

Variasi Intraspesies *Lactobacillus plantarum* (Orla-Jensen) Bergey *et al.* Asal Sayur Asin Berdasarkan Analisis Molekuler
(Intraspecies Variation of *Lactobacillus plantarum* (Orla-Jensen) Bergey *et al.* Originated from Sayur Asin based on Molecular Analysis)

¹Sulistiani, ²Abinawanto, ³Endang Sukara, ²Andi Salamah, ¹Achmad Dinoto & ²Wibowo Mangunwardoyo

1. Pusat Penelitian Biologi, LIPI, Jl. Raya Jakarta Bogor Km 46 Cibinong, Jawa Barat, Indonesia, 16911.

2. Departemen Biologi, FMIPA, Universitas Indonesia, Depok, Indonesia, 16424.

3. Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI, Jl. Raya Jakarta Bogor Km 46 Cibinong, Jawa Barat, Indonesia, 16911.

Email: sulis_lipi@yahoo.com

Memasukkan: September 2014, Diterima Januari 2015

ABSTRACT

The current study is the first report on intraspecies analysis of *L. plantarum* from sayur asin in Indonesia using molecular approach. Three molecular techniques, i.e., restriction fragment length polymorphism (RFLP) 16S-23S rDNA intergenic spacer region (ISR), random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC-PCR) were used to determine the intraspecies diversity of *L. plantarum* responsible for spontaneous fermentation in sayur asin. These methods were aimed to discriminate 46 isolates of *L. plantarum* isolated from sayur asin, including the type strain. PCR amplification of the 16S-23S rDNA ISR revealed two-bands profile of 800 and 600 bp specific to lactobacilli. RAPD-PCR and ERIC-PCR were very valuable in discriminating genetic polymorphism among *L. plantarum* isolates by producing bands ranged from 4-10 bands (360-2620 bp) and 6-12 bands (160-2900 bp), respectively. Dendograms generated from UPGMA cluster analysis based on RAPD-PCR and ERIC-PCR data showed that all isolates were grouped into three major clusters with 74% and 68.6% genetic similarity thresholds, respectively. The study indicated that strains belong to *L. plantarum* isolated from sayur asin were divided into three genotypic groups.

Keywords: ERIC-PCR, Intraspecies, *Lactobacillus plantarum*, RAPD-PCR, RFLP 16S-23S rDNA ISR

ABSTRAK

Analisis intraspesies *L. plantarum* dari sayur asin di Indonesia dengan menggunakan pendekatan molekuler merupakan penelitian yang baru pertama kali dilakukan. Tiga teknik molekuler yaitu: *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) 16S-23S rDNA intergenic spacer region (ISR), *random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction* (RAPD-PCR) dan *enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC-PCR) digunakan untuk mengetahui keragaman intraspesies *L. plantarum*. Penelitian ini bertujuan untuk membedakan 46 isolat *L. plantarum* yang diisolasi dari sayur asin dan strain tipenya. Amplifikasi PCR 16S-23S rDNA ISR menghasilkan dua pita DNA dengan panjang 800 dan 600 bp spesifik pada *lactobacilli*. Hasil penelitian menunjukkan produk RAPD-PCR dan ERIC-PCR dapat digunakan untuk membedakan polimorfisme genetik antara isolat *L. plantarum* asal sayur asin berdasar pada jumlah dan panjang pita DNA hasil amplifikasi. Amplifikasi RAPD-PCR menghasilkan pita DNA sebanyak 4-10 buah dengan panjang 360-2620 bp dan amplifikasi ERIC-PCR menghasilkan pita DNA sebanyak 6-12 buah dengan panjang 160-2900 bp. Dendogram hasil analisis kluster menggunakan metode UPGMA pada data RAPD-PCR dan ERIC-PCR menunjukkan *L. plantarum* dikelompokkan menjadi tiga kelompok dengan derajat kemiripan genetik masing masing 74% dan 68,6%. Hasil penelitian mengungkapkan bahwa strain *L. plantarum* yang diisolasi dari sayur asin terbagi menjadi tiga kelompok genotip.

Kata Kunci: ERIC-PCR, intraspesies, *Lactobacillus plantarum*, RAPD-PCR, RFLP 16S-23S rDNA ISR

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat sering digunakan untuk pengawetan dan peningkatan cita rasa makanan.

Lactobacillus plantarum adalah jenis bakteri asam laktat yang sering digunakan untuk memfermentasi makanan yang dikonsumsi manusia seperti fermentasi *sauerkraut*, fermentasi zaitun, fermentasi anggur

dan fermentasi bahan pangan lainnya (Rivas *et al.* 2006). Pada hasil penelitian sebelumnya, *L. plantarum* telah diketahui sebagai spesies yang paling dominan dalam sayur asin di Jawa (Sulistiani *et al.* 2014). Kualitas produk sayur asin keseluruhannya tergantung pada spesies dan strain yang digunakan dalam proses fermentasi (Solieri *et al.* 2009). Sayur asin merupakan produk fermentasi spontan/alami sawi pahit (*Brassica juncea* (L.) Czern.) oleh bakteri asam laktat (Puspito & Fleet 1985). Sayur asin yang berkualitas ditandai dengan rasa asam yang mampu mengawetkan produk sayur asin dan muncul aroma khas yang meningkatkan cita rasa sawi pahit yang difermentasi (Chiou 2004).

