

**UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM
LAKTAT (BAL) PADA PRODUK SUSU FERMENTASI TERHADAP
BAKTERI *Escherichia coli* di WILAYAH MALANG**

SKRIPSI

**Oleh:
AFNAN ADILA
NIM. 18930078**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2023**

**UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM
LAKTAT (BAL) PADA PRODUK SUSU FERMENTASI TERHADAP
BAKTERI *Escherichia coli* di WILAYAH MALANG**

SKRIPSI

**Oleh:
AFNAN ADILA
NIM. 18930078**

**Diajukan Kepada:
Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2023**

**UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM
LAKTAT (BAL) PADA PRODUK SUSU FERMENTASI TERHADAP
BAKTERI *Escherichia coli* di WILAYAH MALANG**

SKRIPSI

Oleh:

AFNAN ADILA

NIM. 18930078

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:

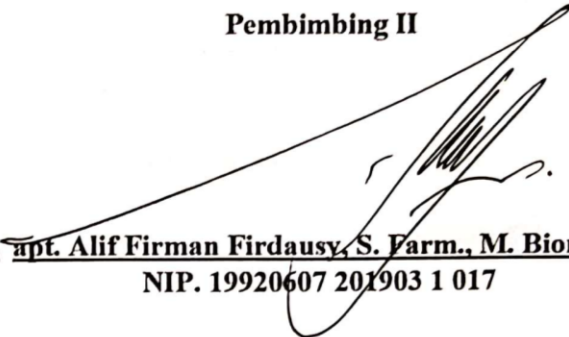
Tanggal: 19 Juni 2023

Pembimbing I



Prof. Dr. apt. Roihatul Muti'ah, M.Kes.
NIP. 19800203 200912 2 003

Pembimbing II



apt. Alif Firman Firdausy, S. Farm., M. Biomed.
NIP. 19920607 201903 1 017



apt. Abdul Hakim, M.PI., M.Farm
NIP. 19761214 200912 1 002

**UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM
LAKTAT (BAL) PADA PRODUK SUSU FERMENTASI TERHADAP
BAKTERI *Escherichia coli* di WILAYAH MALANG**

SKRIPSI

Oleh:

AFNAN ADILA

NIM. 18930078

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan Dinyatakan
Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan Untuk Memproduksi Gelar
Sarjana Farmasi (S.Farm)**

Tanggal: 13 Desember 2023

**Ketua Penguji : apt. Alif Firman Firdausy, S.Farm., M.Biomed (.....)
NIP. 19920607 201903 1 017**

**Anggota Penguji : 1. Prof. Dr. Apt. Roihatul Muti'ah, M.Kes (.....)
NIP. 19800203 200912 2003
2. drg. Arief Suryadinata, Sp.,Ort. (.....)
NIP. 19850720 200912 1 003
3. Muhammad Amiruddin, Lc., M.Pd. (.....)
NIP. 19780317 20180201 1 218**

**Mengetahui,
Ketua Program Studi Farmasi**



**apt. Abdul Hafid, M.Pi., M.Farm
NIP. 19761214 200912 1 002**

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Afnan Adila

NIM : 18930078

Jurusan : Farmasi

Fakultas : Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

Judul Skripsi : Uji Aktivitas Antimikroba Dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) Pada Produk Susu Fermentasi Terhadap Bakteri *Escherichia coli* di Wilayah Malang

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar rujukan. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 11 Desember 2023

Yang membuat pernyataan,



Afnan Adila
NIM. 18930078

MOTTO

”إِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا“

(Q.S. Al-Insyirah :6)

“Truly with hardship comes ease”

”اتَّقِ اللَّهَ حَيْثُمَا كُنْتَ، وَأَتَّبِعِ السَّبِيلَ الْحَسَنَةَ تَمْحُهَا، وَخَالِقِ النَّاسَ بِخُلُقٍ حَسَنٍ“

“Bertaqwalah kepada Allah dimanapun kita berada, iringilah perbuatan buruk dengan perbuatan baik, dan pergaulilah manusia dengan adab yang baik”

(HR. at Tirmidzi)

“Salah satu pengkerdilan terkejam dalam hidup adalah membiarkan pikiran yang cemerlang menjadi budak bagi tubuh yang malas, yang mendahulukan istirahat sebelum lelah”

(Buya HAMKA)

“Be the best version of you”

KATA PENGANTAR

Assalamu 'alaikum wa rahmatullahi wa barakatuh

Alhamdulillahirabbil 'alamin oleh karena limpahan rahmat, hidayah, serta taufiq dari Allah SWT, penulisan skripsi sebagai salah satu bagian dari persyaratan kelulusan tingkat Strata-1 (S1) dengan judul “Uji Aktivitas Antimikroba Dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) Pada Produk Susu Fermentasi Terhadap Bakteri *Escherichia coli* di Wilayah Malang” ini telah selesai dituliskan. Shalawat dan salam dijunjungkan kepada baginda Nabi Muhammad *sallahu alaihi wa sallam*, yang semoga dilimpahkan syafaatnya kelak atas umatnya di hari akhir nanti. Penulis bersyukur atas banyak pihak yang telah memberikan dukungan, harapan, dan iringan doa sehingga ucapan syukur dan terima kasih penulis haturkan kepada:

1. Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, Prof. Dr. H. M. Zainuddin, MA.
2. Dekan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, Prof. Dr. dr. Yuyun Yueniwati P.W., M. Kes, Sp.Rad (K).
3. Ketua program studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, apt. Abdul Hakim, M.P.I., M. Farm. yang telah membantu, memberikan pengarahan serta memberikan pengalaman yang berharga terhadap penulisan skripsi dan selama masa perkuliahan penulis.
4. Apt. Alif Firman Firdausy, S. Farm, M. Biomed dan Prof. Dr. apt. Roihatul Muti'ah, M.Kes selaku dosen pembimbing skripsi yang selalu dan sangat banyak membantu, mendukung, memberikan pengarahan serta nasihat dan pengalaman yang berharga terhadap penulisan skripsi dan selama masa perkuliahan penulis.
5. drg. Arief Suryadinata, Sp. Ort selaku dosen wali yang selalu memberikan semangat, dukungan, memberikan pengarahan serta nasihat terkait perkuliahan sejak semester awal perkuliahan hingga saat ini.

6. Segenap civitas akademika Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang termasuk semua dosen, staff serta asisten laboratorium.
7. Orang tua penulis yang tersayang, Abi Hanan Munthaha dan Umi Hambar Pangesti, yang selalu berjuang untuk membesarkan penulis, serta selalu mendoakan, meridhoi, memotivasi dan memberi dukungan kepada penulis sejak kecil sampai dapat menempuh pendidikan S1 Farmasi.
8. Keempat orang adik penulis, Bilal, Aca, Ahmad dan Aisyah, yang selalu mendukung, menyemangati dan menemani serta menghibur penulis selama ini.
9. Teman-teman Tim Riset BAL Kurnia Mufidah, Nofita Diah Ningrum, Azizah Nurul Rahmadany yang telah saling membantu, mendukung, menemani, dan menyemangati selama penelitian, perkuliahan, maupun penulisan skripsi; serta laboran yang banyak memberikan arahan dan bantuan.
10. Para sahabat dan teman dekat penulis yang selalu mendukung dan menyemangati penulis untuk dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini.
11. Kawan-kawan Polymerization 2018 juga keluarga besar penulis yang telah memberikan doa serta dukungan dalam menyelesaikan skripsi.
12. Semua pihak yang belum disebutkan yang telah ikut serta memberi dukungan dalam menyelesaikan skripsi baik secara materil maupun moril.

Akhir kata, skripsi ini diharapkan dapat menjadi manfaat bagi para pembaca maupun peneliti dalam penelitian selanjutnya. Mohon maaf apabila ada kekurangan,

Wassalamu'alaikum wa rahmatullahi wa barakatuh

Malang, 12 Desember 2023

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	
HALAMAN PENGAJUAN	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN.....	iii
MOTTO	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN	xiv
ABSTRAK	xvi
ABSTRACT	xvii
مستخلص البحث	xviii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
1.5 Batasan Masalah.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Produk Susu Fermentasi.....	7
2.1.1 Yoghurt	8

2.1.2 Kefir	9
2.2 Bakteri Asam Laktat (BAL).....	10
2.3 Identifikasi Isolat Bakteri Asam Laktat	10
2.4 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) dan Gen 16s rRNA.....	12
2.5 Filogenetik	14
2.6 Bakteri <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	15
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL.....	17
3.1 Kerangka Konseptual	17
3.2 Uraian Kerangka Konseptual	17
3.3 Hipotesis Penelitian	19
BAB IV METODE PENELITIAN	20
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	20
4.2 Waktu dan Tempat Penelitian	20
4.3 Populasi dan Sampel	20
4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	20
4.4.1 Variabel Penelitian	20
4.4.2 Definisi Operasional Variabel.....	21
4.5 Alat dan Bahan Penelitian.....	22
4.5.1 Alat Penelitian.....	22
4.5.2 Bahan Penelitian.....	22
4.6 Prosedur Penelitian.....	23
4.6.1 Isolasi Bakteri Asam Laktat Dari Yoghurt Dan Kefir	24
4.6.2 Pembuatan Kultur Stok BAL	24
4.6.3 Uji Identifikasi Bakteri Asam Laktat	25
4.6.4 Uji Kekeruhan Metode Standar McFarland 0,5	27
4.6.5 Ekstraksi <i>Cell Free Supernatant</i> (CFS)	28
4.6.6 Uji Aktivitas Antimikroba Terhadap <i>E. coli</i>	28
4.6.7 Analisis Data SPSS	29
4.6.8 Ekstraksi DNA Bakteri	29
4.6.9 Amplifikasi Gen 16s rRNA.....	29
4.6.10 Separasi DNA dengan Elektroforesis Gel.....	30

4.6.11 Sekuensing DNA & Perbandingan Hasil Sekuensing Dengan Bank Data BLAST	30
4.6.12 Analisis Kekerbatan Spesies Bakteri Dengan Metode Filogenetik.....	30
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	31
5.1 Isolasi Bakteri Asam Laktat Dari Yoghurt Dan Kefir	31
5.2 Pembuatan Kultur Stok BAL	33
5.3 Identifikasi Fenotipik Bakteri Asam Laktat	34
5.3.1 Uji Pewarnaan Gram	34
5.3.2 Uji Endospora	36
5.3.3 Uji Motilitas	37
5.3.4 Uji Katalase	38
5.3.5 Uji Fermentasi Karbohidrat.....	40
5.3.6 Uji Oksidase	42
5.4 Uji Aktivitas Antimikroba Terhadap E. coli	44
5.5 Analisis Data SPSS	47
5.6 Identifikasi Genotip Bakteri Asam Laktat	49
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	64
6.1 Kesimpulan	64
6.2 Saran.....	64
DAFTAR PUSTAKA	66
LAMPIRAN.....	75

DAFTAR GAMBAR

Gambar 3.1 Kerangka konsep penelitian	17
Gambar 4.1 Prosedur Penelitian	23
Gambar 5.1 Hasil pengamatan uji pewarnaan gram.....	35
Gambar 5.2 Hasil pengamatan uji endospora	37
Gambar 5.3 Hasil pengamatan uji motilitas	38
Gambar 5.4 Hasil pengamatan uji katalase.....	39
Gambar 5.5 Hasil pengamatan uji fermentasi karbohidrat	42
Gambar 5.6 Hasil pengamatan uji oksidase	43
Gambar 5.7 Hasil pengukuran zona hambat sampel	46
Gambar 5.8 Hasil separasi DNA isolat sampel dengan metode elektroforesis gel..	53
Gambar 5.9 Hasil penelusuran kekerabatan spesies bakteri dari urutan nukleotida DNA sampel y6 (a) dan k4 (b) melalui media daring NCBI	55
Gambar 5.10 Pohon filogenetik kekerabatan isolat bakteri y6	58
Gambar 5.11 Pohon filogenetik kekerabatan isolat bakteri k4	59

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Hasil pengamatan makroskopis koloni bakteri asam laktat sampel	33
Tabel 5.2 Hasil uji identifikasi fenotip	43
Tabel 5.3 Data pengukuran zona hambat	47
Tabel 5.4 Hasil Uji SPSS	48
Tabel 5.5 Hasil ekstraksi DNA	50
Tabel 5.6 Hasil sekuensing sampel y6 dan k4 dengan metode PCR	54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema kerja	75
Lampiran 2. Hasil uji SPSS	79
Lampiran 3. Hasil lab genotip PCR	82
Lampiran 4. Berkas penelitian	87

DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

Sampel K: sampel kefir

Sampel Y: sampel yoghurt

BAL: Bakteri Asam Laktat

CFS: *Cell Free Supernatant*

°C: derajat Celcius

mg: miligram

mm: milimeter

mL: mililiter

cm: centimeter

µg : mikrogram

LAF: *Laminar Air Flow*

BSC: *Biological Safety Cabinet*

NA: *Nutrient Agar*

NB: *Nutrient Broth*

MRS: *de Mann Rogosa Sharpe*

TSIA: *Triple Sugar Iron Agar*

MYE: *Milk Yeast Extract*

SIM: *Sulfide Indole Motility*

MRSA: *de Mann Rogosa Sharpe Agar*

MHA: *Muller Hilton Agar*

rpm: *revolutions per minute*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

RNA: *Ribonucleic Acid*

rRNA: *ribosome-Ribonucleic Acid*

UV: ultraviolet

CO₂: karbondioksida

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*

SPSS: *Statistical Package for the Social Science*

bp: pasang basa/*base pair*

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

ABSTRAK

Adila, Afnan. 2023. Uji Aktivitas Antimikroba Dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) Pada Produk Susu Fermentasi Terhadap Bakteri *Escherichia coli* di Wilayah Malang. Skripsi. Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing 1: Prof. Dr. apt. Roihatul Muti'ah, S.F., M.Kes.; Pembimbing 2: apt. Alif Firman Firdausy, S.Farm, M.Biomed.

Yoghurt dan kefir merupakan produk olahan fermentasi dari susu yang umum di masyarakat serta memiliki nilai manfaat sangat baik bagi kesehatan. Malang merupakan salah satu wilayah di Indonesia sebagai penghasil susu sapi terbesar di Indonesia yang memiliki potensi keanekaragaman bakteri asam laktat (BAL) yang tinggi, sehingga untuk mempelajari jenis BAL yang terkandung dalam produk susu fermentasi di Malang sekaligus aktivitasnya dalam menghambat bakteri patogen, seperti bakteri *E. coli*, perlu dilakukan penelitian. Tujuan penelitian ini untuk mengidentifikasi secara fenotip maupun genotip isolat BAL dari produk fermentasi yoghurt dan kefir yang berasal dari Malang sekaligus mengetahui aktivitas antimikrobanya dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Sejumlah koloni bakteri asam laktat yang didapatkan dari proses isolasi produk yoghurt dan kefir dikarakterisasi secara morfologi, fisiologi dan biokimia, kemudian *cell free supernatant* (CFS) isolat BAL diuji aktivitas antimikroba menggunakan metode difusi cakram terhadap bakteri *Escherichia coli*. Dilakukan identifikasi secara genotip menggunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR) dengan sekuen gen 16S rRNA. Diperoleh 6 isolat dari sampel yoghurt dan 6 isolat dari sampel kefir. Isolat BAL dari yoghurt dengan aktivitas antimikroba terbaik ada pada isolat y6 dengan rata-rata diameter zona hambat terhadap *E. coli* sebesar $9,47 \pm 0,16$ mm. Sedangkan isolat BAL dari kefir dengan aktivitas antimikroba terbaik ada pada isolat k4 dengan rata-rata diameter zona hambat terhadap *E. coli* sebesar $8,12 \pm 0,08$ mm. Identifikasi secara genotip dengan gen 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat y6 memiliki kontak kekerabatan yang tinggi terhadap *Pluralibacter pyrinus* strain 533.12.1 (kemiripan 99,71%), sedangkan isolat k4 teridentifikasi sebagai *Staphylococcus saprophyticus* strain UTI-045 (kemiripan 100%).

Kata kunci: aktivitas antibakteri, 16S rRNA, filogenetik

ABSTRACT

Adila, Afnan. 2023. Antimicrobial Activity Test and Identification of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Dairy Fermented Products Against *Escherichia coli* Bacteria in the Malang Region. Thesis. Department of Pharmacy, Faculty of Medicine and Health Sciences, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University, Malang. Supervisor 1: Prof. Dr. apt. Roihatul Muti'ah, S.F., M.Kes.; Supervisor 2: apt. Alif Firman Firdausy, S.Farm, M.Biomed.

Yogurt and kefir are fermented milk products that are common in society and have excellent health benefits. Malang as one of the largest cow's milk producer in Indonesia has the potential for high LAB diversity, so to study the types of LAB contained in fermented milk products in Malang as well as their activity in inhibiting pathogenic bacteria, such as *E. coli* bacteria, research needs to be carried out. The aim of this research was to identify phenotypically and genotypically isolates of lactic acid bacteria from yoghurt and kefir fermentation products originating from Malang as well as determine their antimicrobial activity in inhibiting the growth of *Escherichia coli* bacteria. A number of lactic acid bacteria colonies obtained from the process of isolating yoghurt and kefir products were characterized morphologically, physiologically and biochemically, then the cell free supernatant (CFS) of LAB isolates was tested for antimicrobial activity using the disc diffusion method against *Escherichia coli* bacteria. Genotypic identification was carried out using the polymerase chain reaction (PCR) method with the 16S rRNA gene sequence. 6 isolates were obtained from yoghurt samples and 6 isolates from kefir samples. The LAB isolate from yogurt with the best antimicrobial activity was isolate y6 with an average diameter of the inhibition zone against *E. coli* of 9.47 ± 0.16 mm. Meanwhile, the LAB isolate from kefir with the best antimicrobial activity was isolate k4 with an average diameter of the inhibition zone against *E. coli* of 8.12 ± 0.08 mm. Genotypic identification with the 16S rRNA gene showed that isolate y6 was highly related to *Pluralibacter pyrinus* strain 533.12.1 (99.71% similarity), while isolate k4 was identified as *Staphylococcus saprophyticus* strain UTI-045 (100% similarity).

Keyword: antibacterial activity, 16S rRNA, phylogenetic

مستخلص البحث

عادلة، أفنان. 2023. اختبار النشاط المضاد للميكروبات وتحديد بكتيريا حمض اللاكتيك (BAL) في منتجات الحليب المتخمّر ضد بكتيريا الإشريكية القولونية في مديرية مالانق. البحث الجامعي . قسم الصيدلة، كلية الطب والعلوم الصحية، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية بمالانق. الإشراف : 1. أ.د. رائحة المطيعة الماجستير ؛ المشرف 2. أليف فيرمان فردوس الماجستير.

يعتبر الزبادي والكفير من المنتجات المصنعة المخمرة من الحليب الشائعة في المجتمع ولها فوائد جيدة جدا للصحة. مالانق منطقة من المناطق في إندونيسيا باعتبارها أكبر منتج لحليب البقر في إندونيسيا ولديها القدرة على تنوع كبير من بكتيريا حمض اللاكتيك (BAL)، لذلك بحث أنواع BAL الموجودة في منتجات الحليب المخمر في مالانج وكذلك نشاطها في تثبيط البكتيريا المسببة للأمراض، مثل بكتيريا الإشريكية القولونية، يجب إجراء البحث. يستهدف هذا البحث إلى معرفة الأنماط الظاهرية والجينية لعزلات BAL من الزبادي المخمر ومنتجات الكفير الناشئة من مالانج وكذلك تحديد نشاطها المضاد للميكروبات في تثبيط نمو بكتيريا الإشريكية القولونية. تم تمييز عدد من مستعمرات بكتيريا حمض اللاكتيك التي تم الحصول عليها من عملية عزل منتجات الزبادي والكفير شكليا وفسولوجيا وكميائيا حيويا، ثم تم اختبار عزلات BAL الخالية من الخلايا (CFS) للنشاط المضاد للميكروبات باستخدام طريقة انتشار القرص ضد بكتيريا الإشريكية القولونية. تم إجراء تحديد النمط الوراثي باستخدام طريقة تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) مع تسلسل جين S 16 rRNA. تم الحصول على 6 عزلات من عينات الزبادي و 6 عزلات من عينات الكفير. كانت عزلات BAL من الزبادي مع أفضل نشاط مضاد للميكروبات في عزلات y6 بمتوسط قطر المنطقة المثبطة مقابل الإشريكية القولونية 9.47 ± 0.16 مم. بينما كانت عزلات BAL من الكفير مع أفضل نشاط مضاد للميكروبات في عزلات k4 بمتوسط قطر مناطق تثبيط ضد الإشريكية القولونية 8.12 ± 0.08 ملم. أظهر التعرف الوراثي مع جين الرنا الريباسي S16 أن العزلة y6 كانت مرتبطة بشكل كبير بسلالة 533.12.1 *Pluralibacter pyrinus* (تشابه 99.71٪)، في حين تم تحديد العزلة k4 على أنها سلالة UTI-045 *Staphylococcus saprophyticus* (تشابه 100٪).

الكلمات الأساسية: النشاط المضاد للميكروبات، *rRNA s16*، النشوء والتطور

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pola hidup sehat akan selalu menjadi faktor penting bagi kehidupan manusia. Konsumsi produk pangan yang sehat dan mengandung probiotik termasuk dalam upaya menjalankan pola hidup sehat. Probiotik adalah mikroorganisme yang apabila terdapat dalam jumlah tertentu akan memiliki dampak baik pada kesehatan tubuh orang yang menerimanya (Wiraharja, 2020). Mikroorganisme tersebut dikatakan memiliki manfaat dalam menjaga kesehatan pencernaan serta meningkatkan daya tahan tubuh. Kandungan probiotik biasanya terdapat dalam produk olahan susu seperti yoghurt dan kefir (Mantzourani et al., 2019).

Yoghurt dan kefir merupakan produk olahan susu hewan yang dibuat dengan menggunakan suatu metode konvensional fermentasi. Yoghurt dibuat dengan bantuan bakteri starter, sedangkan kefir dibuat dengan bantuan bakteri dan *grain* kefir berupa khamir. Kedua produk susu fermentasi tersebut memiliki fungsi fisiologis bagi kesehatan tubuh manusia, salah satunya dapat membantu menjaga keseimbangan mikroflora usus karena mengandung bakteri probiotik, bakteri asam laktat (BAL) (Mantzourani et al., 2019; Setiarto et al., 2017; Yang et al., 2017).

Bakteri asam laktat atau BAL memproduksi asam laktat sebagai produk hasil metabolisme. BAL memiliki peran yang multifungsi dalam berbagai aspek, seperti dalam pertanian, makanan dan kesehatan. Kelompok bakteri gram positif ini merupakan bakteri non patogen yang sering digunakan dalam banyak produk fermentasi produk pangan seperti yoghurt dan kefir (Setiarto et al., 2017; Yang et al., 2017). Beberapa contoh bakteri asam laktat yang terkandung dalam yoghurt

atau kefir, antara lain famili *Streptococcaceae* terutama *Leuconostoc*, *Streptococcus* dan *Pediococcus* serta famili *Lactobacillaceae* yaitu *Lactobacillus*.

Sifat produk susu fermentasi tergantung pada jenis dan suhu susu, langkah pra-perlakuan, kondisi reaksi, pendekatan teknologi, komposisi mikroba atau kultur starter yang ditambahkan (Khalil & Anwar, 2016). Perbedaan daerah yang didalamnya meliputi faktor tersebut juga dapat mempengaruhi karakteristiknya. Pemilihan wilayah Malang sebagai lokasi pengambilan sampel dilakukan karena wilayah Malang merupakan daerah di provinsi Jawa Timur yang banyak menghasilkan susu segar. Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Pato et al. (2021), diketahui BAL suatu produk olahan fermentasi susu memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri *E. coli*. Raras et al. (2019) dalam penelitiannya mengenai BAL mendapati hasil sampel produk fermentasi susu produksi Malang yang digunakan memiliki aktivitas antimikroba terhadap suatu bakteri patogen.

