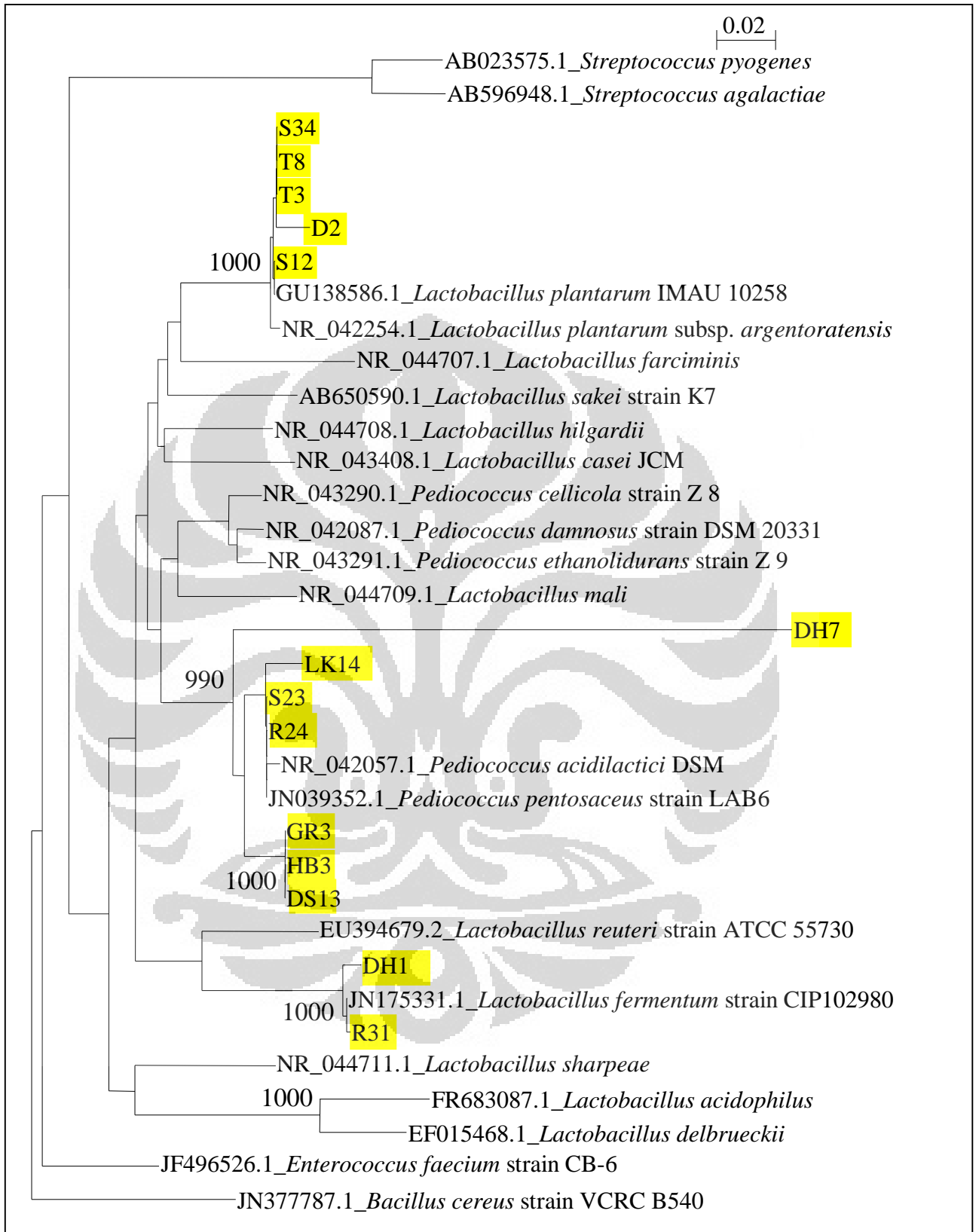
No	Isolat	Spesies	Identity	Accession Number
1	S12	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain 019	99%	JN560843.1
2	S34	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	100%	AL935263.2
3	D2	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917	99%	HQ615669.1
4	T3	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	99%	AL935263.2
5	T8	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	100%	AL935263.2
6	DH1	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain MTCC 8711	98%	GU213430.1
7	R31	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain BCS36	99%	EU547300.1
8	HB3	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99%	AB481102.1
9	GR3	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	96%	AB550295.1
10	DS13	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	100%	AB481102.1
11	LK14	<i>Pediococcus pentosaceus</i> strain LAB2	98%	JN039348.1
12	DH7	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain UL5 16S	97%	EF059987.1
13	S23	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain IMAU20070	100%	FJ844982.1
14	R24	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99%	FJ844982.1

Bakteri asam laktat yang telah diidentifikasi dari 14 isolat terdiri atas dua genus dan empat spesies yang berbeda. Genus yang berhasil ditemukan dari hasil identifikasi dengan program BLAST adalah *Lactobacillus* dan *Pediococcus*. Jenis bakteri asam laktat yang telah diidentifikasi dari 14 isolat bakteri asam laktat antara lain *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, dan *Lactobacillus fermentum*. Isolat S12, S34, T3, T8, dan D2 diidentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum*, sedangkan isolat R24, S23, dan

DH7 diidentifikasi sebagai *Pediococcus acidilactici*. Bakteri yang teridentifikasi sebagai *Pediococcus pentosaceus* adalah Isolat DS13, HB3, LK14 dan GR3, sedangkan isolat DH1 dan R31 diidentifikasi sebagai *Lactobacillus fermentum* (Tabel 4.1.7).

Kumpulan basa nukleotida dari setiap isolat dan data dari GenBank kemudian dianalisis untuk konstruksi pohon filogenetik. Pohon filogenetik dapat dilihat pada gambar 4.1.7. Hasil analisis *bootstrap* menunjukkan bahwa isolat-isolat bakteri asam laktat memiliki nilai kekerabatan antara 990—1000. Nilai 990—1000 dari pengulangan 1000 kali berdasarkan analisis dengan program Clustal X dan NJ Plot, menjelaskan bahwa hubungan kekerabatan di antara isolat sangat dekat.





Gambar 4.1.7. Pohon Filogenetik bakteri asam laktat yang resisten terhadap *chloramphenicol* dan *erythromycin*

4.2 Pembahasan

4.2.1 Kemampuan resistansi bakteri asam laktat terhadap *chloramphenicol*

Bakteri asam laktat sebanyak 59 isolat diketahui memiliki kemampuan resistansi terhadap *chloramphenicol* (2 µg/ml) pada medium cair. Penapisan tahap awal terhadap *chloramphenicol* (2 µg/ml) bertujuan untuk mengetahui kandidat isolat potensial yang sensitif terhadap keberadaan *chloramphenicol*. *Chloramphenicol* (2 µg/ml) memiliki konsentrasi yang relatif rendah untuk penapisan tahap awal. Penelitian Burchard dan Parish (1974: 233) melaporkan bahwa *Myxococcus xanthus* memiliki sifat resistansi yang rendah terhadap *chloramphenicol* (2 µg/ml). Penelitian D'Aimmo *dkk.* (2007: 40) juga melaporkan bahwa *Bifidobacteria* sensitif terhadap *chloramphenicol* (2 µg/ml).

Penapisan tahap kedua pada bakteri asam laktat dengan *chloramphenicol* (5 µg/ml) berguna untuk menyeleksi kandidat isolat potensial untuk diuji kemampuan resistansinya pada medium MRS/M17 agar. Hasil penapisan isolat bakteri asam laktat pada medium cair berbeda dengan hasil uji resistansi pada medium agar. Kemampuan resistansi terhadap *chloramphenicol* dari kebanyakan isolat mengalami pengurangan pada saat diuji daya resistansinya pada medium MRS/M17 agar. Isolat yang masih resistan terhadap *chloramphenicol* (5 µg/ml) pada medium MRS agar adalah DH1, DH7, dan S34, sedangkan sebelas isolat lainnya tidak tahan hidup pada *chloramphenicol* (5 µg/ml).

Perbedaan kemampuan hidup pada medium yang berbeda dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor. Menurut Ammor *dkk.* (2007: 562), perbedaan kemampuan resistansi dapat dipengaruhi oleh periode inkubasi. Periode inkubasi bakteri asam laktat pada medium cair lebih cepat dibandingkan dengan medium padat. Pertumbuhan koloni bakteri asam laktat pada medium MRS/M17 agar, merupakan indikator positif sel bakteri dapat hidup, sedangkan perubahan warna pada medium cair menjadi indikator kemampuan hidup bakteri. Menurut Chao *dkk.* (2008: 137), koloni bakteri asam laktat yang berwarna putih atau kuning mengilat dapat dihitung pada medium MRS agar. Madigan *dkk.* (2000: 13) juga

menjelaskan bahwa sel bakteri hidup ditandai oleh koloni yang terlihat pada medium.

Jumlah keseluruhan isolat bakteri asam laktat paling banyak berasal dari dadih. Isolat yang resistan terhadap *chloramphenicol* (2 µg/ml) juga paling banyak berasal dari dadih, yaitu 16,04%. Jumlah isolat bakteri asam laktat paling banyak dari dadih dikarenakan proses isolasi yang dilakukan pada dadih lebih mudah. Dadih juga merupakan produk susu kerbau fermentasi yang melibatkan berbagai bakteri asam laktat yang berasal dari bambu, susu kerbau, dan daun pisang sehingga bakteri yang terdapat beragam (Collado *dkk.* 2007: 89). Keterlibatan bakteri asam laktat dari berbagai sumber tersebut diduga dapat menyebabkan terjadinya resistansi. Menurut Liu *dkk.* (2009: 401), resistansi terhadap *chloramphenicol* dapat terjadi akibat penerimaan gen resistan dari bakteri asam laktat lainnya di alam.

Mekanisme resistansi terhadap *chloramphenicol* dapat terjadi pada berbagai cara. Roberts dan Schwarz (2009: 183) menjelaskan bahwa resistansi dapat terjadi akibat adanya penembusan *chloramphenicol* melewati membran yang berhubungan dengan transporter. Resistansi juga dapat terjadi akibat mutasi yang terjadi pada gen 23S rRNA, proses inaktivasi *chloramphenicol* oleh 3-O-phosphotransferase, dan pengaruh *chloramphenicol acetyltransferase* (CATs) (Roberts & Schwarz 2009: 183). Menurut Burchard dan Parish (1974: 235), Enzim *chloramphenicol acetyltransferase* dapat mengubah *chloramphenicol* menjadi 3-acetyl *chloramphenicol*, 1-acetyl *chloramphenicol*, 1,3-diacetyl *chloramphenicol*.

Analisis hasil identifikasi bakteri asam laktat dengan program BLAST menunjukkan bahwa keempat belas isolat bakteri asam laktat teridentifikasi sebagai *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, dan *Pediococcus pentosaceus*. Isolat DH1 dan R31 yang diidentifikasi sebagai *Lactobacillus fermentum* berturut-turut memiliki kemampuan resistansi terhadap *chloramphenicol* pada medium agar yaitu (5 µg/ml) dan (1 µg/ml). Menurut Ammor *dkk.* (2007: 562), bakteri yang tergolong *Lactobacilli* secara umum bersifat sensitif terhadap antibiotik yang bekerja dengan cara menghambat sintesis protein, seperti *chloramphenicol*.

