

Berita Biologi

Jurnal Ilmu-ilmu Hayati



BERITA BIOLOGI

Vol. 16 No. 2 Agustus 2017

Terakreditasi Berdasarkan Keputusan Kepala Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
No. 636/AU3/P2MI-LIPI/07/2015

Tim Redaksi (*Editorial Team*)

Andria Agusta (Pemimpin Redaksi, *Editor in Chief*)
Kusumadewi Sri Yulita (Redaksi Pelaksana, *Managing Editor*)
Gono Semiadi
Atit Kanti
Siti Sundari
Evi Triana
Kartika Dewi
Dwi Setyo Rini

Desain dan Layout (*Design and Layout*)

Muhamad Ruslan, Fahmi

Kesekretariatan (*Secretary*)

Nira Ariasari, Enok, Budiarto

Alamat (*Address*)

Pusat Penelitian Biologi-LIPI
Kompleks Cibinong Science Center (CSC-LIPI)
Jalan Raya Jakarta-Bogor KM 46,
Cibinong 16911, Bogor-Indonesia
Telepon (021) 8765066 - 8765067
Faksimili (021) 8765059
Email: berita.biologi@mail.lipi.go.id
jurnalberitabiologi@yahoo.co.id
jurnalberitabiologi@gmail.com

Keterangan foto cover depan: Studi perbanyakan vegetatif pada bidara upas koleksi Kebun Raya Bogor, sesuai dengan halaman 169
(*Notes of cover picture*): (*Study of vegetative propagation on bidara upas of bogor botanical garden collection, (as in page 169)*)



ISSN 0126-1754

636/AU3/P2MI-LIPI/07/2015

Volume 16 Nomor 2, Agustus 2017

Berita Biologi

Jurnal Ilmu-ilmu Hayati

Berita Biologi	Vol. 16	No. 2	Hlm. 111 - 216	Bogor, Agustus 2017	ISSN 0126-1754
----------------	---------	-------	----------------	---------------------	----------------

Pusat Penelitian Biologi - LIPI

Ucapan terima kasih kepada
Mitra Bebestari nomor ini
16(2) – Agustus 2017

Dr. Nurainas
Dr. Iman Hidayat
Dr. Rudhy Gustiano
Ahmad Thontowi M.Si.
Dr. Kusumadewi Sri Yulita
Dr. Etti Sartina Siregar, MSi
Dr. Puspita Lisdiyanti, M.Agr.Chem
Prof. Ir. Moh. Cholil Mahfud, PhD
Dr. Edi Mirmanto M.Sc.
Dra. Siti Fatimah Syahid
Dr. Livia Rossila Tanjung
Dr. Ir. Fauzan Ali, M.Sc.

VARIASI GENETIK *Lactobacillus fermentum* Beijerinck ASAL SAYUR ASIN BERDASARKAN ANALISIS RFLP 16S-23S rDNA ISR, RAPD-PCR DAN ERIC-PCR [Genetic Variation of *Lactobacillus fermentum* Beijerinck Origin Sayur Asin Based on RFLP 16S-23S rDNA ISR, RAPD-PCR and ERIC-PCR Analysis]

Sulistiani^{1✉}, Wibowo Mangunwardoyo², Abinawanto², Endang Sukara³,
Achmad Dinoto¹ dan Andi Salamah²

¹Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, LIPI

²Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia,
Depok, Indonesia, 16424

³Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI
email: sulis_lipi@yahoo.com

ABSTRACT

Molecular analysis of *Lactobacillus fermentum* isolates is essential to understand their genetic variation in relations to their roles in sayur asin fermentation process. Combination of three molecular techniques which is restriction fragment length polymorphism (RFLP) of 16S-23S rDNA intergenic spacer region (ISR), random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) and an enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC-PCR) analysis were performed to discriminate 19 representative isolates of *L. fermentum* isolated from sayur asin. The result showed that *L. fermentum* strain D11 is distantly related to other isolates based on RFLP using *HhaI* restriction enzyme and RAPD-PCR analyses. In addition, both of RAPD-PCR and ERIC-PCR successfully determined the genetic variation among *L. fermentum* strains by exhibiting distinct 4-8 bands (800-2080 bp) and 4-10 bands (280-3050 bp), respectively. A dendogram generated from UPGMA cluster analysis of both RAPD-PCR and ERIC-PCR data showed two distinct genotypic groups exist among *L. fermentum* isolated from sayur asin in Indonesia.

Key words: ERIC-PCR, genetic variation, *Lactobacillus fermentum*, RAPD-PCR, RFLP 16S-23S rDNA, ISR.

ABSTRAK

Analisis molekuler *Lactobacillus fermentum* asal sayur asin sangat penting dilakukan untuk mengetahui variasi genetik dari strain-strain *L. fermentum* yang terlibat langsung dalam proses fermentasi sayur asin. Kombinasi tiga teknik molekuler yaitu *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) 16S-23S rDNA, *Intergenic Spacer Region* (ISR), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD-PCR) dan *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC-PCR) digunakan untuk mengetahui variasi genetik dari 19 strain *L. fermentum* asal sayur asin. Hasil analisis RFLP menggunakan enzim restriksi *HhaI* dan analisis RAPD-PCR menunjukkan bahwa *L. fermentum* strain D11 secara genetik berkaitan jauh dengan strain-strain *L. fermentum* lainnya. Selain itu, variasi genetik diantara strain-strain *L. fermentum* ditemukan pada kisaran 4-8 band (800-2080 bp) dengan metoda RAPD-PCR dan 4-10 pita (280-3050 bp) dengan metoda ERIC-PCR. Dendogram hasil analisis kluster UPGMA dari data RAPD-PCR dan ERIC-PCR mengungkapkan adanya dua kelompok genetik *L. fermentum* asal sayur asin yang berbeda.

Kata Kunci: ERIC-PCR, variasi genetik, *Lactobacillus fermentum*, RAPD-PCR, RFLP 16S-23S rDNA, ISR.

PENDAHULUAN

Di Indonesia, sawi fermentasi dikenal dengan nama sayur asin atau sawi asin. Sayur asin dikonsumsi di banyak daerah di Indonesia selama bertahun-tahun (Puspito dan Fleet, 1985). Sayur asin merupakan produk fermentasi spontan/alami oleh bakteri asam laktat epifit (Daeschel *et al.*, 1987). Kualitas produk sayur asin tergantung pada spesies dan strain yang digunakan dalam proses fermentasi (Solieri *et al.*, 2009). Identifikasi bakteri asam laktat berdasarkan sekuen 16S rDNA telah dilakukan pada penelitian sebelumnya dimana *Lactobacillus fermentum* merupakan spesies dominan kedua pada sayur asin setelah *L. plantarum* (Sulistiani *et al.*, 2014). Sampai saat ini, analisis intraspecies pada spesies *L. fermentum* dari sayur asin tersebut belum pernah dilakukan dan penting untuk dilakukan untuk mengetahui variasi genetik strain-strain *L. fermentum* yang berperan atau terlibat langsung

dalam proses fermentasi sayur asin.