Manfaat BAL dari produk susu fermentasi seperti yoghurt dan kefir antara lain menjaga keseimbangan mikroflora usus. Mikroflora usus berupa mikroorganisme alami yang terdapat dalam tubuh manusia dalam jumlah banyak serta memiliki peran penting dalam kesehatan sistem pencernaan. Upaya bakteri asam laktat dalam menjaga keseimbangan mikroflora usus antara lain menghambat pertumbuhan mikroflora yang dapat bersifat patogen seperti *Escherichia coli* (*E. coli*) (S. U. T. Pratiwi, 2008). Keseimbangan *E. coli* harus tetap terjaga, karena berdasarkan literatur oleh Gopinath & Lakshmipriya (2019) beberapa strain bakteri *E. coli* yang berevolusi memiliki faktor virulensi yang lebih besar, dan berpotensi besar menjadi patogen berbahaya. Penelitian oleh Wibisono (2015) menjelaskan bahwa *E. coli*

adalah bakteri penyebab *foodborne zoonotic disease* yang masih banyak terjadi di masyarakat. *Enterohemorrhagic E. coli* (EHEC) adalah contoh salah satu varian *E. coli* yang paling berbahaya karena dapat memproduksi eksotoksin bernama verotoksin, toksin penyebab banyak penyakit mulai dari diare ringan, kolitis hemoragik, sindrom uremik hemolitik, sampai *thrombotic thrombocytopenic purpura*. Kasus kematian yang disebabkan oleh penyakit yang penyebab utamanya bakteri *E. coli* seperti diare masih terbilang tinggi di Indonesia (KEMENKES RI, 2017). Menurut hasil Riset Kesehatan Dasar tahun 2018 dalam literatur oleh (KEMENKES RI, 2022) menunjukkan prevalensi diare di Indonesia untuk semua kelompok umur sebesar 8%, balita sebesar 12,3%, dan sebesar 10,6% pada bayi. Diketahui jumlah kasus diare yang terjadi di wilayah Malang sebanyak 15.062 kasus dari total 222.006 kasus diare di provinsi Jawa timur (Badan Pusat Statistik, 2020).

BAL merupakan keanekaragaman mikroba yang masih perlu dieksplorasi di bidang kesehatan. Antar spesies strain BAL yang sama dapat memiliki karakteristik dan khasiat kandungan yang berbeda, sehingga diperlukan identifikasi BAL, metode yang banyak dilakukan dalam penelitian mikrobiologi. Beberapa identifikasi BAL umum dilakukan melalui pemeriksaan morfologi, metabolit, fenotip, dan genotip. Penelitian ini selain menggunakan metode fenotip juga menggunakan metode genotip yang mana bertujuan untuk dapat melengkapi faktor kemungkinan galat yang terjadi dari uji fenotip yang telah dilakukan. Metode analisis genotip yang acapkali digunakan dalam penelitian mikrobiologi adalah

metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Mantzourani et al., 2019; Widyadnyana et al., 2017).

Metode PCR diaplikasikan dalam mengembangkan untaian DNA ke dalam besaran yang lebih banyak dengan kurun waktu yang relatif singkat (Setyawati & Zubaidah, 2021). Sekuen gen 16s rRNA merupakan suatu metode sequencing DNA bakteri yang telah digunakan dalam banyak penelitian. Selain karena dapat dilakukan dengan masa yang singkat, metode ini memiliki keakuratan yang tinggi dalam mengidentifikasi bakteri. Pemilihan gen 16s rRNA dalam penelitian ini karena dapat menunjukkan potensi yang dimiliki suatu spesies bakteri secara akurat (Akihary & Kolondam, 2020). Proses penentuan genotip suatu bakteri dengan sekuen 16S rRNA melalui beberapa tahapan antara lain proses DNA yang diekstraksi, perbanyakan serta perbesaran wilayah 16S dengan PCR, penggambaran visual gen dengan bantuan elektroforesis, proses pengurutan basa DNA (*sequencing*), dan pengolahan data hasil *sequencing* dengan *software* penunjang (Noer, 2021).

Pengetahuan akan kontak kekerabatan antar spesies makhluk hidup diperlukan dalam menelaah evolusi sebagian taksa yang memiliki kekerabatan. Ilmu filogenetik memungkinkan dalam membuat perkiraan evolusi tersebut di masa terdahulu dengan cara melakukan perbandingan pada urutan DNA atau proteinnya. Ilmu ini memberikan data hubungan perubahan yang terjadi dari suatu makhluk hidup yang didapatkan dari data morfologi serta molekuler (Akbar et al., 2018).

Penelitian ilmiah merupakan salah satu bentuk mendalami suatu ilmu secara akademis dengan cara yang mulia. Penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan integritas diri dalam menambah ilmu pengetahuan serta dapat menambah

keimanan. Allah menyatakan akan memuliakan derajat orang yang menuntut ilmu dengan diiringi ketaatan kepada-Nya. Terkait hal tersebut Allah *subhanahu wa ta'ala* berfirman dalam Q.S. Al-Mujadalah ayat 11:

..... يَرْفَعُ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ وَاللَّهُ بِمَا تَعْمَلُونَ خَبِيرٌ ﴿١١﴾

“..... niscaya Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antaramu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat. Dan Allah Maha Mengetahui apa yang kamu kerjakan.”

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah isolat bakteri asam laktat pada sampel produk yoghurt dan kefir di Malang memiliki aktivitas antimikroba terhadap *E. coli*?
2. Bagaimana karakteristik fenotipik bakteri asam laktat pada sampel produk yoghurt dan kefir di Malang?
3. Bagaimana karakteristik genotipik bakteri asam laktat pada sampel produk yoghurt dan kefir di Malang?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui aktivitas antimikroba isolat bakteri asam laktat pada yoghurt dan kefir terhadap *Escherichia coli* di Malang.
2. Mengetahui karakteristik fenotipik isolat bakteri asam laktat pada produk fermentasi yoghurt dan kefir di Malang.
3. Mengetahui karakteristik genotipik isolat bakteri asam laktat pada produk fermentasi yoghurt dan kefir di Malang.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Menambah pengetahuan akan aktivitas antimikroba isolat BAL yang terkandung dalam produk yoghurt dan kefir terhadap bakteri *Escherichia coli*.
2. Memberikan informasi karakteristik fenotip dan genotip isolat BAL yang terkandung dalam produk yoghurt dan kefir.
3. Menjadi sumber referensi kepustakaan dan bahan pembelajaran untuk penelitian-penelitian selanjutnya.

1.5 Batasan Masalah

1. Lokasi pengambilan sampel dibatasi dari wilayah Malang.
2. Bakteri yang diamati berupa bakteri asam laktat (BAL).
3. Teknik yang digunakan dalam pengujian identifikasi secara genotip adalah *sequencing* DNA menggunakan metode PCR dengan gen pengkode 16S rRNA.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Produk Susu Fermentasi

Definisi susu menurut Badan Standarisasi Nasional (2011) adalah cairan bersih yang dikeluarkan dari kelenjar susu hewan ternak bersih juga sehat, diperah melalui proses pemerahan yang sesuai dan kandungan alami yang dimiliki tidak mengalami pengurangan atau penambahan sesuatu serta belum mendapat perlakuan apapun selain pendinginan. Kandungan gizi yang tinggi dari susu sangat bermanfaat bagi manusia (Khalil & Anwar, 2016). Terkait hal itu Allah SWT berfirman dalam Q.S. An - Nahl ayat 66:

وَإِنَّ لَكُمْ فِي الْأَنْعَامِ لَعِبْرَةً ۚ نُسْقِيكُمْ مِمَّا فِي بُطُونِهِ ۖ مِنْ بَيْنِ فَرْثٍ وَدَمٍ لَبْنَا خَالِصًا سَائِغًا

لِّلشَّارِبِينَ ﴿٦٦﴾

“Dan sesungguhnya pada binatang ternak itu benar-benar terdapat pelajaran bagi kamu. Kami memberimu minum dari pada apa yang berada dalam perutnya (berupa) susu yang bersih antara tahi dan darah, yang mudah ditelan bagi orang-orang yang meminumnya.”

Berdasarkan tafsir Jalalain oleh Al-Mahalli & As-Suyuthi (2021) ayat tersebut dijelaskan bahwa, “(Dan sesungguhnya pada binatang ternak itu benar-benar terdapat pelajaran bagi kalian) bahan pelajaran. (Kami memberi kalian minum) lafal ini berfungsi sebagai penjelas daripada pengertian pelajaran tadi (daripada apa yang berada dalam perutnya) dalam perut binatang ternak itu (di) huruf ‘min’ di sini menunjukkan makna ibtida’ dan berta'alluq kepada lafal

nusqiikum (antara kotoran) yakni lemak ususnya (dan darah berupa air susu yang bersih) sedikit pun tidak bercampur kotoran dan darah baik dari segi rasa, bau atau warnanya atau campuran di antara keduanya (yang mudah ditelan bagi orang-orang yang meminumnya) lewat dengan mudah di tenggorokan mereka dan tidak sulit untuk ditelan”.

Susu adalah media pertumbuhan ideal bagi proliferasi mikroba (Khalil & Anwar, 2016). Adapun fermentasi merupakan suatu metode yang tepat dalam perkembangbiakan mikroba. Metode fermentasi merupakan proses modifikasi biokimia yang umumnya menggunakan bakteri, ragi, atau jamur dalam prosesnya terhadap suatu produk. Pada dasarnya proses fermentasi berlangsung secara anaerobik dan menghasilkan produk berupa etanol, asam laktat, dan hidrogen. Susu yang diolah lebih lanjut dengan metode fermentasi akan mengalami peningkatan nilai manfaat dan khasiat pada produknya. Beberapa contoh produk olahan susu fermentasi yang umum di masyarakat serta memiliki nilai manfaat sangat baik bagi kesehatan adalah yoghurt dan kefir (Kristiandi et al., 2021).

2.1.1 Yoghurt

Yoghurt merupakan suatu produk pangan yang diproduksi dengan mekulturkan satu atau lebih bahan susu pilihan dengan karakterisasi kultur bakteri yang mengandung bakteri penghasil asam laktat seperti *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*. Yoghurt diketahui sebagai produk yang mengandung probiotik yang memiliki manfaat bagi kesehatan manusia seperti menjaga sistem saluran pencernaan. Probiotik yang terkandung dalam yoghurt berperan dalam menjaga stabilitas mikrobiota usus. Sejalan dengan itu, mengonsumsi yoghurt yang mengandung BAL hidup dalam jumlah yang baik

setiap hari dapat berdampak baik bagi mikroorganisme usus. Selain itu, yoghurt yang diproduksi dengan BAL probiotik telah menunjukkan efek penghambatan pada kanker usus besar, kemampuan untuk memulihkan homeostasis usus, mencegah perkembangan berbagai penyakit pada usus, seperti kolitis ulserativa dan penyakit Chron, dan mengurangi efek buruk dari penyakit tersebut. Pada dasarnya epitel usus terbukti menjadi target utama untuk manfaat dari probiotik BAL ini (Popović et al., 2020; Wahyuningtyas, 2017).

2.1.2 Kefir

Kefir merupakan produk fermentasi susu selain yoghurt yang memiliki khasiat dan manfaat untuk kesehatan tubuh setiap insan. Kefir adalah produk susu yang diolah melalui proses fermentasi berasal dari susu hewan seperti kambing atau sapi dengan bantuan tambahan grain kefir. Grain kefir berwarna kuning dan biasanya memiliki ukuran pada kisaran diameter 1-6 mm. Starter kefir terdiri atas bakteri asam laktat dan ragi yang mana menghasilkan asam laktat serta alkohol. Kualitas kefir dipengaruhi oleh jenis produk susu yang digunakan, dosis grain kefir, jenis bakteri asam laktat, ragi, dan lama masa inkubasi. Diketahui bahwa rasa asam pada kefir disebabkan oleh asam laktat, CO₂, dan konsentrasi alkohol dari aksi sel ragi dalam grain kefir tersebut (Sulmiyati et al., 2019). Kandungan dalam kefir terdiri dari campuran kompleks BAL, bakteri asetat, juga ragi. Beberapa spesies mikroflora yang terkandung dalam kefir antara lain, bakteri asam laktat (*streptococci*, *lactobacilli*, *lactococci*), bakteri asetat serta ragi (*Kazachstania* sp., *Candida* sp., *Saccaromyces* sp., *Kluyveromyces* sp., *Zygosaccharomyces* sp., *Torulosis* sp.) (Gao & Li, 2016).

2.2 Bakteri Asam Laktat (BAL)

Bakteri asam laktat (BAL) termasuk golongan non spora, bakteri gram positif, tahan terhadap asam, dan biasanya bersifat non motil. BAL berbentuk batang *coccobacilli* dengan berantai, tanpa sitokrom, dan katalase negatif. Bakteri ini tumbuh dengan baik dalam kondisi anaerobik, namun dapat juga memungkinkan untuk tumbuh secara mikroaerofilik dan juga aerobik. Bakteri asam laktat menunjukkan pertumbuhan optimal pada kondisi asam yang sedikit lebih rendah (pH 5,5-6,0). BAL bersifat sangat fermentatif. Produk utama hasil dari proses fermentasi adalah asam laktat. Klasifikasi BAL dapat dibagi berdasarkan morfologinya (kokus atau batang, bentuk tetrad), pertumbuhan pada temperatur yang berbeda dan konsentrasi garam, cara fermentasi glukosa, dan konfigurasi produksi asam laktat (D, L, atau keduanya). Selain itu, komposisi dan motilitas asam lemak juga dianggap sebagai alat identifikasi. Proses metabolisme fermentasi BAL terbagi menjadi homofermentatif dan heterofermentatif. BAL dengan proses metabolisme homofermentatif menjadikan dua molekul laktat per mol glukosa sebagai hasil akhir, sedangkan proses metabolisme BAL secara heterofermentatif menghasilkan sebuah molekul asam laktat bersama dengan etil alkohol dan CO₂ (Irianto, 2013; Khalil & Anwar, 2016).

2.3 Identifikasi Isolat Bakteri Asam Laktat

Identifikasi isolat BAL dilakukan berdasarkan karakteristik fenotip dan genotip. Identifikasi secara fenotip dilakukan atas aspek morfologi, biokimia dan fisiologi. Identifikasi fenotip secara morfologi meliputi warna, bentuk, elevasi, dan tepi dari koloni bakteri. Pewarnaan Gram tergolong ke dalam morfologi dengan maksud untuk memahami golongan bakteri yang diamati. Apabila bakteri berupa

bakteri gram positif maka akan berwarna ungu, dan apabila bakteri berupa bakteri gram negatif maka akan tampak berwarna merah (Willey et al., 2008). Proses pewarnaan gram diawali dengan difiksasi bakteri di atas slide mikroskop menggunakan NaCl, dengan tahapan pertama diberi larutan kristal violet selama 3 menit, kemudian diberikan lugol selama 1 menit, alkohol 95% selama 30 detik dan yang terakhir safranin selama 2 menit (Holderman et al., 2017). Identifikasi fenotip secara biokimia seperti uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) bermanfaat dalam melihat kemampuan sukrosa, glukosa serta laktosa dalam meragi; uji SIM (*Sulfur, Indol, Motility*) yang digunakan dalam pengujian untuk mengetahui pergerakan bakteri, produksi indol dan pembentukan gas H_2S ; dan uji SC (*Simon Citrate*) yang dilakukan dalam menentukan bakteri yang menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Tujuan dilakukan uji biokimia adalah untuk melihat karakteristik bakteri melalui reaksi biokimia (Apriyanthi et al., 2022). Identifikasi fisiologi bertujuan untuk mengetahui bakteri berdasarkan aktivitas selnya sedangkan identifikasi biokimia mempelajari tentang senyawa-senyawa yang ada di dalam sistem hidup, penyusunan senyawa-senyawa tersebut ke dalam sel-sel dan interaksi kimia yang terjadi (Murray, 2005). Identifikasi fisiologi dan biokimia dalam melakukan karakterisasi spesies suatu bakteri yang tidak dikenal penting untuk dilakukan, sebab hasil uji morfologi bahkan ataupun sel bakteri yang berbeda akan tampak serupa apabila tidak dilakukan pengamatan lanjutan secara fisiologi juga biokimia (Amrulloh et al., 2021a).

Identifikasi secara genotip berprinsip pada analisis molekuler (Sunaryanto & Marwoto, 2013). Identifikasi ini bertujuan untuk dapat melengkapi faktor

kemungkinan galat yang terjadi dari uji fenotip yang telah dilakukan. Metode analisis genotip yang acapkali digunakan dalam penelitian mikrobiologi adalah metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Mantzourani et al., 2019). Metode genotip dengan PCR umumnya menggunakan analisis gen pengkode 16S rRNA (Widyadnyana et al., 2017). Penggunaan Gen 16S rRNA sebagai alat dalam mengidentifikasi bakteri bersifat sangat luas. Gen pengkode ini memiliki suatu bagian yang bersifat konservatif. Daya analisis yang cepat dan praktis membuat gen pengkode 16s rRNA lebih umum digunakan dalam pelbagai bidang penelitian bakteriologi khususnya untuk tujuan identifikasi dibandingkan dengan gen lainnya, (5S dan 23S), yang lebih sulit apabila diterapkan pada proses identifikasi bakteri (Akihary & Kolondam, 2020).

2.4 *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan Gen 16s rRNA

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan metode yang dikembangkan Kary Mullis pada tahun 1980-an. Metode PCR adalah teknik in vitro dalam proses perlipatgandaan DNA. Metode ini berguna dalam memperbanyak potongan DNA ke jumlah yang lebih banyak dengan kurun waktu yang relatif singkat. Asas metode ini adalah memanfaatkan kemampuan DNA polimerase dalam mensintesis untai DNA baru yang melengkapi untai cetakan yang disediakan. Primer merupakan molekul oligonukleotida untai tunggal. Primer tersusun atas 30 basa. Keberhasilan sekuensing DNA dipengaruhi salah satunya oleh desain primer yang tepat. DNA polimerase menambahkan nukleotida ke gugus 3'-OH yang telah ada sebelumnya saja, sehingga primer diperlukan untuk menambahkan pada nukleotida kesatu. Hal ini memungkinkan untuk memberikan gambaran wilayah tertentu dari urutan templat yang ingin diperkuat dalam suatu penelitian. Urutan spesifik kemudian

akan terakumulasi dalam miliaran salinan (amplikon) (Kusnadi & Laras Arumingtyas, 2020; Sasmito et al., 2014; Setyawati & Zubaidah, 2021).

PCR berkembang dari skema teoritis yang dikemukakan oleh Kleppe et al. (1971) dan selanjutnya direalisasikan oleh Karry Mullis serta tim penelitiannya untuk mengamplifikasi sekuens dideoksinukleotida tertentu dari suatu gen atau genom organisme dengan menggunakan satu oligonukleotida/primer sintetik. Pada saat teknik PCR digunakan untuk amplifikasi sekuens DNA dari genom yang kompleks dan besar, maka primer yang sebelumnya hanya satu akan menyebabkan sintesis DNA yang tidak terkontrol, tidak dapat diketahui kapan berhentinya. Hal ini merupakan bagian yang tidak diinginkan dan dinilai tidak efektif karena menghabiskan waktu yang lama dan produk yang dihasilkan menjadi tidak spesifik. Primer kedua perlu untuk ditambahkan untuk menghentikan sintesis dari primer pertama. Tujuan penambahan primer kedua juga agar dapat terjadi ikatan dengan untai DNA pasangannya, sehingga tiap untai menghasilkan produk fragmen DNA yang dibatasi oleh dua primer yang digunakan. Metode ini apabila dibarengi dengan annealing dari masing-masing primer kepada masing-masing untai DNA secara bersamaan dan dilakukan pengaturan suhu untuk memanaskan campuran reaksi, serta mengulang tahap-tahap annealing dan ekstensi, maka akan terjadi peningkatan produk fragmen DNA secara eksponensial. Pengulangan tersebut akan memungkinkan produk dari siklus pertama menjadi berlipat pada siklus kedua, memperoleh hasil salinan ganda. Siklus berikutnya akan berulang dan menghasilkan 4 salinan dan seterusnya (Kusnadi & Laras Arumingtyas, 2020).

Penentuan taksonomi, filogeni, dan perkiraan jarak keragaman antar spesies bakteri dilakukan dengan menggunakan gen pengkode rRNA. Komparasi sekuen dari rRNA akan memperlihatkan kontak perubahan yang terjadi antar bakteri yang diteliti (Rinanda, 2011). Gen 16s rRNA diketahui memiliki daya analisis yang cepat dan praktis, sehingga khususnya dalam proses identifikasi di masa ini gen pengkode 16s rRNA lebih umum dilakukan dalam berbagai bidang penelitian bakteriologi dibandingkan dengan gen pengkode lain. Keunggulan lain dari penggunaan gen 16S rRNA adalah adanya suatu daerah konservatif sehingga dapat membentuk pohon filogenetik yang menyeluruh (Akihary & Kolondam, 2020).

Pengurutan asam nukleat dari gen 16S rRNA bakteri telah dimanfaatkan selama beberapa dekade dalam mengidentifikasi isolat klinis dan lingkungan dan untuk menetapkan hubungan filogenetik. Carl Woese dan George Fox memelopori perbandingan data urutan 16S sebelum pengembangan metode pengurutan DNA untuk melakukan studi filogenetik kompleks, awal penggunaannya adalah untuk mengklasifikasikan bakteri metanogenik dan untuk menggambarkan *Archaeobacterium Halobacterium volcanii* (Church et al., 2020). Akumulasi selanjutnya sejumlah besar data sekuens gen rRNA subunit kecil memungkinkan studi rekonstruksi filogenetik lain, yang membentuk tiga domain fundamental (Archaea, Bakteri, dan Eucarya) dalam pohon kehidupan universal.

2.5 Filogenetik

Filogenetik merupakan suatu teknik analisis yang digunakan dalam mengetahui hubungan kekerabatan antar organisme. Kelompok organisme, apabila didapatkan karakter yang sama akan dipandang memiliki kontak yang dekat dalam hal kekerabatan. Kesamaan ini dilihat sebagai turunan dari satu induk, kemudian

terbentuk suatu *monophyletic*. Filogeni memiliki tujuan untuk menampilkan sejarah evolusi makhluk hidup dengan mendefinisikan gugus alaminya. Susunan pengelompokan filogenetik adalah teknik paling umum yang digunakan dalam sistematika pemahaman keanekaragaman hayati, serta telah menjadi praktik umum dalam pengelompokan biologi. Keanekaragaman filogenetik memberikan pengetahuan secara spesifik serta memberikan pandangan dalam hal morfologi, biologis, atau molekuler berdasarkan perbandingan mengenai perubahan dan persebaran karakteristik secara turun temurun. Berdasarkan asal filogenetiknya, berbagai tipe karakteristik didistribusikan, dan hal tersebut berperan dalam menjadi awal pengetahuan bagi penemuan sejarah filogenetik. Pohon filogeni merupakan penggambaran dari silsilah makhluk hidup yang terurai melalui penjabaran layaknya akar pohon. Pohon filogeni ini membantu membangun hubungan antar makhluk hidup dan membantu memperkirakan sifat yang berbeda yang terdapat dari satu leluhur ke keturunannya (Fietri et al., 2021; Lubis, 2014).