Isolat S12, S34, D2, T3, dan T8 diketahui teridentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum*. Isolat S12 dan S34 memiliki kemampuan resistansi terhadap *chloramphenicol* berturut-turut, yaitu (4 µg/ml) dan (5 µg/ml), sedangkan isolat D2, T3, dan T8 masih resistan terhadap *chloramphenicol* (3 µg/ml). Menurut penelitian Pan *dkk.* (2011: 1319), *Lactobacillus plantarum* SHC 167 juga memiliki kemampuan resistansi terhadap *chloramphenicol* (4 µg/ml). Kemampuan resistansi *Lactobacillus plantarum* SHC 167 digolongkan sensitif berdasarkan EFSA tahun 2008.

Isolat DH7, S23, dan R24 diketahui teridentifikasi sebagai *Pediococcus acidilactici*. Isolat DH7, S23, dan R24 memiliki kemampuan resistansi terhadap *chloramphenicol* berturut-turut (5 µg/ml), (4 µg/ml), dan (1 µg/ml). Isolat DS13 dan LK14 yang teridentifikasi sebagai *Pediococcus acidilactici* memiliki kemampuan resistansi berturut-turut terhadap *chloramphenicol*, yaitu (1 µg/ml) dan (4 µg/ml). Menurut Ammor *dkk.* (2007: 561), *Pediococcus* spp. diketahui memiliki kemampuan resistansi terhadap *chloramphenicol* (4 µg/ml).

4.2.2 Kemampuan resistansi bakteri asam laktat terhadap *erythromycin*

Bakteri asam laktat sebanyak 18 isolat diketahui memiliki kemampuan resistansi terhadap *erythromycin* (1 µg/ml) pada medium cair. *Erythromycin* (1 µg/ml) memiliki konsentrasi yang relatif rendah untuk penapisan tahap awal. Penelitian Tang *dkk.* (2002: 1), melaporkan bahwa 44 strain *Staphylococcus aureus* resistan terhadap *erythromycin* (1 µg/ml).

Isolat bakteri asam laktat yang resistan terhadap *erythromycin* (1 µg/ml) diketahui paling banyak berasal dari tape ketan, yaitu 4,81%. Menurut Rahayu *dkk.* (2011: 400), proses fermentasi tape dipengaruhi oleh penambahan *starter* berupa ragi. Ragi merupakan *starter* yang didominasi oleh khamir, kapang, bakteri asam laktat, dan bakteri asam asetat. Penambahan *starter* dalam proses pembuatan tape akan memengaruhi resistansi bakteri asam laktat terhadap *erythromycin*. *Starter* yang didominasi dari berbagai jenis mikroorganisme dapat mengakibatkan terjadinya horizontal transfer gen resistan. Hal tersebut sesuai dengan Liu *dkk.* (2009: 401) yang menyatakan bahwa horizontal transfer gen

resistan antibiotik dapat terjadi melalui plasmid konjugatif, transposon, integron, dan elemen sisipan dari organisme lain.

Gen resistan antibiotik dapat ditransfer dari satu bakteri ke bakteri lainnya selama proses pembuatan makanan. Mekanisme transfer gen resistan disebut sebagai horizontal transfer gen. Peristiwa horizontal transfer gen terjadi pada pembuatan keju tanpa proses pasteurisasi yang menyebabkan *Lactococcus lactis* menerima gen resistan *streptomycin*, *tetracycline*, *chloramphenicol*, dan *erythromycin*. Gen resistan tersebut berasal dari mikroba patogen seperti *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus*, dan *Listeria monocytogenes* (Guilfoile 2007: 62).

Resistensi terhadap *erythromycin* dipengaruhi oleh dua tipe mekanisme, yaitu metilasi pada ribosomal dan *efflux pump* (Heelan 2004: 1263—1264). Mekanisme resistansi terhadap *erythromycin* dapat terjadi akibat proses penempelan gugus metil (CH₃) pada RNA ribosom sehingga akan melindungi sel dari *erythromycin* (Guilfoile 2007: 51). Metilasi pada 23S rRNA oleh enzim *erythromycin ribosomal methylase* akan menghambat ikatan antara *erythromycin* dengan subunit 50S ribosomal RNA sehingga menyebabkan terjadinya resistansi. Guilfoile (2007: 51) menjelaskan bahwa keberadaan *erythromycin* akan mengurangi sintesis protein dan akan mengaktifkan mekanisme resistansi pada bakteri. Sel bakteri dapat menjadi resistan terhadap *erythromycin* akibat tidak terbentuk konfigurasi penghambatan sehingga protein resistansi dapat dibentuk.

Analisis hasil identifikasi bakteri asam laktat dengan program BLAST menunjukkan bahwa empat isolat bakteri asam laktat teridentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum* dan *Pediococcus acidilactici*. Isolat D2, T3, dan T8 yang teridentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum* memiliki kemampuan resistansi terhadap *erythromycin* berturut-turut, yaitu (3 µg/ml), (4 µg/ml), dan (15 µg/ml). Ammor *dkk.* (2007: 561) melaporkan bahwa *Lactobacillus plantarum* tahan terhadap *erythromycin* (4 µg/ml). Penelitian Pan *dkk.* (2011: 1319) juga melaporkan bahwa *Lactobacillus plantarum* SHC096 memiliki kemampuan resistansi terhadap *erythromycin* (8 µg/ml). Kemampuan resistansi *Lactobacillus plantarum* SHC096 digolongkan resistan berdasarkan EFSA 2008. Isolat T8 secara tidak langsung juga dapat digolongkan resistan berdasarkan data tersebut,

karena isolat T8 memiliki kemampuan resistansi yang lebih tinggi dibandingkan *Lactobacillus plantarum* SHC096.

Isolat S23 yang teridentifikasi sebagai *Pediococcus acidilactici* memiliki kemampuan resistansi terhadap *erythromycin* (1 µg/ml). Ammor *dkk.* (2007: 561) melaporkan bahwa *Pediococcus* spp. diketahui memiliki kemampuan resistansi terhadap *erythromycin* (4 µg/ml). Isolat S23 memiliki kemampuan resistansi terhadap *erythromycin* yang lebih rendah dibandingkan dengan kemampuan resistansi *Pediococcus* spp. yang dilaporkan oleh Ammor *dkk.* (2007: 561).

4.2.3 Kemampuan resistansi bakteri asam laktat terhadap kombinasi *chloramphenicol* dan *erythromycin*

Isolat bakteri asam laktat tidak hanya memiliki kemampuan resistansi terhadap masing-masing antibiotik *chloramphenicol* dan *erythromycin*, tetapi juga pada kombinasi kedua antibiotik tersebut. Hasil uji resistansi menunjukkan bahwa kombinasi antibiotik *chloramphenicol* dan *erythromycin* dapat menurunkan kemampuan resistansi isolat bakteri asam laktat. Hal tersebut dapat dibandingkan pada hasil uji resistansi masing-masing antibiotik. Hasil penelitian tersebut sesuai dengan pernyataan Garrod (1957: 58) yang melaporkan bahwa kombinasi antibiotik dapat menyebabkan kemampuan resistansi yang lebih rendah dibandingkan tanpa adanya kombinasi antibiotik.

Menurut Garrod (1957: 58), kombinasi antibiotik akan memberikan efek yang lemah terhadap kemampuan resistansi. Isolat T3 tidak dapat hidup pada kombinasi antibiotik *chloramphenicol* dan *erythromycin*, meskipun isolat T3 dapat tahan hidup pada masing-masing antibiotik tersebut. Garrod (1957: 58) menjelaskan bahwa kemampuan resistansi yang lebih rendah dapat disebabkan oleh mekanisme resistansi terhadap kedua antibiotik yang berjalan tidak sinergis.

4.2.4 Analisis hasil isolasi genom, konsentrasi, dan kemurnian DNA

Konsentrasi DNA dari empat belas sampel isolasi genom menunjukkan nilai antara 74,8—269,3 ng/µl. Nilai konsentrasi DNA tersebut cukup untuk

digunakan sebagai DNA *template* pada proses PCR. Menurut Sambrook dan Russell (2001a: 6.11), konsentrasi DNA sebesar 50 µg/ml digunakan sebagai standar pada pengukuran konsentrasi dengan absorbansi panjang gelombang 260 nm.

Hasil isolasi genom dari 8 isolat, yaitu T3, S34, S12, R31, R24, GR3, HB3, dan DH7 diketahui merupakan sampel yang murni karena memiliki nilai kemurnian di antara 1,8—2. Menurut Sambrook dan Russell (2001c: A8.20), suatu sampel akan dikatakan murni apabila memiliki nilai kemurnian di antara 1,8—2. Hasil isolasi genom dari 6 isolat, yaitu S23, DS13, DH1, D2, T8, dan LK14 diketahui merupakan sampel yang tidak murni. Suatu sampel akan dikatakan tidak murni apabila memiliki nilai kemurnian di bawah 1,8. Sambrook dan Russell (2001c: A8.20) menjelaskan bahwa nilai kemurnian sampel di bawah 1,8 disebabkan oleh adanya kontaminasi dari protein atau *phenol*.

4.2.5 Analisis identifikasi bakteri asam laktat terhadap sumber isolat

Isolat S12, S34, dan D2 merupakan isolat yang diidentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum*. Isolat S12 dan S34 merupakan isolat yang berasal dari bekasam daging sapi, sedangkan isolat D2 berasal dari daging domba. *Lactobacillus plantarum* merupakan bakteri asam laktat yang banyak ditemukan pada proses pembuatan makanan fermentasi dari bahan daging. Yahya *dkk.* (1997: 116) melaporkan bahwa *Lactobacillus plantarum* berperan dalam pembuatan bekasam dari ikan Mujair. Penelitian Tran *dkk.* (2011: 340) juga melaporkan bahwa *Lactobacillus plantarum* merupakan bakteri asam laktat yang secara dominan banyak ditemukan pada *nem chua*, yaitu produk fermentasi makanan dari Vietnam yang berbahan dasar daging Babi. *Lactobacillus plantarum* tidak hanya ditemukan pada daging, tetapi juga pada tape ketan. Penelitian membuktikan bahwa isolat T3 dan T8 yang berasal dari tape ketan telah diidentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum*.

Lactobacillus plantarum memiliki berbagai peran penting dalam pembuatan makanan fermentasi. Rahayu (2003: 80) melaporkan bahwa *Lactobacillus plantarum* merupakan salah satu bakteri asam laktat yang memiliki

peran penting dalam pembuatan tape ketan. Menurut Rahayu *dkk.* (2011: 401), *Lactobacillus plantarum* berperan sebagai probiotik potensial. *Lactobacillus plantarum* berperan dengan cara menghambat pertumbuhan patogen, seperti *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella typhi* (Rahayu *dkk.* 2011: 402). Menurut penelitian Tran *dkk.* (2011: 344), *Lactobacillus plantarum* juga diketahui memiliki kemampuan menghasilkan asam kuat dalam proses fermentasi.