Analisis intraspesies merupakan langkah awal yang penting untuk membantu dalam pemilihan strain yang berpotensi sebagai kandidat pembuatan starter supaya tidak terjadi penggunaan spesies dan strain yang sama (*overlapping*). Strain bakteri asam laktat yang penting dalam industri dapat ditandai secara molekuler (*genetic marker*) dengan teknik tersebut. Teknik tersebut dapat dipakai untuk pemantauan isolat yang berpotensi dalam proses produksi skala besar. Johannsson *et al.* (1995) dan Putri *et al.* (2011) menyatakan bahwa potensi bioprospeksi bakteri asam laktat berada pada tingkat strain, maka pengetahuan mengenai variasi genetik dalam spesies menjadi semakin penting dan perlu dilakukan. Permasalahan sampai saat ini, analisis intraspesies pada spesies *L. plantarum* dari sayur asin belum pernah dilakukan.

BAHAN DAN CARA KERJA

Sebanyak 46 isolat *L. plantarum* (B110; B131; B134; BC41; DD8; E06; E23; E71; EE11; F11; F31; F42; F66; FF03; FF08; FF11; FF16; S1_05L; S1_15L; S2_04DO; S2_04DP; S2_10D; S2_15DO; S2_16DO; S2_16DP; S2_29D; S2_30D; SS2_09L; SS2_12LO; SS2_12LP; Y1_14D; YY1_01D; YY1_12D; Y1_05L; YY1_05L; YY1_06L; Y2_14D; Y2_28D; YY2_03D; YY2_05L; G2_06D; G2_07D; G2_20D; GG2_1L;

GG2_6L; GG2_15L) yang diisolasi dari larutan fermentasi dan sayur asin digunakan dalam penelitian ini. Sebagai pembanding dalam analisis, digunakan dua spesies tipe *L. plantarum* JCM 1149^T dan *L. fermentum* JCM 1173^T (RIKEN BioResource Center, Saitama, Jepang). Isolat-isolat *L. plantarum* yang digunakan dalam analisis telah diidentifikasi secara molekuler menggunakan sekuen 16S rDNA.

Sel bakteri asam laktat diesktraksi DNA nya menggunakan metode Franco *et al.* (2010). Bakteri asam laktat ditumbuhkan pada medium MRSA (de Man, Rogosa, Sharpe Agar) (Oxoid) selama 4 hari secara anaerobik pada suhu ruang (28-30°C). Koloni bakteri sebanyak 2 ose diambil lalu dimasukkan dalam *microtube* (tabung mikro) 1,5 ml. Koloni bakteri ditambah dengan 1 ml akuades steril kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 9.300 xg selama 15 menit dan supernatan dibuang kemudian ditambah 500 ml larutan lisis. Komposisi larutan lisis terdiri atas Tris-HCl 100 mmol/l pH 7, EDTA 20 mmol/l, NaCl 250 mmol/l, SDS 2% (b/v), lisosim 1 mg/ml. Sel bakteri yang telah ditambah larutan lisis diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C kemudian ditambah 1 ml larutan proteinase K (20 mg/ml) dan diinkubasi selama 65°C selama 30 menit lalu ditambah 500 ml fenol dan disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 9.300 xg. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikro baru, lalu ditambah dengan 200 ml fenol dan 200 ml kloroform kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 9.300 xg selama 15 menit. Supernatan diambil dengan cara dipipet dan dipindahkan ke dalam tabung mikro baru. Supernatan ditambah 150 ml NaCl 150 mmol/l dan 300 ml alkohol 95% dingin kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 9.300 xg selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet DNA dicuci dengan alkohol 70% kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 9.300 xg selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet DNA dikeringanginkan selama 15 menit. Pelet DNA yang telah kering ditambahkan 25 ml larutan TE 1X.

Amplifikasi 16S-23S rDNA ISR masing

masing reaksi sebanyak 58 ml dilakukan berdasarkan metode Rachman et al. (2003) dengan menggunakan primer 16S/p2 forward (5'-CTTGTACACACC GCCCGTC-3') posisi 1390-1407 pada 16S rDNA dan 23S/p7 reversed (5'-GGTACTTAGATGTTT CAGTTC-3') posisi 188-208 pada 23S rDNA *Escherichia coli* (Gurtler & Stanisich, 1996). Komposisi reaksi PCR terdiri atas: 30 ml *GoTag Green master mix 2x*, 4,8 ml primer 16S/p2 forward 10 mM dan 4,8 ml primer 23S/p7 reversed 10 mM, 18,4 ml *nuclease free water* (NFW) dan 1 ml (10-100 ng) DNA *template* (Promega, 2012). Reaksi PCR adalah 94°C 1,5 menit (1 siklus); 95°C 30 detik, 50°C 30 detik dan 72°C 1,5 menit (30 siklus); 72°C 5 menit (1 siklus); dan diakhiri dengan 4°C 20 menit (1 siklus). Produk PCR dielektroforesis menggunakan gel agarosa 2 % (b/v) dengan panjang 6 cm pada 100 V selama 30 menit. Volume produk PCR digunakan dalam elektroforesis sebanyak 5 ml dan volume DNA *ladder* 1Kb plus sebanyak 7,5 ml. Gel direndam dalam larutan ethidium bromida 10 mg/ml selama 30 menit kemudian dicuci dengan TAE 1X dan didokumentasi menggunakan *gel documentation system*. DNA *ladder* 1Kb plus digunakan dalam elektroforesis untuk mengetahui ukuran pita DNA hasil amplifikasi (Rachman et al. 2003).

Restriksi produk PCR 16S-23S rDNA ISR dilakukan sesuai intruksi produk Thermo Scientific (2012). Enzim restriksi *HhaI* dibuat sebanyak 5 ml (2 U/ml) dengan komposisi 2 ml *buffer tango* 10x, 1 ml enzim *HhaI* (10 U/ μ l) dan 2 ml NFW. Enzim restriksi *AfaI* dibuat sebanyak 5 ml (4 U/ml) dengan komposisi 2 ml *buffer tango* 10x, 2 ml enzim *AfaI* (10 U/ μ l) dan 1 ml *bovine serum albumine* (BSA) 0,1%. Masing-masing enzim restriksi sebanyak 5 ml dicampur dengan 10 ml produk PCR kemudian dihomogenkan. Campuran tersebut diinkubasi selama 4 jam pada suhu 37°C.