2.6 Bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*)

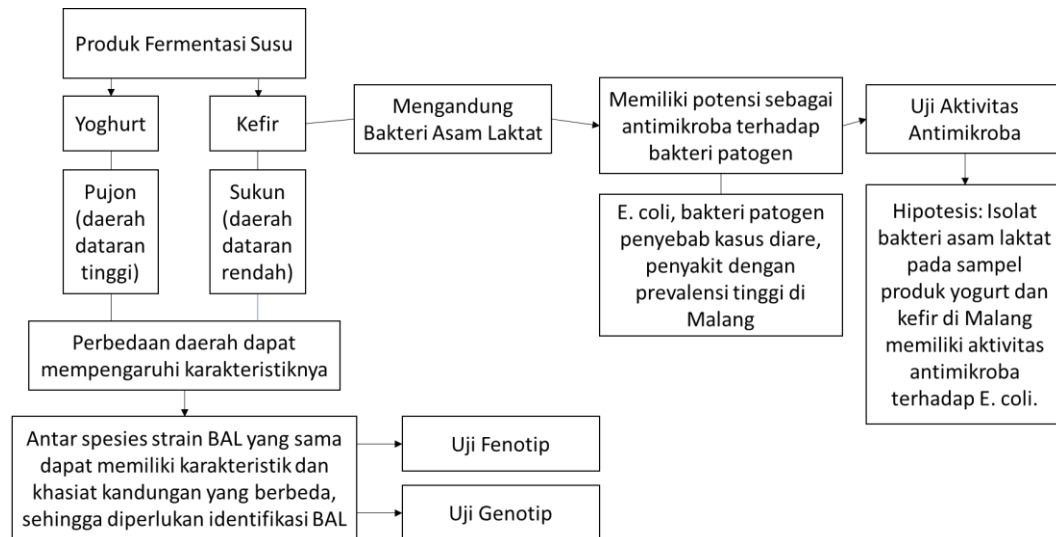
Bakteri *E. coli* merupakan bagian dari mikroflora usus. Mikroflora usus merupakan mikroorganisme alami yang terdapat dalam tubuh manusia dalam jumlah banyak serta memiliki peran penting dalam kesehatan sistem pencernaan. *E. coli* merupakan mikroflora usus yang perlu dijaga keseimbangannya (S. U. T. Pratiwi, 2008). *E. coli* memiliki sifat versatil, berupa golongan bakteri gram negatif, mudah ditemukan dan dapat diterima perubahan genetik alami maupun acak. Banyak koleksi gen *E. coli* yang diurutkan memperlihatkan ukuran yang berbeda. Keragaman genom antara komensal dan patogen juga memperlihatkan format yang bermacam-macam dalam spesies bakteri yang sama. Mereka terdiri

dari bakteri yang tidak bersifat patogen (yang mungkin berperan sebagai komensal) dan milik mikroorganisme normal pada usus manusia juga hewan. Terdapat beberapa bentuk patogen dari *E. coli*, yaitu diaregenik dan ekstraintestinal, dengan jenis patogen yang tidak sama dan strain hibrida alami. Varian ini bisa bersifat patogen fakultatif atau obligat. Bakteri fakultatif adalah bagian dari saluran usus dan dapat bertindak sebagai patogen oportunistik ketika berada di luar habitat aslinya, menyebabkan berbagai jenis infeksi ekstraintestinal. Di sisi lain, penyebab varian patogen obligat usus infeksi dalam kondisi yang berbeda, dari diare sedang hingga kasus yang lebih mengancam, seperti kematian (Braz et al., 2020).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

3.2 Uraian Kerangka Konseptual

Yoghurt dan kefir merupakan produk olahan susu hewan yang dibuat dengan menggunakan fermentasi. Yoghurt dibuat dengan bantuan bakteri starter, sedangkan kefir dibuat dengan bantuan bakteri dan *grain* kefir berupa khamir. Kedua produk susu fermentasi tersebut memiliki fungsi fisiologis bagi kesehatan tubuh manusia, salah satunya dapat membantu menjaga keseimbangan mikroflora usus karena mengandung bakteri probiotik, bakteri asam laktat (BAL) (Mantzourani et al., 2019; Setiarto et al., 2017; Yang et al., 2017). Bakteri asam laktat atau BAL memproduksi asam laktat sebagai produk utama hasil metabolisme. Kelompok bakteri gram positif ini merupakan bakteri non patogen yang sering digunakan dalam banyak produk fermentasi produk pangan seperti yoghurt dan kefir (Setiarto et al., 2017; Yang et al., 2017).

Sifat produk susu fermentasi tergantung pada jenis dan suhu susu, langkah pra-perlakuan, kondisi reaksi, pendekatan teknologi, komposisi mikroba atau kultur starter yang ditambahkan (Khalil & Anwar, 2016). Perbedaan daerah yang di dalamnya meliputi faktor tersebut juga dapat mempengaruhi karakteristiknya. Raras et al. (2019) dalam penelitiannya mengenai bakteri asam laktat mendapati hasil sampel produk fermentasi susu produksi Malang yang digunakan memiliki aktivitas antimikroba terhadap suatu bakteri patogen. Manfaat BAL dari produk susu fermentasi seperti yoghurt dan kefir antara lain menjaga keseimbangan mikroflora usus. Upaya bakteri asam laktat dalam menjaga keseimbangan mikroflora usus antara lain menghambat pertumbuhan mikroflora yang dapat bersifat patogen seperti *Escherichia coli* (*E. coli*) (S. U. T. Pratiwi, 2008). Keseimbangan *E. coli* harus tetap terjaga, karena berdasarkan literatur oleh Gopinath & Lakshmipriya (2019) beberapa strain bakteri *E. coli* yang berevolusi memiliki faktor virulensi yang lebih besar, dan berpotensi besar menjadi patogen berbahaya. Kasus kematian yang disebabkan oleh penyakit yang penyebab utamanya bakteri *E. coli* seperti diare masih terbilang tinggi di Indonesia (KEMENKES RI, 2017). Diketahui jumlah kasus diare yang terjadi di wilayah Malang sebanyak 15.062 kasus dari total 222.006 kasus diare di provinsi Jawa timur (Badan Pusat Statistik, 2020).

Antar spesies strain BAL yang sama dapat memiliki karakteristik dan khasiat kandungan yang berbeda, sehingga diperlukan identifikasi BAL. Penelitian ini selain menggunakan metode fenotip juga menggunakan metode genotip yang mana bertujuan untuk dapat melengkapi faktor kemungkinan galat yang terjadi dari uji

fenotip yang telah dilakukan. Metode analisis genotip digunakan dalam penelitian mikrobiologi ini adalah metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Mantzourani et al., 2019; Widyadnyana et al., 2017). Adapun sekuen gen pengkode yang digunakan adalah gen 16s rRNA yang merupakan suatu metode sequencing DNA bakteri yang telah digunakan dalam banyak penelitian. Selain karena dapat dilakukan dengan masa yang singkat, metode ini memiliki keakuratan yang tinggi dalam mengidentifikasi bakteri (Akihary & Kolondam, 2020). Proses penentuan genotip suatu bakteri dengan metode PCR sekuen 16S rRNA melalui beberapa tahapan antara lain proses DNA yang diekstraksi, perbanyakan serta perbesaran wilayah 16S dengan PCR, penggambaran visual gen dengan bantuan elektroforesis, proses pengurutan basa DNA (*sequencing*), dan pengolahan data hasil *sequencing* dengan *software* penunjang (Noer, 2021).

Pengetahuan akan kontak kekerabatan antar spesies makhluk hidup diperlukan dalam menelaah evolusi sebagian taksa yang memiliki kekerabatan. Ilmu filogenetik yang di dalam proses perlakuannya mencakup pembuatan pohon filogenetik memungkinkan dalam membuat perkiraan evolusi tersebut di masa terdahulu dengan cara melakukan perbandingan pada urutan DNA atau proteinnya (Akbar et al., 2018).

3.3 Hipotesis Penelitian

Isolat bakteri asam laktat pada sampel produk yogurt dan kefir di Malang memiliki aktivitas antimikroba terhadap *E. coli*.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian dilaksanakan dengan metode deskriptif eksperimental dalam skala laboratorium. Proses penelitian dilakukan dengan cara melakukan uji aktivitas antibakteri produk susu fermentasi dari wilayah Malang terhadap bakteri *Escherichia coli*. Uji fenotip dan uji genotip serta pemeriksaan kontak filogeni dari bakteri asam laktat.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Pelaksanaan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan di Genetika Lab PT. Genetika Science Indonesia di Tangerang, Banten. Penelitian dilakukan selama bulan Maret – Juni 2022.

4.3 Populasi dan Sampel

Dua buah produk susu fermentasi yang berupa 1 buah yoghurt dan 1 buah kefir yang diproduksi oleh produsen minuman fermentasi lokal di wilayah Malang merupakan sampel yang dilakukan perlakuan dalam penelitian.

4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas: Sampel yoghurt, sampel kefir
2. Variabel terikat: Zona hambat isolat BAL, karakter fenotipik BAL, karakter genotipik BAL
3. Variabel kontrol: Bakteri *E. coli*, suhu inkubasi, media pertumbuhan

4.4.2 Definisi Operasional Variabel

1. Yoghurt adalah produk fermentasi susu komersial yang mengandung BAL dan diproduksi di Kecamatan Pujon, Kabupaten Malang.
2. Kefir adalah produk fermentasi susu komersial yang mengandung BAL serta khamir, diproduksi di Kecamatan Sukun, Kota Malang.
3. Yoghurt dan kefir digunakan sebagai sampel berasal dari Malang dengan merk yoghurt Yumoo® dan kefir Talitha fata®.
4. Isolat BAL adalah bakteri yang diisolasi dari produk yogurt dan kefir menggunakan media MRS.
5. Media MRS (*de Mann Rogosa Sharpe*) adalah media pertumbuhan yang digunakan dalam penelitian, yang komposisinya terdiri atas kasein *tryptic digest*, ekstrak daging sapi, ekstrak ragi, glukosa, sorbitan monooleat, dikalsium hidrogen ortofosfat, magnesium sulfat, mangan (II) sulfat, amonium sitrat, natrium asetat, agar, dan air suling atau deionisasi.
6. Bakteri *E. coli* adalah bakteri patogen yang nilai prevalensinya tinggi pada kejadian penyakit diare di Malang.
7. Aktivitas antimikroba bakteri asam laktat diuji menggunakan metode daya hambat; jangka sorong digunakan sebagai alat dalam mengukur zona hambat.
8. Karakteristik fenotipik adalah uji fermentasi karbohidrat, uji pewarnaan gram, uji katalase, uji motilitas, uji endospora, dan uji oksidase.
9. Karakteristik genotipik adalah meliputi ekstraksi DNA, amplifikasi DNA, separasi dengan elektroforesis gel, sekuensing DNA, komparasi hasil

sekuen dengan data bank dengan metode BLAST, pembuatan pohon filogenetik.

10. Proses identifikasi genotip dilakukan untuk menunjang proses identifikasi fenotip yang telah dilakukan.
11. Proses identifikasi genotip dengan memanfaatkan metode PCR dan sekuen gen 16s rRNA.
12. Dilakukan analisis filogenetik terhadap hasil sekuen gen 16s rRNA.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat Penelitian

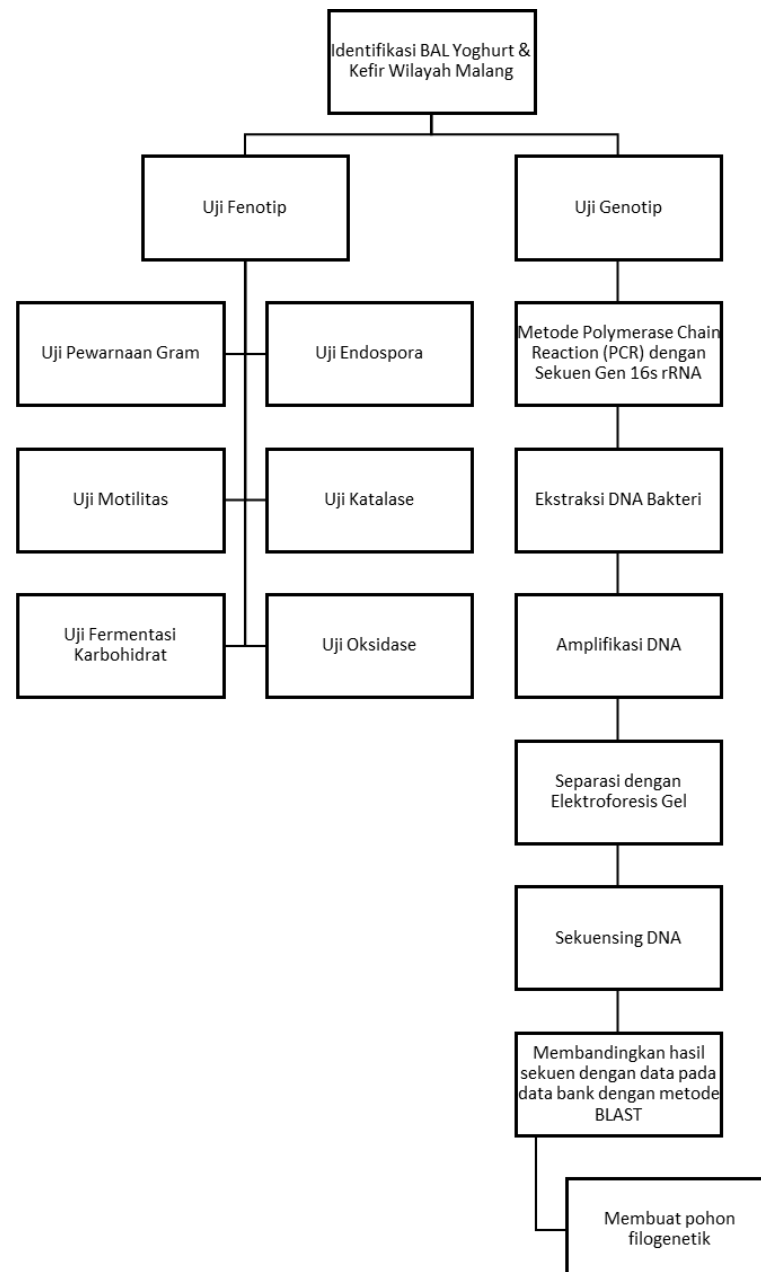
Beberapa alat pada penelitian ini di antaranya labu erlenmeyer, gelas beaker, gelas ukur, batang pengaduk, tabung reaksi, neraca analitik, kertas timbang, lemari pendingin, *Laminar Air Flow Biological Safety Cabinet* (BSC), mikropipet beserta tip, inkubator CO₂, aluminium foil, batang L, spatel logam, pipet, cawan petri, gelas objek, *cover glass*, bunsen, pinset, ose gores, ose jarum lurus, rak tabung, *magnetic stirrer*, kapas penyumbat, mikrofilter, syringe injector, microtube Eppendorf®, mikroskop cahaya, tabung durham, kertas label, *sentrifuge*, corong, *cotton bud* steril, jangka sorong, autoklaf, seperangkat alat uji PCR, seperangkat alat elektroforesis (Mini-Sub Cell GT Systems, Bio Rad), Quick-DNA Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research®).

4.5.2 Bahan Penelitian

Beberapa bahan pada penelitian ini di antaranya yoghurt dan kefir produksi wilayah Malang, *Milk Yeast Extract* (MYE), *de Mann Rogosa Sharpe* agar (MRSA), *Milk Yeast Extract* (MYE), susu skim, larutan buffer, kristal violet, D-Glucose powder, iodine, Gliserol, gliserol 30%, media MRS *broth*, media *Nutrient*

Agar (NA), media (MHA), lugol *Muller Hinton Agar*, safranin, akuades, alkohol 96%, *green malachite*, H₂O₂ 3% (Hidrogen peroksida), media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), sampel uji DNA marker, pewarna elektroforesis, dan media agarosa.

4.6 Prosedur Penelitian



Gambar 4.1 Prosedur Penelitian

4.6.1 Isolasi Bakteri Asam Laktat Dari Yoghurt Dan Kefir

Produk kefir dan yoghurt yang digunakan sebagai sampel penelitian diambil dari daerah Malang. BAL yang didapatkan dari yoghurt dan kefir dilakukan isolasi dengan cara disiapkan 10 mL yoghurt dan 1 mL kefir, dituangkan ke dalam tabung reaksi, kemudian pada tiap sampel dilakukan pengenceran dimulai dari 10^{-1} - 10^{-4} dengan air. Masing-masing sampel dari yoghurt dan kefir yang telah dilakukan pengenceran diambil sebanyak 1 mL; ditumbuhkan di media pertumbuhan MRS agar. Metode pada tahapan ini adalah cawan sebar (*spread plate*), dengan tahapan berikutnya diinkubasi sampel selama 1×24 jam dengan pengaturan suhu pada 37°C . Tahapan terakhir, teknik cawan gores (*streak plate*) dilakukan pada media MRS agar lain terhadap isolat yang tumbuh untuk memperoleh biakan murni, kemudian sampel diinkubasi selama 2×24 jam dengan pengaturan suhu pada 37°C (Ismail et al., 2017).

4.6.2 Pembuatan Kultur Stok BAL

Media kultur stok BAL berupa *milk yeast extract* (MYE). Komposisi yang terkandung dalam MYE antara lain 0,5% yeast extract, 10% susu skim, serta 15% glukosa. Sejumlah 1 mL MYE dan 1 mL gliserol 10% dimasukkan ke dalam tabung mikro steril. Diinokulasi isolat BAL dalam media agar MRS ke dalam tabung mikro berisi MYE dan gliserol menggunakan ose. Proses perlakuan dilakukan secara aseptis dalam instrumen laboratorium *laminar air flow* (LAF) untuk menghindari kontaminasi. Selanjutnya tabung mikro pada suhu 37°C diinkubasi dengan kondisi mikroaerofilik selama 24 jam. Konsentrasi akhir gliserol yang diperoleh sebesar 5%. Kultur stok BAL disimpan di lemari pendingin bersuhu -20°C , sehingga dapat

digunakan untuk keperluan penelitian berikutnya (Arepally et al., 2019; Maldonado et al., 2007).

4.6.3 Uji Identifikasi Bakteri Asam Laktat

4.6.3.1 Uji Pewarnaan Gram

Diambil isolat yang telah ditanam dengan ose, kemudian disiapkan kaca objek yang telah disterilisasi alkohol 70%. Dioleskan isolat pada kaca objek dan dilakukan fiksasi beberapa kali dengan menggunakan api bunsen. Dilakukan pemberian dua tetes kristal violet pada isolat bakteri di kaca objek, didiamkan selama satu menit. Kaca objek yang di atasnya terdapat isolat tersebut dibilas dengan aquades dan dilakukan pengeringan. Isolat ditetesi larutan iodin, dibiarkan selama dua menit, lalu dibilas dengan aquadest dan dianginkan sampai kering. Alkohol 96% kemudian secara perlahan ditetaskan pada isolat sampai warna ungu tidak tampak. Selanjutnya safranin secara perlahan ditetaskan pada isolat, dibiarkan 30 detik dan dibilas dengan aquadest lalu dilakukan pengeringan. Tahapan selanjutnya dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop perbesaran 100× dengan menggunakan minyak emersi. Aspek yang diamati berupa warna dan bentuk sel bakteri. Parameter bakteri asam laktat diketahui dengan sel berbentuk batang dan memiliki warna ungu saat diamati (Detha et al., 2019).

4.6.3.2 Uji Endospora

Disiapkan kaca objek dan gelas penutup, dibersihkan menggunakan etanol 96% kemudian dianginkan agar mengering. Ditetaskan aquadest steril diatas kaca objek. Diambil bakteri yang berumur 72 jam kemudian diratakan pada permukaan atas gelas objek ukuran $\pm 1,5 \times 1,5 \text{ cm}^2$. Difiksasi preparat dengan mengayunkan beberapa kali kaca objek diatas nyala api bunsen. Digenangi preparat yang sudah

difiksasi dengan pewarnaan malasit hijau. Tahapan selanjutnya, dipanaskan diatas pemanas air, di atas air mendidih, sampai uap air bermunculan (± 10 menit) (selalu diawasi pewarna agar tidak mengering). Selanjutnya, dibilas dengan air dan dianginkan hingga kering. Proses untuk diketahui adanya spora dalam sel dilakukan dengan melakukan pengamatan menggunakan preparat pada mikroskop dengan perbesaran $1000\times$. Parameter untuk isolat BAL akan memperlihatkan ketidakberadaan spora dalam sel (Fitriyana et al., 2016).

4.6.3.3 Uji Motilitas

Tahapan awal pada proses ini adalah dengan ditusukkan sebuah koloni isolat bakteri dari media MRS agar dengan jarum ose ke dalam media SIM tegak di dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi selama 2×24 jam dengan pengaturan suhu pada 37°C . Hasil akan menandakan positif (motil) apabila ada tampak rambatan di daerah sekitar tempat penusukan jarum ose pada media, sedangkan apabila tidak tampak rambat di sekitar wilayah penusukan jarum ose pada media maka tergolong ke dalam hasil negatif (non motil). Menurut literatur BAL adalah bakteri yang tergolong non motil, ditandai dengan tidak adanya rambatan pada daerah tusukan jarum ose (Detha et al., 2019; Ismail et al., 2017).

4.6.3.4 Uji Katalase

Identifikasi dengan uji katalase dimulai dari diambil satu isolat ose dari media tumbuh MRSA, lalu diletakkan pada kaca objek yang telah distrerilkan. Diteteskan pereaksi H_2O_2 3% sebanyak 2 tetes pada isolat yang telah diletakkan di kaca objek. Dibiarkan beberapa saat, kemudian diamati. Hasil yang sesuai untuk uji katalase pada BAL akan memperlihatkan bahwa isolat yang diperoleh memberikan reaksi negatif dengan tidak adanya gelembung udara pada perlakuan uji katalase.

Perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan (triplo) (Lindawati & Suardana, 2017; Suhaeni et al., 2016; Utama et al., 2018).

4.6.3.5 Uji Fermentasi Karbohidrat

Pembuatan media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) dengan diletakkan sebanyak 6 mL ke dalam tabung reaksi. Dilakukan pensterilan media dengan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Didinginkan media dalam keadaan miring. Disiapkan jarum inokulasi lurus untuk dilakukan inokulasi isolat bakteri secara aseptik dengan cara ditusuk ke bagian tengah hingga mencapai $\frac{3}{4}$ bagian dari permukaan media, dan bagian *slant* media digores. Tahapan selanjutnya selama 1 × 24 jam dengan pengaturan suhu pada 37°C dilakukan inkubasi media. Diamati hasilnya. Hasil akan menunjukkan bakteri terdapat laktosa, sukrosa, dan glukosa apabila bagian *slant* dan *butt* berwarna kuning (Pattuju et al., 2014).

4.6.3.6 Uji Oksidase

Uji oksidase dimulai dengan cara perendaman oxidase disc dengan aquadest dan ditempatkan di atas slide bersih. Selanjutnya dilihat perubahan yang terjadi selama 10-30 detik. Apabila terjadi perubahan warna menjadi ungu tua di daerah oxidase disc yang terkena bakteri maka oksidase positif, jika tidak terjadi perubahan warna (putih) maka bersifat negatif (Jayabarath et al., 2014; Kumar et al., 2012).

4.6.4 Uji Kekeruhan Metode Standar McFarland 0,5

Larutan standar McFarland 0,5 umum digunakan sebagai pembanding kekeruhan biakan bakteri dalam media cair dengan kepadatan antara 1×10^7 sel/ml - 1×10^8 sel/ml (Aviany & Pujiyanto, 2020). Tahapan pertama adalah disiapkan aquades kemudian dituangkan ke tiap tabung reaksi yang telah diberikan keterangan bakteri *E. coli*. Diambil bakteri menggunakan ose dan dimasukkan ke

tiap tabung reaksi yang telah diberi label yang telah diberi keterangan tiap jenis bakteri, kemudian dihomogenkan. Larutan pengenceran diamati kekeruhannya dan disesuaikan/disetarakan dengan standard McFarland 0,5 (Datta et al., 2019).

4.6.5 Ekstraksi *Cell Free Supernatant* (CFS)

Ekstraksi CFS dilakukan dengan cara media produksi yang telah diinkubasi disentrifugasi dalam keadaan suhu 4°C, menggunakan kecepatan 10.000 rpm yang dilakukan selama 10 menit (Chaudhary et al, 2020).

4.6.6 Uji Aktivitas Antimikroba Terhadap *E. coli*

Uji aktivitas antimikroba pada penelitian ini menggunakan metode kertas cakram dengan cara dibuat media MHA dengan ditimbang sebanyak 7,2 gr dan ditambahkan 250 mL aquades, kemudian dihomogenkan dan dipanaskan hingga larutan media jernih. Dituang MHA ke 4 buah cawan petri yang telah disiapkan kemudian didiamkan hingga media padat. Disiapkan kertas cakram antibiotik kloramfenikol dan cakram blank. Sebanyak 10 µL biakan bakteri *E. coli* diambil dan disebar pada permukaan media MHA. Kontrol positif berupa kertas cakram antibiotik kloramfenikol, diambil dengan pinset yang telah disterilkan kemudian diletakkan pada bagian permukaan tengah media. Sampel kemudian diinkubasi pada kondisi inkubator dengan keadaan suhu pada inkubator sebesar 37°C selama 24 jam; posisi cawan tidak terbalik. Zona hambat akan terbentuk pada media setelah masa inkubasi. Pengukuran diameter zona hambat kemudian dilakukan dengan menggunakan jangka sorong pada interval waktu pengukuran pada 24 jam dan 48 jam (Datta et al., 2019).