Isolat R24, S23, dan DH7 yang teridentifikasi sebagai *Pediococcus acidilactici*, berasal dari sumber yang berbeda. Isolat R24, S23, dan DH7 merupakan isolat yang berturut-turut berasal dari fermentasi biji kakao, bekasam daging sapi, dan dadih. Berbagai penelitian juga telah melaporkan peranan *Pediococcus acidilactici* dalam pembuatan berbagai produk pangan fermentasi. Penelitian Kostinek *dkk.* (2008: 10) melaporkan bahwa *Pediococcus acidilactici* berperan penting dalam proses fermentasi kakao di Nigeria. Yahya *dkk.* (1997: 116) juga melaporkan bahwa *Pediococcus acidilactici* memiliki peran penting dalam pembuatan bekasam dari ikan Mujair (*Tilapia mossambica*). Rahayu (2003: 80) juga melaporkan bahwa *Pediococcus acidilactici* berperan dalam pembuatan pakasam yang berasal dari ikan Gabus (*Ophiocephalus striatus*) dan ikan Sepat Siam (*Trichogaster pectoralis*). *Pediococcus acidilactici* diketahui dapat memproduksi laktat dan tidak menghasilkan gas dari metabolisme glukosa pada proses fermentasi (Kostinek *dkk.* 2008: 5).

Isolat DS13, Hb3, LK14 dan GR3 diidentifikasi sebagai *Pediococcus pentosaceus*. Isolat DS13, Hb3, LK14 dan GR3 berasal dari berbagai sumber yang berbeda. Isolat DS13, GR3, dan HB3 diketahui berturut-turut berasal dari dadih, fermentasi biji kakao, dan kotoran luwak. *Pediococcus pentosaceus* merupakan mikrobiota yang terdapat pada saluran gastrointestinal hewan, seperti luwak. Hal tersebut sesuai dengan penjelasan Toomey *dkk.* (2010: 127) yang menerangkan bahwa bakteri asam laktat merupakan mikrobiota dalam saluran gastrointestinal manusia dan hewan, serta dapat ditemukan pada makanan seperti daging, susu, dan keju.

Isolat DH1 dan R31 diidentifikasi sebagai *Lactobacillus fermentum*. Isolat DH1 merupakan isolat yang berasal dari dadih, sedangkan isolat R31 berasal dari fermentasi biji kakao. Selain terdapat pada dadih dan fermentasi biji kakao,

Lactobacillus plantarum diketahui berperan dalam mengatur aktivitas antimikroba dalam proses pembuatan keju (Heller *dkk.* 2008: 259).

4.2.6 Analisis keragaman genetik bakteri asam laktat

Keragaman genetik bakteri asam laktat dilakukan dengan cara menganalisis gen 16S rRNA. Menurut Beumer & Robinson (2005: 8301), gen 16S rRNA banyak digunakan untuk konstruksi pohon filogenetik. Gen 16S rRNA pada bakteri memiliki tingkat *similarity* yang tinggi karena terdapat pada semua Prokariot. Gen 16S rRNA juga tidak mengalami mekanisme *horizontal gene transfer*. Beberapa alasan tersebut yang membuat gen 16S rRNA dipilih untuk digunakan untuk konstruksi pohon filogenetik.

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA merupakan primer yang digunakan pula pada penelitian Chao *dkk.* Menurut Chao *dkk.* (2008: 136), primer 8F akan mengamplifikasi gen 16S rRNA pada posisi 8—27, sedangkan primer 15R akan mengamplifikasi gen 16S rRNA pada posisi 1541—1522. Kedua primer tersebut dapat digunakan untuk mengamplifikasi *full length* dari gen 16S rRNA.

Hasil identifikasi dengan PCR menunjukkan bahwa gen 16S rRNA telah berhasil diamplifikasi. Analisis data hasil DNA *sequencing* dari gen 16S rRNA yang berasal dari isolat bakteri asam laktat kemudian dikumpulkan dengan data dari GenBank. Hasil analisis tersebut berupa konstruksi pohon filogenetik. Pohon filogenetik pada Gambar 4.1.7 menjelaskan bahwa bakteri asam laktat yang resistan terhadap *chloramphenicol* dan *erythromycin* memiliki kekerabatan yang dekat. Hal tersebut dapat dilihat dari tingginya nilai *bootstrap*, yaitu 990—1000. Menurut Mount (2001: 278), analisis *bootstrap* akan menunjukkan kekerabatan yang dekat apabila memiliki nilai yang tinggi, yaitu lebih dari 70% atau di atas nilai 700.

Pohon filogenetik membentuk tiga *cluster* berdasarkan hubungan kekerabatan di antara isolat. *Cluster* pertama menjelaskan bahwa isolat D2, S12, S34, T3, dan T8 memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Lactobacillus plantarum* IMAU 10258 (Zhang 2009, data *unpublished*). Berdasarkan pohon

filogenetik pada gambar 4.1.7, nilai *bootstrap* di antara isolat D2, S12, S34, T3, dan T8 menunjukkan skor yang tinggi yaitu sebesar 1000. Nilai 1000 membuktikan bahwa di antara isolat memiliki kekerabatan yang dekat.

Hubungan kekerabatan yang dekat di antara isolat dapat dipengaruhi oleh asal sumber isolat. Isolat D2, S12, dan S34 merupakan isolat yang sama-sama berasal dari fermentasi daging. Hasil yang sama juga ditemukan pada penelitian Yahya *dkk.* (1997: 116), yang membuktikan bahwa *Lactobacillus plantarum* dapat ditemukan pada bekasam. Isolat T3 dan T8 merupakan isolat yang berasal dari sumber yang sama, yaitu tape ketan. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Rahayu (2003: 77) yang melaporkan bahwa *Lactobacillus plantarum* dapat ditemukan pada tape ketan.

Isolat T3 dan T8 memiliki kemampuan resistansi yang sama terhadap *chloramphenicol* (3 µg/ml). Hal tersebut membuktikan bahwa kedua isolat selain memiliki kekerabatan yang dekat, juga memiliki kemampuan resistansi yang sama terhadap *chloramphenicol*. Namun, kemampuan resistansi terhadap *erythromycin* serta terhadap kombinasi kedua antibiotik pada medium MRS agar menunjukkan perbedaan. Isolat T8 memiliki kemampuan resistansi lebih tinggi dibandingkan isolat T3. Kedua isolat T3 dan T8 kemungkinan merupakan dua strain yang berbeda, meskipun berasal dari sumber yang sama dan teridentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum*. Perbedaan kemampuan resistansi pada jenis yang sama, tetapi berbeda strain dapat dilihat pada penelitian Pan *dkk.* (2011: 1319).

Pan *dkk.* (2011: 1319) menjelaskan bahwa *Lactobacillus plantarum* SHC 062 memiliki kemampuan resistansi terhadap *chloramphenicol* yang sama dengan *Lactobacillus plantarum* SHC096. Namun, kemampuan resistansi terhadap *erythromycin* dari kedua bakteri tersebut menunjukkan perbedaan. *Lactobacillus plantarum* SHC 062 memiliki kemampuan resistansi yang lebih tinggi dibandingkan dengan *Lactobacillus plantarum* SHC096.

Cluster kedua menjelaskan bahwa isolat LK14, S23, R24, DH7, DS13, GR3, HB3 memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Pediococcus pentosaceus* strain LAB6 dan *Pediococcus acidilactici* DSM 20284. Nilai *bootstrap* di antara isolat menunjukkan skor yang tinggi yaitu sebesar 990. Isolat GR3, HB3, dan DS13 memiliki hubungan kekerabatan paling dekat dibandingkan dengan isolat

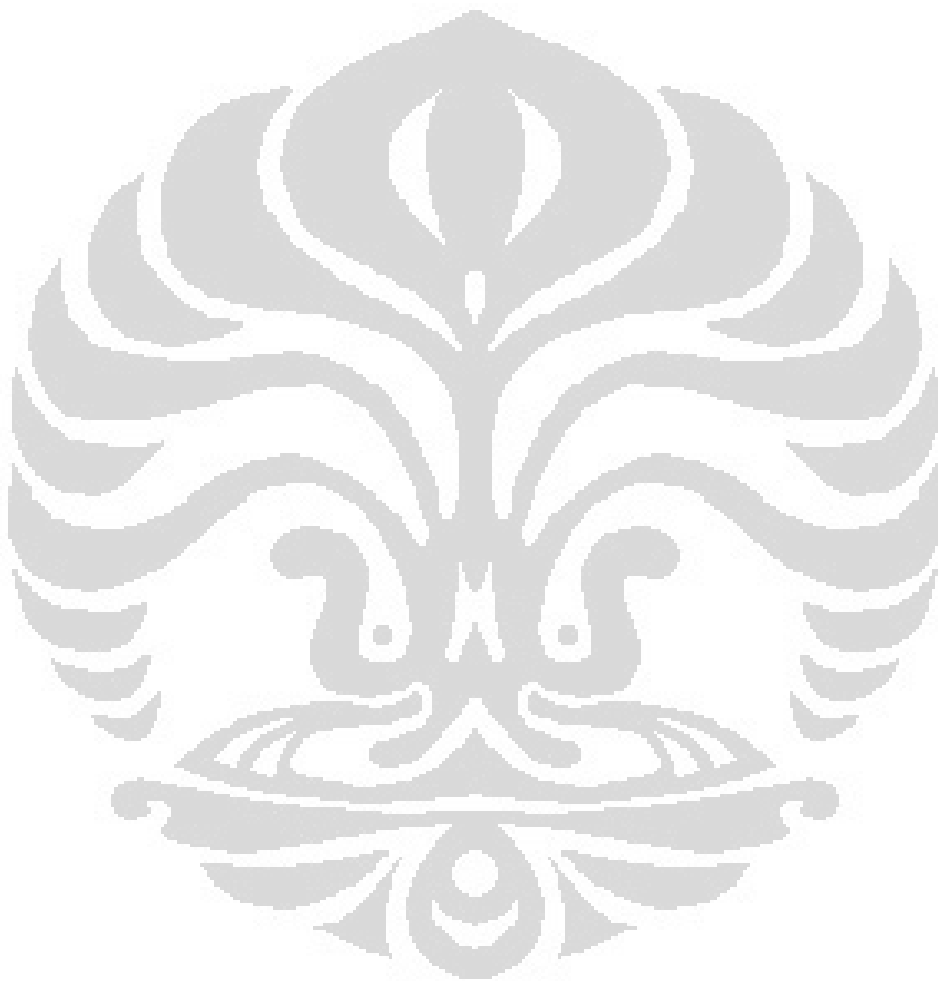
LH14, S23, R24, dan DH7. Hal tersebut dibuktikan dengan nilai *bootstrap* di antara isolat menunjukkan skor 1000. *Pediococcus pentosaceus* strain LAB6 merupakan isolat yang berasal dari Malaysia (Ramasamy 2011, data *unpublished*), sedangkan *Pediococcus acidilactici* DSM 20284 merupakan isolat yang berasal dari Amerika Serikat. Berdasarkan hasil penelitian Heinz *dkk.* (2000: 946), *Pediococcus acidilactici* DSM 20284 diketahui merupakan bakteri Gram positif yang memiliki kemampuan multiresistan terhadap antibiotik.