Kemajuan dalam bidang biologi molekuler telah memberikan peluang baru untuk melangkah lebih cepat dalam analisis variasi genetik mikroba. Pada umumnya, lebih dari satu metode digunakan untuk analisis variasi genetik mikroba (Rossetti dan Giraffa, 2005). *Intergenic Spacer Region* (ISR) dikenal juga dengan istilah *Intergenic/Internal Transcribed Spacer* (ITS) (Yavuz *et al.*, 2004) atau *Intergenic Spacer* (IGS) (Zavaleta *et al.*, 1996), merupakan daerah yang terletak diantara gen 16S dan 23S rDNA. Daerah tersebut memiliki sekuen konservatif dan variabel, seperti gen tRNA (Yavuz *et al.*, 2004). Daerah 16S-23S rDNA ISR merupakan daerah penting dalam genom bakteri yang dapat digunakan untuk analisis taksonomi bakteri (Moschetti *et al.*, 1998). Polimorfisme dalam sekuen nukleotida 16S-23S rDNA ISR dapat digunakan untuk identifikasi pada tingkat spesies (Yavuz *et al.*, 2004). Panjang

dan variasi sekuen 16S-23S rDNA ISR telah digunakan untuk membedakan strain dalam spesies (Zavaleta *et al.*, 1996). Belgacem *et al.* (2009) melaporkan bahwa analisis RFLP 16S-23S rDNA ISR berhasil digunakan untuk mengetahui variasi genetik dalam spesies. Teknik molekuler *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD-PCR) dan *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC-PCR) menghasilkan beberapa pita DNA (*fingerprint*) yang dapat digunakan untuk membedakan bakteri di tingkat spesies dan tingkat genetik/strain bakteri (Saito *et al.*, 2001; Gillings and Holley, 1997). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui variasi genetik strain-strain *L. fermentum* asal sayur asin dengan menggunakan tiga teknik molekuler, yaitu RFLP 16S-23S rDNA ISR, RAPD-PCR dan ERIC-PCR.

BAHAN DAN CARA KERJA

Sebanyak 19 strain *L. fermentum* yang diisolasi dari sayur asin dan cairan/larutan fermentasi digunakan dalam penelitian ini, yaitu strain S2_20D; S1_12L; S1_05D; Y2_29D; Y2_04L; S1_03L; S2_28D; S1_02D; Y2_27D; S1_07D; Y2_16L; F61; E85; D11; E25; S2_24D; Y2_18D; Y1_08L; dan S1_13D. Strain tipe *L. plantarum* JCM 1149^T (D79210) dan *L. fermentum* JCM 1173^T (AJ575812) yang diperoleh dari *Japan Collection of Microorganisms* (RIKEN BioResource Center, Saitama, Jepang) digunakan sebagai pembanding. Identitas strain-strain *L. fermentum* dalam penelitian ini telah diidentifikasi secara molekuler berdasarkan analisis sekuen 16S rDNA dan telah dipublikasikan dalam Sulistiani *et al.* (2014).

Bakteri asam laktat ditumbuhkan pada medium *de Man, Rogosa, Sharpe* Agar (MRSA) selama 4 hari secara anaerobik pada suhu ruang (28-30 °C). Sel dikoleksi menggunakan ose selanjutnya digunakan untuk ekstraksi DNA berdasarkan metode Franco *et al.* (2010). Amplifikasi 16S-23S rDNA ISR dilakukan berdasarkan metode Rachman *et al.* (2003). Masing masing campuran reaksi sebanyak 58 mL menggunakan primer 16S/p2 *forward* (5'-CTTGACACACCGCCCGTC-3') posisi 1390-1407 pada 16S rDNA dan primer 23S/p7 *reversed* (5'-GGTACTTAGATGTTTCAGTTC-3') posisi 188-208 pada 23S rDNA *Escherichia coli* (Gurtler and

Stanisich, 1996). Komposisi campuran 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, 17,4 mL *nuclease free water* (NFW) dan 1mL (10-100 ng) cetakan DNA (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) (Rachman *et al.*, 2003). Produk PCR selanjutnya dielektroforesis.

Restriksi produk PCR 16S-23S rDNA ISR dilakukan sesuai instruksi yang tercantum pada produk Thermo Scientific (2012). Sebanyak 5 ml (2 U/ml) enzim restriksi *HhaI* dengan komposisi 2 mL *buffer tango* 10x, 1 mL enzim *HhaI* (10 U/μL) dan 2 mL NFW 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'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') (Huey and Hall, 1989; Rossetti and Giraffa, 2005). Volume masing-masing reaksi sebanyak 42 mL terdiri atas: 22,5 mL GoTag[®] Green master mix 2x, 9 mL primer M13 10 mM, 9,5 mL NFW dan 1 mL cetakan DNA (10-100 ng). Reaksi RAPD-PCR menurut Rossetti and Giraffa (2005) dengan modifikasi sebagai berikut 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'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') (Versalovic *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, 9,5 mL NFW dan 1 mL cetakan DNA (10-100 ng). Reaksi ERIC-PCR Gilling & Holley (1997) dengan dimodifikasi sebagai berikut 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 μL dari masing-masing produk PCR 16S-23S rDNA ISR yang telah direstriksi, produk RAPD-PCR dan produk ERIC-PCR 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 etidium 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 dan Li (1979) dengan metode *Unweighted Pair-Group Method Arithmetic* (UPGMA) pada program *Numerical Taxonomy and Multivariate System* (NTSYS) versi 2.02 (Rohlf, 1998). Koefisien similaritas yang digunakan untuk mengukur polimorfisme genetik dalam semua analisis UPGMA adalah *Jaccard's similarity coefficient*.

HASIL

Amplifikasi dan RFLP Daerah 16S-23S rDNA ISR *L. fermentum*.

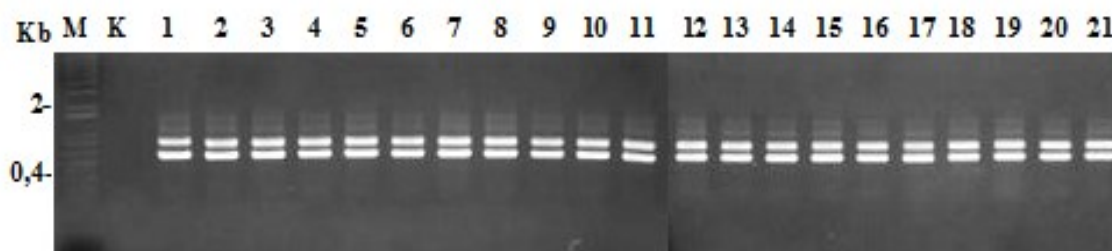
Amplifikasi daerah 16S-23S rDNA ISR pada 19 strain *L. fermentum* dan satu strain tipe *L.*

fermentum JCM 1173^T menghasilkan dua pita DNA dengan panjang 765 dan 570 bp sedangkan strain tipe *L. plantarum* JCM 1149^T menghasilkan dua pita DNA pada posisi 800 dan 600 bp (Gambar 1).

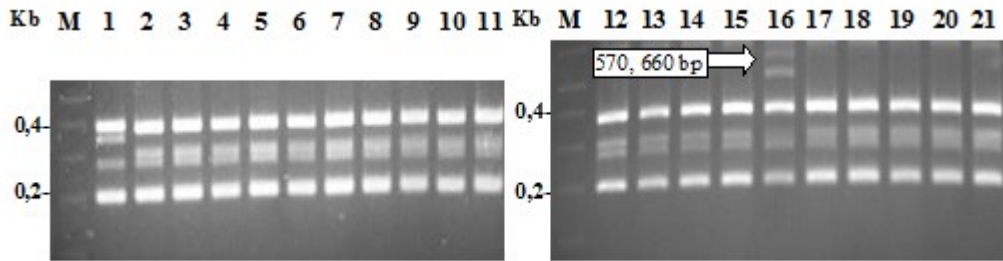
Hasil RFLP menggunakan enzim *HhaI* pada daerah 16S-23S rDNA ISR terhadap 19 strain *L. fermentum* secara umum menghasilkan empat fragmen DNA masing-masing dengan panjang 400, 320, 290 dan 200 bp, kecuali *L. fermentum* strain D11 yang menunjukkan adanya enam fragmen DNA masing-masing dengan panjang 660, 570, 400, 320, 290 dan 200 bp. Fragmen DNA pada strain tipe *L. plantarum* JCM 1149^T (*outgroup*) masing-masing berada pada posisi 410, 380, 290 dan 200 bp (Gambar 2).