Amplifikasi RAPD-PCR menggunakan primer tunggal M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3') (Huey & Hall 1989). Volume masing-masing

reaksi RAPD-PCR sebanyak 42 ml terdiri atas 22,5 ml *GoTag Green master mix 2x*, 9 ml primer M13 10 mM, 10,5 ml NFW dan 1 ml DNA *template* (10-100 ng). Reaksi RAPD-PCR mengikuti metode Rossetti & Giraffa (2005) dengan dimodifikasi yaitu 94°C 2 menit (1 siklus); 94°C 1 menit, 42°C 20 detik, 72°C 2 menit (40 siklus); dan 72°C 10 menit (1 siklus); dan diakhiri 4°C 20 menit (1 siklus).

Amplifikasi ERIC-PCR menggunakan primer tunggal ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTG AGCG-3') (Versalonic et al. 1991). Volume masing-masing reaksi ERIC-PCR sebanyak 42 ml terdiri atas: 22,5 ml *GoTag Green master mix 2x*, 9 ml primer ERIC2 10 mM, 10,5 ml NFW dan 1 ml DNA *template* (10-100 ng). Reaksi ERIC-PCR dilakukan berdasarkan metode Gilling & Holley (1997) dengan dimodifikasi yaitu 94°C 3 menit (1 siklus); 94°C 30 detik, 46°C 1,5 menit, 68°C 8 menit (35 siklus); dan 68°C 8 menit (1 siklus) dan diakhiri dengan pendinginan suhu 4°C 20 menit (1 siklus).

Sebanyak 15 ml produk PCR 16S-23S rDNA ISR yang telah direstriksi, produk amplifikasi RAPD-PCR dan ERIC-PCR masing masing dielektroforesis menggunakan gel agarosa 2% (b/v) dengan panjang 12 cm pada 100 V selama 1 jam. Sebanyak 7,5 ml DNA *ladder* 1Kb plus digunakan untuk mengetahui ukuran pita DNA hasil restriksi. Gel direndam dalam larutan ethidium bromida 10 mg/ml selama 30 menit kemudian dicuci dengan TAE 1X dan didokumentasi menggunakan *gel documentation system* (Rachman et al. 2003).

Ukuran pita DNA dianalisis menggunakan program PhotoCaptMw versi 99.03 (Vilber-Lourmat, Marne-la-Vallée, France). Pita DNA hasil RAPD-PCR dan ERIC-PCR yang telah diketahui ukurannya selanjutnya diterjemahkan menjadi data biner (diberi nilai 1 bila ada pita dan 0 bila tidak ada pita). Data digunakan untuk menyusun matriks kesamaan genetik berdasarkan rumus Nei & Li (1979) dengan metode *Unweighted Pair-Group Method Arithmetic* (UPGMA) (Rohlf 1998). Koefisien similaritas

digunakan untuk mengukur polimorfisme genetik dalam semua analisis UPGMA adalah *Jaccard's similarity coefficient*.

HASIL

Amplifikasi daerah 16S-23S rDNA ISR pada 46 isolat *L. plantarum* dan strain tipenya menggunakan primer 16S/P2 dan 23S/P7 menghasilkan 2 pita DNA dengan panjang 800 dan 600 bp. Amplifikasi daerah 16S-23S rDNA ISR strain tipe *L. fermentum* JCM 1173^T (*outgroup*) menghasilkan 2 pita DNA dengan panjang 765 dan 570 bp (Gambar 1). Strain tipe *L. plantarum* JCM 1149^T dimasukkan dalam analisis bertujuan untuk mengetahui kedekatan genetik antara *L. plantarum* asal sayur asin yang dianalisis dengan strain tipe *L. plantarum* JCM 1149^T.

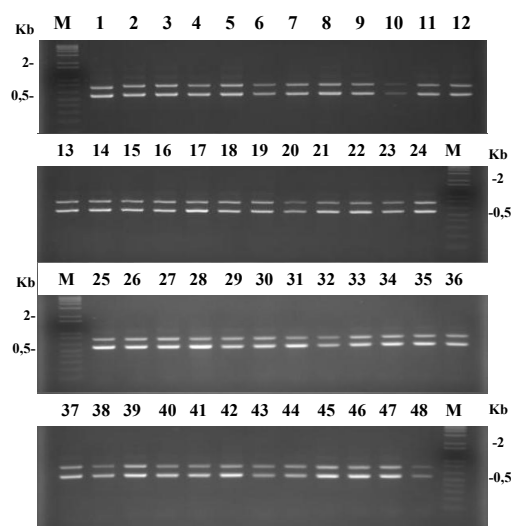
Hasil RFLP menggunakan enzim *HhaI* pada daerah 16S-23S rDNA ISR *L. plantarum* dan strain tipenya menghasilkan 4 fragmen DNA yaitu 410, 380, 290 dan 200 bp kecuali *L. plantarum* strain S2_29D dan YY2_05L yang menghasilkan 6 fragmen DNA masing-masing dengan panjang 610, 570, 410, 380, 290 dan 200 bp (Gambar 2). Fragmen DNA dengan panjang 610 dan 570 bp spesifik pada strain S2_29D dan YY2_05L, ditunjukkan dengan anak panah pada Gambar 2. Hasil RFLP 16S-23S rDNA ISR strain tipe *L. fermentum* JCM 1173^T (*outgroup*) menghasilkan 4 fragmen DNA masing-masing dengan panjang 400, 320, 290 dan 200 bp.