4.6.7 Analisis Data SPSS

Data yang telah didapatkan sebelumnya kemudian diolah menggunakan aplikasi *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) 23. Data yang telah didapatkan diolah menggunakan aplikasi SPSS. Nilai normalitas dan homogenitas yang didapatkan akan menentukan jenis uji yang digunakan untuk analisis data pada penelitian. Apabila normalitas pada data penelitian terdistribusi normal atau nilai signifikansi $> 0,05$ dan homogenitas bersifat homogen, maka dapat digunakan uji *Analysis of Variance* (ANOVA). Apabila data yang didapatkan sebaliknya, maka uji *Kruskall-Wallis* adalah uji yang dilakukan untuk analisis data penelitian. Apabila dari uji tersebut didapatkan hasil yang bermakna, maka diteruskan dengan uji lanjutan berupa uji Post Hoc. Uji Post Hoc berperan dalam menentukan kelompok perlakuan yang terdapat perbedaan secara signifikan.

4.6.8 Ekstraksi DNA Bakteri

Proses ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan Quick-DNA Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research®). Proses dilakukan sesuai prosedur manufaktur (Vesty et al., 2017).

4.6.9 Amplifikasi Gen 16s rRNA

Proses amplifikasi dilakukan di Genetika Lab PT. Genetika Science Indonesia. Cetakan untuk mengamplifikasi segmen menggunakan DNA yang telah diekstraksi sebelumnya menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Noer, 2021). Setiap DNA selanjutnya diamplifikasi dengan metode PCR menggunakan primer. Sepasang primer yang digunakan adalah 27F sebagai forward primer dan 1492R sebagai reverse primer (Frank et al., 2008).

4.6.10 Separasi DNA dengan Elektroforesis Gel

Proses lanjutan setelah amplifikasi adalah proses separasi atau pemisahan DNA. Proses separasi dilakukan di Genetika Lab PT. Genetika Science Indonesia. Dilakukan proses separasi dengan elektroforesis gel agarosa 1% terhadap DNA yang telah melalui proses amplifikasi. Penggambaran visual dilakukan dengan pewarna etidium bromida untuk kemudian dilakukan deteksi menggunakan sinar ultraviolet (UV) dengan instrumen UV transiluminator. Didokumentasikan hasil dengan alat bernama *gel documentation system (gel-doc)* (Kepel & Fatimawali, 2015).

4.6.11 Sekuensing DNA & Perbandingan Hasil Sekuensing Dengan Bank Data BLAST

Proses sekuensing dilakukan di Lab Genetika PT. Genetika Science Indonesia di Tangerang. Hasil sekuensing DNA dianalisis oleh peneliti menggunakan metode *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) melalui media daring NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) untuk dicari kesamaan atau disejajarkan urutan nukleotida gen 16s dalam menelusuri spesies bakteri asam laktat dari isolat produk yoghurt dan kefir yang diteliti (Kepel & Fatimawali, 2015).

4.6.12 Analisis Kekerabatan Spesies Bakteri Dengan Metode Filogenetik

Data hasil pensejajaran gen dari data bank yang sebelumnya telah didapatkan dari situs NCBI menggunakan metode BLAST kemudian dioperasikan ke dalam proses pembuatan pohon filogenetik. Analisis filogeni spesies bakteri asam laktat dilakukan dengan membuat pohon filogenetik (Rohimah et al., 2018; Suardana, 2014).

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Isolasi Bakteri Asam Laktat Dari Yoghurt Dan Kefir

Sampel yang digunakan dalam penelitian berupa yoghurt (dituliskan sebagai sampel Y) berasal dari Pujon dan kefir (dituliskan sebagai sampel K) berasal dari Sukun. Tahap pertama yang dilakukan terhadap sampel yakni proses isolasi bakteri asam laktat (BAL). Proses isolasi BAL bertujuan untuk mendapatkan isolat murni dari sampel yang digunakan. Proses ini dilakukan dengan cara mengambil bakteri dari sampel untuk kemudian ditumbuhkan pada media buatan dengan tujuan mendapatkan isolat murni bakteri (Sabbathini et al., 2017). Proses isolasi diawali dengan dilakukan pengenceran bertingkat pada sampel. Pengenceran dilakukan dengan H₂O hingga konsentrasi sampel yang mulanya ada pada tingkat 10⁻¹ menjadi 10⁻⁴. Dikutip dari literatur oleh (Tyas et al., 2018) pengenceran bertingkat atau pengenceran berseri dilakukan untuk mengurangi jumlah mikroba dalam suatu cairan. Tingkat pengenceran bergantung pada perkiraan jumlah mikroba yang ada pada sampel.

Tahap selanjutnya penanaman bakteri dari sampel ke medium pertumbuhan bakteri yang bersifat selektif terhadap BAL, yakni pada media MRS agar. MRS agar merupakan medium yang umum digunakan untuk kultivasi bakteri asam laktat (Subagiyo et al., 2016). Diambil masing-masing sampel yang telah diencerkan sebelumnya sebanyak 1 mL untuk ditumbuhkan pada media MRS agar dengan menggunakan metode cawan sebar (*spread plate*). Berdasarkan literatur oleh Srivastava & Srivastava (2013) prinsip metode cawan sebar adalah untuk

mendapatkan koloni tunggal yang tersebar dengan baik. Kemudian tahap dilanjutkan dengan diinkubasi tiap sampel selama 1×24 jam dengan pengaturan suhu pada 37°C . Setelah didapatkan koloni bakteri tumbuh, teknik cawan gores (streak plate) dilakukan. Penggunaan teknik cawan gores untuk mengisolasi koloni bakteri dari populasi campuran melalui pemisahan mekanis sederhana (Sanders, 2012).

Dilakukan pengamatan morfologi terhadap koloni bakteri yang tumbuh. Pengamatan morfologi secara makroskopis meliputi warna, bentuk, tepian, dan elevasi atau permukaan koloni bakteri (Nurin et al., 2017; Zuraidah et al., 2020). Hasil pengamatan makroskopis koloni bakteri yang didapatkan dari masing-masing sampel antara lain berbentuk bulat, memiliki tepian rata, berwarna putih susu, dan elevasi permukaan berbentuk cembung (*convex*).

Diambil koloni yang tumbuh secara acak dan ditanam pada media MRS agar baru untuk memperoleh biakan murni, kemudian masing-masing sampel diinkubasi kembali selama 2×24 jam dengan pengaturan suhu pada 37°C . Didapatkan hasil berupa 6 isolat bakteri dari sampel Y dengan penamaan berupa isolat y1, y2, y3, y4, y5, dan y6; serta 6 isolat bakteri dari sampel K yang diberi keterangan sebagai isolat k1, k2, k3, k4, k5 dan k6. Penamaan dilakukan dengan keterangan huruf serta nomor sesuai sampel dan urutan saat perlakuan.

Tabel 5.1 Hasil pengamatan makroskopis koloni BAL pada sampel

Parameter	Sampel Y (Yoghurt)	Sampel K (Kefir)
Bentuk	Bulat	Bulat
Tepian	Rata	Rata
Warna	Putih susu	Putih susu
Elevasi/Permukaan	Cembung (<i>Convex</i>)	Cembung (<i>Convex</i>)

5.2 Pembuatan Kultur Stok BAL

Pembuatan kultur stok BAL berfungsi mempermudah proses penelitian dalam memperoleh stok isolat bakteri asam laktat, yang mana kultur stok dapat digunakan untuk keperluan proses penelitian selanjutnya (Tuhuteru et al., 2018). Kultur stok dibuat dalam bentuk *milk yeast extract* (MYE) dengan komposisi campuran susu skim sebanyak 10%, glukosa 15%, dan *yeast extract* 0,5% (Maldonado et al., 2019). Sejumlah 1 mL MYE dan 1 mL gliserol 10% dimasukkan ke dalam tabung mikro steril. Diinokulasi isolat BAL yang telah didapatkan dari proses isolasi menggunakan ose dalam media MRS agar ke dalam tabung *eppendorf* berisi MYE dan gliserol. Masing-masing kultur stok MYE yang telah dibuat dan disimpan dalam tabung *eppendorf* dinamai atau diberi nomor sesuai jumlah isolat bakteri yang didapatkan sebelumnya dari tiap sampel. Apabila sampel yoghurt, maka ditulis y1 sampai dengan y6; begitupun dengan sampel kefir ditulis dengan keterangan k1 sampai dengan k6. Disimpan stok kultur MYE dalam dalam lemari pendingin laboratorium dengan suhu -20°C. Penyimpanan kultur stok pada suhu -20°C dapat menghasilkan *recovery* yang baik karena dapat memperlambat laju reaksi biokimia yang dapat merugikan mikroba selama penyimpanan. Suhu penyimpanan yang lebih rendah daripada 0°C akan menciptakan pembentukan es

di dalam atau di luar sel yang mengakibatkan potensi rusaknya dinding sel mikroba serta keluarnya cairan intra sel. Hal tersebut diantisipasi dengan penambahan gliserol sebagai zat antibeku. Sebagaimana literatur oleh Manjana et al. (2016) bahwa cara paling sederhana untuk menyimpan suatu kultur adalah dengan menambahkan gliserol ke dalam kultur tersebut untuk kemudian menyimpannya pada suhu -20°C atau -80°C di dalam freezer. Dikutip dari literatur oleh Fitriana (2019) yang mengatakan bahwa gliserol berfungsi dalam menurunkan titik beku suspensi, memodifikasi pembentukan kristal es melalui pencegahan peningkatan konsentrasi elektrolit di dalam sel, melindungi jaringan intraseluler dengan cara menembus membran sel, serta mencegah pengumpulan molekul H_2O dan kristalisasi es pada daerah titik beku larutan sehingga gliserol dapat mengurangi potensi pembentukan es di dalam sel mikroba.

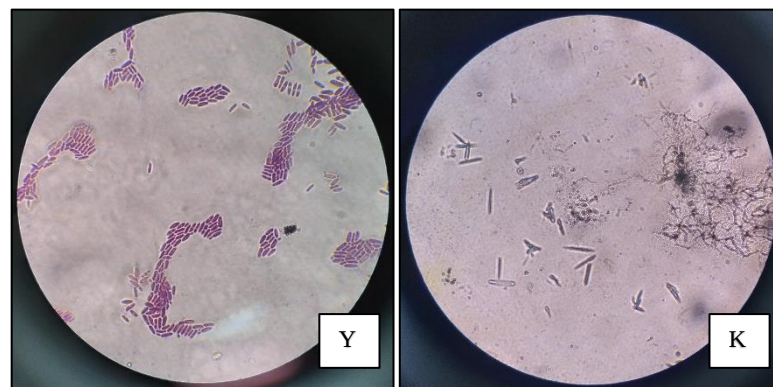
5.3 Identifikasi Fenotipik Bakteri Asam Laktat

Sejumlah isolat bakteri yang telah didapatkan dari proses isolasi diuji untuk diketahui karakteristik isolat bakterinya. Karakteristik isolat bakteri diketahui melalui beberapa uji yang meliputi sifat morfologi, fisiologi, dan biokimia dari suatu bakteri. Identifikasi secara fenotip dalam penelitian ini dilakukan melalui uji endospora, uji fermentasi karbohidrat, uji pewarnaan gram, uji motilitas, uji katalase, dan uji oksidase.

5.3.1 Uji Pewarnaan Gram

Uji pewarnaan gram dilakukan sebagai bentuk identifikasi terhadap morfologi bakteri. Dilakukan uji pewarnaan gram untuk mengetahui isolat bakteri yang diteliti tergolong ke dalam bakteri gram positif atau bakteri gram negatif.

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, isolat bakteri dari sampel Y dan sampel K menunjukkan bahwa bakteri tergolong ke dalam bakteri gram positif. Hal tersebut dilihat dari hasil pengamatan uji pewarnaan gram secara mikroskopik yang menunjukkan warna ungu pada pengamatan preparat isolat bakteri serta berbentuk basil (batang) (Gambar 5.1).



Gambar 5.1 Hasil pengamatan uji pewarnaan gram secara mikroskopik dari sampel Y, yoghurt; dan sampel K, kefir

Bakteri yang tergolong ke dalam bakteri gram positif memiliki kandungan peptidoglikan yang lebih tinggi dibandingkan bakteri gram negatif. Hamidah et al. (2019) dalam literturnya mengatakan bahwa peptidoglikan merupakan penyusun utama pada dinding sel bakteri gram positif. Terdapat kekuatan mekanik pada dinding sel bakteri gram positif yang terbentuk oleh sebab adanya ikatan silang peptida antara rantai peptidoglikan. Hal tersebut mempengaruhi peran peptidoglikan dalam ketahanan warna dari kristal violet. Peptidoglikan diketahui terbentuk dari ikatan *N-acetyl murmaric acid* dan gula amino *N-acetylglucoaminase*.

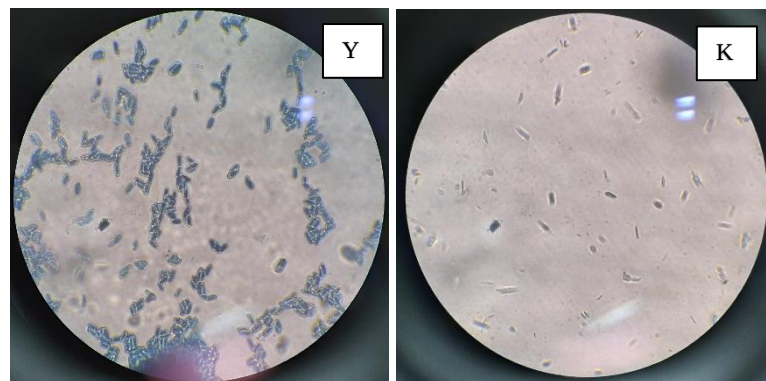
Prinsip uji pewarnaan gram yakni kemampuan dinding sel dalam mempertahankan pewarna kristal violet selama perlakuan pelarut. Hal ini yang membuat bakteri gram positif menunjukkan hasil berwarna ungu, bukan berwarna

merah seperti bakteri gram negatif yang terpengaruh warna safranin sebagai pelarut terakhir pada proses pengujian. Sesuai literatur oleh Putri (2018) dan Hamidah et al. (2019) saat pemberian larutan alkohol, dinding sel gram positif akan terdehidrasi, pori-pori pada dinding sel akan menyempit, dan permeabilitas akan berkurang, sehingga dinding sel tetap dapat menahan kristal violet sebagai pewarna awal. Sedangkan pada bakteri yang berupa gram negatif lapisan dinding sel peptidoglikan relatif tipis, pelarut alkohol dapat merusak membran luarnya dan tidak dapat mempertahankan kristal violet. Hasil pengamatan bakteri yang tergolong gram negatif kemudian akan tampak dengan warna merah di bawah pengamatan mikroskop karena pengaruh pemberian pelarut akhir safranin.

5.3.2 Uji Endospora

Uji endospora dilakukan sebagai bentuk identifikasi terhadap aspek fisiologis bakteri. Uji endospora dilakukan untuk mengetahui suatu sel bakteri mengandung spora atau tidak. Endospora memiliki struktur yang tebal, padat dan berlapis. Sel tampak berbentuk bujur telur dan bersifat tahan terhadap panas, radiasi, bahan kimia, serta agen lain yang umumnya menyebabkan kematian pada bakteri. Sifatnya yang sangat resisten disebabkan oleh dua hal, di antaranya lapisan dinding sel berlapis tebal yang mengandung peptidoglikan dan adanya molekul penstabil protein yang disebut asam dipikolinat (DPA). Endospora mempunyai sifat yang berbeda dengan sel vegetatif sehingga uji pewarnaan endospora ini dapat digunakan untuk membedakan bakteri yang memiliki spora atau tidak (non endospora) (Murugalatha et al., 2012; Rahayu & Setiadi, 2023).

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, isolat bakteri dari tiap sampel, Y dan K, menunjukkan hasil tidak ada endospora dalam isolat bakteri. Ditandai dengan hasil mikroskopis isolat dari kedua preparat yang tidak berwarna hijau setelah melalui proses pengujian (Gambar 5.2). Hasil tersebut sesuai dengan literatur oleh Nurin et al. (2017) yang menyatakan bahwa sifat non endospora (tidak memiliki endospora) pada bakteri adalah salah satu ciri umum dari BAL. BAL diketahui tidak memiliki endospora sehingga pada pengamatan hasil uji endospora dengan pewarna *green malachite* akan tampak tidak berwarna hijau.

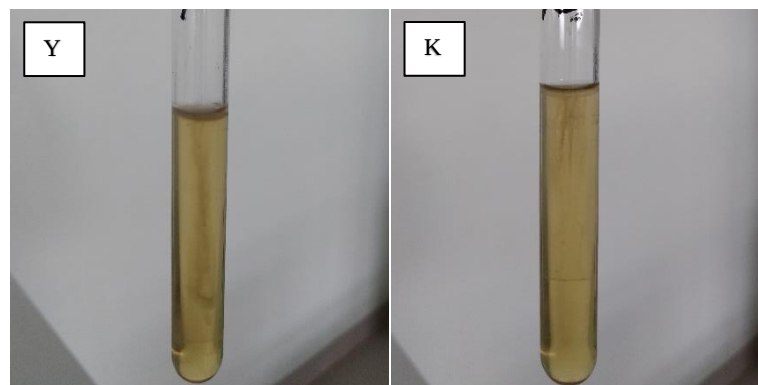


Gambar 5.2 Hasil pengamatan uji endospora secara mikroskopik dari sampel Y, yoghurt; dan sampel K, kefir

5.3.3 Uji Motilitas

Uji motilitas dilakukan sebagai bentuk identifikasi terhadap aspek fisiologis bakteri. Motilitas bakteri adalah suatu gerakan dari bakteri yang disebabkan adanya gerakan aktif atau pasif. Uji motilitas ini dilakukan untuk mengetahui pergerakan bakteri pada media tumbuh. Bakteri yang bersifat motil akan menunjukkan adanya pergerakan. Pergerakan tersebut menunjukkan bahwa suatu bakteri memiliki flagel. Flagela (*gliding motility*) sendiri merupakan alat gerak bakteri yang terdapat pada bakteri motil, namun tidak dimiliki oleh bakteri non motil (Kosasi et al., 2019; Panjaitan et al., 2020). Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, isolat bakteri

dari sampel Y dan sampel K menunjukkan sifat non motil, yaitu tidak adanya pergerakan dari bakteri. Hasil tersebut ditunjukkan dengan media semi padat tegak SIM yang sebelumnya telah ditanamkan isolat bakteri sampel dengan cara menusukkan ose jarum lurus, kemudian diinkubasi selama 2×24 jam dengan pengaturan suhu pada 37°C , menunjukkan hasil pengamatan berupa tidak adanya rambatan yang menyebar pada daerah sekitar tusukan. Hal tersebut sesuai dengan literatur pada penelitian sebelumnya oleh Kosasi et al. (2019) bahwa apabila hasil pengamatan dari uji motilitas menunjukkan tidak ada penyebaran pada bekas tusukan ose dan hanya bertumbuh lurus di daerah tusukan bakteri pada media, maka hasil penelitian bersifat negatif dan/atau bakteri bersifat non motil. Literatur lain oleh Falakh & Asri (2022) juga menyebutkan bahwa bakteri asam laktat menunjukkan sifat non motil pada uji motilitas, yang mana hal tersebut mengartikan isolat BAL sampel tidak memiliki flagela.

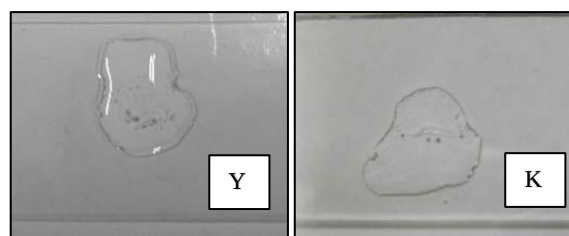


Gambar 5.3 Hasil pengamatan uji motilitas dari sampel Y, yoghurt; dan sampel K, kefir

5.3.4 Uji Katalase

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui karakteristik biokimia suatu bakteri. Tujuan dilakukan uji katalase adalah mengkonfirmasi apakah bakteri tergolong ke dalam kelompok bakteri yang dapat memecah H_2O_2 menjadi oksigen

atau tidak. Katalase sendiri merupakan enzim yang dapat mengkatalis penguraian hidrogen peroksida menjadi H_2O dan O_2 . Uji ini dilakukan dengan cara ditetaskan larutan pereaksi H_2O_2 3% sebanyak 2 tetes pada gelas objek yang telah dioleskan satu ose isolat bakteri dari media pertumbuhan MRS agar, kemudian didiamkan sebentar dan diamati yang terjadi. Pengujian tersebut bersifat positif apabila hasil akhir terbentuk gelembung gas hasil degradasi H_2O_2 oleh enzim katalase dan bersifat negatif jika tidak adanya gelembung yang terbentuk pada saat isolat ditetaskan H_2O_2 (Fadilah et al., 2022; Lindawati & Suardana, 2017; Rahayu & Setiadi, 2023). Berdasarkan hasil uji katalase dari penelitian ini, isolat bakteri dari kedua sampel menunjukkan adanya dua sampai empat buah gelembung kecil pada hasil pengamatan, yang menunjukkan bakteri dapat tergolong ke katalase positif. Apabila dibandingkan dengan hasil yang seharusnya, menurut literatur oleh Peacock & Hassan (2021) bakteri asam laktat umumnya menghasilkan hasil uji katalase negatif. Mayoritas hasil penelitian sebelumnya dan/atau literatur lainnya menunjukkan bahwa salah satu karakteristik BAL adalah berkatalase negatif. Ketidaksesuaian hasil penelitian ini dengan literatur mengindikasikan kemungkinan terjadi kontaminasi pada proses perlakuan berlangsung.



Gambar 5.4 Hasil pengamatan uji katalase dari sampel Y, yoghurt; dan sampel K, kefir

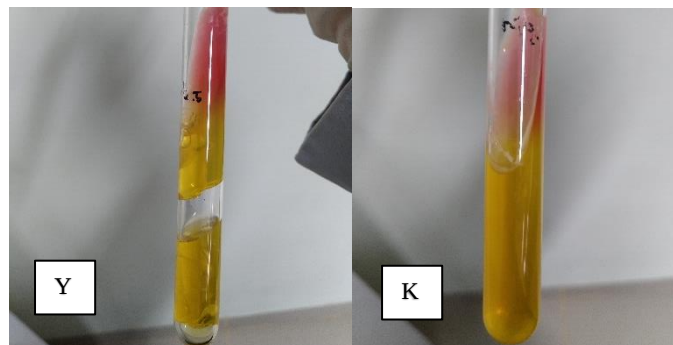
5.3.5 Uji Fermentasi Karbohidrat

Uji fermentasi karbohidrat merupakan pengujian terhadap karakteristik biokimia bakteri. Tujuan metode pengujian ini adalah untuk mengetahui kemampuan suatu bakteri dalam proses fermentasi karbohidrat. Fermentasi adalah aktivitas biokimia yang dilakukan oleh bakteri sebagai proses pertumbuhan dan perbanyakan dengan menggunakan nutrisi yang diperoleh dari lingkungan sekitar. Karbohidrat adalah sumber karbon serta sumber energi utama untuk pertumbuhan bakteri. Bakteri diketahui memiliki daya fermentasi pada senyawa karbohidrat seperti laktosa, glukosa, dan sukrosa. Kemampuan fermentasi tiap spesies bakteri berbeda, ada yang mampu memfermentasi karbohidrat jenis tertentu ada pula yang tidak mampu memfermentasi jenis karbohidrat lain. Tanda bahwa suatu hasil uji fermentasi karbohidrat bersifat positif adalah dengan adanya perubahan warna dari merah menjadi kuning pada media yang telah diberi perlakuan. Jika tidak terjadi perubahan warna, maka hasil uji fermentasi karbohidrat tergolong negatif (Amrulloh et al., 2021; Fitriyana et al., 2016; Santri et al., 2018).

Media pertumbuhan bakteri yang digunakan dalam pengujian ini adalah media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*). Proses perlakuan uji fermentasi karbohidrat dilakukan dengan cara menusukkan isolat bakteri menggunakan jarum ose hingga mencapai $\frac{3}{4}$ bagian media TSIA dan juga menggoreskan bagian *slant* media dengan bakteri secara aseptik. Kemudian diinkubasi media TSIA yang telah ditanamkan bakteri tersebut selama 24 jam dengan pengaturan suhu 37°C. Menurut literatur oleh (Pattuju et al., 2014) terdapat beberapa kemungkinan hasil yang akan didapatkan dari proses uji fermentasi karbohidrat, di antaranya: (1) kuning pada *butt*

(dasar) dan merah pada bagian *slant* (permukaan miring), menandakan adanya fermentasi glukosa; (2) kuning pada *butt* dan *slant*, menandakan adanya fermentasi laktosa dan/atau sukrosa; (3) pembentukan gas, yang ditandai dengan pembentukan ruang udara di bawah media sehingga terangkat ke atas; (4) pembentukan gas (H_2S), terlihat dari adanya pembentukan warna hitam pada media; dan (5) *butt* dan *slant* tetap berwarna merah, menandakan tidak adanya fermentasi gula dan pembentukan gas atau pembentukan H_2S .