Analisis Fragmen DNA Berdasarkan Metode RAPD-PCR dan ERIC-PCR.

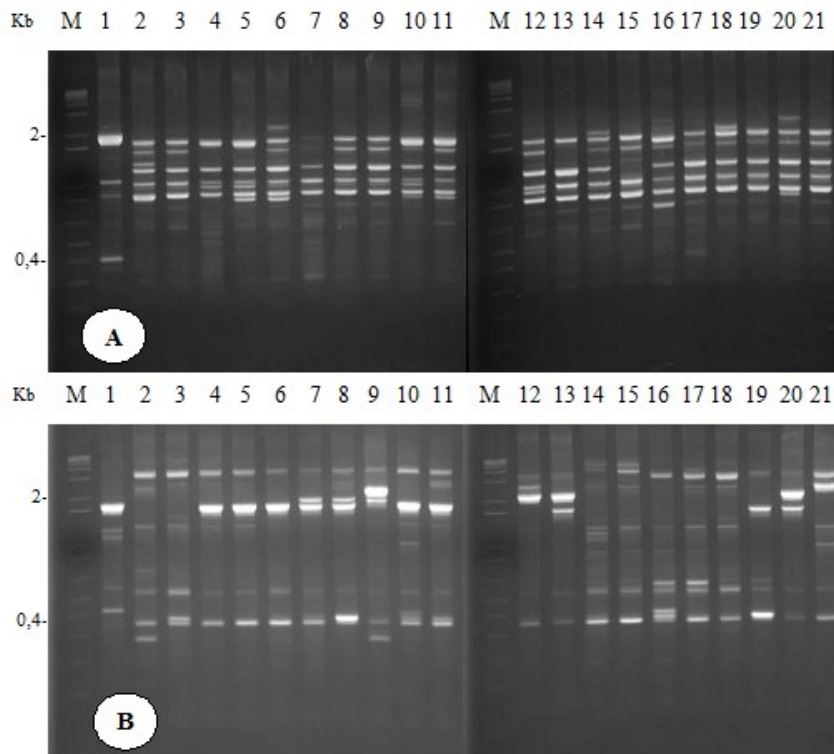
Teknik RAPD-PCR menggunakan primer M13 dan ERIC-PCR menggunakan primer ERIC2 berhasil diterapkan untuk analisis variasi genetik strain-strain *L. fermentum* asal sayur asin. Amplifikasi RAPD-PCR menghasilkan pita DNA sebanyak 4-8 buah dengan kisaran panjang 800-2080 bp (Gambar 3A), sedangkan amplifikasi dengan ERIC-PCR menghasilkan pita DNA sebanyak 4-10 buah dengan ukuran 280-3050 bp (Gambar 3B).



Gambar 1. Elektroforesis produk PCR 16S-23S rDNA ISR strain-strain *L. fermentum* dalam agarosa 2%. M, DNA ladder 1Kb Plus; K, kontrol negatif; no. 1, *L. plantarum* JCM 1149^T; *L. fermentum* (no. 2: JCM 1173^T; 3: S2_20D; 4: S1_12L; 5: S1_05D; 6: Y2_29D; 7: Y2_04L; 8: S1_03L; 9: S2_28D; 10: S1_02D; 11: Y2_27D; 12: S1_07D; 13: Y2_16L; 14: F61; 15: E85; 16: D11; 17: E25; 18: S2_24D; 19: Y2_18D; 20: Y1_08L; 21: S1_13D) (*Electrophoresis of PCR product from 16S-23S rDNA ISR of L. fermentum strain on 2% gel agarose. M, DNA ladder 1Kb Plus; K, negative control; no. 1, L. plantarum JCM 1149^T; L. fermentum (no. 2: JCM 1173^T; 3: S2_20D; 4: S1_12L; 5: S1_05D; 6: Y2_29D; 7: Y2_04L; 8: S1_03L; 9: S2_28D; 10: S1_02D; 11: Y2_27D; 12: S1_07D; 13: Y2_16L; 14: F61; 15: E85; 16: D11; 17: E25; 18: S2_24D; 19: Y2_18D; 20: Y1_08L; 21: S1_13D).*



Gambar 2. Pola RFLP 16S-23S ISR strain-strain *L. fermentum* dalam agarosa 2% setelah dipotong dengan enzim restriksi *HhaI*. M, DNA ladder 1Kb Plus; no. 1, *L. plantarum* JCM 1149^T; *L. fermentum* (no. 2: JCM 1173^T; 3: S2_20D; 4: S1_12L; 5: S1_05D; 6: Y2_29D; 7: Y2_04L; 8: S1_03L; 9: S2_28D; 10: S1_02D; 11: Y2_27D; 12: S1_07D; 13: Y2_16L; 14: F61; 15: E85; 16: D11; 17: E25; 18: S2_24D; 19: Y2_18D; 20: Y1_08L; 21: S1_13D), tanda panah menunjuk fragmen DNA spesifik (*RFLP pattern of 16S-23S ISR L. fermentum strains using HhaI on gel agarose 2%. M, DNA ladder 1Kb Plus; no. 1, L. plantarum JCM 1149^T; L. fermentum (no. 2: JCM 1173^T; 3: S2_20D; 4: S1_12L; 5: S1_05D; 6: Y2_29D; 7: Y2_04L; 8: S1_03L; 9: S2_28D; 10: S1_02D; 11: Y2_27D; 12: S1_07D; 13: Y2_16L; 14: F61; 15: E85; 16: D11; 17: E25; 18: S2_24D; 19: Y2_18D; 20: Y1_08L; 21: S1_13D), arrow pointing specific DNA fragments*).



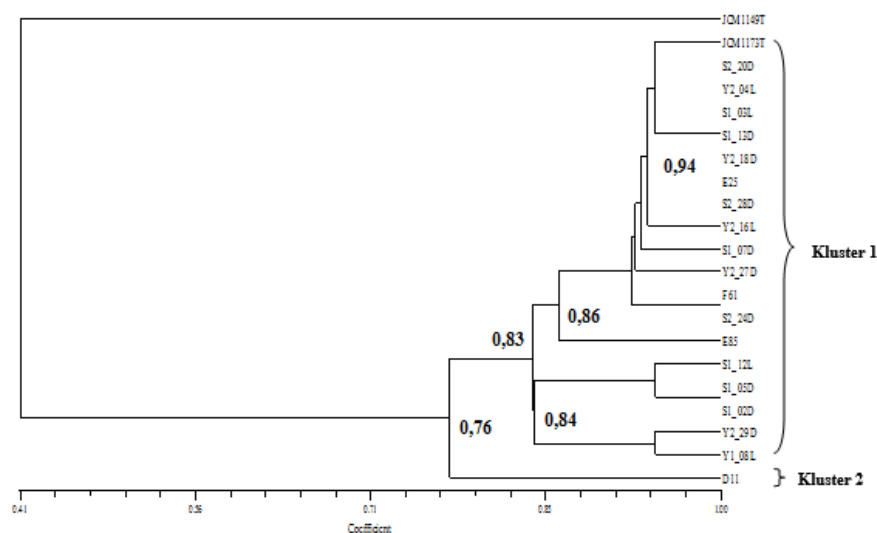
Gambar 3. Elektroforesis produk RAPD-PCR (A) dan produk ERIC-PCR (B) isolat *L. fermentum* dalam agarosa 2%. M, DNA ladder 1Kb Plus; no. 1, *L. plantarum* JCM 1149^T; *L. fermentum* (no. 2: JCM 1173^T; 3: S2_20D; 4: S1_12L; 5: S1_05D; 6: Y2_29D; 7: Y2_04L; 8: S1_03L; 9: S2_28D; 10: S1_02D; 11: Y2_27D; 12: S1_07D; 13: Y2_16L; 14: F61; 15: E85; 16: D11; 17: E25; 18: S2_24D; 19: Y2_18D; 20: Y1_08L; 21: S1_13D) (*Electrophoresis of RAPD-PCR product (A) and ERIC-PCR product (B) on gel agarose 2%. M, DNA ladder 1Kb Plus; no. 1, L. plantarum JCM 1149^T; L. fermentum (no. 2: JCM 1173^T; 3: S2_20D; 4: S1_12L; 5: S1_05D; 6: Y2_29D; 7: Y2_04L; 8: S1_03L; 9: S2_28D; 10: S1_02D; 11: Y2_27D; 12: S1_07D; 13: Y2_16L; 14: F61; 15: E85; 16: D11; 17: E25; 18: S2_24D; 19: Y2_18D; 20: Y1_08L; 21: S1_13D)*).