Hasil RFLP 16S-23S rDNA ISR pada 45 isolat *L. plantarum* menggunakan enzim restriksi *AfaI* menghasilkan 2 fragmen DNA dengan panjang 460 dan 120 bp dan 2 isolat *L. plantarum* (strain S2_29D, YY2_05L) menghasilkan 3 fragmen DNA dengan panjang 600, 460 dan 120 bp. Fragmen DNA dengan panjang 600 bp spesifik pada kedua strain tersebut (Gambar 3).

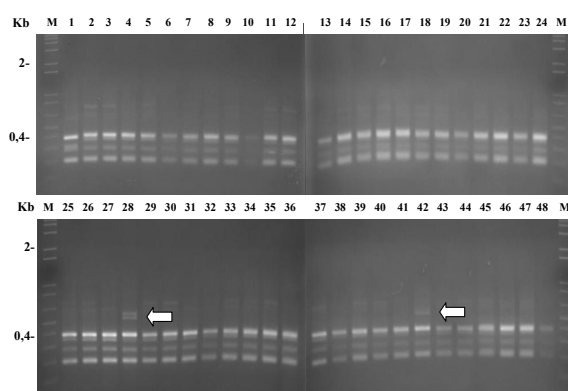
Teknik RAPD-PCR menggunakan primer M13 berhasil diterapkan untuk analisis intraspecies *L. plantarum* asal sayur asin. Amplifikasi RAPD-PCR menghasilkan pita DNA sebanyak 4-10

buah dengan kisaran panjang 360-2620 bp (Gambar 4). Analisis dendrogram produk RAPD-PCR menggunakan metode UPGMA dengan *Jaccard's similarity coefficient* menunjukkan kelompok *L. plantarum* berbeda kluster dengan *L. fermentum* JCM 1173^T (Gambar 5).

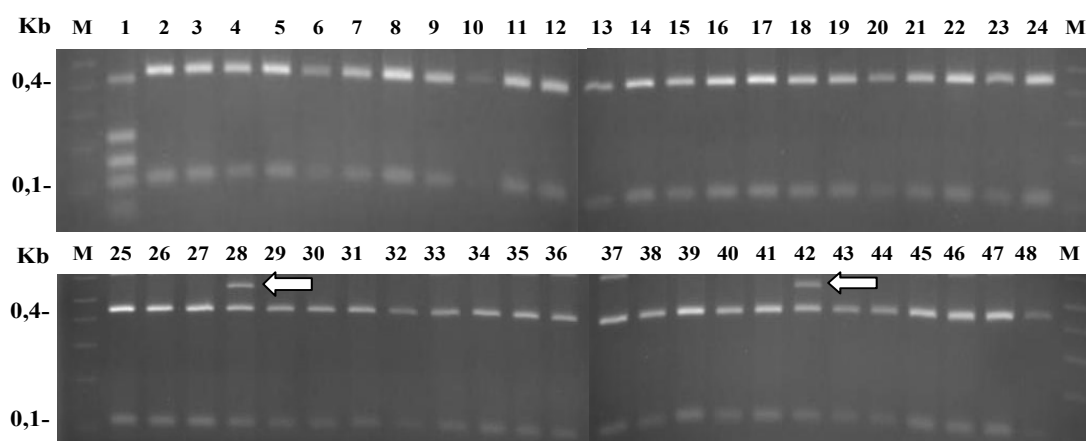
Hasil analisis produk RAPD-PCR menunjukkan isolat-isolat *L. plantarum* asal sayur asin Indonesia terbagi menjadi tiga kluster besar yaitu kluster 1, kluster 2 dan kluster 3 dengan nilai koefisien similaritas $\pm 71\%$. Kluster pertama terdiri atas 22 strain asal sayur asin Indonesia dan 1 strain tipe *L. plantarum* JCM 1149^T. Kluster pertama terbagi menjadi 2 subkluster (subkluster 1, subkluster 2) dan satu



Gambar 1. Elektroforesis produk PCR 16S-23S ISR isolat *L. plantarum* menggunakan agarosa 2%.



Gambar 2. Elektroforesis produk RFLP PCR 16S-23S ISR isolat *L. plantarum* dalam agarosa 2% setelah dipotong dengan enzim restriksi *HhaI*.



Gambar 3. Elektroforesis produk RFLP PCR 16S-23S ISR isolat *L. plantarum* dalam agarosa 2% setelah dipotong dengan enzim restriksi *AfaI*.

Keterangan gambar 1,2,& 3: M, DNA ladder 1Kb Plus; tanda panah menunjuk fragmen DNA spesifik; 1: *L. fermentum* JCM 1173^T, *L. plantarum* (2: JCM 1149^T; 3: B110; 4: B131; 5: B134; 6: BC41; 7: DD8; 8: E06; 9: E23; 10: E71; 11: EE11; 12: F11; 13: F31; 14: F42; 15: F66; 16: FF03; 17: FF08; 18: FF11; 19: FF16; 20: S1_05L; 21: S1_15L; 22: S2_04DO; 23: S2_04DP; 24: S2_10D; 25: S2_15DO; 26: S2_16DO; 27: S2_16DP; 28: S2_29D; 29: S2_30D; 30: SS2_09L; 31: SS2_12LO; 32: SS2_12LP; 33: Y1_14D; 34: YY1_01D; 35: YY1_12D; 36: Y1_05L; 37: YY1_05L; 38: YY1_06L; 39: Y2_14D; 40: Y2_28D; 41:YY2_03D; 42: YY2_05L; 43: G2_06D; 44: G2_07D; 45: G2_20D; 46: GG2_1L; 47: GG2_6L; 48: GG2_15L).