Cluster ketiga menjelaskan bahwa isolat R31 dan DH1 memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Lactobacillus fermentum* strain CIP102980 yang merupakan isolat Perancis (Yarza 2011, data *unpublished*). Nilai *bootstrap* di antara isolat tersebut menunjukkan skor nilai yang tinggi yaitu 1000. Hal tersebut membuktikan bahwa di antara isolat memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat. Hasil analisis pohon filogenetik menunjukkan kesesuaian dengan hasil identifikasi dengan program BLAST. Hasil identifikasi program BLAST menunjukkan bahwa isolat DH1 dan R31 memiliki nilai *identity* yang tinggi berturut-turut, yaitu 98% dan 99%.

Isolat DH1 diketahui berasal dari produk fermentasi dadih, sedangkan isolat R31 berasal dari fermentasi biji Kakao. Hal tersebut membuktikan bahwa kedua isolat yang teridentifikasi sebagai *Lactobacillus fermentum*, diketahui dapat berperan penting dalam pembuatan makanan fermentasi. Penelitian Heller *dkk.* (2008: 259), menjelaskan bahwa *Lactobacillus fermentum* ME-3 berperan dalam mengatur aktivitas antimikrobia dan antioksidatif pada proses pembuatan keju. Penelitian Surh *dkk.* (2008: 338) juga menyatakan bahwa *Lactobacillus fermentum* yang diisolasi dari Kimchi diketahui dapat menekan aktivitas antimutagen.

Lactobacillus fermentum merupakan bakteri asam laktat yang termasuk dalam kelompok *heterofermentative* (Tanasupawat dan Visessanguan 2008: 499). Menurut Jay *dkk.* (2005: 153), bakteri asam laktat yang diklasifikasikan ke dalam kelompok *heterofermentative* merupakan bakteri yang mampu menghasilkan laktat, karbon dioksida, dan etanol dalam jumlah yang relatif sama. Kelompok *heterofermentative* juga berperan dalam memengaruhi aroma dan rasa dari makanan hasil fermentasi.

Kemampuan resistansi isolat DH1 dan R31 terhadap *chloramphenicol* menunjukkan perbedaan. Isolat DH1 memiliki kemampuan resistansi lebih tinggi dibandingkan dengan isolat R31. Perbedaan kemampuan resistansi tersebut dapat dipengaruhi oleh perbedaan sumber isolat. Menurut Ammor *dkk.* (2007: 561), kemampuan resistansi terhadap antibiotik di antara bakteri dapat dipengaruhi oleh perbedaan lingkungan hidup bakteri tersebut.



BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Isolat DH1, DH7, dan S34 memiliki sifat resistansi tertinggi terhadap *chloramphenicol*, karena masih dapat tumbuh pada media MRS agar yang mengandung *chloramphenicol* sebesar 5 µg/ml.
2. Isolat T8 memiliki sifat resistansi tertinggi terhadap *erythromycin*, karena masih dapat tumbuh pada media MRS agar yang mengandung *erythromycin* sebesar 15 µg/ml.
3. Isolat D2, S23, dan T8 masih resistan terhadap kombinasi *chloramphenicol* dan *erythromycin* dengan konsentrasi 1 µg/ml.
4. Pohon filogenetik dan hasil BLAST menunjukkan bahwa isolat bakteri asam laktat yang resistan terhadap *chloramphenicol* dan *erythromycin* memiliki kekerabatan yang dekat di antara isolat.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan deteksi gen resistan *chloramphenicol* dan *erythromycin* pada D2, DH1, DH7, S23, S34, dan T8 isolat sehingga diketahui letak, jenis, serta ukuran dari gen tersebut.

DAFTAR REFERENSI

- Aiyar, A. 2000. The use of clustal w and clustal x for multiple sequence alignment. *Dalam: Misener, S. & S.S. Krawetz. (eds.). 2000. Bioinformatics: Methods and protocols. Humana Press, Inc., New Jersey: xi + 500 hlm.*
- Albano, H., C.A. van Reenen, S.D. Todorov, D. Cruz, L. Fraga, T. Hogg, L.M.T. Dicks, & P. Teixeira. 2009. Phenotypic and genetic heterogeneity of lactic acid bacteria isolated from “alheira”, a traditional fermented sausage produced in Portugal. *Meat science* **82**: 389—398.
- Ammor, M.S., A.B. Florez, & B. Mayo. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and *Bifidobacteria*. *Food microbiology* **24**: 559—570.
- Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. *Dalam: Salminen, S., A. Wright, & A. Ouwehand. (eds.). 2004. Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. Marcel Dekker, Inc., New York: xiii + 610 hlm.*
- Babic, M. & R.A. Bonomo. 2009. Mutations as a basis of antimicrobial. *Dalam: Mayers, D.L., S.A. Lerner, M. Ouellette, & J.D. Sobel (eds.). 2009. Antimicrobial drug resistance: Mechanisms of drug resistance. Humana Press, Inc., New York: xxvi + 678 hlm.*
- Ballongue, J. 2004. *Bifidobacteria* and probiotic action. *Dalam: Salminen, S., A. Wright, & A. Ouwehand (eds.). 2004. Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. 3rd ed. Marcel Dekker, Inc, New York: xiii + 610 hlm.*
- Bedell, J., I. Korf, & M. Yandell. 2003. *Blast*. O'Reilly & Associates, Inc., Sebastopol: 312 hlm.
- Berthier, F., M. Zagorec, M. Champomier-Vesges, S.D. Ehrlich, & F. Morel-Deville. 1996. Efficient transformation of *Lactobacillus sake* by electroporation. *Microbiology* **142**: 1273—1279.

- Beumer, A. & J.B. Robinson. 2005. A broad-host-range, generalized transducing phage (SN-T) acquires 16S rRNA genes from different genera of bacteria. *Applied and environmental microbiology* **71**(12): 8301—8304.
- Botsoglou, N.A. & D.J. Fletouris. 2001. *Drug residues in foods: Pharmacology, food safety, and analysis*. Marcel Dekker, Inc., New York: xvi + 1154 hlm.
- Brehm-Stecher, B. & E. Johnson. 2003. *Electron micrograph of the meat spoilage bacterium Lactobacillus sake*. 1 hlm.
<http://archive.microbelibrary.org/ASMOnly/Details.asp?ID=1471>: 27
September 2011. pk. 23.00 WIB.
- Brock, T.D. & M.T. Madigan. 1991. *Biology of microorganisms*. 6th ed. Prentice-Hall, Inc., New Jersey: xix + 874 hlm.
- Burchard, R.P. & J.H. Parish. 1975. Chloramphenicol resistance in *Myxococcus xanthus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **7**(3): 233—238.
- Chao, S., R. Wu, K. Watanabe, & Y. Tsai. 2009. Diversity of lactic acid bacteria in suan-tsai and fu-tsai, traditional fermented mustard products of Taiwan. *International journal of food microbiology* **135**: 203—210.
- Chao, S., Y. Tomii, K. Watanabe, & Y. Tsai. 2008. Diversity of lactic acid bacteria in fermented brines used to make stinky tofu. *International journal of food microbiology* **123**: 134—141.
- Collado, M.C., I. Surono, J. Meriluoto, & S. Salminen. 2007. Indigenous dadih lactic acid bacteria: Cell surface properties and interactions with pathogens. *Food microbiology and safety* **72**(3): 89—93.
- D'Aimmo, M.R., M. Modesto, & B. Biavati. 2007. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International journal of food microbiology* **115**(1): 35—42.
- Dale, J.W. & S.F. Park. 2004. *Molecular genetics of bacteria*. 4th ed. John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex: xiii + 346 hlm.
- Dang, H., J. Zhao, L. Song, M. Chen, & Y. Chang. 2009. Molecular characterizations of chloramphenicol- and oxytetracycline- resistant bacteria and resistance genes in mariculture waters of China. *Marine pollution bulletin* **58**: 987—994.

- Desmond, C., R.P. Ross, G. Fitzgerald, & C. Stanton. 2005. Sequence analysis of the plasmid genome of the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* NFBC338 which includes the plasmids pCD01 and pCD02. *Plasmid*: 160—175.
- Eguchi, T., K. Doi, K. Nishiyama, S. Ohmomo, & S. Ogata. 2000. Characterization of a phage resistance plasmid, pLKS, of silage-making *Lactobacillus plantarum* NGRI0101. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* **64**(4): 751—756.
- Elrod, S.L. & W.D. Stansfield. 2002. *Schaum's outlines: Teori dan soal-soal genetika*. 4th ed. terj. dari *Schaum's outlines of teory and problems of genetics*. 4th ed., oleh D. Tyas. Erlangga, Jakarta: viii + 328 hlm.
- Fons, M., T.Hege, M. Ladire, P. Raibaud, R. Ducluzeau, & E. Maguin. 1997. Isolation and characterization of a plasmid from *Lactobacillus fermentum* conferring erythromycin resistance. *Plasmid* **37**: 199—203.
- Garrod, L.P. 1957. The erythromycin group of antibiotics. *British medical journal*: 57—63.
- Guilfoile, P. 2007. *Antibiotic resistant bacteria*. Chelsea House, New York: 128 hlm.
- Hall, T. 2007. *BioEdit v7.0.9*. 2 hlm.
<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>: 5 September 2011. pk. 07.21 WIB.
- Heelan, J.S., M.E. Hasenbein, & A.J. McAdam. 2004. Resistance of group B *Streptococcus* to selected antibiotics, including erythromycin and clindamycin. *Journal of clinical microbiology* **42**(3): 1263—1254.
- Heinz, M., F. von Wintzingerode, A. Moter, E. Halle, H. Lohbrunner, U. Kaisers, P. Neuhaus, & E. Halle. 2000. A case of septicemia with *Pediococcus acidilactici* after long term antibiotic treatment. *European journal of clinical microbiology and infectious diseases* **19**: 946—948.
- Heller, K.J., W. Bockelmann, J. Schrezenmeir, & M. deVrese. 2008. Cheese and its potential as a probiotic food. *Dalam*: Farnworth, E.R. (ed.). 2008. *Handbook of fermented functional foods*. 2nd ed. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton: xviii + 581 hlm.

- Helmark, S., M.E. Hansen, B. Jelle, K.I. Sorensen, & P.R. Jensen. 2004. Transformation of *Leuconostoc carnosum* 4010 and evidence for natural competence of the organism. *Applied and environmental microbiology* **70**(6): 3695—3699.
- Heritage, J. 2006. *Antimicrobial chemotherapy*. 1 hlm. <http://www.bmb.leeds.ac.uk/mbiology/ug/ugteach/icu8/antibiotics/protein.html>: 7 Agustus 2011. pk. 22.54 WIB.
- Hogg, S. 2005. *Essential microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex: xii + 468 hlm.
- Hutkins, R. 2011. *Streptococcus thermophilus* LMD-9. 1 hlm. <http://genome.jgi-psf.org/strth/strth.home.html>: 24 November 2011. pk. 10.50 WIB.
- Ibrahim, L. 2008. Produksi susu, reproduksi, dan manajemen kerbau perah di Sumatera Barat. *Jurnal Peternakan* **5**(1): 1—9.
- Jay, J.M., M.J. Loessner, & D.A. Golden. 2005. *Modern food microbiology*. 7th ed. Springer, New York: xx + 790 hlm.
- Johansen, E. 2003. Challenges when transferring technology from *Lactococcus* laboratory strains to industrial strains. 5 hlm. http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2003/vol1-2/sim0006_abstract.htm: 19 Desember 2011. pk. 04.30 WIB.
- Kostinek, M., L. Ban-Koffi, M. Ottah-Atikpo, D. Teniola, U. Schillinger, W.H. Holzapfel, & C.M.A.P. Franz. 2008. Diversity of predominant lactic acid bacteria associated with cocoa fermentation in Nigeria. *Current Microbiology* **56**(4): 306—314.
- Lee, J., J.S. Halgerson, J. Kim, & D.J. O'Sullivan. 2007. Comparative sequence analysis of plasmids from *Lactobacillus delbrueckii* and construction of a shuttle cloning vector. *Applied and environmental microbiology* **73**(14): 4417—4424.
- Liu, C., Z. Zhang, K. Dong, J. Yuan, & X. Guo. 2009. Antibiotic Resistance of Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria Isolated from Marketed Foods and Drugs. *Biomedical and environmental sciences* **22**: 401—412.
- Lodge, J., P. Lund, & S. Minchin. 2007. *Gene cloning: Principles and applications*. Taylor & Francis Group, New York: ix +460 hlm.