Dendrogram UPGMA Berdasarkan Fragmen DNA dari Metode RAPD-PCR dan ERIC-PCR.

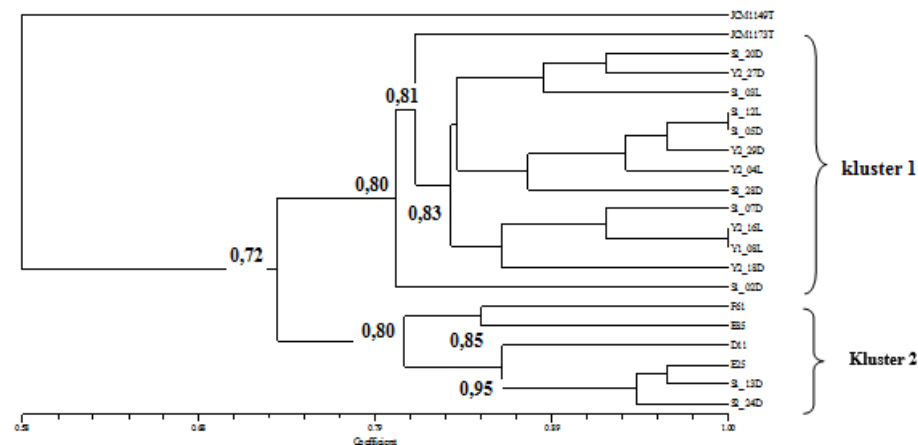
Analisis pengelompokan hierarki (*hierarchical cluster analysis*) produk RAPD-PCR dengan metode UPGMA menggunakan *Jaccard's similarity coefficient* dalam bentuk dendrogram menunjukkan bahwa kluster *L. fermentum* tidak identik secara genetik dengan *L. plantarum* JCM 1149^T, dengan koefisien similaritas ± 76% (Gambar 4). Strain-strain *L. fermentum* asal sayur asin terbagi menjadi satu kluster besar (kluster 1) dan satu kluster kecil (kluster 2) hanya beranggotakan satu strain yang berdiri sendiri (*independent strain*), yaitu strain D11, dengan nilai koefisien similaritas ± 76% (Gambar 4). Kluster besar yang terdiri dari atas 18 strain asal sayur asin dan satu strain tipe *L. fermentum* JCM 1173^T memiliki koefisien similaritas ± 83,8%. Kluster besar ini terbagi menjadi dua subkluster (subkluster 1 dan subkluster 2) dengan nilai koefisien similaritas ± 86%. Subkluster satu terdiri atas 13 strain *L. fermentum* asal sayur asin dan satu strain tipe *L. fermentum* JCM 1173^T dengan nilai koefisien similaritas ± 86%; sedangkan subkluster 2 terdiri atas lima strain *L. fermentum* yaitu strain S1_12L, S1_05D, S1_02D, Y2_29D dan Y1_08L dengan nilai koefisien similaritas ± 4%.

Dendrogram hasil analisis UPGMA dari produk ERIC-PCR memperlihatkan dua kelompok genetik

dari 19 strain *L. fermentum* asal sayur asin dengan nilai koefisien similaritas ± 72% (Gambar 5). Kluster pertama terdiri atas 13 strain, berada pada kluster yang sama dengan strain tipe *L. fermentum* JCM 1173^T (koefisien similaritas ± 80,5 %), dan kluster kedua terdiri atas enam strain yang terpisah dari strain tipe *L. fermentum* JCM 1173^T (koefisien similaritas ± 80,75%). Kluster pertama menunjukkan keberagaman genetik, dimana ketigabelas isolat *L. fermentum* asal sayur asin membentuk kluster sendiri terpisah dari strain tipe *L. fermentum* JCM 1173^T dengan nilai koefisien similaritas ± 81,5%, dan terbagi menjadi tiga subkluster dengan koefisien similaritas ± 83%. Subkluster pertama terdiri atas strain S2_20D, Y2_27D dan S1_03L; subkluster kedua terdiri atas strain S1_12L, S1_05D, Y2_29D, Y2_04L dan S2_28D; sedangkan subkluster ketiga terdiri atas strain S1_07D, Y2_16L, Y1_08L dan Y2_18D. Strain S1_02D berdiri sendiri dalam kluster 1. Kluster kedua terbagi menjadi dua subkluster utama dengan nilai koefisien similaritas ± 80,75%. Subkluster pertama terdiri atas strain F61 dan E85 dengan nilai koefisien similaritas ± 85%, sedangkan subkluster kedua terdiri atas strain E25, S1_13D dan S2_24D dengan nilai koefisien similaritas ± 95%. Strain D11 berdiri sendiri dalam subkluster kedua dengan nilai koefisien similaritas ± 86%.



Gambar 4. Dendrogram RAPD-PCR 19 strain *L. fermentum* asal sayur asin menggunakan metode UPGMA (*RAPD-PCR dendrogram of 19 L. fermentum strains using UPGMA method*).



Gambar 5. Dendrogram UPGMA ERIC-PCR 19 strain *L. fermentum* (UPGMA dendrogram of 19 *L. fermentum* strains using ERIC-PCR).

PEMBAHASAN

Hasil amplifikasi daerah 16S-23S rDNA ISR menunjukkan ukuran ISR *L. fermentum* (765 bp dan 570 bp) lebih pendek dibandingkan ISR *L. plantarum* (800bp dan 600 bp) (Gambar 1). Perbedaan panjang ISR tersebut dapat digunakan untuk membedakan spesies *L. fermentum* dengan *L. plantarum*. Variasi panjang dan sekuen ISR dapat digunakan sebagai pembeda tingkat taksa genus dan spesies (Rivas *et al.*, 2006; Belgacem *et al.*, 2009; Yavuz *et al.*, 2004).

Menurut Belgacem *et al.* (2009) dan Rahman *et al.* (2003) ukuran produk amplifikasi 16S-23S rDNA ISR menggunakan primer 16S/P2 dan 23S/P7 dapat digunakan untuk pengelompokan bakteri asam laktat menjadi empat kelompok berdasarkan jumlah dan ukuran operon *ribosomal* RNA (*rrn*) yaitu: 1) kelompok *Lactococcus* yang mempunyai tipe operon *rrn* tunggal *medium* (M-ISR); 2) kelompok *Enterococcus* mempunyai dua tipe operon *rrn small* (S-ISR) dan *medium* (M-ISR); 3) kelompok *Lactobacillus* mempunyai 2 tipe operon *rrn small* (S-ISR) dan *large* (L-ISR) dan 4) kelompok *Pediococcus* spp. dan *Weisella* mempunyai tiga tipe operon *rrn small* (S-ISR), *medium* (M-ISR) dan *large* (L-ISR). Hasil pengukuran produk 16S-23S rDNA ISR terhadap 19 strain *L. fermentum* dari sayur asin menunjukkan bahwa *L. fermentum* termasuk dalam kelompok *Lactobacillus* karena mempunyai tipe dua *rrn* operon L-ISR dengan panjang 765 bp dan S-ISR

dengan panjang 570 bp. Daerah S-ISR *Lactobacillus* berisi sekuen *noncoding* dan daerah L-ISR *Lactobacillus* berisi sekuen mengkode tRNA^{Ile}- tRNA^{Ala} - sekuen *noncoding* (Rahman *et al.*, 2003).