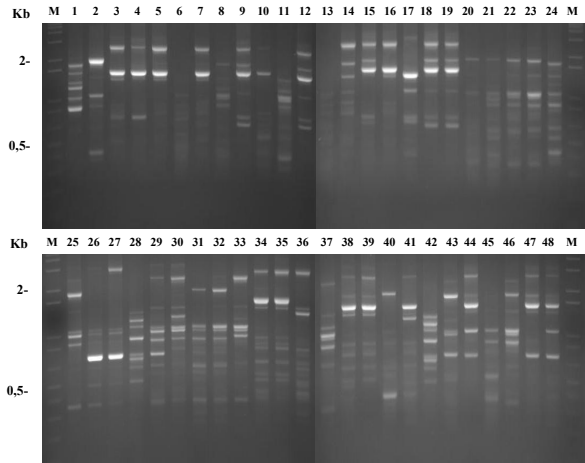
outlier. Subkluster 1 terdiri dari 9 isolat *L. plantarum* asal sayur asin Indonesia dan 1 tipe strain *L. plantarum* JCM 1149^T, sedangkan subkluster 2 terdiri atas 12 isolat *L. plantarum* asal sayur asin Indonesia. *Outlier* pada kluster pertama adalah isolat *L. plantarum* strain YY1_05L. Kluster kedua terdiri dari 2 isolat, yaitu *L. plantarum* strain S2_29D dan YY2_05L. Kluster ketiga terbagi menjadi 2 subkluster, subkluster 1 terdiri atas 19 isolat sedangkan subkluster 2 terdiri atas 3 isolat. Subkluster yang terbentuk dalam dendrogram menunjukkan bahwa terdapat variasi genotip dari strain-strain spesies *L. plantarum* asal sayur asin Indonesia (Gambar 5)

Teknik ERIC-PCR menggunakan primer ERIC2 berhasil diterapkan untuk analisis intraspecies *L. plantarum*. Amplifikasi ERIC-PCR menghasilkan pita DNA sebanyak 6-12 buah dengan ukuran 160-2900 bp. (Gambar 6) Analisis dendrogram produk ERIC-PCR menunjukkan bahwa semua isolat *L. plantarum* berada pada kluster yang sama. Hasil analisis ERIC-PCR menunjukkan isolat-isolat *L. plantarum* asal sayur asin Indonesia terbagi menjadi 3 kelompok besar (kluster 1, 2 dan 3). Kluster pertama terdiri atas 33 isolat, berada

pada kluster yang sama dengan tipe strain *L. plantarum* JCM 1149^T. Kluster pertama terbagi menjadi 3 subkluster, subkluster 1 terdiri atas 19 isolat bersama dengan strain tipe *L. plantarum* JCM 1149^T, subkluster 2 terdiri atas 4 isolat *L. plantarum* (strain BC41, G2_20D, S2_10D dan FF08) dan subkluster 3 terdiri atas 9 isolat *L. plantarum* asal sayur asin Indonesia (strain E23, F11, F66, FF11, FF16, F42, G2_07D, GG2_06L dan GG2_15L). Kluster kedua terdiri atas 2 isolat (strain S2_29D dan YY2_05L) dengan koefisien similaritas ± 68,6%. (Gambar 7).

PEMBAHASAN

Hasil pengukuran daerah 16S-23S rDNA ISR menunjukkan panjang ISR *L. plantarum* (800 dan 600 bp) lebih panjang dibandingkan ISR *L. fermentum* (765 dan 570 bp). Perbedaan panjang ISR tersebut dapat digunakan untuk membedakan spesies *L. plantarum* dan *L. fermentum*. Menurut Rivas et al. (2006), Belgacem et al. (2009), Yavuz et al. (2004) menyebutkan variasi panjang dan sekuen ISR dapat digunakan untuk membedakan genus dan spesies yang berbeda.

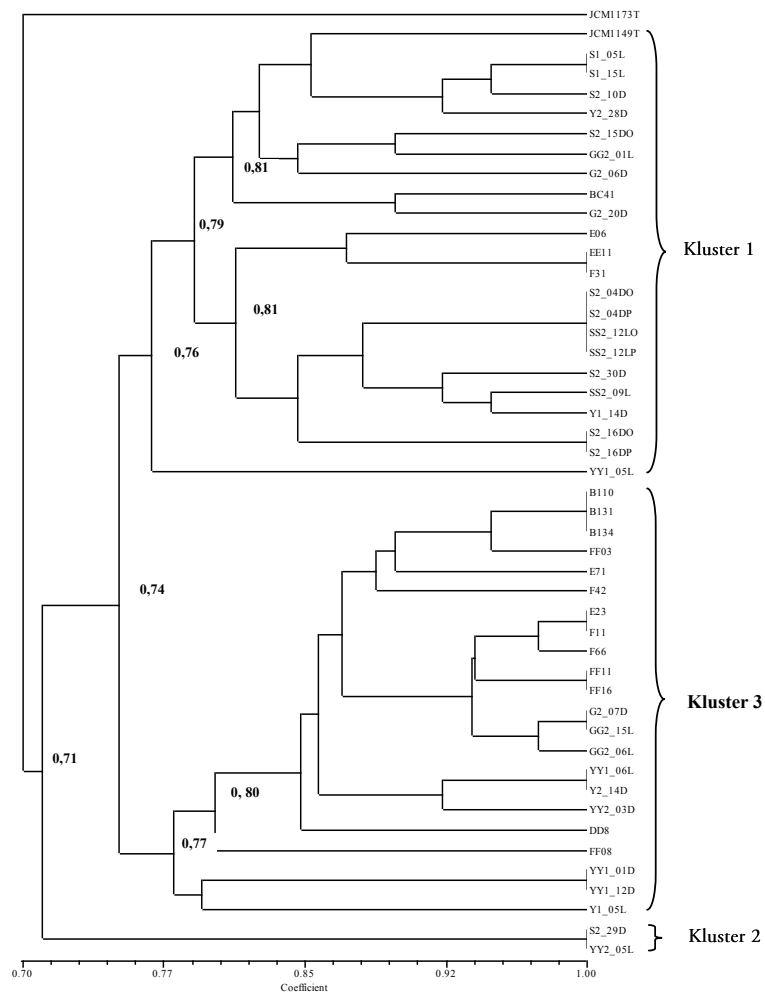


Keterangan: Lihat gambar 1, &3.