- Long, K.S. & B.T. Porse. 2003. A conserved chloramphenicol binding site at the entrance to the ribosomal peptide exit tunnel. *Nucleic acids research* **31**(24): 7208—7215.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, & J. Parker. 2000. *Brock: Biology of microorganisms*. 9th ed. Prentice Hall, New Jersey: xix + 991 hlm.
- Mechanisms in medicine. 2011. *Macrolides: Mechanisms of action and resistance*. 4 hlm. <http://www.mechanismsinmedicine.com>: 25 November 2011. pk.09.00 WIB.
- Miles, A.A., S.S. Misra, & J.O. Irwin. 1938. The estimation of the bacterial power of the blood. *The journal of hygiene* **38**(6): 732—749.
- Molecular Cell Biology Vrije Universiteit Amsterdam. 2002. *Miniprep of bacterial genomic DNA*. 3 hlm. http://www.bio.vu.nl/geomicrob/protocols/DNA_isolation/DNA-isol-Bacteria.pdf: 12 Oktober 2011. pk. 07.18 WIB.
- Morelli, L., F.K. Vogensen, & A.V. Wright. 2004. Genetics of lactic acid bacteria. *Dalam: Salminen, S., A. Wright, & A. Ouwehand (eds.). 2004. Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects*. 3rd ed. Marcel Dekker, Inc, New York: xiii + 610 hlm.
- Mount, D.W. 2001. *Bioinformatics: Sequence and genome analysis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xii + 564 hlm.
- Muladno. 2010. *Teknologi rekayasa genetika*. 2nd ed. IPB Press, Bogor: ix + 130 hlm.
- Mustopa, A.Z., R. Balia, W.S. Putranto, M. Ridwan, & M. Solehudin. 2010. Penapisan bakteri asam laktat yang diisolasi dari bekasam daging sapi dalam menghasilkan bakteriosin untuk menghambat bakteri patogen. *Seminar nasional fakultas peternakan Universitas Padjajaran ke-2*: 679—685.
- Normark, B.H. & S. Normark. 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of internal medicine* **252**: 91—106.
- Oxoid. 2010. *MRS Broth (De Man, Rogosa, Sharpe)*. 1 hlm. http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0359&org=133&c=UK&lang=EN: 26 September 2011, pk. 02.45 WIB.

- Pan, L., X. Hu, & X. Wang. 2011. Assessment of antibiotic resistance of lactic acid bacteria in Chinese fermented foods. *Food control* **22**: 1316—1321.
- Pearson education. 2011. *Concept 2: Transcription and translation in cells*. 1 hlm. http://www.phschool.com/science/biology_place/biocoach/transcription/tctlpreu.html: 25 November 2011, pk. 07.00 WIB.
- Promega. 2010. *Technical bulletin: Wizard SV gel and PCR clean-up system instruction for use of products A9280, A9281, A9282, and A9285*. Promega Corporation, Madison: 12 hlm.
- Putri, S.F. 2011. Isolasi dan purifikasi inhibitor RNA *Helikase* virus Hepatitis C dari bakteriosin bakteri asam laktat S34. Skripsi-S1. Departemen Biokimia, FMIPA-IPB, Bogor: x + 24 hlm.
- Rahayu, E.S. 2003. Lactic acid bacteria in fermented foods of Indonesian origin. *Agritech* **23**(2): 75—84.
- Rahayu, E.S., A. Yogeswara, T. Utami, & Suparmo. 2011. Indigenous probiotic strains of Indonesia and their application for fermented food. *The 12th ASEAN food conference 2011*: 400—404.
- Rice, G. 2006. *Modern genomics: How to identify microbial species*. 1 hlm. http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/genomics/modgen.html: 24 November 2011. pk. 05.20 WIB.
- Roberts, M.C. & S. Schwarz. 2009. Tetracycline and chloramphenicol resistance mechanisms. *Dalam*: Mayer, D.L., S.A. Lerner, M. Ouellette, J.D. Sobel. (ed.). 2009. *Antimicrobial drug resistance: Mechanisms of drug resistance*. Humana Press, Inc., New York: xxvi + 678 hlm.
- Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001a. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Vol 1. 3rd ed. Coldspring Harbor Laboratory Press, New York: xxv — 7.94 + I.44 hlm.
- Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001b. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Vol 1. 3rd ed. Coldspring Harbor Laboratory Press, New York: 14.53 + I.44 hlm.
- Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001c. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Vol 1. 3rd ed. Coldspring Harbor Laboratory Press, New York: 18.136 + I.44 hlm.

- Shaw, W.V., D.G. Brenner, S.F.J. LeGrice, S.E. Skinner, & A.R. Hawkins. 1985. Chloramphenicol acetyltransferase gene of *Staphylococcal* plasmid pC221: Nucleotide sequence analysis and expression studies. *Federation of european biochemical societies letters* **179**(1): 101—106.
- Sujaya, I.N., K.A. Nocianitri, & K. Asano. 2010. Diversity of bacterial flora of Indonesian ragi tape and their dynamics during the tape fermentation as determined by PCR-DGGE. *International food research journal* **17**: 239—245.
- Surh, J., Y.L. Kim, & H. Kwon . 2008. Korean fermented foods. *Dalam*: Farnworth, E.R. (ed.). 2008. *Handbook of fermented functional foods*. 2nd ed. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton: xviii + 581 hlm.
- Surono, I.S., M.C. Collado, S. Salminen, & J. Meriluoto. 2008. Effect of glucose and incubation temperature on metabolically active *Lactobacillus plantarum* from dadih in removing microcystin-LR. *Food and chemical toxicology* **48**: 502—507.
- Tanasupawat, S. & W. Visessanguan. 2008. Microorganisms and their health benefits. *Dalam*: Farnworth, E.R. (ed.). 2008. *Handbook of fermented functional foods*. 2nd ed. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton: xviii + 581 hlm.
- Tang, P., K. Pike, A. Simor, S. Richardson, D.E. Low, & B.M. Willey. 2002. Investigation of *Staphylococcus aureus* with vitek-1 erythromycin-intermediate susceptibilities: Comparison with vitek-2 and phoenix. The interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy (ICAAC): 1—2.
- Teuber, M., F. Schwarz, & L. Meile. 2003. Antibiotic resistance and transfer in lactic acid bacteria. *Dalam*: Wood, B.J.B. & P.J. Warner. (eds.). 2003. *Genetics of lactic acid bacteria*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York: xviii + 394 hlm.
- Toomey, N., D. Bolton, & S. Fanning. 2010. Characterisation and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria isolated from Irish pork and beef abattoirs. *Research in microbiology* **161**: 127—135.

- Tran, K.T.M., B.K. May, P.M. Smooker, T.T.H. Van, & P.J. Coloe. 2011. Distribution and genetic diversity of lactic acid bacteria from traditional fermented sausage. *Food research international* **44**: 338—344.
- Usman, P. 2003. Potensi bakteri asam laktat yang diisolasi dari dadih untuk menurunkan resiko penyakit kanker. *Jurnal Natur Indonesia* **5**(2): 162—166.
- Vierstraete, A. 1999. *Principle of the PCR*. 7 hlm.
<http://users.ugent.be/~avierstr/index.html>: 26 September 2011, pk. 02.10 WIB.
- Yahya, D. Wibowo, & P. Darmadji. 1997. Karakteristik bakteri asam laktat dan perubahan kimia pada fermentasi bekasam ikan mujair (*Tilapia mossambica*). *Beasiswa pendidikan pascasarjana Universitas Gajah Mada*, **10**(1B): 105—118.
- Yuwono, T. 2005. *Biologi molekular*. Erlangga, Jakarta: xiii + 269 hlm.
- Yuwono, T. 2006. *Teori dan aplikasi polymerase chain reaction*. Penerbit ANDI, Yogyakarta: viii + 240 hlm.

Lampiran 1

Cara pembuatan larutan, *buffer*, serta medium

Larutan/ <i>buffer</i> / medium	Cara pembuatan	Sumber
MRS cair	MRS sebanyak 52 g dilarutkan dengan akuades sebanyak 1000 ml, kemudian ditambahkan sodium azide 0,02% sebanyak 1 ml. Semua komposisi bahan dicampurkan hingga homogen. Medium MRS kemudian disterilisasi pada suhu 121°C, 1 atm, selama 15 menit.	Oxoid (2010: 1)
MRS Agar	MRS sebanyak 52 g dan <i>bacteriological agar</i> sebanyak 15 g dilarutkan dengan akuades sebanyak 1000 ml, kemudian ditambahkan sodium azide 0,02% sebanyak 1 ml. Semua komposisi bahan dicampurkan hingga homogen. Medium MRS kemudian disterilisasi pada suhu 121°C, 1 atm, selama 15 menit.	Oxoid (2010: 1)
Lisozim 10 mg/ml	Lisozim bubuk dilarutkan dengan 10 mM Tris-Cl pH 8,0	Sambrook & Russell (2001c: A1.8)
Buffer TBE 10x	Tris base sebanyak 108 g, 55 g asam borat, dan 40 ml EDTA 0,5 M (pH 8,0) dilarutkan dengan akuades hingga volume mencapai 1.000 ml	Sambrook & Russell (2001c: A1.17)
SDS 10%	Sebanyak 10 g SDS ditambahkan akuades hingga volume 100 ml.	Sambrook & Russell (2001: A1.7)

Lanjutan

Buffer TBE 1x	TBE 10x sebanyak 100 ml ditambahkan akuades hingga volume 1000 ml.	Sambrook & Russell (2001c: A1.17)
Gel agarosa 1%	Sebanyak 1 g agarosa dilarutkan dalam 100 ml TBE 1x, lalu dipanaskan hingga mendidih dan homogen. Larutan dituang ke dalam cetakan gel yang telah dipasangkan <i>comb</i> (sisir) setelah suhu $\pm 60^{\circ}$ C. Setelah gel mengeras, <i>comb</i> diangkat sehingga terbentuk <i>well</i> (sumur). Gel diletakkan di dalam tangki elektroforesis yang telah berisi larutan TBE 1x.	Sambrook & Russell (2001c: A1.17)
10 x TE pH 8	Larutan 100 mM Tris-Cl pH 8 dilarutkan dengan 10 mM EDTA pH 8 dan diautoklaf selama 15 menit, 121°C, 1 atm.	Sambrook & Russell (2001: A1.7)
<i>Chloramphenicol</i> 10 mg/ml	<i>Chloramphenicol</i> sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan <i>ethanol</i> absolut sebanyak 10 ml hingga tercampur merata	Sambrook & Russell (2001a: 4.53)
<i>Ethanol</i> 70%	Ethanol absolut dengan volume 35 ml dilarutkan dengan akuabides steril dengan volume 15 ml.	Sambrook & Russell (2001a: 2.105)