Daerah 16S-23S rDNA ISR mempunyai sekuen lebih variabel dibandingkan gen 16S dan 23S rDNA. Daerah antara tRNA^{Ala} dan 23S rDNA merupakan daerah yang mempunyai polimorfisme tinggi (Belgacem *et al.*, 2009). Analisis RFLP 16S-23S rDNA ISR dan strain tipe-nya dapat digunakan untuk mengetahui variasi genetik dalam spesies (Miteva *et al.*, 2001; Rahman *et al.*, 2003; Belgacem *et al.*, 2009). Restriksi *HhaI* pada 16S-23S rDNA ISR strain tipe *L. plantarum* JCM 1149^T (*outgroup*) menghasilkan empat fragmen DNA masing-masing dengan panjang 410, 380, 290 dan 200 bp; sedangkan fragmen DNA pada isolat-isolat *L. fermentum* masing-masing berada pada posisi 400, 320, 290 dan 200 bp. Hasil tersebut mengkonfirmasi bahwa kelompok *L. fermentum* secara taksonomi berbeda dari *L. plantarum* (Gambar 2).

Secara detail hasil RFLP 16S-23S rDNA ISR *L. fermentum* dan spesies tipe-nya (20 isolat) menggunakan enzim restriksi *HhaI* menghasilkan dua kelompok genotip *L. fermentum*. Kelompok pertama memiliki empat fragmen DNA masing-masing dengan panjang 400, 320, 290 dan 200 bp. Kelompok kedua hanya satu strain, yaitu *L. fermentum* strain D11 yang memiliki enam fragmen DNA masing-masing dengan panjang 660, 570, 400,

320, 290 dan 200 bp. Data menunjukkan bahwa polimorfisme genetik diantara isolat-isolat *L. fermentum* pada sayur asin berdasarkan data 16S-23S rDNA ISR adalah rendah. Adanya fragmen tambahan pada *L. fermentum* strain D11 pada posisi fragmen 570 dan 660 bp menunjukkan bahwa posisi kedua fragmen tersebut spesifik pada *L. fermentum* strain D11, ditunjuk dengan tanda panah pada Gambar 2. Posisi fragmen spesifik pada suatu isolat dan sangat penting karena dapat digunakan sebagai marka untuk pengembangan metoda deteksi secara molekuler.

Teknik RAPD-PCR menggunakan primer M13 berhasil diterapkan untuk analisis variasi genetik *L. fermentum* asal sayur asin. Polimorfisme profil DNA isolat-isolat yang analisis, ditunjukkan dalam Gambar 3 dimana pita DNA tampak teramplifikasi, baik tebal maupun tipis serta jumlah pita DNA bervariasi. Menurut Zulkifli *et al.* (2009) polimorfisme pita DNA kemungkinan disebabkan adanya mutasi pada sekuen DNA tempat penempelan primer RAPD pada genom bakteri. Analisis dendrogram produk RAPD-PCR menggunakan metode UPGMA dengan *Jaccard's similarity coefficient* menunjukkan kelompok *L. fermentum* berbeda kluster dengan *L. plantarum* JCM 1149^T (Gambar 4). Hasil tersebut mengkonfirmasi bahwa teknik RAPD-PCR dapat memisahkan polimorfisme pada spesies yang berbeda, seperti dilaporkan oleh Saito *et al.* (2011). Secara umum, hasil analisis RAPD yang mendukung diskriminasi analisis RFLP 16S-23S rDNA ISR, mengindikasikan bahwa isolat *L. fermentum* strain D11 merupakan isolat dengan karakter genetik yang independen/unik dibandingkan dengan strain-strain *L. fermentum* lainnya asal sayur asin.

Menurut Gillings dan Holley (1997) teknik ERIC-PCR merupakan teknik yang sensitif dan dapat direproduksi untuk mengetahui variasi genetik melalui profil pita DNA pada target enterobakteri dan non-enterobakteri. Analisis ERIC-PCR telah digunakan untuk mengenali polimorfisme intra- dan interspesies *L. paraplantarum*, *L. curvatus*, *L. sakei*, *L. pentosus* dan *L. plantarum* (Saito *et al.*, 2011). Aplikasi teknik ERIC-PCR menggunakan primer ERIC2 berhasil diterapkan untuk analisis intraspesies *L. fermentum* pada penelitian ini (Gambar 3B). Amplifikasi dengan ERIC-PCR menghasilkan pita

DNA sebanyak 4-10 buah dengan ukuran 280-3050 bp.

Analisis pengelompokan hierarki atas produk ERIC-PCR memperlihatkan dua kelompok genetik dari strain-strain *L. fermentum* asal sayur asin yang berada pada kluster terpisah. Pengelompokan ini juga dengan jelas memisahkan strain-strain anggota kelompok spesies *L. fermentum* dari spesies *L. plantarum*. Berdasarkan data tersebut, teknik ERIC-PCR dapat memperlihatkan polimorfisme pada spesies berbeda (Saito *et al.*, 2011). Hasil analisis ERIC-PCR menunjukkan isolat-isolat *L. fermentum* asal sayur asin terbagi menjadi dua kelompok besar (kluster 1 dan kluster 2) dimana 6 strain *L. fermentum* asal sayur asin memiliki perbedaan genotipe dibandingkan strain tipe *L. fermentum* JCM 1173^T. Oleh karena itu, perlu dilakukan analisis fisiologi lanjutan untuk memastikan identitas keenam strain tersebut dan karakteristik aktivitasnya dalam proses fermentasi sayur asin. Hasil analisis DNA polimorfisme menunjukkan bahwa posisi pita DNA 2200, 2000, 1820, 1710, 1650, 1280, 720, 390 dan 280 bp spesifik pada kluster pertama dan posisi pita DNA 3050, 2980, 2920, 1350, 1230, 1110 dan 940 bp spesifik pada kluster kedua (Gambar 3B). Posisi pita DNA 2700, 2400, 530, 640, 370 dan 340 bp umum ditemukan pada kedua kluster *L. fermentum*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa primer ERIC2 cukup informatif dalam membedakan variasi genetik isolat-isolat *L. fermentum* hingga tingkat strain.