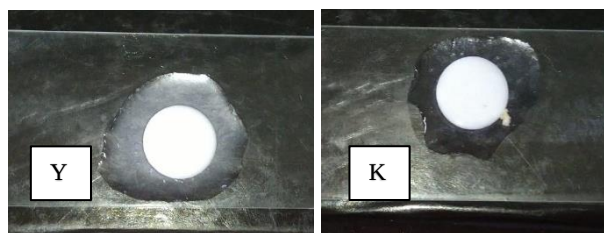
Berdasarkan hasil pengamatan pada kedua sampel yang diuji, tampak *slant* sebagian berwarna merah dan sebagian berwarna kuning dengan bagian *butt* berwarna kuning, dengan terdapat pembentukan gas di bawah media pertumbuhan sampel Y namun tidak ada pembentukan gas di bawah media pertumbuhan sampel K. Hasil tersebut menunjukkan bahwa hasil uji fermentasi karbohidrat sampel Y dan sampel K positif dapat memfermentasi glukosa, laktosa, dan/atau sukrosa. Hasil ini menurut literatur oleh Ingratubun et al. (2013) menunjukkan bahwa bakteri asam laktat pada sampel bersifat homofermentatif karena dapat memproduksi asam dari glukosa, laktosa, dan sukrosa. Perubahan warna menjadi kuning mengartikan bakteri dapat membentuk asam dari fermentasi karbohidrat, adapun terbentuknya gelembung gas mengartikan hasil fermentasi dari bakteri berbentuk gas (Amrulloh et al., 2021). Disebutkan juga bahwa terjadinya perubahan warna menjadi kuning serta adanya pembentukan gas menunjukkan bahwa bakteri memiliki kemampuan dalam memfermentasi karbohidrat (Apriyanthi et al., 2022).



Gambat 5.5 Hasil pengamatan uji fermentasi karbohidrat dari sampel Y, yoghurt; dan sampel K, kefir

5.3.6 Uji Oksidase

Uji oksidase dilakukan untuk mengetahui karakteristik biokimia bakteri. Uji oksidase dilakukan untuk menentukan keberadaan enzim oksidase pada bakteri (Arfiandi & Tumbol, 2020). Pada proses perlakuannya, uji oksidase diawali dengan dioleskan isolat bakteri pada disc oksidase yang telah direndam aquades sebelumnya, kemudian diletakkan di atas kaca objek dan diamati perubahan warna yang terjadi. Apabila muncul perubahan warna menjadi ungu dalam waktu 10 sampai 20 detik, maka menunjukkan adanya aktivitas oksidase. Tidak adanya perubahan warna atau perubahan warna terjadinya setelah 30 detik diartikan sebagai hasil pengujian negatif (Jayabarath et al., 2015; A. Kumar et al., 2012). Berdasarkan hasil uji oksidase yang dilakukan, isolat bakteri dari kedua sampel menunjukkan hasil negatif. Tidak ada perubahan warna menjadi ungu pada disc (cakram) oksidase dalam jangka waktu pengamatan pada 10-20 detik setelah diletakkan di kaca objek. Hal tersebut sesuai dengan karakteristik bakteri asam laktat bahwa dalam uji oksidase akan bersifat negatif (Reimena et al., 2017; Setiarto, 2021).



Gambar 5.6 Hasil pengamatan uji oksidase sampel Y, yoghurt; dan sampel K, kefir

Tabel 5.2 Hasil uji identifikasi fenotip

Identifikasi Fenotip		Sampel Y	Sampel K
Morfologi	Uji Pewarnaan Gram	Gram positif	Gram Positif
	Bentuk Bakteri	Basil	Basil
Fisiologi	Uji Endospora	-	-
	Uji Motilitas	-	-
Biokimia	Uji Katalase	+	+
	Uji Fermentasi Karbohidrat	+	+
	Uji Oksidase	-	-

Tabel 5.2 berupa rangkuman hasil identifikasi secara fenotip yang menunjukkan karakteristik bakteri dari sampel Y dan sampel K. Isolat bakteri dari sampel Y dan sampel K menunjukkan karakteristik secara fenotip berupa bakteri gram positif, berbentuk basil atau batang, bersifat non-endospora, non motil, katalase positif, dapat memfermentasi karbohidrat, dan bersifat oksidase negatif. Semua hasil dari tiap uji selain uji katalase mengarah pada karakteristik bakteri asam laktat, yaitu bakteri gram positif, tidak berspora, berbentuk bulat/batang, oksidase negatif, tidak motil dan menghasilkan asam laktat sebagai mayoritas produk akhir selama proses fermentasi karbohidrat (Falakh & Asri, 2022; Finanda, 2021; Setiarto, 2021); adapun hasil positif pada uji katalase dapat disebabkan oleh karena kemungkinan adanya kontaminasi karena ciri bakteri asam laktat umumnya berkatalase negatif yakni tidak memproduksi enzim katalase yang dapat memecah H_2O_2 .

5.4 Uji Aktivitas Antimikroba Terhadap *E. coli*

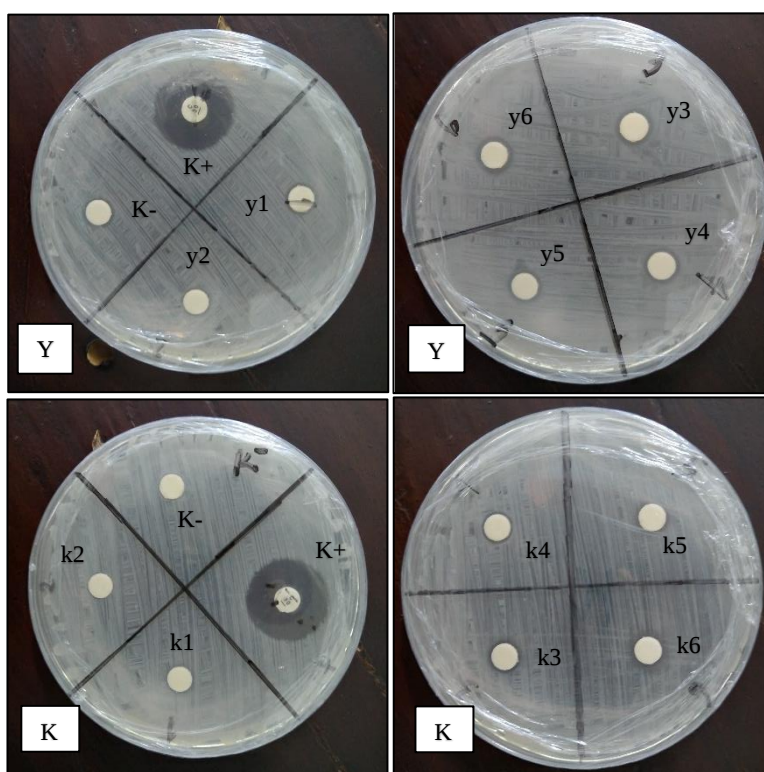
Suspensi sampel bakteri yang diuji pada penelitian ini distandarisasi dengan larutan standar McFarland 0,5. McFarland 0,5 digunakan sebagai standar dalam menyesuaikan kekeruhan bakteri suspensi sehingga jumlah bakteri berada dalam kisaran yang diberikan untuk membakukan mikroba pengujian (Rosmania & Yanti, 2020). Larutan standar McFarland digunakan sebagai standar kekeruhan bakteri suspensi sehingga kekeruhan suatu suspensi bakteri yang diuji akan berada dalam kisaran tertentu (Rizki et al., 2021).

Didapatkan kekeruhan bakteri yang diuji sesuai dengan kekeruhan pada larutan standar McFarland 0,5. Proses kemudian dilanjutkan dengan pembuatan *cell free supernatant* (CFS). CFS merupakan cairan yang mengandung metabolit yang dihasilkan dari pertumbuhan mikroba dan sisa nutrisi dari media yang digunakan. CFS dari BAL diketahui dapat memiliki aktivitas antimikroba antara lain karena asam organik, asam lemak, senyawa protein, dan senyawa lainnya (Lopez et al., 2021). Pembuatan CFS berasal dari isolat bakteri sampel pada media MRS Broth yang sebelumnya telah distandarisasi dengan McFarland. Diambil sampel sebanyak 1,5 mL menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam eppendorf. Kemudian eppendorf disentrifugasi menggunakan alat *centrifuge* selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm.

Pengujian aktivitas antimikroba menggunakan metode *disc diffusion* atau metode difusi cakram. Metode difusi cakram adalah metode yang paling sering digunakan untuk mengetahui aktivitas antimikroba suatu bakteri. Cara kerja difusi cakram yaitu antibakteri fraksi yang akan diuji diserapkan pada kertas cakram (*disc*)

dan ditempelkan pada media agar yang telah dihomogenkan dengan bakteri, kemudian diinkubasi sampai terlihat zona hambat di daerah sekitar cakram (Novita, 2016). Penelitian ini menggunakan media pertumbuhan *Muller Hilton Agar* (MHA), cakram/disc kloramfenikol dengan kekuatan 30 µg sebagai kontrol positif, dan aquades sebagai kontrol negatif. Pemilihan kloramfenikol sebagai kontrol positif dikarenakan kloramfenikol memiliki sifat sebagai antimikroba dengan spektrum luas yang aktif terhadap organisme aerobik/anaerobik, gram positif ataupun gram negatif (Pattipeilohy et al., 2022). MHA merupakan media pertumbuhan terbaik untuk pemeriksaan sensibilitas tes khususnya pada metode difusi Kirby-Bauer (difusi cakram), yang memiliki fungsi sebagai sumber nutrisi bagi pertumbuhan bakteri aerob maupun anaerob (Atmojo, 2016). Media MHA pada penelitian ini telah ditanamkan bakteri *E. coli* terlebih dahulu dengan metode *spread plate*. Kemudian diletakkan kertas cakram di cawan media. Kertas cakram yang diletakkan terdiri atas 6 kertas cakram yang telah direndam CFS dari masing-masing sampel uji, 1 kertas cakram kontrol positif kloramfenikol, dan 1 kertas cakram kontrol negatif yang telah direndam aquades. Tiap cawan dari masing-masing sampel kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Diamati zona bening (zona hambat) yang terbentuk di sekitar kertas cakram, kemudian diukur dan dicatat diameternya menggunakan jangka sorong. Diameter diukur sebanyak tiga kali yaitu secara vertikal, horizontal, dan diagonal; kemudian dihitung rata-rata diameternya. Daerah jernih/bening di sekeliling sumur dari media pertumbuhan bakteri uji yang tidak ditumbuhi bakteri disebut sebagai zona hambat (Putri et al., 2016). Pengamatan hasil zona hambat bakteri pada kedua sampel

semua isolat menunjukkan potensi aktivitas antimikroba. Hasil pengukuran zona hambat yang didapatkan dari 6 isolat sampel Y dan 6 isolat sampel K dapat dilihat pada gambar 5.7 dan tabel 5.3.



Gambar 5.7 Hasil pengukuran zona hambat sampel Y dengan isolat y1 - y6; sampel K dengan isolat k1-k6; k+ sebagai kontrol positif, k- sebagai kontrol negatif

Zona hambat dengan nilai daya hambat terbesar didapatkan pada isolat y6 dari sampel Y dengan rata-rata diameter sebesar $9,47 \pm 0,16$ mm dan pada isolat k4 dari sampel K dengan rata-rata diameter sebesar $8,12 \pm 0,08$ mm. Penentuan kriteria disebutkan bahwa kekuatan daya antibakteri bervariasi tergantung besaran diameter zona hambatnya; jika diameter zona hambat sebesar 5 mm atau kurang berarti lemah, 5-10 mm berarti sedang, 10-20 mm berarti kuat, serta 20 mm atau lebih maka sangat kuat (Novita, 2016). Berdasarkan penentuan kriteria tersebut dapat digolongkan potensi aktivitas antibakteri isolat y6 dan k4 bernilai sedang.

Tabel 5.3 Data pengukuran zona hambat

Sampel dan Kontrol	Diameter Zona Hambat Terhadap Bakteri <i>E. coli</i> (mm)			
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Rata-rata
K ⁺ (y)	18,10	19,4	18,80	18,77 ± 0,65
K ⁻ (y)	8,05	8,20	8,30	8,18 ± 0,13
K ⁺ (k)	21,00	23,00	23,00	22,33 ± 1,15
K ⁻ (k)	7,00	7,20	7,30	7,17 ± 0,15
y1	8,55	8,65	8,50	8,57 ± 0,08
y2	8,30	8,10	8,10	8,17 ± 0,12
y3	8,90	9,25	9,20	9,12 ± 0,19
y4	8,60	8,90	8,60	8,70 ± 0,17
y5	8,90	8,80	9,10	8,93 ± 0,15
y6	9,40	9,35	9,65	9,47 ± 0,16
k1	7,15	7,40	7,40	7,32 ± 0,14
k2	7,40	7,65	7,55	7,53 ± 0,13
k3	7,70	8,10	8,00	7,93 ± 0,21
k4	8,05	8,20	8,10	8,12 ± 0,08
k5	7,80	7,40	7,90	7,70 ± 0,26
k6	7,50	8,05	7,70	7,75 ± 0,28

5.5 Analisis Data SPSS

Statistical Package for the Social Science atau SPSS merupakan suatu perangkat lunak yang umum digunakan untuk menganalisa data statistika (Marsitin & Sesanti, 2022). Analisis data dari hasil pengukuran zona hambat secara statistik dilakukan menggunakan aplikasi *software* SPSS 23. Data zona hambat pada penelitian ini diuji normalitas terlebih dahulu menggunakan metode *Saphiro-Wilk*. Uji *Shapiro-Wilk* adalah metode yang lebih tepat untuk digunakan pada ukuran sampel kecil (berjumlah <50 sampel) (Mishra et al., 2019). Hasil uji normalitas menunjukkan terdapat beberapa nilai sig. < 0,05 (pada kontrol positif K, isolat y2, isolat y4, dan isolat k1) yang mana menginterpretasikan distribusi tidak normal. Dilakukan uji homogenitas varian berupa uji *Levene*. Didapatkan secara statistik hasil pengujian berupa asumsi homogenitas tidak terpenuhi, Data pada hasil uji

normalitas dengan *Saphiro-Wilk* tidak terdistribusi normal dan uji homogenitas dengan *uji Levene* memberikan hasil yang tidak homogen, sehingga tidak dapat dilanjutkan untuk pengujian statistik dengan metode ANOVA (*Anaylsis of Variance*). Dilakukan uji beda berupa uji *Kruskal-Wallis* pada SPSS sebagai uji alternatif (Dahlan, 2014). Hasil pengujian data menggunakan metode *Kruskal-Wallis* berupa nilai sig. = 0,000. Nilai sig. < 0,05 menginterpretasikan bahwa terdapat perbedaan nilai signifikan pada data hasil pengukuran zona hambat.

Tabel 5.4 Hasil uji SPSS

Metode Uji SPSS	Nilai Signifikansi/p-value	Interpretasi
Uji Saphiro-Wilk	0,000 (pada kontrol positif K, isolat y2, y4, dan k1)	sig. < 0,05, artinya tidak terdistribusi normal
Uji Levene	0,043	sig. < 0,05, artinya varian tidak homogen
Uji Kruskal-Wallis	0,000	sig. < 0,05, artinya terdapat perbedaan yang signifikan
Uji Mann-Whitney	0,05 (pada perbandingan kontrol positif Y dengan y6); dan 0,046 (pada perbandingan kontrol positif K dengan k4)	sig. ≤ 0,05, artinya terdapat perbedaan signifikan pada masing-masing perbandingan

Menurut literatur oleh Dahlan (2014) bahwasanya untuk mencari tahu pada kelompok mana terdapat perbedaan signifikan, maka dilakukan uji analisis *post hoc*. Uji *Mann-Whitney* adalah analisis *post hoc* yang digunakan untuk uji *Kruskal-Wallis*. Diketahui dari tabel pengukuran diameter zona hambat bahwa isolat y6 dari sampel Y dan isolat k4 dari sampel B memiliki diameter zona hambat paling besar di antara 5 isolat lainnya dari masing-masing sampel. Dibandingkan isolat y6 dengan kontrol positif Y dan isolat k4 dengan kontrol positif K menggunakan analisis uji *Mann-Whitney*. Didapatkan hasil pengujian berupa sig. = 0,05 pada perbandingan isolat y6 dengan kontrol positif Y; dan sig. = 0,046 pada

perbandingan isolat k4 dengan kontrol positif K. Kedua hasil tersebut memberikan interpretasi secara statistik bahwa terdapat perbedaan signifikan pada tiap perbandingan karena nilai signifikansi $\leq 0,05$. Hal tersebut dapat diartikan terdapat aktivitas antimikroba dari isolat y6 maupun isolat k4 terhadap bakteri *E. coli*.

Bakteri asam laktat sendiri diketahui memiliki kandungan metabolit yang berpotensi sebagai antimikroba. Literatur oleh Fitriarni & Ibrahim (2014) mencantumkan bahwa terdapat metabolit bernama bakteriosin yang didapatkan dari isolasi dari bakteri *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus*. Dikatakan bahwa bakteriosin memiliki daya hambat pada aktivitas bakteri gram negatif juga bakteri gram positif. *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus* diketahui merupakan bakteri yang sering digunakan pada proses pembuatan produk susu fermentasi seperti yoghurt dan kefir (Wahyuningtyas, 2017).

5.6 Identifikasi Genotip Bakteri Asam Laktat

Identifikasi genotip dilakukan terhadap isolat bakteri yang berpotensi memiliki aktivitas antimikroba terbesar dari masing-masing sampel. Sebanyak 30 μ l dari masing-masing isolat y6 dan k4 diidentifikasi secara genotip menggunakan metode PCR sekuen gen 16S rRNA. Proses sekuensing dengan PCR adalah amplifikasi gen pada DNA bakteri dengan sekuen gen 16S rRNA menggunakan primer 27F sebagai *forward* primer dan 1492R sebagai *reverse* primer. *Forward* primer adalah awalan primer yang mengapit target sekuens, sedangkan *reverse* primer adalah urutan sekuens primer yang terdapat pada bagian akhir gen target yang sedang diamati (Hartatik, 2021). Genom bakteri diperbanyak atau

diampifikasi berdasarkan urutan basa nukleotida dalam gen ribosom 16S dengan menggunakan pasangan primer 27F/1492R (Mastuti et al., 2020). Kondisi siklus PCR terdiri dari denaturasi awal pada suhu 95°C selama 1 menit, dilanjutkan dengan siklus 35 (denaturasi pada suhu 95°C selama 15 detik, annealing pada suhu 55°C selama 15 detik, ekstensi pada suhu 72°C selama 10 detik), kemudian pasca ekstensi pada suhu 72°C selama 5 menit. Analisis produk PCR dilakukan dengan elektroforesis pada gel 0,8 % agarose untuk mengontrol akurasi (Maleki et al., 2017). Setelah itu, fragmen divisualisasikan di bawah sinar UV dalam sistem dokumentasi gel (Yurnaningsih et al., 2021).

Tabel 5.5 Tabel hasil ekstraksi DNA

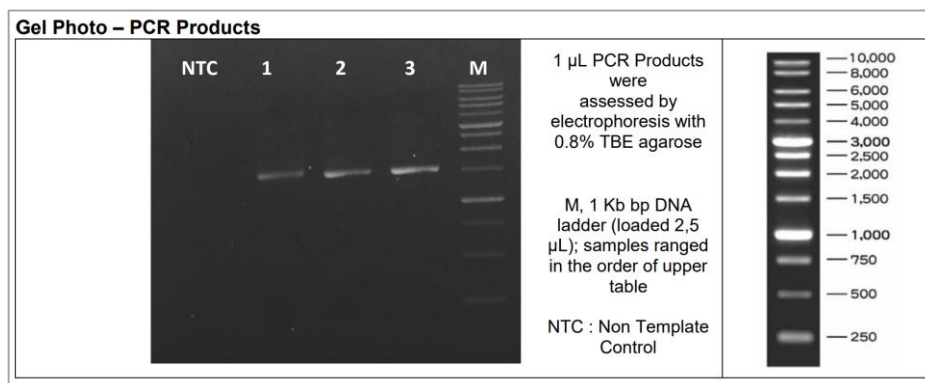
No.	Nama Sampel	Konsentrasi (ng/μl)	A _{260/280}	A _{260/230}	Volume (μl)
1	y6	13.8	1.93	0.12	30
2	k4	18.5	1.85	0.15	30

Proses identifikasi secara genotip melalui beberapa tahapan, diawali dengan ekstraksi DNA menggunakan Quick-DNA Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research®, D6005). Tujuan dilakukannya ekstraksi adalah untuk memisahkan DNA murni dari komponen sel seperti protein, karbohidrat, lemak. Ekstraksi DNA merupakan proses pemisahan DNA yang terdiri dari tiga tahap utama yaitu pemecahan sel (lisis), pemisahan DNA dari komponen lain sel, serta pemurnian DNA (Emilia et al., 2021; Hutami et al., 2018). Hasil dari proses ekstraksi dengan Quick-DNA Bacterial Miniprep Kit didapatkan konsentrasi pada isolat sampel y6 dan k4 berturut-turut sebesar 13,8 ng/μl dan 18,5 ng/μl. Tingkat kemurnian kemudian dibaca dari hasil yang terlihat berupa rasio dari nilai absorbansi (A) pada panjang gelombang 260/280 nm dan 260/230 nm (E. Pratiwi & Widodo, 2020).

Hasil dapat dilihat pada tabel 5.3 berupa rasio nilai $A_{260/280}$ dari isolat sampel y6 dan k4 berturut-turut adalah 1,93 dan 1,85; sedangkan nilai $A_{260/230}$ dari isolat sampel y6 dan k4 adalah 0,12 dan 0,15. Nilai yang sesuai pada kriteria ‘murni’ DNA pada indikator $A_{260/280}$ mengartikan kedua isolat sampel memenuhi kriteria kemurnian DNA yang baik. Adapun nilai $A_{260/230}$ yang cenderung rendah daripada yang seharusnya menunjukkan kemungkinan adanya kontaminasi. Pengamatan perbedaan penyerapan cahaya menggunakan alat spektrofotometer Nanodrop mengandalkan perhitungan perbedaan penyerapan cahaya ultraviolet dimana pilinan ganda DNA dapat menyerap cahaya ultraviolet pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan kontaminan (fenol atau protein) akan menyerap cahaya pada panjang gelombang 280 nm. Rentang kemurnian DNA pada rasio absorbansi terhadap panjang gelombang 260 nm dan 280 nm yang baik adalah sebesar 1,8-2,0. Apabila rasionya jauh lebih rendah dari yang seharusnya ($\leq 1,6$), hal ini memungkinkan ada kontaminasi zat kontaminan seperti protein, fenol, atau kontaminan lain yang menyerap dengan kuat pada atau mendekati 280 nm. Sebaliknya, karena pembacaan absorbansi tidak dapat membedakan antara DNA dan RNA, keberadaan RNA dapat menyebabkan peningkatan rasio dan kemungkinan ini harus dipertimbangkan untuk menghindari DNA mengalami *over quantification*. Adapun rasio absorbansi 260/230 banyak digunakan sebagai indikator sekunder kemurnian DNA. Nilai 260/230 yang diharapkan untuk DNA “murni” umumnya berada dalam kisaran antara 2,0 dan 2,2. Apabila rasionya jauh lebih rendah, hal ini mengindikasikan adanya kemungkinan kontaminan yang menyerap pada panjang gelombang 230 nm seperti protein, guanidine HCL

(digunakan untuk isolasi DNA), EDTA, karbohidrat, lipid, garam, atau fenol (Dewanata & Mushlih, 2021; Lucena-Aguilar et al., 2016).