Lanjutan

CTAB 10%	NaCl sebanyak 4.1 g dilarutkan dalam 80 ml akuades dan sedikit demi sedikit ditambahkan 10 g CTAB pada suhu 55°C hingga merata. Akuades kemudian ditambahkan hingga volume larutan menjadi 100 ml. Larutan diautoklaf selama 15 menit, 121°C, 1 atm.	Sambrook & Russell (2001a: 2.105)
<i>Chloramphenicol</i> 5 µg/ml	<i>Chloramphenicol</i> 10 mg/ml dengan volume 500 µl dilarutkan dengan <i>ethanol</i> absolut dengan volume 500 µl	Sambrook & Russell (2001a: 4.53)
<i>Chloramphenicol</i> 2 µg/ml	<i>Chloramphenicol</i> 10 mg/ml dengan volume 200 µl dilarutkan dengan <i>ethanol</i> absolut dengan volume 800 µl	Sambrook & Russell (2001a: 4.53)
<i>Erythromycin</i> 10 mg/ml	<i>Erythromycin</i> sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan <i>ethanol</i> absolut sebanyak 10 ml hingga tercampur merata	Sambrook & Russell (2001a: 4.53)
<i>Erythromycin</i> 5 µg/ml	<i>Erythromycin</i> 10 mg/ml dengan volume 500 µl dilarutkan dengan <i>ethanol</i> absolut dengan volume 500 µl	Sambrook & Russell (2001a: 4.53)
<i>Erythromycin</i> 1 µg/ml	<i>Erythromycin</i> 10 mg/ml dengan volume 100 µl dilarutkan dengan <i>ethanol</i> absolut dengan volume 900 µl	Sambrook & Russell (2001a: 4.53)

Lampiran 2

Data penapisan isolat pada *chloramphenicol* (2 µg/ml) dan *erythromycin* (1 µg/ml)

No	Isolat	Sumber	Kemampuan Resistansi	
			<i>Chloramphenicol</i> 2 µg/ml	<i>Erythromycin</i> 1 µg/ml
1	S1	Bekasam Sapi	+	-
2	S2	Bekasam Sapi	+	-
3	S3	Bekasam Sapi	-	-
4	S4	Bekasam Sapi	-	-
5	S5	Bekasam Sapi	-	-
6	S6	Bekasam Sapi	-	+
7	S7	Bekasam Sapi	-	-
8	S8	Bekasam Sapi	-	-
9	S9	Bekasam Sapi	-	-
10	S10	Bekasam Sapi	-	-
11	S11	Bekasam Sapi	+	-
12	S12	Bekasam Sapi	+	-
13	S13	Bekasam Sapi	-	-
14	S14	Bekasam Sapi	-	-
15	S15	Bekasam Sapi	-	-
16	S16	Bekasam Sapi	-	-
17	S17	Bekasam Sapi	+	-
18	S18	Bekasam Sapi	+	-
19	S19	Bekasam Sapi	-	-
20	S20	Bekasam Sapi	-	-
21	S21	Bekasam Sapi	+	-
22	S22	Bekasam Sapi	-	-
23	S23	Bekasam Sapi	+	+
24	S24	Bekasam Sapi	-	-
25	S25	Bekasam Sapi	-	-
26	S26	Bekasam Sapi	+	-
27	S27	Bekasam Sapi	+	-
28	S28	Bekasam Sapi	-	-
29	S29	Bekasam Sapi	+	-
30	S30	Bekasam Sapi	-	-
31	S31	Bekasam Sapi	-	-
32	S32	Bekasam Sapi	+	-
33	S33	Bekasam Sapi	-	-
34	S34	Bekasam Sapi	+	-
35	D2	Bekasam Domba	+	+
36	GR2	Fermentasi Biji Kakao	-	-
37	GR3	Fermentasi Biji Kakao	+	-
38	GR32	Fermentasi Biji Kakao	-	-

Lanjutan

39	HB2	Fermentasi Biji Kakao	-	
40	HB3	Fermentasi Biji Kakao	+	-
41	R24	Fermentasi Biji Kakao	+	-
42	R31	Fermentasi Biji Kakao	+	+
43	DH1	Dadiah	+	-
44	DH2	Dadiah	-	-
45	DH3	Dadiah	+	-
46	DH4	Dadiah	-	-
47	DH5	Dadiah	-	-
48	DH6	Dadiah	-	-
49	DH7	Dadiah	+	-
50	DH8	Dadiah	-	-
51	DH9	Dadiah	-	-
52	DH10	Dadiah	-	-
53	DH11	Dadiah	-	-
54	DH12	Dadiah	-	-
55	DH13	Dadiah	-	-
56	DH14	Dadiah	-	-
57	DH15	Dadiah	-	-
58	DH16	Dadiah	-	-
59	DH17	Dadiah	+	-
60	DH18	Dadiah	-	-
61	DH19	Dadiah	-	-
62	DH20	Dadiah	-	-
63	DH21	Dadiah	-	-
64	DH22	Dadiah	-	-
65	DH23	Dadiah	-	-
66	DH24	Dadiah	-	-
67	DH25	Dadiah	-	-
68	DH26	Dadiah	-	-
69	DH27	Dadiah	-	-
70	DH28	Dadiah	-	-
71	DH29	Dadiah	-	-
72	DH30	Dadiah	+	-
73	DH31	Dadiah	-	-
74	DH32	Dadiah	-	-
75	DH33	Dadiah	-	-
76	DH34	Dadiah	-	-
77	DH35	Dadiah	-	-
78	DS1	Dadiah	+	-
79	DS2	Dadiah	-	-
80	DS3	Dadiah	-	-
81	DS4	Dadiah	-	-
82	DS5	Dadiah	+	+

Lanjutan

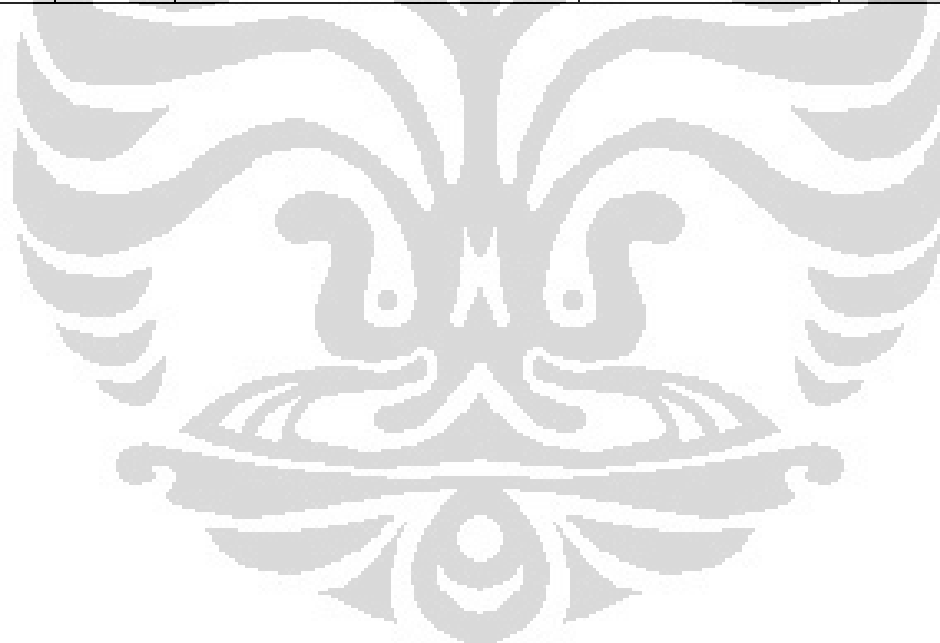
83	DS6	Dadih	+	-
84	DS7	Dadih	-	-
85	DS8	Dadih	+	-
86	DS9	Dadih	+	-
87	DS10	Dadih	+	-
88	DS11	Dadih	+	-
89	DS12	Dadih	+	-
90	DS13	Dadih	+	-
91	DS14	Dadih	+	-
92	DS15	Dadih	+	-
93	DS16	Dadih	-	-
94	DS17	Dadih	+	-
95	DS18	Dadih	+	-
96	DS19	Dadih	+	-
97	DS20	Dadih	+	-
98	DS21	Dadih	+	-
99	DS22	Dadih	+	-
100	DS23	Dadih	+	-
101	DS24	Dadih	+	-
102	DS25	Dadih	+	-
103	DS26	Dadih	+	+
104	DS27	Dadih	+	-
105	DS28	Dadih	+	-
106	DS29	Dadih	+	-
107	DS30	Dadih	+	-
108	AT1	Air Tape	-	-
109	AT2	Air Tape	+	-
110	AT3	Air Tape	-	-
111	AT4	Air Tape	-	-
112	AT5	Air Tape	-	-
113	AT6	Air Tape	-	-
114	AT7	Air Tape	-	-
115	AT8	Air Tape	-	+
116	AT9	Air Tape	-	-
117	AT10	Air Tape	-	-
118	T1	Tape	+	+
119	T2	Tape	+	+
120	T3	Tape	-	+
121	T4	Tape	-	+
122	T5	Tape	+	+
123	T6	Tape	-	+
124	T7	Tape	-	+
125	T8	Tape	+	+
126	T10	Tape	-	-

Lanjutan

127	LK1	Kotoran Luwak	-	-
128	LK2	Kotoran Luwak	-	-
129	LK3	Kotoran Luwak	-	-
130	LK4	Kotoran Luwak	-	-
131	LK5	Kotoran Luwak	-	-
132	LK6	Kotoran Luwak	-	-
133	LK7	Kotoran Luwak	-	-
134	LK8	Kotoran Luwak	-	-
135	LK9	Kotoran Luwak	-	-
136	LK10	Kotoran Luwak	+	-
137	LK11	Kotoran Luwak	-	-
138	LK12	Kotoran Luwak	-	-
139	LK13	Kotoran Luwak	-	-
140	LK14	Kotoran Luwak	+	-
141	LK15	Kotoran Luwak	+	-
142	LK16	Kotoran Luwak	-	-
143	LK17	Kotoran Luwak	-	-
144	LK18	Kotoran Luwak	-	-
145	LK19	Kotoran Luwak	-	-
146	LK20	Kotoran Luwak	+	-
147	LK21	Kotoran Luwak	-	-
148	LK22	Kotoran Luwak	-	-
149	LK23	Kotoran Luwak	-	-
150	LK24	Kotoran Luwak	-	-
151	LK25	Kotoran Luwak	-	-
152	LK26	Kotoran Luwak	-	-
153	LK27	Kotoran Luwak	-	-
154	LK28	Kotoran Luwak	-	-
155	LK29	Kotoran Luwak	-	-
156	LK30	Kotoran Luwak	-	-
157	LK31	Kotoran Luwak	-	-
158	LK32	Kotoran Luwak	-	-
159	LK33	Kotoran Luwak	-	-
160	LK34	Kotoran Luwak	-	-
161	LK35	Kotoran Luwak	-	-
162	LK36	Kotoran Luwak	-	-
163	LK37	Kotoran Luwak	-	-
164	LK38	Kotoran Luwak	-	+
165	LK39	Kotoran Luwak	-	-
166	LK40	Kotoran Luwak	-	-
167	LK41	Kotoran Luwak	-	-
168	LK42	Kotoran Luwak	-	-
169	LK43	Kotoran Luwak	-	-
170	LK44	Kotoran Luwak	-	-