Hasil analisis molekuler menunjukkan terdapat dua kelompok genetik *L. fermentum* asal sayur asin. Variasi genetik strain-strain *L. fermentum* diduga berperan dalam proses fermentasi sawi (sayur asin) dan kualitas hasil fermentasinya. Oleh karena itu, perlu dibuktikan dalam studi berikutnya bahwa variasi genetik strain-strain *L. fermentum* sangat mempengaruhi kualitas fermentasi sayur asin. Data penelitian dapat dipergunakan untuk mengembangkan berbagai jenis starter dalam usaha pengembangan industri sayur asin/fermentasi sayuran dan buah-buahan.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan genotipe diantara strain-strain *L. fermentum* asal sayur asin. Hasil amplifikasi daerah 16S-23S rDNA

ISR pada 19 strain *L. fermentum* dan satu strain tipe *L. fermentum* menunjukkan dua pita DNA dengan ukuran 765 bp dan 570 bp. Kedua ampikon tersebut merupakan *large* (L-ISR) dan *small* (S-ISR) spesifik yang pada *Lactobacillus*. Hasil analisis RFLP 16S-23S rDNA ISR menggunakan enzim restriksi *HhaI* menunjukkan *L. fermentum* strain D11 merupakan isolat yang unik dan independen dari 18 isolat *L. fermentum* lainnya. Analisis RAPD-PCR menghasilkan pita DNA sebanyak 4-8 buah dengan ukuran 800-2080 bp. ERIC-PCR menghasilkan pita DNA sebanyak 4-10 buah dengan ukuran 280-3050 bp. Dendogram hasil analisis kluster dengan metoda UPGMA pada produk RAPD-PCR dan ERIC-PCR menunjukkan bahwa *L. fermentum* asal sayur asin dapat dibedakan menjadi dua kelompok genetik. Hasil ketiga metode analisis molekuler menunjukkan adanya dua kelompok genetik *L. fermentum* asal sayur asin.

UCAPAN TERIMA KASIH

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

DAFTAR PUSTAKA

- Belgacem, Z.B., Dousset, X., Prevost, H. and Manai, M., 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, pp. 711-720.
- Daeschel, M.A., Andersson, R.E. and Fleming, H.P., 1987. Microbial ecology of fermenting plant material. *FEMS Microbiology Reviews*, 46, pp. 357-367.
- Franco, M., Quintana, A., Duque, C., Suarez, C., Rodriguez, M.X. and Barea, J., 2010. Evaluation of *actinomyces* strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Applied Soil Ecology*, 45, pp. 209-217.
- Gillings, M. and Holley, M., 1997. Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. *Letter in Applied Microbiology*, 25, pp. 17-21.
- Gurtler, V. and Stanisch, V.A., 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142, pp. 3-16.
- Huey, B. and Hall, J., 1989. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13. *Journal of Bacteriology*, 171(5), pp. 2528-2532.
- Miteva, V., Boudakov, I., Toyancheva, G.I.S., Marinova, B., Mitev V. and Mengaud, J., 2001. Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies by ribotyping and amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *Journal of Applied Microbiology*, 90, pp. 909-918.
- Moschetti, G., Blaiotta, G., Aponte, M., Catzeddu, P., Villani, F., Deiana, P. and Coppola, S., 1998. Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 85(1), pp. 25-36.
- Nei, M. and Li, W., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10), pp.5269-5273.
- Promega. 2012. Certificate of Analysis GoTaq® Green Master Mix and Usage Information. Part# 9PIM712 and Revised 3/12. <http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/>. (Diunduh 11Mei 2014).
- Puspito, H. and Fleet, G.H., 1985. Microbiology of sayur asin fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 22, pp.442-445.
- Rachman, C.N., Kabadjova, P., Prévost H. and Dousset. X., 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, pp.1207-1216.
- Rivas, B., Marcobal, Á. and Munoz, R., 2006. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Lactobacillus plantarum* strains. *Microbiology*, 152, pp. 85-93.
- Rohlf, F.J., 1998. *NTSYS/PC numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Version 2.0. Applied Biostatistics Inc, New York.
- Rossetti, L. and Giraffa, G., 2005. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M 13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods*, 63, pp.135-144.
- Saito S., Kobayashi, M., Kimoto-Nira, H., Aoki, R., Mizumachi, K., Miyata, S., Yamamoto, K., Kitagawa, Y. and Suzuki. C., 2011. Intraspecies Discrimination of *Lactobacillus paraplantarum* by PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 316, pp. 70-76.
- Solieri, L., Genova, F., De Paola, M. and Giudici, P., 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, pp. 285-298.
- Sulistiani, Abinawanto, Sukara, E., Salamah, A., Dinoto A. and Mangunwardoyo, W., 2014. Identification of lactic acid bacteria in sayur asin from central java (Indonesia) based on 16S rDNA sequence. *International Food Research Journal*, 21(2), pp. 527-532.
- Yavuz, E., Gunes, H., Bulut, C., Harsa, S. and Yenidunya, A.F., 2004. RFLP of 16S-ITS rDNA Region to differentiate lactobacilli at species level. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(6), pp. 535-537.
- Zavaleta, A.I., Murcia, A.J.M. and Valera, F.R., 1996. 16S-23S rDNA Intergenic sequences indicate that *Leuconostoc oenos* is phylogenetically homogeneous. *Microbiology*, 142, pp. 2105-2114.
- Zulkifli, Y., Alitheen, N.B., Son, R., Raha, A.R., Samuel, L., Yeap, S.K. and Nishibuchi, M., 2009. Random amplified polymorphic DNA-PCR and ERIC PCR analysis on *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cockles in Padang, Indonesia. *International Food Research Journal*, 16, pp. 141-150.

Pedoman Penulisan Naskah Berita Biologi

Berita Biologi adalah jurnal yang menerbitkan artikel kemajuan penelitian di bidang biologi dan ilmu-ilmu terkait di Indonesia. Berita Biologi memuat karya tulis ilmiah asli berupa makalah hasil penelitian, komunikasi pendek dan tinjauan kembali yang belum pernah diterbitkan atau tidak sedang dikirim ke media lain. Masalah yang diliput harus menampilkan aspek atau informasi baru.

Tipe naskah

- 1. Makalah lengkap hasil penelitian (*original paper*)**
Naskah merupakan hasil penelitian sendiri yang mengangkat topik yang *up to date*. Tidak lebih dari 15 halaman termasuk tabel dan gambar. Pencantuman lampiran seperlunya, namun redaksi berhak mengurangi atau meniadakan lampiran.
- 2. Komunikasi pendek (*short communication*)**
Komunikasi pendek merupakan makalah hasil penelitian yang ingin dipublikasikan secara cepat karena hasil temuan yang menarik, spesifik dan baru, agar dapat segera diketahui oleh umum. Artikel yang ditulis tidak lebih dari 10 halaman. Hasil dan pembahasan boleh digabung.
- 3. Tinjauan kembali (*review*)**
Tinjauan kembali merupakan rangkuman tinjauan ilmiah yang sistematis-kritis secara ringkas namun mendalam terhadap topik penelitian tertentu. Hal yang ditinjau meliputi segala sesuatu yang relevan terhadap topik tinjauan yang memberikan gambaran '*state of the art*', meliputi temuan awal, kemajuan hingga issue terkini, termasuk perdebatan dan kesenjangan yang ada dalam topik yang dibahas. Tinjauan ulang ini harus merangkum minimal 30 artikel.