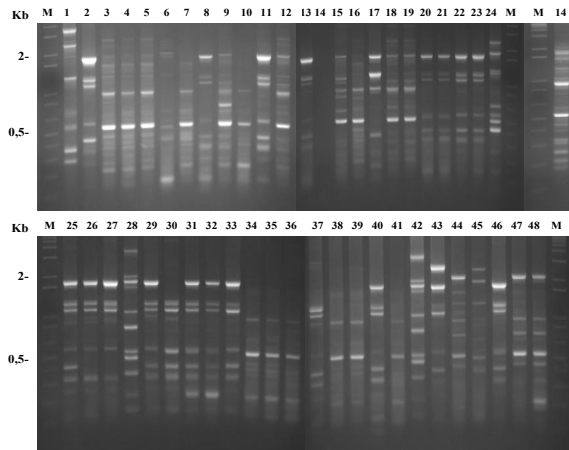
Gambar 4. Elektroforesis produk RAPD-PCR isolat *L. plantarum* dalam agarosa 2%.

Hasil analisis 16S-23S rDNA ISR *L. plantarum* asal sayur asin menunjukkan spesies tersebut masuk ke dalam kelompok *Lactobacillus* karena mempunyai 2 tipe *rrn* operon L-ISR dengan panjang 800 bp dan S-ISR dengan panjang 600 bp. Daerah S-ISR *Lactobacillus* berisi sekuen *noncoding* dan daerah L-ISR *Lactobacillus* berisi sekuen yang mengkode tRNA^{Ile}- tRNA^{Ala} -sekuen *noncoding* (Rahman *et al.* 2003).

Restriksi *Hha*I pada 16S-23S rDNA ISR *L. plantarum* dan strain tipenya menghasilkan 4 fragmen DNA bp kecuali *L. plantarum* strain S2_29D dan YY2_05L menghasilkan 6 fragmen DNA. Restriksi *Hha*I pada 16S-23S rDNA ISR *L. fermentum* JCM 1173^T (*outgroup*) menghasilkan



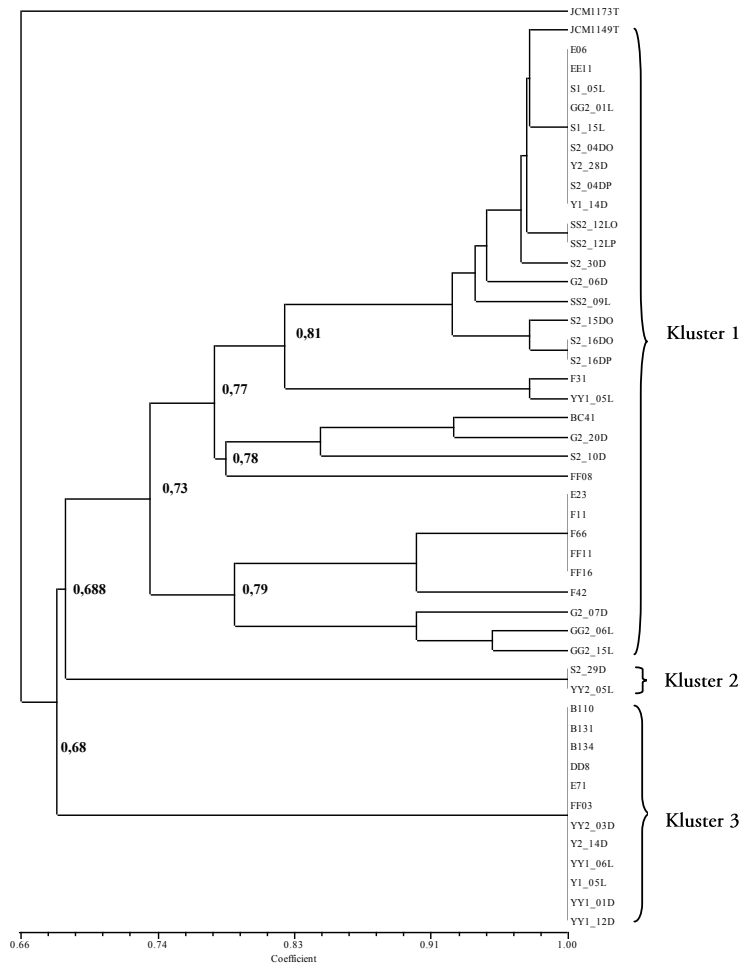
Gambar 5. Dendrogram RAPD-PCR isolat *L. plantarum* menggunakan metode UPGMA.



Keterangan: Lihat Gambar 1,2&3

Gambar 6. Elektroforesis produk ERIC-PCR isolat *L. plantarum* dalam agarosa 2%.