Keberadaan DNA pada suatu organisme dapat ditentukan secara kuantitatif, dengan spektrofotometri, dan secara kualitatif, dengan elektroforesis gel agarosa. Pengujian DNA kuantitatif merupakan analisis untuk mengetahui kuantitas/kandungan DNA yang terdapat dalam zat yang diketahui memiliki DNA plasmid dalam larutan sampel atau komponen zat melalui pengujian kualitatif (Dewanata & Mushlih, 2021). Proses identifikasi dilanjutkan dengan dilakukan separasi DNA dengan elektroforesis gel. Produk PCR berupa DNA yang telah teramplifikasi divisualisasikan dengan elektroforesis. Sebanyak 1 µl produk PCR diuji dengan menggunakan campuran agarosa TBE konsentrasi 0,8%. Tahap elektroforesis dilakukan untuk melihat hasil amplifikasi DNA dengan PCR. TBE atau Tris-borat-EDTA merupakan buffer yang berfungsi untuk mempertahankan konsentrasi agarosa tetap stabil pada waktu dipanaskan (Rumbiwati & Trimuratno, 2021). Hasil elektroforesis gel ekstrak DNA yang diperoleh dapat dilihat pada gambar 5.12. Visualisasi pita DNA dengan elektroforesis gel agarosa menunjukkan jumlah DNA yang terdeteksi ada pada kisaran nilai 1500 pasang basa. Nilai tersebut didapatkan dengan cara membandingkan pita DNA sampel dengan DNA marker yang telah diketahui ukuran pita DNA-nya (Gaffar et al., 2021).



Gambar 5.8 Hasil separasi DNA isolat sampel dengan metode elektroforesis gel

Pengurutan atau sekuensing DNA kemudian dilakukan untuk mengetahui jumlah besar molekul untai DNA dari tiap sampel. Proses sekuensing – sebagaimana proses ekstraksi DNA dan separasi dengan elektroforesis gel dilakukan di Lab Genetika, PT. Genetika Science Indonesia di Tangerang. Hasil sekuensing dapat dilihat pada tabel 5.4. Urutan nukleotida pada hasil sekuensing menunjukkan urutan DNA mencapai angka 1403 pasang basa (bp) ampikon pada sampel y6 dan 1414 bp ampikon pada sampel k4. Algarni (2022) dalam literturnya menyatakan bahwa umumnya ukuran ampikon PCR yang menggunakan primer universal (primer 27F dan primer 1492R) ada pada kisaran nilai 1500 bp. Hal tersebut menunjukkan keselarasan bahwa hasil sekuensing dengan metode PCR serta hasil visualisasi panjang DNA menggunakan elektroforesis gel, memiliki urutan DNA pada kisaran 1500 bp pada kedua sampel.

Tabel 5.6 Hasil sekuensing sampel y6 dan k4 dengan metode PCR

No.	Sampel	Urutan Nukleotida DNA
1	y6	Sequence Assembly 1403bp 1 AGTCGAACGG TAACAGGAAG CAGCTTGCTG CTTGCGTGAC GAGTGGCGGA CGGGTGAGTA 61 ATGTCTGGGA AACTGCCCGA TGGAGGGGGA TAACTACTGG AAACGGTAGC TAATACCGCA 121 TAACGTCGCC AGACCAAAGA GGGGGACCTT CGGGCCTCTT GCCATCGGAT GTGCCAGAT 181 GGGATTAGCT AGTAGGTGGG GTAACGGCTC ACCTAGGCGA CGATCCCTAG CTGGTCTGAG 241 AGGATGACCA GCCACACTGG AACTGAGACA CGGTCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG 301 GGGAAATATT CACAATGGGC GCAAGCCTGA TGCAGCCATG CCGCGTGTAT GAAGAAGGCC 361 TTCGGGTTGT AAAGTACTTT CAGCGGGGAG GAAGGCGATG AGGTTAATAA CCTCGTCGAT 421 TGACGTTACC CGCAGAAGAA GCACCGGCTA ACTCCGTGCC AGCAGCCCGG GTAATACGGA 481 GGGTGCAAGC GTTAATCGGA ATTACTGGGC GTAAAGCGCA CGCAGGCGGT CTGTCAAGTC 541 GGATGTGAAA TCCCCGGGCT CAACCTGGGA ACTGCATTTC AAATGGCAG GCTTGAGTCT 601 CGTAGAGGGG GGTAGAATTC CAGGTGTAGC GGTGAAATGC GTAGAGATCT GGAGGAATAC 661 CGGTGGCGAA GGGCGCCCCC TGGACGAAGA CTGACGCTCA GGTGCGAAAG CGTGGGGAGC 721 AAACAGGATT AGATACCTGT GTAGTCCACG CCGTAAACGA TGTCTACTTG GAGGCTGTTC 781 CCTTGAGGAG TGGCTTCCGG AGCTAACGCG TTAAGTAGAC CGCTGGGGA GTACGGCCGC 841 AAGGTTAAAA CTCAAATGAA TTGACGGGGG CCGCACAAAG CGGTGGAGCA TGTGTTTAA 901 TTCGATGCAA CGCGAAGAAC CTTACCTACT CTTGACATCC AGAGAACTTA GCAGAGATGC 961 TTTGGTGCCT TCGGGAATCT TGAGACAGGT GCTGCATGGC TGTGCTGAGC TCGTGTGTG 1021 AAATGTTGGG TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AACCTTATC CTTTGTGTCC AGCGGTTGCG 1081 CCGGGAATCT AAAGGAGACT GCCAGTGACA AACTGGAGGA AGGTGGGGAT GACGTCAGT 1141 CATCATGGCC CTTACGAGTA GGGCTACACA CGTGCTACAA TGGCGCATAA AAAGAGAAGC 1201 GACCTCGCGA GAGCAAGCGG ACCTCATAAA GTGCGTCGTA GTCCGGATCG GAGTCTGCAA 1261 CTCGACTCCG TGAAGTCGGA ATCGCTAGTA ATCGTGGATC AGAATGCCAC GGTGAATACG 1321 TTCCCGGGCC TTGTACACAC CGCCCGTCAC ACCATGGGAG TGGGTTGCAA AAGAAGTAGG 1381 TAGCTTAACC TTCGGGAGGG CGC
2	k4	Sequence Assembly 1414bp 1 GTCGAGCGAA CAGATAAGGA GCTTGCTCCT TTGACGTTAG CGGCGGACGG GTGAGTAACA 61 CGTGGGTAAC CTACCTATAA GACTGGGATA ACTTCGGGAA ACCGGAGCTA ATACCGGATA 121 ACATTTGGAA CCGCATGGTT CTAAAGTGAA AGATGGTTTT GCTATCACTT ATAGATGGAC 181 CCGCGCCGTA TTAGCTAGTT GGTAAGGTAA CGGCTTACCA AGGCGACGAT ACGTAGCCGA 241 CCTGAGAGGG TGATCGGCCA CACTGGAATC GAGACACGGT CCAGACTCCT ACGGGAGGCA 301 GCAGTAGGGA ATCTTCCGCA ATGGGCGAAA GCCTGACGGA GCAACGCCCG GTGAGTGATG 361 AAGGGTTTCG GCTCGTAAAA CTCTGTTATT AGGGAAGAAC AAACGTGTAA GTAACGTGTC 421 ACGTCTTGAC GGTACCTAAT CAGAAAGCCA CGGCTAACTA CGTGCCAGCA GCCCGGGTAA 481 TACGTAGGTG GCAAGCGTTA TCCGGAATTA TTGGGCGTAA AGCGCGCGTA GCGGTTTCT 541 TAAGTCTGAT GTGAAAGCCC ACGGCTCAAC CGTGGAGGGT CATTGGAAC TGGGAAACTT 601 GAGTGCAGAA GAGGAAAGTG GAATTCATG TGTAACGGTG AAATGCGCAG AGATATGGAG 661 GAACACCACT GCGCAAGCGC ACTTCTGGT CTGTAACCTA CGCTGATGTG CGAAACCGTG 721 GGGATCAAA AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCGT AAACGATGAG TGTAAAGTGT 781 TAGGGGGTTT CCGCCCTTA GTGCTGCAGC TAACGCATTA AGCACTCCCG CTGGGGAGTA 841 CGACCGCAAG GTTGAAACTC AAAGGAATTG ACGGGGACCC GCACAAGCGG TGGAGCATGT 901 GGTTTAATTC GAAGCAACGC GAAGAACCCT ACCAAATCTT GACATCCTTT GAAACTCTA 961 GAGATAGAGC CTTCCCTTC GGGGACAAA GTGACAGGTG GTGCATGTT GTGCTGAGT 1021 CGTGTCTGTA GATGTTGGGT TAAGTCCCGC AACGAGCGCA ACCCTTAAGC TTAGTTGCCA 1081 TCATTAAGTT GGGCACTCTA GGTGACTGC CGGTGACAAA CCGGAGGAAG GTGGGGATGA 1141 CGTCAAATCA TCATGCCCT TATGATTGG GCTACACACG TGCTACAATG GACAATACAA

Hasil sekuensing DNA kemudian dianalisis menggunakan metode *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) melalui media daring NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Penelusuran melalui NCBI dilakukan terhadap urutan basa DNA yang didapatkan untuk mengetahui kekerabatan spesies dari tiap sampel bakteri yang diuji. Hasil penelusuran dengan metode BLAST tersebut dapat dilihat pada gambar 5.9.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓ Pluralibacter pyrinus partial 16S rRNA gene, type strain DSM12410T	Pluralibacter pyrinus	2582	2582	100%	0.0	99.86%	1535	LN875036.1
✓ Pluralibacter pyrinus strain E872 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pluralibacter pyrinus	2582	2582	100%	0.0	99.86%	1419	EF059884.1
✓ Uncultured Enterobacter sp. clone NAB3e 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured Enterobacter sp.	2564	2564	100%	0.0	99.64%	1477	AY395025.1
✓ Enterobacter sp. NAB3a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Enterobacter sp. NAB3a	2549	2549	100%	0.0	99.43%	1477	AY395008.1
✓ Pluralibacter pyrinus strain 533.12.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pluralibacter pyrinus	2532	2532	98%	0.0	99.71%	1384	MG859616.1
✓ Enterobacter sp. NAB3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Enterobacter sp. NAB3	2516	2516	100%	0.0	98.94%	1466	AY395007.1
✓ Enterobacter hormaechei strain CPO 4.200 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Enterobacter hormaechei	2508	2508	100%	0.0	98.93%	1485	MN733028.1
✓ Enterobacter hormaechei strain 40a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Enterobacter hormaechei	2508	2508	100%	0.0	98.93%	1472	MN294585.1
✓ Enterobacter hormaechei strain 15a1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Enterobacter hormaechei	2508	2508	100%	0.0	98.93%	1481	MN294583.1
✓ Enterobacter hormaechei strain VITJS3A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Enterobacter hormaechei	2508	2508	100%	0.0	98.93%	1572	MN258703.1

a

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓ Staphylococcus saprophyticus strain UTI-045 chromosome, complete genome	Staphylococcus saprophyticus	2612	15577	100%	0.0	100.00%	2639876	CP054831.1
✓ Staphylococcus saprophyticus strain csgm_h2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Staphylococcus saprophyticus	2612	2612	100%	0.0	100.00%	1495	MN826552.1
✓ Staphylococcus saprophyticus strain UTI-042v chromosome, complete genome	Staphylococcus saprophyticus	2612	15610	100%	0.0	100.00%	2645137	CP054438.1
✓ Staphylococcus edaphicus strain 1328 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Staphylococcus edaphicus	2612	2612	100%	0.0	100.00%	1461	MT573756.1
✓ Staphylococcus edaphicus strain Uyi_20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Staphylococcus edaphicus	2612	2612	100%	0.0	100.00%	1423	MT507214.1
✓ Staphylococcus sp. strain Atellm2C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Staphylococcus sp.	2612	2612	100%	0.0	100.00%	1422	MT386290.1
✓ Staphylococcus edaphicus strain BPs2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Staphylococcus edaphicus	2612	2612	100%	0.0	100.00%	1441	MT269536.1
✓ Staphylococcus arlettae strain NR_115607.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Staphylococcus arlettae	2612	2612	100%	0.0	100.00%	1477	MN851079.1
✓ Staphylococcus arlettae strain NR_156818.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Staphylococcus arlettae	2612	2612	100%	0.0	100.00%	1541	MN851078.1
✓ Staphylococcus saprophyticus strain 100 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Staphylococcus saprophyticus	2612	2612	100%	0.0	100.00%	1508	MF457583.1

b

Gambar 5.9 Hasil penelusuran kekerabatan spesies bakteri dari urutan nukleotida DNA sampel y6 (a) dan k4 (b) melalui media daring NCBI

Berdasarkan literatur oleh Gaffar et al. (2021) terdapat beberapa indikator hasil BLAST yang dapat digunakan dalam menentukan kemiripan sekuen, antara lain: Query Coverage dan Per. Ident mendekati 100%, e-value mendekati 0, serta Max Score dan Total Score sama pada setiap database. Hasil penelusuran nukleotida DNA dari isolat bakteri y6 didapatkan daftar spesies bakteri dengan kontak kekerabatan yang paling mirip dengan diambil 10 spesies yang memiliki persentase identitas teratas dari tiap sampel. Hasil penelusuran nukleotida DNA sampel isolat y6 diketahui memiliki kontak kekerabatan dengan persentase 98,93% - 99,86% pada 10 DNA target teratas, antara lain:

1. *Pluralibacter pyrinus*, strain DSM12410T (99,86%)
2. *Pluralibacter pyrinus*, strain E872 (99,86%)
3. *Pluralibacter pyrinus*, strain 533.12.1 (99,71%)

4. *Enterobacter* sp., strain NAB3e (99,64%)
5. *Enterobacter* sp., strain NAB3a (99,43%)
6. *Enterobacter* sp., strain NAB3 (98,94%)
7. *Enterobacter hormaechei*, strain CPO 4.200 (98,93%)
8. *Enterobacter hormaechei*, strain 40a (98,93%)
9. *Enterobacter hormaechei*, strain 15a1 (98,93%)
10. *Enterobacter hormaechei*, strain VITJS3A (98,93%)

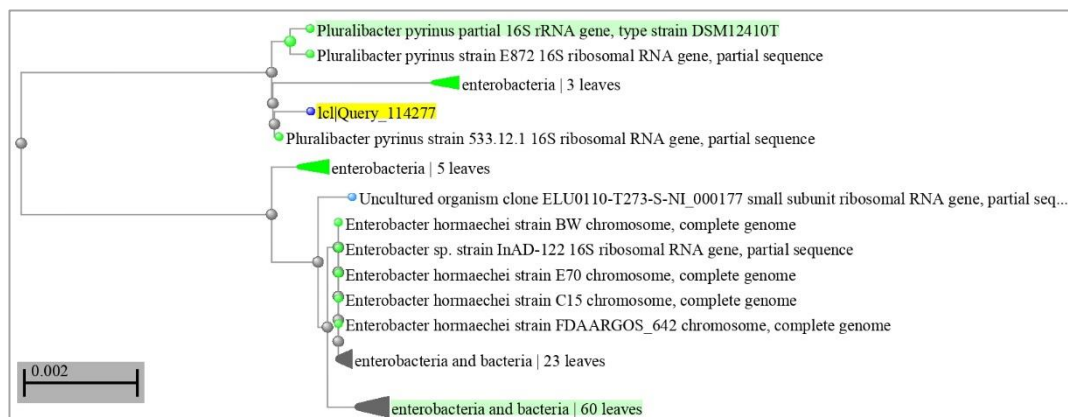
Hasil penelusuran nukleotida DNA sampel isolat k4 diketahui memiliki persentase kemiripan identitas 100% pada 10 DNA target teratas. Persentase identitas kontak kekerabatan DNA sampel menunjukkan bahwa isolat k4 merupakan spesies *Staphylococcus* dengan strain yang berbeda-beda, antara lain:

1. *Staphylococcus saprophyticus*, strain UTI-045 (100%)
2. *Staphylococcus saprophyticus*, strain cqsm_h2 (100%)
3. *Staphylococcus saprophyticus*, strain UTI-042y (100%)
4. *Staphylococcus edaphicus*, strain 1328 (100%)
5. *Staphylococcus edaphicus*, strain Uyi_20 (100%)
6. *Staphylococcus* sp., strain Atelim2C (100%)
7. *Staphylococcus edaphicus*, strain BPs2 (100%)
8. *Staphylococcus arlettae*, strain NR_115607.1 (100%)
9. *Staphylococcus arlettae*, strain NR_156818.1 (100%)
10. *Staphylococcus saprophyticus*, strain 100 (100%)

Berdasarkan hasil yang didapatkan, nilai persentase identitas dari tiap isolat sampel ada pada nilai $> 98\%$, yang mana menurut literatur oleh Gaffar et al. (2021) nilai

kemiripan > 98% mengindikasikan bahwa homologi sekuen berada pada tingkat spesies. Hal tersebut dapat diartikan sampel yang diidentifikasi paling dekat hubungannya dengan *Pluralibacter pyrinus* strain DSM12410T (99,86%) untuk isolat y6 dan isolat k4 dengan *Staphylococcus saprophyticus* strain UTI-045 (100%). Besarnya persentase homologi DNA pengelompokan bakteri dalam status spesies dalam *alignment* suatu sekuen sangat dipengaruhi oleh persentase dan panjang panjang asam amino (Suyono, 2010).

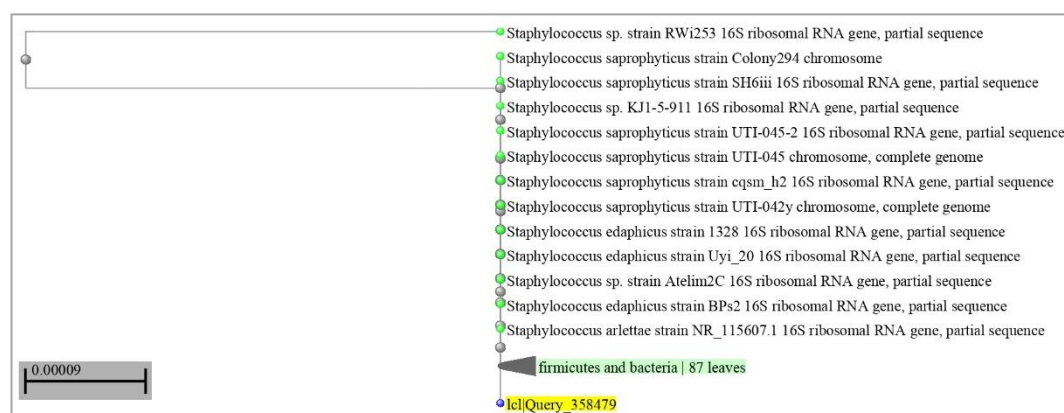
Penelusuran kontak kekerabatan lebih lanjut dilakukan dengan membuat pohon filogenetik. Pohon kekerabatan filogenetik isolat bakteri y6 dan k4 telah didapatkan melalui proses penelusuran dengan *website* NCBI menggunakan metode *neighbour joining*. Metode *neighbour joining* merupakan metode yang banyak digunakan dalam merekonstruksi filogeni dalam jumlah besar, kelebihan metode berupa kecepatan komputasi dan akurasi tinggi dalam inferensi filogenetik (Kumar & Gadagkar, 2001). Pembentukan pohon filogenetik dibuat dengan mengambil data sekuen yang memiliki kemiripan paling tinggi dari database kemudian disejajarkan (*alignment*) dengan sekuen sampel (Gaffar et al., 2021). Hasil penelusuran pohon filogenetik bersifat monofiletik yang mana artinya suatu kelompok memiliki satu leluhur yang mewariskan sifat genetik, morfologi serta biokimia pada semua keturunannya. Hal itu menyebabkan anggota monofiletik berkerabat sangat dekat antara satu dengan yang lain, yang berasal dari genus yang satu (Anafarida & Badruzsaufari, 2020). Pohon filogenetik dari masing-masing isolat sampel dapat dilihat pada gambar 5.10.



Gambar 5.10 Pohon filogenetik kekerabatan isolat bakteri y6

Berdasarkan hasil penelusuran pohon filogenetik dengan NCBI, isolat y6 memiliki kekerabatan terdekat dengan *Pluralibacter pyrinus* strain 533.12.1, ditunjukkan dengan keberadaan kedua spesies tersebut pada cabang yang sama. Hal tersebut selaras dengan literatur oleh (Masruroh et al., 2018) bahwa pada pohon filogeni masing-masing spesies yang memiliki tingkat kekerabatan paling dekat dikelompokkan pada cabang yang sama. Berbeda dari hasil pada tahap penelusuran sebelumnya yang dilihat berdasarkan persentase identitas (gambar 5.13), berdasarkan pengamatan pohon filogeni isolat y6 memiliki kekerabatan lebih dekat dengan spesies *P. pyrinus* strain 533.12.1 daripada *P. pyrinus* strain DSM12410T. Hal ini dapat dipengaruhi oleh karena perbedaan pasangan basa yang dimiliki antar spesies. Menurut literatur oleh Triesita et al. (2018) bahwa semakin rendah perbedaan basa nukleotida dari tiap spesies maka akan menunjukkan hubungan kekerabatan yang semakin dekat antar spesies tersebut. Diketahui bahwa isolat y6 memiliki panjang urutan basa DNA sebesar 1403 bp, yang mana memiliki perbedaan basa nukleotida lebih sedikit dengan *P. pyrinus* strain 533.12.1 (1384 bp) daripada dengan *P. pyrinus* strain DSM12410T (1535 bp).

Pluralibacter pyrinus pada mulanya merupakan *Enterobacter pyrinus* yang diisolasi dari lesi bercak coklat pada daun pohon pir. Bakteri ini merupakan bakteri berbentuk batang, bersifat fakultatif anaerobic, gram negatif dan motil. Bakteri ini memiliki kekerabatan dengan spesies dari famili *Enterobacteriaceae* lain seperti *Enterobacter gergoviae* dan *Enterobacter agglomerans* (Chung et al., 1993). Brady et al. (2013) dalam literturnya menyatakan bahwa *Pluralibacter pyrinus* merupakan suatu spesies bakteri yang tergolong dalam famili *Enterobacteriaceae*. *Pluralibacter pyrinus* oleh Brady ditulis sebagai *Pluralibacter pyrinus* comb. nov. Comb. nov. (*combination nova*) merupakan nama baru berdasarkan nama sah yang diterbitkan sebelumnya, yang merupakan nama dasarnya. Hal tersebut dapat diartikan dengan suatu spesies telah dipindahkan dari satu genus ke genus lainnya.



Gambar 5.11 Pohon filogenetik kekerabatan isolat bakteri k4

Isolat k4 memiliki kemiripan nilai persentase identitas sebesar 100% pada DNA target penelusuran di *genbank* NCBI. Persentase kemiripan 100% tersebut mengarah berbagai macam spesies dengan strain yang bervariasi dari genus *Staphylococcus*, yang pada urutan pertama mengarah kepada spesies *Staphylococcus saprophyticus* strain UTI-045. *Staphylococcus saprophyticus* merupakan *Staphylococcus* koagulase-negatif, gram-positif dan merupakan

uropatogen utama infeksi saluran kemih (ISK) tanpa komplikasi. *Staphylococcus saprophyticus* merupakan spesies bakteri yang umum dikenal sebagai salah satu penyebab infeksi saluran kemih (Fauziah et al., 2022), walau begitu *S. saprophyticus* memiliki virulensi yang lebih rendah atau potensi patogen yang lebih rendah dibandingkan *S. aureus* (Hur et al., 2016; Michels et al., 2021).

Hasil identifikasi secara fenotip pada isolat y6 dari sampel Y apabila diselaraskan dengan hasil identifikasi genotip filogeninya didapatkan karakteristik bakteri sedikit kurang selaras. Ada kesamaan ciri pada sifatnya yang berkatalase positif, oksidase negatif, bersifat non endospora, dan bersifat fermentatif, namun berbeda pada ciri lainnya, seperti bakteri yang terdeteksi (*Pluralibacter pyrinus* dan *Enterobacter hormaechei*) adalah bakteri gram negatif dan bersifat motil (Hoffmann et al., 2005; S. Kumar et al., 2023). Sedangkan hasil identifikasi secara fenotip pada isolat k4 dari sampel K apabila diselaraskan dengan hasil identifikasi genotip filogeninya didapatkan karakteristik bakteri ada kesamaan ciri pada bakteri berupa bakteri gram positif, berkatalase positif dan tidak membentuk endospora. Adapun karakteristik yang berbeda adalah bakteri berbentuk kokus atau bulat, selain itu dari bakteri hasil genotip filogeni yang didapatkan (*Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus edaphicus*, dan *Staphylococcus arlettae*) menunjukkan karakteristik bakteri berupa koagulase negatif kokus atau *coagulase-negative staphylococcus* (CNS) (Fauziah et al., 2022; Han et al., 2023; Pantůček et al., 2018). Berdasarkan literatur oleh Firdausy et al. (2023) bakteri stafilocokus koagulase negatif atau CNS memiliki peran dalam hal fermentasi. Dikutip dari penelitian sebelumnya *Staphylococcus sp.* dapat diisolasi dari makanan olahan dan

bermanfaat dalam proses pembuatan daging fermentasi juga berbagai produk susu (Soares et al., 2011). Meskipun penggunaan bakteri yang bersifat CNS dalam produk fermentasi dapat dianggap menguntungkan, aspek keamanannya masih perlu diselidiki lebih lanjut, karena menurut literatur oleh Lawal et al. (2021) *S. saprophyticus* merupakan bagian dari flora usus dan dubur ternak, termasuk sapi, dan sering menjadi kontaminan pada daging dan produk makanan fermentasi.