Struktur naskah

- 1. Bahasa**
Bahasa yang digunakan adalah Bahasa Indonesia atau Inggris yang baik dan benar.
- 2. Judul**
Judul diberikan dalam bahasa Indonesia dan Inggris. Judul harus singkat, jelas dan mencerminkan isi naskah dengan diikuti oleh nama serta alamat surat menyurat penulis dan alamat email. Nama penulis untuk korespondensi diberi tanda amplop cetak atas (*superscript*).
- 3. Abstrak**
Abstrak dibuat dalam dua bahasa, bahasa Indonesia dan Inggris. Abstrak memuat secara singkat tentang latar belakang, tujuan, metode, hasil yang signifikan, kesimpulan dan implikasi hasil penelitian. Abstrak berisi maksimum 200 kata, spasi tunggal. Di bawah abstrak dicantumkan kata kunci yang terdiri atas maksimum enam kata, dimana kata pertama adalah yang terpenting. Abstrak dalam Bahasa Inggris merupakan terjemahan dari Bahasa Indonesia. Editor berhak untuk mengedit abstrak demi alasan kejelasan isi abstrak.
- 4. Pendahuluan**
Pendahuluan berisi latar belakang, permasalahan dan tujuan penelitian. Perlu disebutkan juga studi terdahulu yang pernah dilakukan terkait dengan penelitian yang dilakukan.
- 5. Bahan dan cara kerja**
Bahan dan cara kerja berisi informasi mengenai metode yang digunakan dalam penelitian. Pada bagian ini boleh dibuat sub-judul yang sesuai dengan tahapan penelitian. Metode harus dipaparkan dengan jelas sesuai standar topik penelitian dan dapat diulang oleh peneliti lain. Apabila metode yang digunakan adalah metode yang sudah baku cukup ditulis sitasinya dan apabila ada modifikasi maka harus dituliskan dengan jelas bagian mana dan hal apa yang dimodifikasi.
- 6. Hasil**
Hasil memuat data ataupun informasi utama yang diperoleh berdasarkan metode yang digunakan. Apabila ingin mengacu pada suatu tabel/grafik/diagram atau gambar, maka hasil yang terdapat pada bagian tersebut dapat diuraikan dengan jelas dengan tidak menggunakan kalimat 'Lihat Tabel 1'. Apabila menggunakan nilai rata-rata maka harus menyertakan pula standar deviasinya.
- 7. Pembahasan**
Pembahasan bukan merupakan pengulangan dari hasil. Pembahasan mengungkap alasan didapatkannya hasil dan arti atau makna dari hasil yang didapat tersebut. Bila memungkinkan, hasil penelitian ini dapat dibandingkan dengan studi terdahulu.
- 8. Kesimpulan**
Kesimpulan berisi informasi yang menyimpulkan hasil penelitian, sesuai dengan tujuan penelitian, dan penelitian berikutnya yang bisa dilakukan.
- 9. Ucapan terima kasih**
Bagian ini berisi ucapan terima kasih kepada suatu instansi jika penelitian ini didanai atau didukung oleh instansi tersebut, ataupun kepada pihak yang membantu langsung penelitian atau penulisan artikel ini.
- 10. Daftar pustaka**
Pada bagian ini, tidak diperkenankan untuk mensitasi artikel yang tidak melalui proses *peer review*. Apabila harus menyitir dari "laporan" atau "komunikasi personal" dituliskan '*unpublished*' dan tidak perlu ditampilkan di daftar pustaka. Daftar pustaka harus berisi informasi yang *up to date* yang sebagian besar berasal dari *original papers* dan penulisan terbitan berkala ilmiah (nama jurnal) tidak disingkat.

Format naskah

- Naskah diketik dengan menggunakan program Microsoft Word, huruf New Times Roman ukuran 12, spasi ganda kecuali Abstrak. Batas kiri-kanan atas-bawah masing-masing 2,5 cm. Maksimum isi naskah 15 halaman termasuk ilustrasi dan tabel.
- Penulisan bilangan pecahan dengan koma mengikuti bahasa yang ditulis menggunakan dua angka desimal di belakang koma. Apabila menggunakan Bahasa Indonesia, angka desimal ditulis dengan menggunakan koma (,) dan ditulis dengan menggunakan titik (.) bila menggunakan bahasa Inggris. Contoh: Panjang buku adalah 2,5 cm. Length of the book is 2.5 cm. Penulisan angka 1-9 ditulis dalam kata kecuali bila bilangan satuan ukur, sedangkan angka 10 dan seterusnya ditulis dengan angka. Contoh lima orang siswa, panjang buku 5 cm.
- Penulisan satuan mengikuti aturan international system of units.
- Nama takson dan kategori taksonomi ditulis dengan merujuk kepada aturan standar yang diakui. Untuk tumbuhan menggunakan *International Code of Botanical Nomenclature* (ICBN), untuk hewan menggunakan *International Code of Zoological Nomenclature* (ICZN), untuk jamur *International Code of Nomenclature for Algae, Fungi and Plant* (ICFAFP), *International Code of Nomenclature of Bacteria* (ICNB), dan untuk organisme yang lain merujuk pada kesepakatan Internasional. Penulisan nama takson lengkap dengan nama author hanya dilakukan pada bagian deskripsi takson, misalnya pada naskah taksonomi. Penulisan nama takson untuk bidang lainnya tidak perlu menggunakan nama author.
- Tata nama di bidang genetika dan kimia merujuk kepada aturan baku terbaru yang berlaku.
- Ilustrasi dapat berupa foto (hitam putih atau berwarna) atau gambar tangan (*line drawing*).
- Tabel
Tabel diberi judul yang singkat dan jelas, spasi tunggal dalam bahasa Indonesia dan Inggris, sehingga Tabel dapat berdiri sendiri. Tabel diberi nomor urut sesuai dengan keterangan dalam teks. Keterangan Tabel diletakkan di bawah Tabel. Tabel tidak dibuat tertutup dengan garis vertikal, hanya menggunakan garis horisontal yang memisahkan judul dan batas bawah. Paragraf pada isi tabel dibuat satu spasi.
- Gambar
Gambar bisa berupa foto, grafik, diagram dan peta. Judul gambar ditulis secara singkat dan jelas, spasi tunggal. Keterangan yang menyertai gambar harus dapat berdiri sendiri, ditulis dalam bahasa Indonesia dan Inggris. Gambar dikirim dalam bentuk .jpeg dengan resolusi minimal 300 dpi, untuk *line drawing* minimal 600dpi.

9. Daftar Pustaka

Sitasi dalam naskah adalah nama penulis dan tahun. Bila penulis lebih dari satu menggunakan kata 'dan' atau *et al.* Contoh: (Kramer, 1983), (Hamzah dan Yusuf, 1995), (Premachandra *et al.*, 1992). Bila naskah ditulis dalam bahasa Inggris yang menggunakan sitasi 2 orang penulis maka digunakan kata 'and'. Contoh: (Hamzah and Yusuf, 1995). Penulisan daftar pustaka adalah sebagai berikut:

a. Jurnal

Nama jurnal ditulis lengkap.

Agusta, A., Maehara, S., Ohashi, K., Simanjuntak, P. and Shibuya, H., 2005. Stereoselective oxidation at C-4 of flavans by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. isolated from a tea plant. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53(12), pp.1565-1569.

b. Buku

Merna, T. and Al-Thani, F.F., 2008. *Corporate Risk Management*. 2nd ed. John Welly and Sons Ltd. England.

c. Prosiding atau hasil Simposium/Seminar/Lokakarya.

Fidiana, F., Triyuwono, I. and Riduwan, A., 2012. Zakah Perspectives as a Symbol of Individual and Social Piety: Developing Review of the Meadian Symbolic Interactionism. *Global Conference on Business and Finance Proceedings. The Institute of Business and Finance Research*, 7(1), pp. 721 - 742

d. Makalah sebagai bagian dari buku

Barth, M.E., 2004. Fair Values and Financial Statement Volatility. In: Borio, C., Hunter, W.C., Kaufman, G.G., and Tsatsaronis, K.(eds.) *The Market Dicipline Across Countries and Industries*. MIT Press. Cambridge.

e. Thesis, skripsi dan disertasi

Williams, J.W., 2002. Playing the Corporate Shell Game: The Forensic Accounting and Investigation Industry, Law, and the Management of Organizational Appearance. *Dissertation*. Graduate Programme in Sociology. York University. Toronto. Ontario.

f. Artikel online.

Artikel yang diunduh secara online ditulis dengan mengikuti format yang berlaku untuk jurnal, buku ataupun tesis dengan dilengkapi alamat situs dan waktu mengunduh. Tidak diperkenankan untuk mensitasi artikel yang tidak melalui proses peer review misalnya laporan perjalanan maupun artikel dari laman web yang tidak bisa dipertanggung jawabkan kebenarannya seperti wikipedia.