4 fragmen DNA dengan panjang yang berbeda dari fragmen DNA *L. plantarum*. Jumlah dan panjang fragmen DNA yang diperoleh dari restriksi *HhaI* pada 16S-23S rDNA ISR menunjukkan kelompok *L. plantarum* secara taksonomi berbeda dari *L. fermentum*. Analisis RFLP 16S-23S rDNA ISR mampu menunjukkan adanya polimorfisme dalam daerah ISR dalam kelompok *L. plantarum*. Hasil analisis RFLP 16S-23S rDNA ISR menggunakan enzim restriksi *HhaI* diketahui 2 kelompok genotip *L. plantarum*. Fragmen-fragmen DNA pada posisi 610 dan 570 bp diketahui spesifik untuk *L. plantarum* strain S2_29D dan YY2_05L ditunjukkan dengan tanda panah pada Gambar 2. Belgacem et al. (2009) menyebutkan daerah 16S-23S rDNA ISR



Gambar 7. Dendogram ERIC-PCR isolat *L. plantarum* menggunakan metode UPGMA.

merupakan sekuen yang lebih variabel dibandingkan gen 16S dan 23S rDNA. Daerah antara tRNA^{Ala} dan 23S rDNA merupakan daerah mempunyai polimorfisme sehingga dapat digunakan untuk identifikasi bakteri pada tingkat spesies dan strain. Analisis RFLP 16S-23S rDNA ISR bakteri dan strain tipenya dapat digunakan untuk mengetahui variasi strain dalam spesies (Miteva *et al.* 2001; Rahman *et al.* 2003; Belgacem *et al.* 2009).

Analisis RFLP 16S-23S rDNA ISR menggunakan enzim *AfaI* diketahui 2 kelompok genotip *L. plantarum*, yang menguatkan hasil analisis RFLP 16S-23S rDNA ISR menggunakan enzim *HhaI*. Fragmen DNA pada posisi 600 bp diketahui spesifik untuk *L. plantarum* strain S2_29D dan YY2_05L ditunjukkan dengan tanda panah pada Gambar 3.

Teknik RAPD-PCR menggunakan primer M13 berhasil diterapkan untuk analisis intraspecies *L. plantarum* asal sayur asin dengan menghasilkan pita DNA sebanyak 4-10 buah dengan kisaran panjang 360-2620 bp (Gambar 4.). Pita DNA memperlihatkan profil yang bervariasi baik ketebalan maupun jumlahnya. Polimorfisme pita DNA ini dimungkinkan karena mutasi/perubahan struktur sekuen DNA pada tempat penempelan primer RAPD pada genom bakteri (Zulkifli *et al.* 2009). Analisis dendrogram produk RAPD-PCR menggunakan metode UPGMA dengan *Jaccard's similarity coefficient* menunjukkan bahwa kelompok *L. plantarum* berbeda kluster dengan *L. fermentum* JCM 1173^T (Gambar 5.). Data menunjukkan dengan jelas bahwa teknik RAPD-PCR mampu memisahkan spesies *L. plantarum* dengan *L. fermentum* dengan mengacu pada polimorfisme genetik seperti yang pernah dilaporkan oleh Saito *et al.* (2011). Analisis menggunakan teknik RAPD-PCR mampu memisahkan spesies bakteri asam laktat.

Hasil analisis produk RAPD-PCR menunjukkan isolat-isolat *L. plantarum* asal sayur asin Indonesia terbagi menjadi tiga kluster besar (Gambar 5.). Hasil analisis RAPD secara umum mendukung diskriminasi analisis RFLP 16S-23S rDNA ISR mengindikasikan bahwa isolat *L. plantarum* strain

S2_29D dan YY2_05L merupakan isolat yang memiliki karakter genetik unik dibandingkan dengan isolate *L. plantarum* asal sayur asin lainnya. Hasil analisis RFLP 16S-23S rDNA ISR menunjukkan terdapat fragmen DNA spesifik pada strain S2_29D dan YY2_05L yang tidak ditemukan pada isolate *L. plantarum* lainnya.

Analisis produk ERIC-PCR menunjukkan bahwa semua isolat *L. plantarum* berada pada kluster yang sama (Gambar 7.). Data nilai koefisien similaritas $\pm 68\%$ ERIC-PCR tidak jauh dengan data hasil analisis RAPD-PCR yang memiliki koefisien similaritas 71% untuk semua isolat *L. plantarum*. Dendrogram menunjukkan pemisahan kelompok spesies *L. plantarum* dari spesies *L. fermentum*. Dari data menunjukkan teknik ERIC-PCR dapat memisahkan polimorfisme pada spesies yang berbeda.

Hasil analisis ERIC-PCR tersebut mendukung diskriminasi analisis RFLP 16S-23S rDNA ISR dan RAPD-PCR yang mengindikasikan bahwa isolat *L. plantarum* strain S2_29D dan YY2_05L merupakan isolat yang memiliki karakter genetik yang independen dibandingkan dengan isolat-isolat *L. plantarum* asal sayur asin lainnya karena berada pada kluster yang terpisah dari strain tipenya. Hasil analisis produk ERIC-PCR juga menunjukkan kluster ketiga terdiri atas 12 isolat *L. plantarum* asal sayur asin Indonesia (koefisien similaritas $\pm 68\%$) juga memiliki variasi genetik unik, berbeda dari karakter genetik strain tipe *L. plantarum* JCM 1149^T.

Teknik ERIC-PCR merupakan teknik yang sensitif dan reproduibel untuk mengetahui variasi genotip melalui profil pita DNA pada target enterobakteri dan non-enterobakteri (Gillings & Holley 1997). Analisis ERIC-PCR telah digunakan untuk mengenali polimorfisme intra dan interspecies *L. paraplantarum*, *L. curvatus*, *L. sakei*, *L. pentosus* dan *L. plantarum* (Saito *et al.* 2011). Saito *et al.* (2011) melaporkan bahwa pada tingkat spesies, *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, *L. curvatus* dan *L. sakei* dapat dibedakan dengan nilai koefisien similaritas $\pm 8\%$. Hasil penelitian menunjukkan

nilai koefisien similaritas antara tiga kluster *L. plantarum* hanya \pm 68%, maka tidak mungkin ketiga kluster tersebut berbeda spesies karena nilai koefisien similaritas tersebut menunjukkan jarak genetik yang cukup dekat. Besar kemungkinan bahwa isolat dengan karakter genetik unik dalam kluster *L. plantarum* dapat dibedakan dalam tingkat subspecies terutama strain S2_29D dan YY2_05L.