Lanjutan

171	LK45	Kotoran Luwak	-	-
172	LK46	Kotoran Luwak	-	-
173	LK47	Kotoran Luwak	-	-
174	LK48	Kotoran Luwak	-	-
175	LK49	Kotoran Luwak	+	-
176	LK50	Kotoran Luwak	+	+
177	LK51	Kotoran Luwak	-	-
178	LK52	Kotoran Luwak	-	-
179	LK53	Kotoran Luwak	-	-
180	LK54	Kotoran Luwak	-	-
181	LK55	Kotoran Luwak	-	-
182	LK56	Kotoran Luwak	-	-
183	LK57	Kotoran Luwak	-	-
184	LK58	Kotoran Luwak	-	-
185	LK59	Kotoran Luwak	-	-
186	LK60	Kotoran Luwak	-	-
187	LK61	Kotoran Luwak	-	+



Lampiran 3

Penapisan pada *chloramphenicol*, *erythromycin*, dan kombinasi kedua antibiotik (5 µg/ml)

No	Isolat	Konsentrasi <i>chloramphenicol</i> (µg/ml)					Konsentrasi <i>erythromycin</i> (µg/ml)					Konsentrasi kombinasi <i>chloramphenicol</i> dan <i>erythromycin</i> (µg/ml)				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	D2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
2	S23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
3	T3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
4	T8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
5	DH1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	DH7	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	DS13	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	GR3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	HB3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	LK14	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	R24	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	R31	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	S12	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	S34	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Lampiran 4

Penghitungan jumlah koloni dari isolat T3

Jumlah koloni terhitung = 87 koloni

Faktor pengenceran = 10^{-8}

Volume inokulasi = 0,1 ml

Jumlah koloni isolat T3 (cfu/ml) = $\frac{\text{jumlah koloni terhitung}}{\text{faktor pengenceran} \times \text{volume inokulasi}}$

$$\begin{aligned} \text{Jumlah koloni isolat T3 (cfu/ml)} &= \frac{87}{10^{-8} \times 0,1 \text{ ml}} \\ &= 8,70 \times 10^{10} \text{ cfu/ml} \end{aligned}$$

Lampiran 5

Hasil uji resistansi isolat bakteri asam laktat terhadap berbagai konsentrasi *chloramphenicol* pada medium agar

No	Isolat	Jumlah isolat pada berbagai konsentrasi <i>chloramphenicol</i> (cfu/ml)											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8			
		$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
1	D2	(2,65—2,69) x 10 ¹²	(1,62—2,58) x 10 ¹¹	(2,16—2,58) x 10 ¹⁰	(1,82—1,93) x 10 ⁸	0	0	0	0	0	0	0	0
2	DH1	(1,00—1,90) x 10 ¹¹	(0,40—2,00) x 10 ¹⁰	(0,45—1,11) x 10 ⁹	(1,10—1,11) x 10 ⁸	(2,28—2,30) x 10 ⁷	(5,60—6,20) x 10 ⁶	0	0	0	0	0	0
3	DH7	(1,10—2,80) x 10 ¹¹	(1,90—2,80) x 10 ¹⁰	(2,29—2,39) x 10 ⁹	(0,72—2,40) x 10 ⁸	(3,22—3,28) x 10 ⁷	(0,58—8,30) x 10 ⁶	0	0	0	0	0	0
4	DS13	(5,10—6,50) x 10 ¹¹	(3,2—4,80) x 10 ¹⁰	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	GR3	(2,70—3,27) x 10 ¹²	(4,00—4,80) x 10 ¹¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	HB3	(1,60—4,27) x 10 ¹¹	(1,14—1,20) x 10 ¹⁰	(1,65—2,10) x 10 ⁹	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	LK14	(2,30—3,20) x 10 ¹¹	(4,50—5,80) x 10 ¹⁰	(1,95—2,00) x 10 ⁹	(1,90—2,00) x 10 ⁸	(6,50—8,50) x 10 ⁷	0	0	0	0	0	0	0
8	R24	(1,17—2,18) x 10 ¹²	(1,12—2,19) x 10 ¹¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	R31	(1,95—2,46) x 10 ¹²	(3,22—4,13) x 10 ¹¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	S12	(2,10—3,24) x 10 ¹¹	(1,14—1,19) x 10 ¹¹	(2,54—3,03) x 10 ¹⁰	(1,44—2,43) x 10 ⁸	(5,00—5,40) x 10 ⁷	0	0	0	0	0	0	0
11	S23	(3,90—4,27) x 10 ¹²	(2,60—2,70) x 10 ¹⁰	(2,06—5,04) x 10 ⁹	(5,00—5,40) x 10 ⁸	(7,10—7,80) x 10 ⁷	0	0	0	0	0	0	0
12	S34	(0,65—1,00) x 10 ¹¹	(0,63—1,33) x 10 ¹⁰	(1,46—1,65) x 10 ⁹	(1,33—4,80) x 10 ⁸	(6,50—7,20) x 10 ⁷	(1,40—1,42) x 10 ⁷	0	0	0	0	0	0
13	T3	(8,70—9,00) x 10 ¹⁰	(1,80—1,84) x 10 ¹⁰	(2,58—3,14) x 10 ⁹	(2,50—3,10) x 10 ⁸	0	0	0	0	0	0	0	0
14	T8	(2,20—7,90) x 10 ¹¹	(5,00—8,90) x 10 ¹⁰	(3,10—5,50) x 10 ⁹	(1,44—1,74) x 10 ⁸	0	0	0	0	0	0	0	0

Lampiran 6
 Hasil uji resistansi isolat bakteri asam laktat terhadap berbagai konsentrasi *erythromycin* pada medium agar

No	Isolat	Jumlah isolat pada berbagai konsentrasi <i>erythromycin</i> (cfu/ml)						
		0 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	3 µg/ml	4 µg/ml	5 µg/ml	
1	D2	$(0,42-1,00) \times 10^{11}$	$(0,45-2,60) \times 10^{10}$	$(2,54-2,81) \times 10^{10}$	$(0,80-1,9) \times 10^8$	0	0	
2	S23	$(3,00-6,50) \times 10^{11}$	$(3,90-5,80) \times 10^{10}$	0	0	0	0	
3	T3	$(3,10-8,70) \times 10^{11}$	$(0,54-1,84) \times 10^{11}$	$(1,74-2,58) \times 10^{10}$	$(1,44-2,01) \times 10^9$	$(2,46-2,90) \times 10^9$	0	
4	T8	$(0,70-1,83) \times 10^{12}$	$(1,66-2,75) \times 10^{11}$	$(2,54-2,81) \times 10^{10}$	$(0,80-0,83) \times 10^{10}$	$(1,12-1,74) \times 10^9$	$(0,20-0,24) \times 10^9$	
No	Isolat	Konsentrasi <i>Erythromycin</i> (µg/ml)						
		6	7	8	9	10	11	
4	T8	$(5,40-7,90) \times 10^8$	$(1,19-1,26) \times 10^7$	$(0,15-0,18) \times 10^7$	$(0,12-0,16) \times 10^7$	$(2,74-4,64) \times 10^6$	$(0,89-1,25) \times 10^6$	
		12	13	14	15	16	17	
4	T8	$(0,14-0,20) \times 10^6$	$(2,47-2,81) \times 10^5$	$(0,66-0,79) \times 10^5$	$(0,22-0,29) \times 10^5$	0	0	

Lampiran 7

Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA hasil isolasi genom

No	Isolat	Konsentrasi DNA (ng/ μ l)	Kemurnian DNA
1	T3	138,6	1,938
2	S34	76,4	1,959
3	S23	269,3	1,139
4	S12	116,4	1,842
5	R31	106,8	1,931
6	R24	136,9	1,880
7	GR3	74,8	1,913
8	HB3	85,1	1,883
9	DS13	264	1,748
10	DH7	162	1,888
11	DH1	234,4	1,114
12	D2	225,8	1,404
13	T8	229,4	1,221
14	LK14	225,1	1,319

Lampiran 8

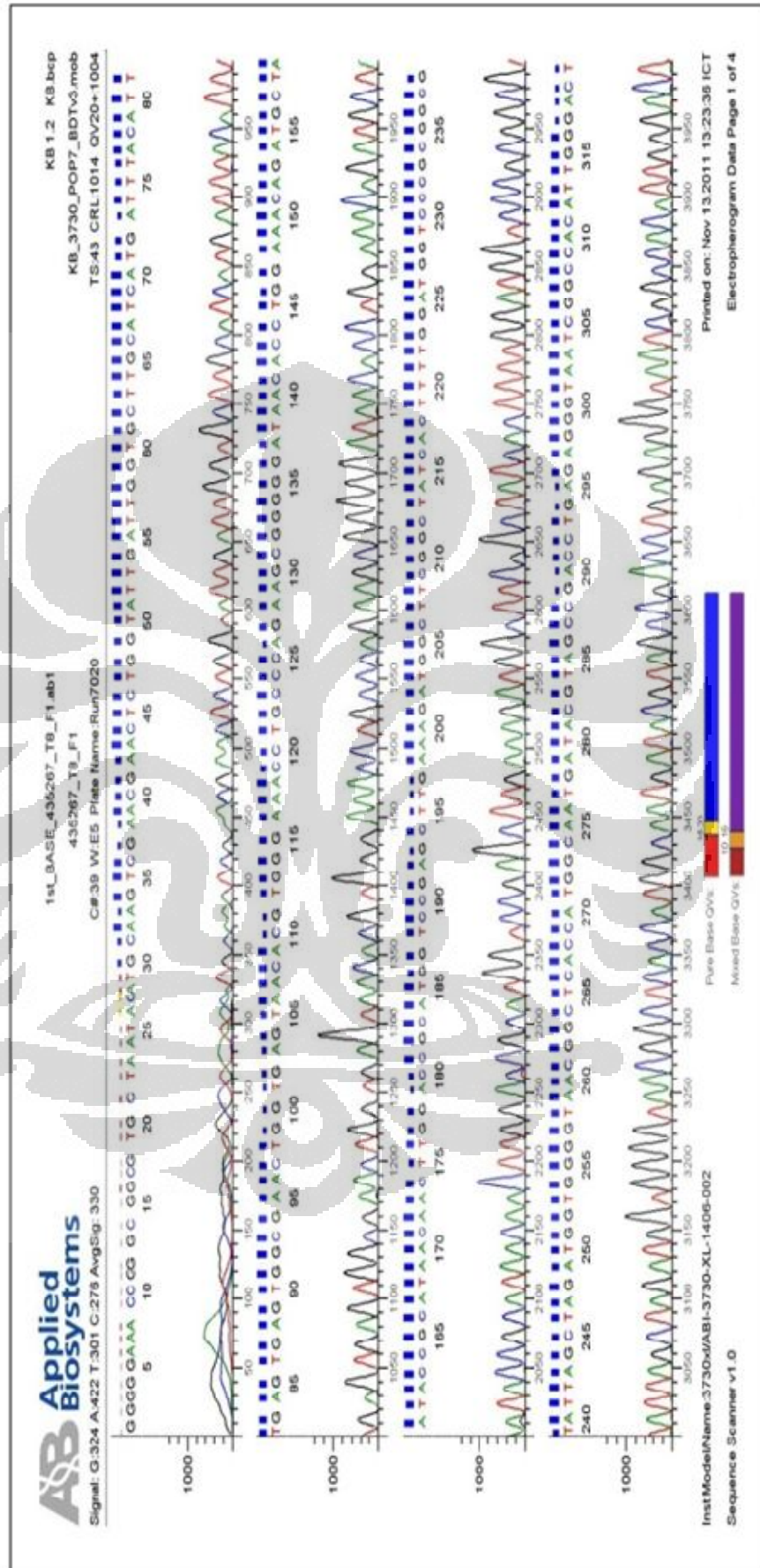
Basa nukleotida gen 16S rRNA dari isolat T8