Himman, L.M., 2002. A Moral Change: Business Ethics After Enron. San Diego University Publication. <http://ethics.sandiego.edu/LMH/oped/Enron/index.asp>. (accessed 27 Januari 2008) bila naskah ditulis dalam bahasa inggris atau (diakses 27 Januari 2008) bila naskah ditulis dalam bahasa indonesia

Formulir persetujuan hak alih terbit dan keaslian naskah

Setiap penulis yang mengajukan naskahnya ke redaksi Berita Biologi akan diminta untuk menandatangani lembar persetujuan yang berisi hak alih terbit naskah termasuk hak untuk memperbanyak artikel dalam berbagai bentuk kepada penerbit Berita Biologi. Sedangkan penulis tetap berhak untuk menyebarkan edisi cetak dan elektronik untuk kepentingan penelitian dan pendidikan. Formulir itu juga berisi pernyataan keaslian naskah yang menyebutkan bahwa naskah adalah hasil penelitian asli, belum pernah dan tidak sedang diterbitkan di tempat lain.

Penelitian yang melibatkan hewan

Setiap naskah yang penelitiannya melibatkan hewan (terutama mamalia) sebagai obyek percobaan / penelitian, wajib menyertakan 'ethical clearance approval' terkait animal *welfare* yang dikeluarkan oleh badan atau pihak berwenang.

Lembar ilustrasi sampul

Gambar ilustrasi yang terdapat di sampul jurnal Berita Biologi berasal dari salah satu naskah yang dipublikasi pada edisi tersebut. Oleh karena itu, setiap naskah yang ada ilustrasinya diharapkan dapat mengirimkan ilustrasi atau foto dengan kualitas gambar yang baik dengan disertai keterangan singkat ilustrasi atau foto dan nama pembuat ilustrasi atau pembuat foto.

Proofs

Naskah *proofs* akan dikirim ke penulis dan penulis diwajibkan untuk membaca dan memeriksa kembali isi naskah dengan teliti. Naskah proofs harus dikirim kembali ke redaksi dalam waktu tiga hari kerja.

Naskah cetak

Setiap penulis yang naskahnya diterbitkan akan diberikan 1 eksemplar majalah Berita Biologi dan *reprint*. Majalah tersebut akan dikirimkan kepada *corresponding author*

Pengiriman naskah

Naskah dikirim secara online ke website berita biologi: http://e-journal.biologi.lipi.go.id/index.php/berita_biologi

Alamat kontak

Redaksi Jurnal Berita Biologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI
Cibinong Science Centre, Jl. Raya Bogor Km. 46 Cibinong 16911
Telp: +61-21-8765067, Fax: +62-21-87907612, 8765063, 8765066,
Email: jurnalberitabiologi@yahoo.co.id atau
jurnalberitabiologi@gmail.com

BERITA BIOLOGI

Vol. 16 (2)

Isi (Content)

Agustus 2017

MAKALAH HASIL RISET (ORIGINAL PAPERS)

- CO-CULTURE OF AMYLOLYTIC FUNGI *Aspergillus niger* AND OLEAGINOUS YEAST *Candida orthopsilosis* ON CASSAVA WASTE FOR LIPID ACCUMULATION [Akumulasi lipid oleh kultur campuran kapang *Aspergillus niger* dan khamir *Candida orthopsilosis* pada media limbah singkong]**
Atit Kanti and I Made Sudiana 111 – 119
- STUDI BIOMETRI BERDASARKAN MERISTIK DAN MORFOMETRIK IKAN GURAMI GALUR BASTAR DAN BLUESAFIR [Biometrical Study Based on Meristic and Morphometric of Giant Gouramy Strain Bastar and Bluesafir]**
Deni Radona, Nunak Nafiqoh dan Ootong Zenal Arifin 121 – 127
- HERITABILITAS DAN PEROLEHAN GENETIK PADA BOBOT IKAN NILA HASIL SELEKSI [Heritability and Genetic Gain on Weight of Tilapia Resulted Frown by Individual Selection]**
Estu Nugroho, Lalu Mayadi dan Sigit Budileksono 129 – 135
- LUMUT SEJATI DI HUTAN ALAM PAMEUNGPEUK, TAMAN NASIONAL GUNUNG HALIMUN SALAK, JAWA BARAT [Mosses Pamengpeuk Primary Forest, Mount Halimun Salak Natiolan Park, West Java]**
Florentina Indah Windadri 137 – 146
- FAUNA IKAN AIR TAWAR DI PERAIRAN KAWASAN GUNUNG SAWAL, JAWA BARAT, INDONESIA [The Freshwater Fish Fauna of Sawal Mountain Region, West Java, Indonesia]**
Haryono 147 – 156
- PENGARUH PENAMBAHAN GLISEROL PADA PAKAN TERHADAP PERTUMBUHAN DAN KELANGSUNGAN HIDUP IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*) [Effect of Glycerol Addition into Fish Feed on the Growth and Survival Rate of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)]**
Lusi Herawati Suryaningrum, Mulyasari dan Reza Samsudin 157 – 165
- PERBANYAKAN VEGETATIF BIDARA UPAS (*Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f) DI PUSAT KONSERVASI TUMBUHAN KEBUN RAYA [Vegetative Propagation of Bidara Upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f) at Center for Plant Conservation – Botanic Garden]**
Ria Cahyaningsih, Syamsul Hidayat dan Endang Hidayat 167 – 174
- KEANEKARAGAMAN JENIS POHON DI KAWASAN CAGAR ALAM DUNGUS IWUL, JASINGA, BOGOR [Tree Biodiversity in dungus iwul Nature Reserve, Jasinga, Bogor]**
Ruddy Polosakan dan Laode Alhamd 175 – 183
- VARIASI GENETIK *Lactobacillus fermentum* Beijerinck ASAL SAYUR ASIN BERDASARKAN ANALISIS RFLP 16S-23S rDNA ISR, RAPD -PCR DAN ERIC -PCR [Genetic Variation of *Lactobacillus fermentum* Beijerinck Origin Sayur Asin Based on RFLP 16S-23S rDNA ISR, RAPD -PCR and ERIC -PCR Analysis]**
Sulistiani, Wibowo Mangunwardoyo, Abinawanto, Endang Sukara, Achmad Dinoto dan Andi Salamah 185 – 192
- PATOGENISITAS ISOLAT BAKTERI *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* DAN PEMANTAUAN PENYAKIT HAWAR DAUN BAKTERI PADA PADI GALUR ISOGENIK [Pathogenicity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Isolates and Bacterial Leaf Blight Disease Monitoring on Rice-Near Isogenic Lines (NILs)]**
Yadi Suryadi dan Triny Suryani Kadir 193 – 202
- KARAKTERISASI ENZIM PROTEASE DARI BAKTERI *Stenotrophomonas* sp. ASAL GUNUNG BROMO, JAWA TIMUR [Characterization of Protease Enzymes of *Stenotrophomonas* sp. bacteria from Bromo Mountain, East Java]**
Yati Sudaryati Soeka dan Sulistiani 203 – 211
- KOMUNIKASI PENDEK (SHORT COMMUNICATION)**
- Pellacalix Symphiodiscus* STAFP FROM LONG BAGUN, MAHAKAM HULU: MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION AND ITS DISTRIBUTION [*Pellacalix Symphiodiscus* Stafp dari Long Bagun, Mahakam hulu: Karakterisasi Morfologi dan Persebarannya]**
Inggit Puji Astuti, Ratna Susandarini dan Rismita Sari 213 – 216