Hasil analisis data RAPD-PCR dan ERIC-PCR mampu membedakan spesies *L. plantarum* pada tingkat strain (intraspecies) yaitu terdapat 3 kelompok genotip *L. plantarum* asal sayur asin. Variasi genotip/strain *L. plantarum* diduga berperan dalam proses fermentasi sawi (sayur asin) dan kualitas hasil fermentasinya.

KESIMPULAN

Hasil analisis intraspecies menunjukkan terdapat tiga kelompok genotip *L. plantarum* asal sayur asin. Hasil analisis RFLP 16S-23S rDNA ISR menggunakan enzim restriksi *Hha*I dan *Afa*I mampu membedakan dua isolat *L. plantarum* (S2_29D dan YY2_05L) dari 45 isolat lainnya. Hasil analisis kluster data RAPD-PCR dan data ERIC-PCR menggunakan metoda UPGMA menunjukkan *L. plantarum* asal sayur asin terbagi menjadi tiga kluster besar/tiga kelompok genotip.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh DIPA tematik Bidang Mikrobiologi Pusat Penelitian Biologi LIPI tahun 2013. Penulis mengucapkan terima kasih kepada JCM (RIKEN BioResource Center, Saitama, Jepang) atas bantuan strain tipe *Lactobacillus plantarum* JCM 1149^T dan *Lactobacillus fermentum* JCM 1173^T, kepada Dr. Iman Hidayat atas diskusinya hingga penelitian ini selesai.

DAFTAR PUSTAKA

- Belgacem, ZB., X. Dousset, H. Prevost & M. Manai. 2009. Polyphasic taxonomic studies of lactic acid bacteria associated with Tunisian fermented meat based on the heterogeneity of the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region. *Archives. of Microbiology*. 191: 711-720.
- Chiou, RYY. 2004. *Chinese pickles: leaf mustard and derived products*. Dalam: Hui, Y. H., L. Meunier-Goddik, O.S. Hansen, J. Josephsen, W. Nip, P.S. Stanfield & F. Toldra. *Handbook of food and beverage fermentation technology*. Marcel Dekker Inc. New York.
- Franco, M., A. Quintana, C. Duque, C. Suarez, MX. Rodriguez & J. Barea. 2010. Evaluation of actinomycetes strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Applied Soil Ecology* 45: 209-217.
- Gillings, M. & M. Holley. 1997. Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. *Letters in Appl. Microbiology*. 25: 17-21.
- Gurtler, V. & VA. Stanisich. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*. 142: 3-16.
- Huey, B. & J. Hall. 1989. Hypervariable DNA fingerprinting in *Eschericia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13. *Journal of Bacteriol*. 171(5): 2528-2532.
- Miteva, V., I. Boudakov, G. Ivanova-Stoyancheva, B. Marinova, V. Mitev & J. Mengaud. 2001. Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies by ribotyping and amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *Journal of Applied Microbiology*. 90: 909-918.
- Nei, M. & W. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of

- restriction endonucleases. *Proceeding Natals Academic of Sciences. USA.* 76(10): 5269-5273.
- Puspito, H. & GH. Fleet. 1985. Microbiology of sayur asin fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 22: 442-445.
- Putri, WDW., M. Mika, Y. Nakagawa, H. Kawasaki, Haryadi, NM. Cahyanto & DW. Marseno. 2011. Differentiation studies of predominant lactic acid bacteria isolated during *growol* fermentation by using polyphasic taxonomic characterization. *African Journal of Biotechnology.* 10(42): 8194-8204.
- Rachman, CN., P. Kabadjova, H. Pre'vost & X. Dousset. 2003. Identification of *Lactobacillus alimentarius* and *Lactobacillus farciminis* with 16S-23S rDNA intergenic spacer region polymorphism and PCR amplification using species-specific oligonucleotide. *Journal of Applied Microbiology.* 95: 1207-1216.
- Rivas, B., A. Marcobal & R. Munoz. 2006. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Lactobacillus plantarum* strains. *Microbiology.* 152: 85-93.
- Rohlf, FJ. 1998. *NTSYSpc numerical taxonomy and multivariate analysis system.* Version 2.0. Applied Biostatistics Inc. New York: v + 31 hlm.
- Rossetti, L. & G. Giraffa. 2005. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M 13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiology Methods.* 63: 135-144.
- Saito, S., M. Kobayashi, H. Kimoto-Nira, R. Aoki, K. Mizumachi, S. Miyata, K. Yamamoto, Y. Kitagawa & C. Suzuki. 2011. Intraspecies discrimination of *Lactobacillus paraplantarum* by PCR. *FEMS Microbiology Letters.* 316: 70-76.
- Solieri, L., F. Genova, M. De Paola & P. Giudici. 2009. Characterization and technological properties of *Oenococcus oeni* strains from wine spontaneous malolactic fermentations: a framework for selection of new starter cultures. *Journal of Applied Microbiology.* 108: 285-298.
- Sulistiani, Abinawanto, E. Sukara, A. Salamah, A. Dinoto & W. Mangunwardoyo. 2014. Identification of lactic acid bacteria in sayur asin from Central Java (Indonesia) based on 16S rDNA sequence. *IFRJ* 21(2): 527-532.
- Yavuz, E., H. Gunes, C. Bulut, S. Harsa & AF. Yenidunya. 2004. RFLP of 16S-ITS rDNA region to differentiate lactobacilli at species level. *World Journal Microbiology and Biotechnology.* 20(6): 535-537.
- Zulkifli, Y., NB. Alitheen, R. Son, AR. Raha, L. Samuel, SK. Yeap & M. Nishibuchi. 2009. Random amplified polymorphic DNA-PCR and ERIC PCR analysis on *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cockles in Padang, Indonesia. *International Food Resarch Journal.* 16: 141-150.