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
.....									
GCTATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCATTGATTTACATTTGAGTGAAGTGGCGAACTGGTGAATAAACACGTGGGAAAC									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
.....									
TGCCAGAAAGCGGGGATAAACCTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTGGACCCGATGGTCCGAGCTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTT									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
.....									
TTGGATGGTCCCGCGCTATTAGCTAGATGGTGGGTAAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCAATTGGGACT									
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
.....									
GAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGTGAAGTAAAGAAAGGGTTTCG									
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
.....									
GCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAAGAAATATCTGAGAGTAACTGTTGAGTATTGACGGTATTTAAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA									
510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
.....									
GCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGATTTATTGGCCGTAAGCGAGCCGAGCGGGTTTTTTAAAGTCTGATGTAAAGCCCTTCGGCTCAAC									
610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
.....									
CGAAGAAAGTGCATCGGAACCTGGGAAACTTGAGTGCAGAAAGGACAGTGGAACTCCATGTTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAAGAACACCAAT									
710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
.....									
GGCGAAGGGGGCTGTGTTCTGTAAGTGAAGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTGTCCATACCGTAAACGATGAA									
810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
.....									
TGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTCAGTGTGAGCTAACGCATTAAAGCATTCCGCCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAAGGAATTG									
910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
.....									
ACGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATCGAAGTACCGCAAGAACCTTACCAGGCTTGCATATATGCAAACTAAAGAGATTAGAC									
1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
.....									
GTTCCCTTCGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTCCGTGAGATGTTGGGTTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTATC									
1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
.....									
AGTTGCCAGCATTAAAGTTGGCACTCTGGTGAAGCTGCCGGTGAACAAACCGGAGGAAAGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC									
1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
.....									
TACACAGTGTACAAATGGATGGTACAAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAACTAAICTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCG									
1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
.....									
CCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCGGGCTTGTACACACCGCCCTCACACCATGAGAGTTTG									
1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470		
TAAACCCAAAGTCGGTGGGTAAACCTTTAGGAAACGACCCGCTAAGGTTGGACAGATGATTAGGGTGAATC									

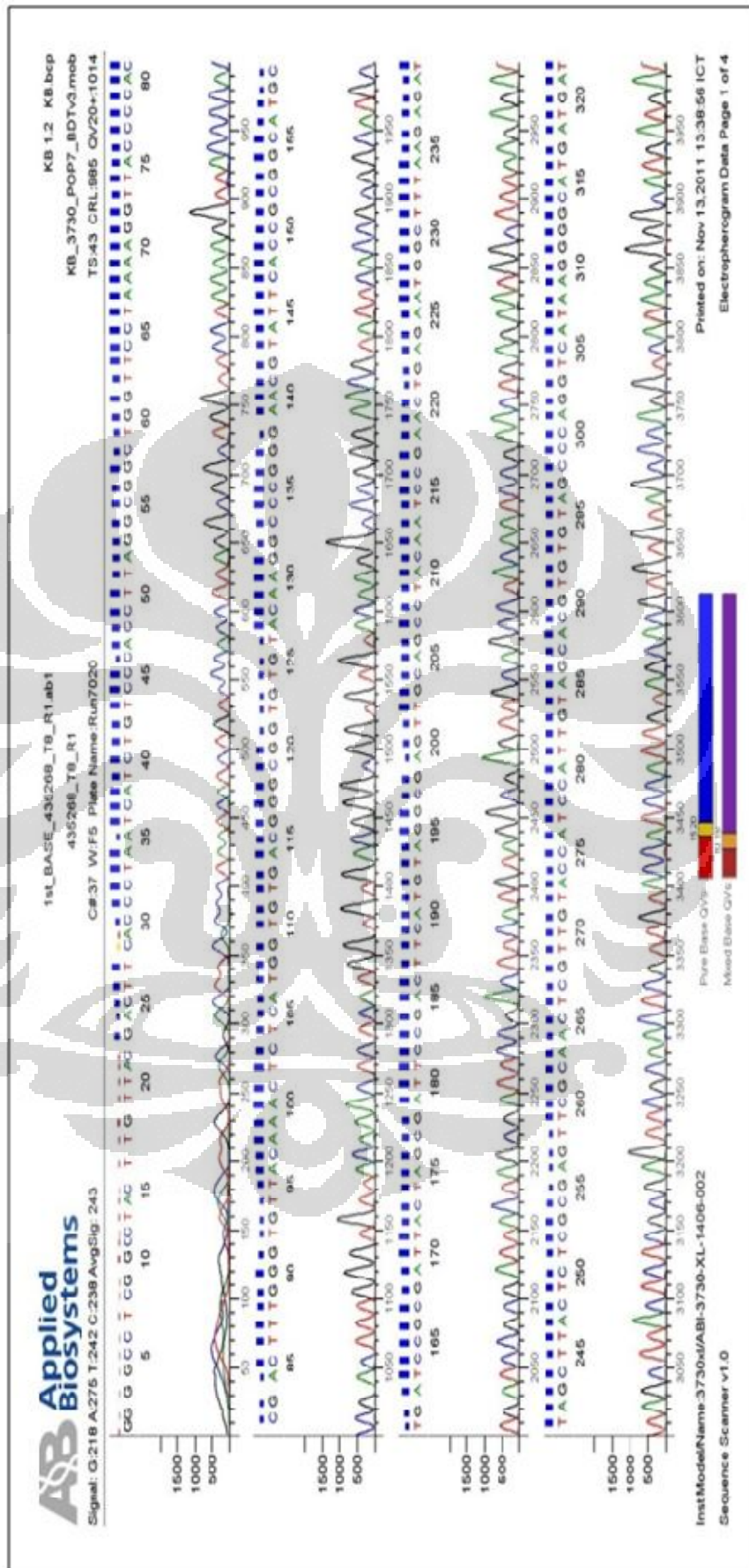
Keterangan:

A = Basa Adenin
 T = Basa Timin
 G = Basa Guanin
 C = Basa Sitosin

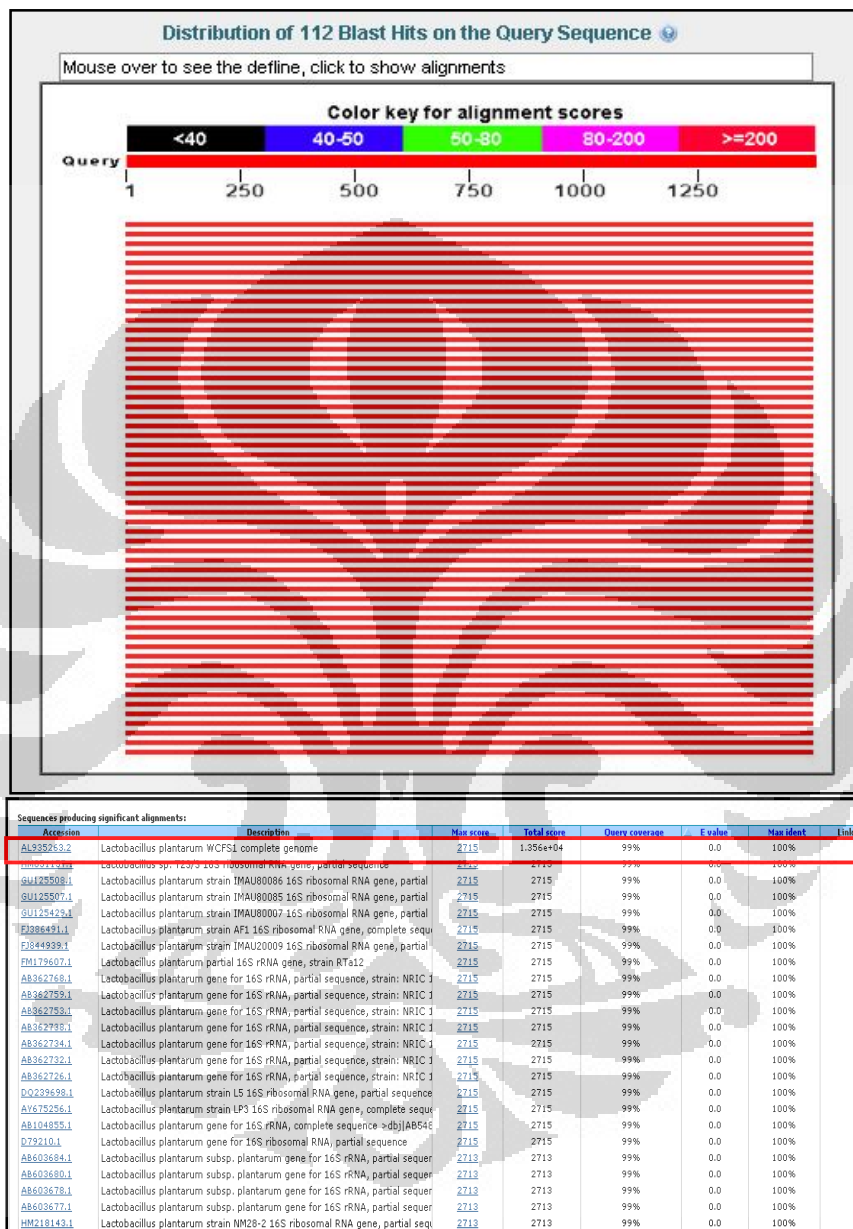
Lampiran 9
 Data elektroferogram hasil analisis DNA sequencing dari isolat T8 dengan menggunakan primer F1



Lampiran 10
Data elektroferogram hasil analisis DNA sequencing dari isolat T8 dengan menggunakan primer R1



Lampiran 11
Homologi isolat T8 dengan data dari GenBank



Keterangan:

Accession number : AL935263.2
 Deskripsi : *Lactobacillus plantarum* WCFS1 complete genome
 Max score : 2751
 Total score : 1.356e+04
 Query coverage : 99%
 E value : 0.0
 Max ident : 100%