Hasil identifikasi bakteri berupa pengetahuan keilmuan yang diperoleh tidak hanya bermanfaat untuk sekelompok kecil, tetapi juga untuk masyarakat secara keseluruhan. Penerapan nilai-nilai juga dapat menciptakan dampak positif dalam masyarakat ataupun lingkungan. Fakultas Kedokteran dan Ilmu-Ilmu Kesehatan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang diketahui memiliki misi “*mengembangkan kesehatan haji sebagai keunggulan fakultas dalam tridharma perguruan tinggi*”. Berdasarkan hal tersebut, hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi referensi tambahan bagi ilmu pengetahuan yang menyangkut bidang kesehatan, termasuk di dalamnya kesehatan haji. Ibadah haji merupakan ibadah yang memerlukan kekuatan fisik dan mental yang sehat sehingga diperlukan asupan yang dapat menambah energi dalam menjalankan semua rukun dalam ibadah haji (Rani, 2023). Pengetahuan jamaah haji dalam menjaga pola hidup sehat meliputi di dalamnya tentang pentingnya mengkonsumsi makanan dan minuman bergizi sangat diperlukan demi menunjang kebugaran tubuh. Konsumsi produk sehat dan bergizi seperti yoghurt dan/atau kefir yang memiliki potensi sebagai antibakteri termasuk di dalam pola makan dan minum sehat yang mudah untuk dilakukan bagi jamaah haji.

Penelitian ilmiah ini merupakan salah satu bentuk pendalaman ilmu secara akademis dengan cara yang mulia. Suatu ilmu pengetahuan adalah hikmah yang dapat diambil oleh setiap muslim. Maulana & Tarto (2022) dalam literturnya mengatakan bahwa hikmah adalah sebuah pengetahuan atau tata cara untuk dapat melakukan sesuatu yang dapat memberikan manfaat. Berikut merupakan hadits yang diriwayatkan oleh Ibnu Majah terkait hikmah:

حَدَّثَنَا عَبْدُ الرَّحْمَنِ بْنُ عَبْدِ الْوَهَّابِ قَالَ: حَدَّثَنَا عَبْدُ اللَّهِ بْنُ مُنِيرٍ، عَنْ إِبْرَاهِيمَ بْنِ الْفَضْلِ، عَنْ سَعِيدِ الْمَقْبُرِيِّ، عَنْ أَبِي هُرَيْرَةَ، قَالَ: قَالَ رَسُولُ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ: "الْكَلِمَةُ الْحِكْمَةُ ضَالَّةُ الْمُؤْمِنِ، حَيْثُمَا وَجَدَهَا فَهُوَ أَحَقُّ بِهَا"

Artinya: *"Telah menceritakan kepada kami Abdurrahman bin Abdul Wahhab dia berkata: telah menceritakan kepada kami Abdullah bin Numair dari Ibrahim bin Al Fadl dari Sa'id Al Maqburi dari Abu Hurairah dia berkata: Rasulullah shallallahu'alaihi wasallam bersabda: "Kalimat hikmah adalah barang seorang mukmin yang hilang, maka dimana saja ia menemukannya ia lebih berhak untuk mengambilnya."*

Al-Qur'an sebagai sumber ajaran Islam dan Hadits sebagai petunjuk dari Rasulullah SAW memberikan nilai-nilai etika yang mengatur setiap aspek kehidupan. Dikutip dari literatur oleh Romlah & Rusdi (2023) bahwa Islam merupakan pilar bagi kehidupan. Islam mendorong kolaborasi dan berbagi pengetahuan untuk kebaikan bersama. Integrasi dan sinergi pada penelitian yang meliputi kolaborasi antar peneliti, lembaga penelitian, dan negara dapat diterapkan untuk meningkatkan pemahaman tentang mikroorganisme. Diharapkan dengan

memahami dan menerapkan nilai-nilai keislaman, penelitian terkait identifikasi bakteri ini dapat menjadi lebih bermakna dan bermanfaat secara etis sesuai dengan ajaran Islam yang selamat dan menyelamatkan.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Isolat bakteri asam laktat pada sampel yoghurt dan sampel kefir memiliki aktivitas antimikroba terhadap *E. coli*, yang ditunjukkan dengan zona hambat terbesar pada isolat y6 ($9,47 \pm 0,16$ mm) dan isolat k4 ($8,12 \pm 0,08$ mm). Hasil berdasarkan analisis SPSS *post hoc* uji *Mann Whitney* menunjukkan nilai signifikan pada y6 sebesar 0,05 dan pada k4 0,046; yang mana hal tersebut mengartikan terdapat aktivitas antimikroba dari isolat y6 maupun k4 terhadap bakteri *E. coli*.
2. Karakteristik fenotip bakteri asam laktat yang didapatkan dari kedua sampel adalah bakteri berbentuk batang, tergolong ke dalam gram positif, bersifat non motil, non endospora, katalase positif, dapat memfermentasi karbohidrat, dan oksidase negatif.
3. Hasil dari pengujian secara genotip isolat y6 dari sampel yoghurt (Y) memiliki kekerabatan terdekat secara filogeni dengan *Pluralibacter pyrinus* strain 533.12.1 (99,71%); sedangkan isolat k4 dari sampel kefir (K) teridentifikasi sebagai *Staphylococcus saprophyticus* strain UTI-045 (100%).

6.2 Saran

1. Perlu kajian lebih lanjut mengenai metabolit apa saja yang berperan dalam aktivitas antimikroba pada bakteri

2. Kedisiplinan kerja perlu ditingkatkan saat melakukan proses perlakuan atau pengerjaan penelitian serta penulisan

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, N., Aris, M., Irfan, M., Tahir, I., & Baksir, A. (2018). Kajian Filogenetik Ikan Tuna (*Thunnus Spp*) Sebagai Data Pengelolaan Di Perairan Sekitar Kepulauan Maluku, Indonesia. *Jurnal Kelautan: Indonesian Journal Of Marine Science And Technology*, 11(2), 120. <https://doi.org/10.21107/Jk.V11i2.3459>
- Akihary, C. V., & Kolondam, B. J. (2020). Pemanfaatan Gen 16s Rrna Sebagai Perangkat Identifikasi Bakteri Untuk Penelitian-Penelitian Di Indonesia. *PHARMACON*, 9(1), 16–22.
- Algarni, A. A. (2022). Combining Of Molecular 16S Rrna Gene And Metabolic Fingerprinting Through Biolog System For The Identification Of Streptomyces In Saudi Arabia. *Journal Of King Saud University - Science*, 34(3), 101889. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101889>
- Al-Mahalli, J., & As-Suyuthi, J. (2021). *Tafsir Al-Jalalain*. AQWAM.
- Amrulloh, M. K., Addy, H. S., & Wahyuni, W. S. (2021a). *Karakterisasi Fisiologis Dan Biokimia Penyebab Penyakit Bakteri Pembuluh Kayu Pada Tanaman Cengkeh (Syzygium Aromaticum L.) Di PT Tirta Harapan*.
- Amrulloh, M. K., Addy, H. S., & Wahyuni, W. S. (2021b). *Karakterisasi Fisiologis Dan Biokimia Penyebab Penyakit Bakteri Pembuluh Kayu Pada Tanaman Cengkeh (Syzygium Aromaticum L.) Di PT Tirta Harapan. Jurnal Proteksi Tanaman Tropis*, 2(1), 1–7.
- Anafarida, O. & Badruzsaufari. (2020). Analisis Filogenetik Mangga (*Mangifera Spp.*) Berdasarkan Gen 5,8S Rrna. *ZIRAA'AH*, 45(2).
- Apriyanti, D. P. R. V., Laksmi W, A. S., & Widayanti, N. P. (2022). Identifikasi Bakteri Kontaminan Pada Gelang Tri Datu. *BIOMA : JURNAL BIOLOGI MAKASSAR*, 7(2).
- Arfiandi, A., & Tumbol, R. A. (2020). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Patogen Pada Ikan Nila (*Oreochromis Niloticus*) Yang Dibudidayakan Di Kecamatan Dimembe Kabupaten Minahasa Utara Tahun 2019. *E-Journal BUDIDAYA PERAIRAN*, 8(1). <https://doi.org/10.35800/Bdp.8.1.2020.27229>
- Aviany, H. B., & Pujiyanto, S. (2020). Analisis Efektivitas Probiotik Di Dalam Produk Kecantikan Sebagai Antibakteri Terhadap Bakteri *Staphylococcus Epidermidis*. *Berkala Bioteknologi*, 3(2).
- BADAN STANDARISASI NASIONAL. (2011). Susu Segar Bagian 1. In *Susu Segar*. Badan Standarisasi Nasional.
- Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Coutinho, T., & De Vos, P. (2013). Taxonomic Evaluation Of The Genus *Enterobacter* Based On Multilocus Sequence Analysis (MLSA): Proposal To Reclassify *E. Nimipressuralis* And *E. Amnigenus* Into *Lelliottia* Gen. Nov. As *Lelliottia Nimipressuralis* Comb. Nov. And *Lelliottia Amnigena* Comb. Nov., Respectively, *E. Gergoviae* And *E. Pyrinus* Into *Pluralibacter* Gen. Nov. As *Pluralibacter Gergoviae* Comb. Nov. And *Pluralibacter Pyrinus* Comb. Nov., Respectively, *E. Cowanii*, *E. Radicincitans*, *E. Oryzae* And *E. Arachidis* Into *Kosakonia* Gen. Nov. As *Kosakonia Cowanii* Comb. Nov., *Kosakonia Radicincitans* Comb. Nov., *Kosakonia Oryzae* Comb. Nov. And *Kosakonia*

- Arachidis Comb. Nov., Respectively, And E. Turicensis, E. Helveticus And E. Pulveris Into Cronobacter As Cronobacter Zurichensis Nom. Nov., Cronobacter Helveticus Comb. Nov. And Cronobacter Pulveris Comb. Nov., Respectively, And Emended Description Of The Genera Enterobacter And Cronobacter. *Systematic And Applied Microbiology*, 36(5), 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.03.005>
- Braz, V. S., Melchior, K., & Moreira, C. G. (2020). Escherichia Coli As A Multifaceted Pathogenic And Versatile Bacterium. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, 10, 548492. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.548492>
- Chung, Y. R., Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G., Kim, B. S., Kim, H. T., & Cho, K. Y. (1993). Enterobacter Pyrinus Sp. Nov., An Organism Associated With Brown Leaf Spot Disease Of Pear Trees. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, 43(1), 157–161. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-1-157>
- Church, D. L., Cerutti, L., Gürtler, A., Griener, T., Zelazny, A., & Emler, S. (2020). Performance And Application Of 16S Rna Gene Cycle Sequencing For Routine Identification Of Bacteria In The Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(4), E00053-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00053-19>
- Dahlan, M. S. (2014). *Statistik Untuk Kedokteran Dan Kesehatan: Deskriptif, Bivariat, Dan Multivariat* (6th Ed.). Epidemiologi Indonesia.
- Dewanata, P. A., & Mushlih, M. (2021). Differences In DNA Purity Test Using UV-Vis Spectrophotometer And Nanodrop Spectrophotometer In Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Indonesian Journal Of Innovation Studies*, 15. <https://doi.org/10.21070/Ijins.V15i.553>
- Emilia, Harnelly, E., & Anhar, A. (2021). *Optimalisasi Metode Ekstraksi Dna Daun, Kulit*. 6.
- Fadilah, W., . R., & Mayasari, U. (2022). Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Heterotrofik Pada Kawasan Perairan Pantai Indah Kalangan, Tapanuli Tengah. *Metamorfosa: Journal Of Biological Sciences*, 9(2), 306. <https://doi.org/10.24843/Metamorfosa.2022.V09.I02.P10>
- Falakh, M. F., & Asri, M. T. (2022). Uji Potensi Isolat Bakteri Asam Laktat Dari Nira Siwalan (Borassus Flabellifer L.) Sebagai Antimikroba Terhadap Salmonella Typhi. *Lentera Bio*, 11(3).
- Fauziah, P. N., Latifah, I., Masdianto, M., Pitaloka, D., & Wahdi, F. H. (2022). Efek Antibakteri Infusum Bunga Rosella Terhadap Staphylococcus Saprophyticus Penyebab Infeksi Saluran Kemih. *Anakes : Jurnal Ilmiah Analisis Kesehatan*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.37012/Anakes.V8i1.868>
- Fietri, W. A., Razak, A., & Ahda, Y. (2021). Analisis Filogenetik Ikan Tuna (Thunnus Spp) Di Perairan Maluku Utara Menggunakan Coi (Cytocrome Oxydase I). 6.
- Finanda, A. (2021). Isolasi Dan Karakterisasi Genus Bakteri Asam Laktat Dari Fermentasi Daging Buah. *Protobiont*, 10(2).

- Firdausy, A. F., Walidah, Z., Mufidah, K., Rahmadhany, A. N., Ningrum, N. D., & Adila, A. (2023). Antimicrobial Activity Of Metabolites Produced By Novel Coagulase-Negative Staphylococci (Cns) Isolated From Fermented Dairy Products In Malang, Indonesia. *Journal Of Microbiology, Biotechnology And Food Sciences*, E9200. <https://doi.org/10.55251/Jmbfs.9200>
- Fitriana. (2019). Preservasi Bakteri *Corynebacterium Striatum* Menggunakan Silika Gel. *PROS SEM NAS MASY BIODIV INDON*, 5(1), 134–138. <https://doi.org/10.13057/Psnmbi/M050125>
- Fitrianarni, D., & Ibrahim, M. (2014). Aktivitas Antibakteri Yoghurt Susu Sapi Dan Yoghurt Susu Kedelai Terhadap *Shigella Dysenteriae* Secara In Vitro. *Lentera Bio*, 3(1).
- Fitriyana, N. I., Suwasono, S., & Kusnadi, J. (2016). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Indigenous Dari Fermentasi Alami Biji Kakao Sebagai Kandidat Agen Antikapang. *AGROINTEK*, 9(1), 33. <https://doi.org/10.21107/Agrointek.V9i1.2122>
- Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., & Olsen, G. J. (2008). Critical Evaluation Of Two Primers Commonly Used For Amplification Of Bacterial 16S Rna Genes. *Applied And Environmental Microbiology*, 74(8), 2461–2470. <https://doi.org/10.1128/AEM.02272-07>
- Gaffar, S., Sumarlin, S., Haryono, M. G., & Pidar, H. (2021). Penentuan Jenis Dan Status Konservasi Pari Layang-Layang Yang Didaratkan Di TPI Gunung Lingkas Kota Tarakan Dengan Pendekatan Molekuler. *Biotropika: Journal Of Tropical Biology*, 9(1), 80–87. <https://doi.org/10.21776/Ub.Biotropika.2021.009.01.09>
- Gao, X., & Li, B. (2016). Chemical And Microbiological Characteristics Of Kefir Grains And Their Fermented Dairy Products: A Review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1). <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1272152>
- Gopinath, S. C. B., & Lakshmi Priya, T. (2019). *Nanobiosensors For Biomolecular Targeting*. Elsevier Science.
- Hamidah, M. N., Rianingsih, L., & Romadhon, R. (2019). Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat Dari Peda Dengan Jenis Ikan Berbeda Terhadap *E. Coli* DAN *S. Aureus*. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Perikanan*, 1(2), 11–21. <https://doi.org/10.14710/Jitpi.2019.6742>
- Han, G., Zhang, J., Luo, Z., Lu, B., Zhang, P., Yong, K., Wang, Y., Luo, Y., Yang, Z., Ren, M., Cao, S., & Yao, X. (2023). Characteristics Of A Novel Temperate Bacteriophage Against *Staphylococcus Arlettae* (Vb_Sars_BM31). *International Microbiology: The Official Journal Of The Spanish Society For Microbiology*, 26(2), 327–341. <https://doi.org/10.1007/S10123-022-00292-3>
- Hartatik, T. (2021). *Dasar Analisis Genetik Pada Kambing Dan Domba*. Gadjah Mada University Press.
- Hoffmann, H., Stindl, S., Ludwig, W., Stumpf, A., Mehlen, A., Monget, D., Pierard, D., Ziesing, S., Heesemann, J., Roggenkamp, A., & Schleifer, K. H. (2005). *Enterobacter Hormaechei* Subsp. *Oharae* Subsp. Nov., *E. Hormaechei* Subsp. *Hormaechei* Comb. Nov., And *E. Hormaechei* Subsp. *Steigerwaltii*

- Subsp. Nov., Three New Subspecies Of Clinical Importance. *Journal Of Clinical Microbiology*, 43(7), 3297–3303. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3297-3303.2005>
- Holderman, M. V., De Queljoe, E., & Rondonuwu, S. B. (2017). Identifikasi Bakteri Pada Pegangan Eskalator Di Salah Satu Pusat Perbelanjaan Di Kota Manado. *JURNAL ILMIAH SAINS*, 17(1), 13. <https://doi.org/10.35799/Jis.17.1.2017.14901>
- Hur, J., Lee, A., Hong, J., Jo, W., Cho, O.-H., Kim, S., & Bae, I.-G. (2016). Staphylococcus Saprophyticus Bacteremia Originating From Urinary Tract Infections: A Case Report And Literature Review. *Infection & Chemotherapy*, 48(2), 136–139. <https://doi.org/10.3947/Ic.2016.48.2.136>
- Hutami, R., Bisyrri, H., Sukarno, Nuraini, H., & Ranasasmita, R. (2018). Ekstraksi DNA Dari Daging Segar Untuk Analisis Dengan Metode Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Jurnal Agroindustri Halal*, 4(2).
- Ingratubun, J. A., Ijong, F. G., & Onibala, H. (2013). Isolation And Identification Of Lactic Acid Bacteria In Bakasang As Fermented Microbe Starter. *AQUATIC SCIENCE & MANAGEMENT*, 48. <https://doi.org/10.35800/Jasm.0.0.2013.2278>
- Irianto, H. E. (2013). *Produk Fermentasi Ikan* (1st Ed.). Penebar Swadaya Grup.
- Jayabarath, J., Joseline, J. J., & Gobika, K. (2015). Isolation & Characterization Of Antibiotic Resistant. *World Journal Of Pharmaceutical Research*, 4(08).
- KEMENKES RI. (2017). *Profil Kesehatan Indonesia* (1st Ed.). Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- KEMENKES RI. (2022). *Profil Kesehatan Indonesia 2021*. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kepel, B., & Fatimawali. (2015). Penentuan Jenis Dengan Analisis Gen 16srna Dan Uji Daya Reduksi Bakteri Resisten Merkuri Yang Diisolasi Dari Feses Pasien Dengan Tambalan Amalgam Merkuri Di Puskesmas Bahu Manado. *JURNAL KEDOKTERAN YARSI*, 23(1), 045–055.
- Khalil, I., & Anwar, N. (2016). *Isolation, Identification And Characterization Of Lactic Acid Bacteria From Milk And Yoghurts*. 4(3), 11.
- Kosasi, C., Lolo, W. A., & Sedewi, S. (2019). Berasosiasi Dengan Alga Turbinaria Ornata (Turner) J. Agardh Serta. *PHARMACON*, 8(2).
- Kristiandi, K., Lusiana, S. A., Ayunin, N. A. Q., Ramdhini, R. N., Marzuki, I., Rezeki, S., Erdiandini, I., Yuniarto, A. E., Lestari, S. D., Ifadah, R. A., Kushargina, R., Yuniarti, T., & Pasanda, O. S. (2021). *Teknologi Fermentasi*. Yayasan Kita Menulis.
- Kumar, A., Kumar, A., Thakur, P., Patil, S., Payal, C., Kumar, A., & Sharma, P. (2012). Antibacterial Activity Of Green Tea (Camellia Sinensis) Extracts Against Various Bacteria Isolated From Environmental Sources. *Recent Research In Science And Technology*, 4.
- Kumar, S., Agyeman-Duah, E., & Ujor, V. C. (2023). Whole-Genome Sequence And Fermentation Characteristics Of Enterobacter Hormaechei UW0SKVC1: A Promising Candidate For Detoxification Of Lignocellulosic Biomass Hydrolysates And Production Of Value-Added

- Chemicals. *Bioengineering*, 10(9), 1090.
<https://doi.org/10.3390/Bioengineering10091090>
- Kusnadi, J., & Laras Arumingtyas, E. (2020). *Polymerase Chain Reaction (PCR) Teknik Dan Fungsi*. Universitas Brawijaya Press.
- Lawal, O. U., Fraqueza, M. J., Bouchami, O., Worning, P., Bartels, M. D., Gonçalves, M. L., Paixão, P., Gonçalves, E., Toscano, C., Empel, J., Urbaś, M., Domínguez, M. A., Westh, H., De Lencastre, H., & Miragaia, M. (2021). Foodborne Origin And Local And Global Spread Of *Staphylococcus Saprophyticus* Causing Human Urinary Tract Infections. *Emerging Infectious Diseases*, 27(3), 880–893.
<https://doi.org/10.3201/Eid2703.200852>
- Lindawati, S. A., & Suardana, I. W. (2017). Isolasi Dan Identifikasi Spesies Bakteri Asam Laktat Penghasil Senyawa Antimikrob Asal Kolon Sapi Bali (Isolation And Identification Of Lactic Acid Bacteria Species Producing Anti-Microbial Substance Isolated From Colon Of Bali Cattle). *Jurnal Veteriner*, 17(4), Article 4.
- Lubis, K. (2014). *Cara Pembuatan Pohon Filogeni*. 20.
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection For Downstream Applications Based On DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation And Biobanking*, 14(4), 264–270.
<https://doi.org/10.1089/Bio.2015.0064>
- Manjana, A., Banjana, A., Arijitmajumdar, D., & Nikhil Tudu, J. (2016). Selection Of Storage Methods For Maintenance Of Different Stock Cultures. *International Journal Of Current Microbiology And Applied Sciences*, 5(10), 1097–1104. <https://doi.org/10.20546/Ijcmas.2016.510.115>
- Mantzourani, I., Chondrou, P., Bontsidis, C., Karolidou, K., Terpou, A., Alexopoulos, A., Bezirtzoglou, E., Galanis, A., & Plessas, S. (2019). Assessment Of The Probiotic Potential Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Kefir Grains: Evaluation Of Adhesion And Antiproliferative Properties In In Vitro Experimental Systems. *Annals Of Microbiology*, 69(7), 751–763. <https://doi.org/10.1007/S13213-019-01467-6>
- Marsitin, R., & Sesanti, N. R. (2022). Pelatihan Analisis Data Menggunakan Aplikasi Statistik SPSS. *SOROT : Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat*, 1(2), 25–28. <https://doi.org/10.32699/Sorot.V1i2.3004>
- Masruroh, I. H., Triesita, N. I. P., Sulistiono, & Santoso, A. M. (2018). Hubungan Kekerabatan Bambu Berdasarkan Gen Rbcl Berbasis Analisis In Silico Sebagai Bukti Adanya Evolusi Molekuler. *Prosiding Seminar Nasional VI Hayati*.
- Mastuti, I., Setiadi, A., Roza, D., & Mahardika, K. (2020). Identifikasi Bakteri Pada Larva Ikan Tuna Sirip Kuning (*Thunnus Albacares*). *JFMR (Journal Of Fisheries And Marine Research)*, 4(1), Article 1.
<https://doi.org/10.21776/Ub.Jfmr.2020.004.01.1>
- Maulana, T. & Tarto. (2022). Ilmu Hikmah: Dari Dogma Ke Paradigma (Interpretasi Ma'na-Cum-Maghza, Q.S. Al-Baqarah: 129). *MAGHZA*:

- Jurnal Ilmu Al-Qur'an Dan Tafsir*, 7(2), 156–172.
<https://doi.org/10.24090/Maghza.V7i2.7313>
- Michels, R., Last, K., Becker, S. L., & Papan, C. (2021). Update On Coagulase-Negative Staphylococci—What The Clinician Should Know. *Microorganisms*, 9(4), Article 4.
<https://doi.org/10.3390/Microorganisms9040830>
- Mishra, P., Pandey, C. M., Singh, U., Gupta, A., Sahu, C., & Keshri, A. (2019). Descriptive Statistics And Normality Tests For Statistical Data. *Annals Of Cardiac Anaesthesia*, 22(1), 67–72.
https://doi.org/10.4103/Aca.ACA_157_18
- Murugalatha, N., Growther, L., Hena, J. V., Shenpagam, N. H., Anitha, R., Devi, D. K., & Rajalakshmi, G. (2012). *MICROBIOLOGICAL TECHNIQUES*. MJP Publisher.
- Noer, S. (2021). Identifikasi Bakteri Secara Molekular Menggunakan 16S Rrna. *Edubiologia: Biological Science And Education Journal*, 1(1), 1.
<https://doi.org/10.30998/Edubiologia.V1i1.8596>
- Novita, W. (2016). Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Sirih (Piper Betle L) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Streptococcus Mutans Secara In Vitro. *JMJ*, 4(2), 16.
- Nurin, L. A., Amalia, R., Arisna, T. S. W., Sulistyanto, W. N., & Trimulyono, G. (2017). Involved In The Fermentation Of Tumpi Jagung (Corn Waste). *Sains Dan Matematika*, 6(1).
- Panjaitan, F. J., Bachtar, T., Arsyad, I., & Lele, O. K. (2020). Karakterisasi Mikroskopis Dan Uji Biokimia Bakteri Pelarut Fosfat (Bpf) Dari Rhizosfer Tanaman Jagung Fase Vegetatif. *CIWAL (Jurnal Ilmu Pertanian Dan Lingkungan)*, 1(1).
- Pantůček, R., Sedláček, I., Indráková, A., Vrbovská, V., Mašlaňová, I., Kovařovic, V., Švec, P., Králová, S., Křištofová, L., Kekláková, J., Petráš, P., & Doškař, J. (2018). Staphylococcus Edaphicus Sp. Nov., Isolated In Antarctica, Harbors The Mecc Gene And Genomic Islands With A Suspected Role In Adaptation To Extreme Environments. *Applied And Environmental Microbiology*, 84(2), E01746-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01746-17>
- Pato, U., Yusmarini, Y., Fitriani, S., Jonnaidi, N. N., Wahyuni, M. S., Feruni, J. A., & Jaswir, I. (2021). Antimicrobial Activity Of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated From Dadih Against Escherichia Coli. *IOP Conference Series: Earth And Environmental Science*, 709(1), 012019.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/709/1/012019>
- Pattipeilohy, A. J., Umarb, C. B. P., & Pattilouw, M. T. (2022). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Tapak Dara (Catharantus Roseus) Di Desa Lisabata Terhadap Pertumbuhan Bakteri S T Ap H Yl O C Oc C U S A U R Eu S Dengan Menggunakan Metode Difusi Agar. *JURNAL JRIK*, 2(1).
- Pattuju, S. M., Fatimawali, & Manampiring, A. (2014). Identifikasi Bakteri Resisten Merkuri Pada Urine, Feses Dan Kalkulus Gigi Pada Individu Di Kecamatan Malalayang, Manado, Sulawesi Utara. *Ebiomedik*, 2(2), Article 2. <https://doi.org/10.35790/Ebm.V2i2.5108>

- Peacock, T., & Hassan, H. M. (2021). Role Of The Mn-Catalase In Aerobic Growth Of *Lactobacillus Plantarum* ATCC 14431. *Applied Microbiology*, 1(3), 615–625. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol1030040>
- Popović, N., Brdarić, E., Đokić, J., Dinić, M., Veljović, K., Golić, N., & Terzić-Vidojević, A. (2020). Yogurt Produced By Novel Natural Starter Cultures Improves Gut Epithelial Barrier In Vitro. *Microorganisms*, 8(10), 1586. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101586>
- Pratiwi, E., & Widodo, L. I. (2020). Kuantifikasi Hasil Ekstraksi Gen Sebagai Faktor Kritis Untuk Keberhasilan Pemeriksaan Rt PCR. *Indonesian Journal For Health Sciences*, 4(1), 1. <https://doi.org/10.24269/Ijhs.V4i1.2293>
- Pratiwi, S. U. T. (2008). *Mikrobiologi Farmasi*. Penerbit Erlangga.
- Putri, A. A. (2018). Isolasi Bakteri Asam Laktat Genus *Lactobacillus* Dari Feses Rusa Sambar (*Cervus Uicolor*). *JIMVET*, 2(1), 7.
- Putri, V. A. D., Posangi, J., Nangoy, E., & Bara, R. A. (2016). Uji Daya Hambat Jamur Endofit Rimpang Lengkuas (*Alpinia Galanga* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia Coli* Dan *Staphylococcus Aureus*. *Jurnal E-Biomedik*, 4(2). <https://doi.org/10.35790/Ebm.4.2.2016.14665>
- Rahayu, H. M., & Setiadi, A. E. (2023). Isolation And Characterization Of Indigenous Lactic Acid Bacteria From Pakatikng Rape, Dayak's Traditional Fermented Food. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*, 9(2), 920–925. <https://doi.org/10.29303/Jppipa.V9i2.2801>
- Rani, H. A. (2023). Determinan Faktor Yang Berhubungan Dengan Penyakit Tidak Menular Pada Jemaah Haji Provinsi Aceh. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*, 2(1).
- Raras, T. Y. M., Firdausy, A. F., Kinanti, I. R., & Noorhamdani, N. (2019). Anti-Biofilm Activity Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Kefir Against Multidrug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae*. *Journal Of Pure And Applied Microbiology*, 13(2), 983–992. <https://dx.doi.org/10.22207/JPAM.13>
- Reimena, R., Erina, E., Darniati, D., Fakhurrazi, F., Darmawi, D., & Budiman, H. (2017). 10. Isolation And Identification Of Lactic Acid Bacteria Genus *Pediococcus* From Sumatran Orangutan (*Pongo Abellii*) Faeces At Kandi Zoo And Kinantan Zoo West Sumatera. *Jurnal Medika Veterinaria*, 11(1), 59–65. <https://doi.org/10.21157/J.Med.Vet.V11i1.3524>
- Rinanda, T. (2011). Analisis Sekuensing 16S Rrna Di Bidang Mikrobiologi. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*, 11, 172–177.
- Rizki, S. A., Latief, M., & Rahman, H. (2021). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak N-Heksan, Etil Asetat, Dan Etanol Daun Durian (*Durio Zibethinus* Linn.) Terhadap Bakteri *Propionibacterium Acnes* Dan *Staphylococcus Epidermidis*.
- Rohimah, S., Mukarramah, L., Sindiya, V., & Yuliana, A. V. (2018). Eksplorasi Jenis Dan Potensi Dna Barkode Anggrek *Thrixspermum* Secara In Silico. *Jurnal Biodjati*, 3(2), 50–58.
- Romlah, S., & Rusdi, R. (2023). Pendidikan Agama Islam Sebagai Pilar Pembentukan Moral Dan Etika. *Al-Ibrah: Jurnal Pendidikan Dan Keilmuan Islam*, 8(1), 67–85. <https://doi.org/10.61815/Alibrah.V8i1.249>

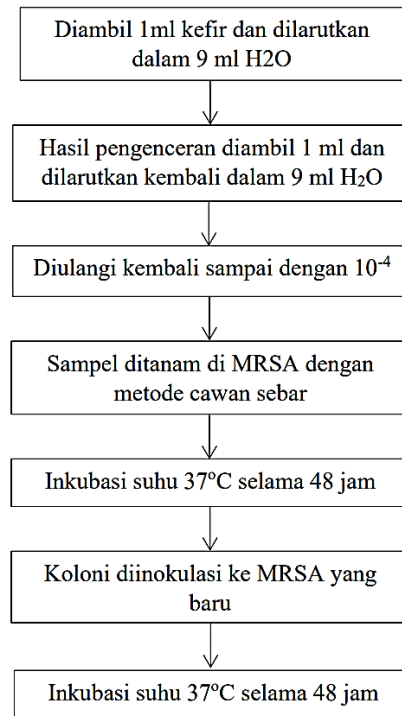
- Rosmania, R., & Yanti, F. (2020). Perhitungan Jumlah Bakteri Di Laboratorium Mikrobiologi Menggunakan Pengembangan Metode Spektrofotometri. *Jurnal Penelitian Sains*, 22(2), Article 2. <https://doi.org/10.56064/jps.v22i2.564>
- Rumbiwati, R., & Trimuratno, J. (2021). Daur Ulang Limbah Gel Agarose Untuk Efisiensi Reagen Elektroforesis. *Indonesian Journal Of Laboratory*, 4(3), 101. <https://doi.org/10.22146/ijl.v4i3.69072>
- Sabbathini, G. C., Pujiyanto, S., Wijanarka, & Lisdiyanti, P. (2017). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Genus Sphingomonas Dari Daun Padi (*Oryza Sativa*) Di Area Persawahan Cibinong. *Jurnal Biologi*, 6(1), 59–64.
- Sanders, E. R. (2012). Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. *Journal Of Visualized Experiments*, 63, 3064. <https://doi.org/10.3791/3064>
- Santri, P., Mulyadi, & Taurina, H. (2018). Angka Dan Pola Bakteri Penyebab Healthcare-Associated Infections (Hais) Pada Udara Di Ruang Intensive Cardiac Care Unit (ICCU) Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Dr. M. Yunus Bengkulu. *Jurnal Kedokteran Raflesia*, 4(1).
- Sasmito, D. E. K., Kurniawan, R., & Muhimmah, I. (2014). *Karakteristik Primer Pada Polymerase Chain Reaction (PCR) Untuk Sekuensing DNA: Mini Review*. 2014.
- Setiarto, R. H. B. (2021). *Bioteknologi Bakteri Asam Laktat Untuk Pengembangan Pangan Fungsional*. Guepedia.
- Setiarto, R. H. B., Widhyastuti, N., & Widhyastuti, N. (2017). Pengaruh Starter Bakteri Asam Laktat Dan Penambahan Tepung Talas Termodifikasi Terhadap Kualitas Yogurt Sinbiotik. *Jurnal Riset Teknologi Industri*, 11(1), 18. <https://doi.org/10.26578/jrti.v11i1.2179>
- Setyawati, R., & Zubaidah, S. (2021). Optimasi Konsentrasi Primer Dan Suhu Annealing Dalam Mendeteksi Gen Leptin Pada Sapi Peranakan Ongole (PO) Menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Indonesian Journal Of Laboratory*, 4(1), 36. <https://doi.org/10.22146/ijl.v4i1.65550>
- Soares, J. C., Marques, M. R., Tavarina, F. K., Pereira, J. O., Malcata, F. X., & Pintado, M. M. (2011). Biodiversity And Characterization Of Staphylococcus Species Isolated From A Small Manufacturing Dairy Plant In Portugal. *International Journal Of Food Microbiology*, 146(2), 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.008>
- Srivastava, S., & Srivastava, P. S. (2013). *Understanding Bacteria*. Springer Science+Business Media Dordrecht.
- Suardana, I. W. (2014). Analysis Of Nucleotide Sequence Of The 16S Rna Gene Of Novel Escherichia Coli Strains Isolated From Feces Of Human And Bali Cattle. *Journal Of Nucleic Acid*.
- Subagiyo, S., Margino, S., & Triyanto, T. (2016). Pengaruh Penambahan Berbagai Jenis Sumber Karbon, Nitrogen Dan Fosfor pada Medium Deman, Rogosa And Sharpe (MRS) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat Terpilih Yang Diisolasi Dari Intestinum Udang Penaeid. *Jurnal Kelautan Tropis*, 18(3), 127. <https://doi.org/10.14710/jkt.v18i3.524>
- Sulmiyati, S., Said, N. S., Fahrodi, D. U., Malaka, R., & Maruddin, F. (2019). The Physicochemical, Microbiology, And Sensory Characteristics Of Kefir

- Goat Milk With Different Levels Of Kefir Grain. *Tropical Animal Science Journal*, 42(2), 152–158. <https://doi.org/10.5398/Tasj.2019.42.2.152>
- Sunaryanto, R., & Marwoto, B. (2013). Isolasi, Identifikasi, Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Dari Dadih Susu Kerbau. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*, 14(3). <https://doi.org/10.29122/jsti.v14i3.931>
- Suyono, Y. (2010). Penentuan Spesies Bakteri Pseudomonas Dan Analisis Phylogenetic Tree Secara Bioinformatika. *BIOPROPAL INDUSTRI*, 01(02).
- Triesita, N. I. P., Masrurroh, I. H., Sulistiono, & Santoso, A. M. (2018). Hubungan Kekerabatan Rana Berdasarkan Gen cyt b Berbasis In Silico sebagai Bukti Adanya Evolusi Molekuler. *Prosiding Seminar Nasional VI Hayati*.
- Tuhuteru, S., Hehanussa, M. L., & Raharjo, S. H. T. (2018). Pertumbuhan Dan Perkembangan Anggrek Dendrobium anosmum Pada Media Kultur In Vitro Dengan Beberapa Konsentrasi Air Kelapa. *Agrologia*, 1(1). <https://doi.org/10.30598/a.v1i1.293>
- Tyas, D. E., Widyorini, N., & Solichin, A. (2018). Perbedaan Jumlah Bakteri Dalam Sedimen Pada Kawasan Bermangrove Dan Tidak Bermangrove Di Perairan Desa Bedono, Demak.
- Vesty, A., Biswas, K., Taylor, M. W., Gear, K., & Douglas, R. G. (2017). Evaluating the Impact of DNA Extraction Method on the Representation of Human Oral Bacterial and Fungal Communities. *PLOS ONE*, 12(1), e0169877. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169877>
- Wahyuningtyas, D. (2017). Pemanfaatan Susu Kedelai Menjadi Produk Minuman Sehat Soyghurt Bagi Warga Dusun Blawong II, Jetis, Kabupaten Bantul. *Jurnal Inovasi Proses*, 2(2), 6.
- Wibisono, F. J. (2015). Potensi Escherichia Coli Sebagai Foodborne Zoonotic Disease. 5.
- Widyadnyana, D. G. A., Sukrama, I. D. M., & Suardana, I. W. (2017). Identifikasi Bakteri Asam Laktat Isolat 9A dari Kolon Sapi Bali sebagai Probiotik melalui Analisis Gen 16S rRNA. *Jurnal Sain Veteriner*, 33(2). <https://doi.org/10.22146/jsv.17923>
- Wiraharja, R. S. (2020). *Peranan Ilmu Kesehatan Masyarakat Dalam Penanggulangan Covid-19* (1st ed.). Penerbit Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya.
- Yang, Y., Song, H., Wang, L., Dong, W., Yang, Z., Yuan, P., Wang, K., & Song, Z. (2017). Antiviral Effects of a Probiotic Metabolic Products against Transmissible Gastroenteritis Coronavirus. *Journal of Probiotics & Health*, 5(3), 6. <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000184>
- Yurnaningsih, D. E., Widyorini, N., & Sabdaningsih, A. (2021). *Molecular Identification Of Denitrifying Bacteria To Evaluate The Sensitivity Of Selective Media*. 17(3).
- Zuraidah, Dessri Wahyuni, & Eka Astuty. (2020). Karakteristik Morfologi dan Uji Aktivitas Bakteri Termofilik dari Kawasan Wisata Ie Seuum (Air Panas). *Jurnal Ilmu Alam dan Lingkungan*, 11(2), 40–47.

LAMPIRAN

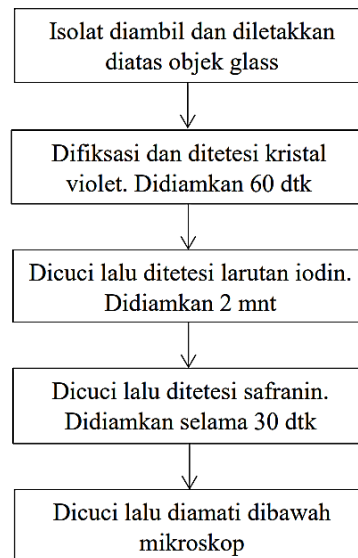
Lampiran 1. Skema Kerja

L.1.1 Isolasi BAL

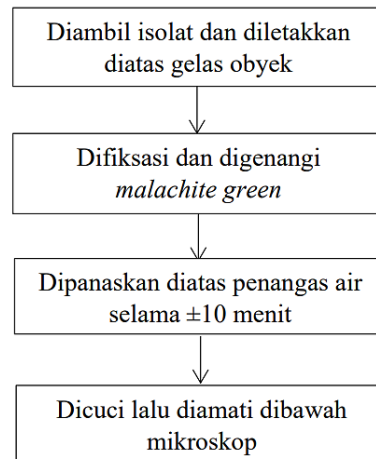


L.1.2 Identifikasi Fenotip Isolat BAL

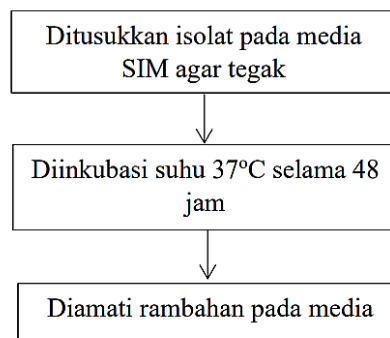
L.1.2.1 Uji Pewarnaan Gram



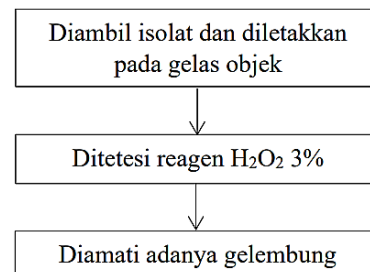
L.1.2.2 Uji Endospora



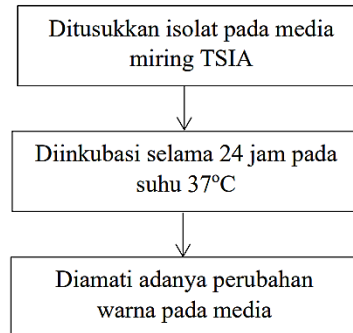
L.1.2.3 Uji Motilitas



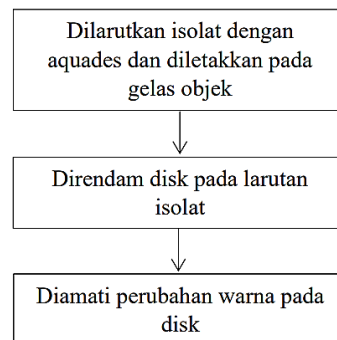
L.1.2.4 Uji Katalase



L.1.2.5 Uji Fermentasi Karbohidrat

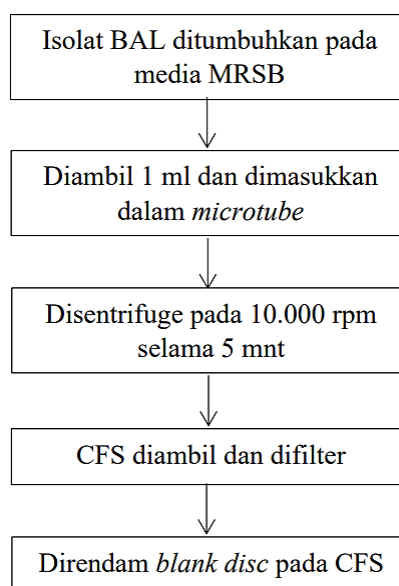


L.1.2.6 Uji Oksidase

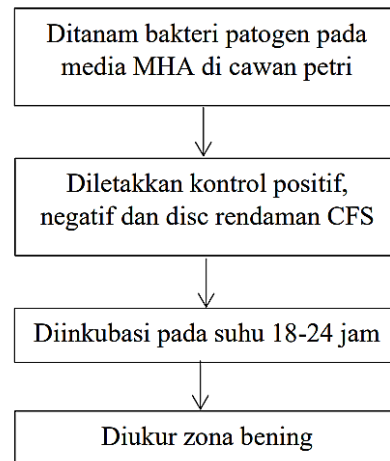


L.1.3 Uji Aktivitas Antibakteri

L.1.3.1 Ekstraksi *Cell Free Supernatant* (CFS)



L.1.3.2 Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap *E. coli*



Lampiran 2. Hasil Uji SPSS

L.2.1 Uji Normalitas *Saphiro-Wilk*

Case Processing Summary							
Kelompok		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
Replikasi	Kontrol Positif Y	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	Kontrol Negatif Y	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	Kontrol Positif K	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	Kontrol Negatif K	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	y1	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	y2	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	y3	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	y4	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	y5	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	y6	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	k1	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	k2	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	k3	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	k4	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	k5	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	k6	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%

Tests of Normality							
Kelompok		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Replikasi	Kontrol Positif Y	.187	3	.	.998	3	.915
	Kontrol Negatif Y	.219	3	.	.987	3	.780
	Kontrol Positif K	.385	3	.	.750	3	.000
	Kontrol Negatif K	.253	3	.	.964	3	.637
	y1	.253	3	.	.964	3	.637
	y2	.385	3	.	.750	3	.000
	y3	.337	3	.	.855	3	.253
	y4	.385	3	.	.750	3	.000
	y5	.253	3	.	.964	3	.637
	y6	.328	3	.	.871	3	.298
	k1	.385	3	.	.750	3	.000
	k2	.219	3	.	.987	3	.780
	k3	.292	3	.	.923	3	.463
	k4	.253	3	.	.964	3	.637
	k5	.314	3	.	.893	3	.363
	k6	.238	3	.	.976	3	.702

a. Lilliefors Significance Correction

L.2.2 Uji Homogenitas *Levene test*

Test of Homogeneity of Variances			
log_replikasi			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.051	15	32	.043

L.2.3 Uji Beda *Kruskal-Wallis*

Test Statistics ^{a,b}	
	Replikasi
Chi-Square	45.587
df	15
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test
b. Grouping Variable:
Kelompok

L.2.4 Uji *Post Hoc* Mann-Whitney

Ranks			
Kelompok		N	Mean Rank
Replikasi	Kontrol Positif Y	3	5.00
	y6	3	2.00
	Total	6	

Test Statistics ^a	
	Replikasi
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok
b. Not corrected for ties.

Sampel y6 dengan kontrol positif Y

Ranks			
Kelompok		N	Mean Rank
Replikasi	Kontrol Positif K	3	5.00
	k4	3	2.00
	Total	6	

Test Statistics ^a	
	Replikasi
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok
b. Not corrected for ties.

Sampel k4 dengan kontrol positif K

Lampiran 3. Hasil Lab genotip PCR



CUSTOMER DETAILS		
Apt. Alif Firman Firdausy, S. Farm., M. Biomed Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang Jl. Kusuma Bangsa Gg Beringin III, rt 002/rw 008, Kel. Tumenggungan, Kec. Lamongan, Kab. Lamongan Telp : 0813-5945-7475 HP : 0813-3671-3332 Email : aliffirman.firdausy@uin-malang.ac.id	Service Order ID	: GMS – 1981
	Type of Service	: Species Barcoding
	Date of Submission	: 18/04/2022
	Date Completed (with deliverables)	: 10/05/2021

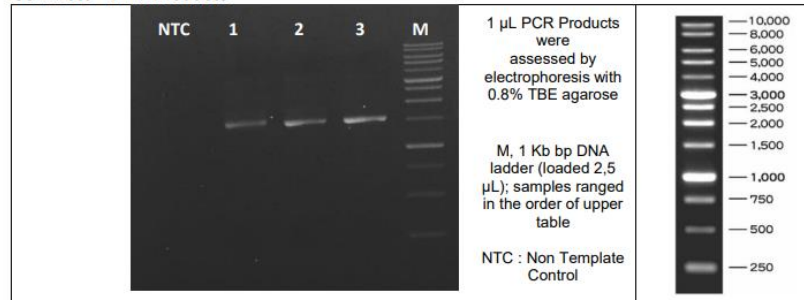
SAMPLE INFORMATION	
Sample Name	: Y.1.2; Y.2.6; K.2.4
PCR Primer	: 16s (27F/1492R)
PCR Products	: Species Barcoding Bacteria (~1400bp)

METHODS
1. Genomic DNA extraction with Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research, D6005) 2. PCR amplification with (2x) My Taq HS Red Mix (Bioline, BIO-25048) 3. Bi-directional Sequencing

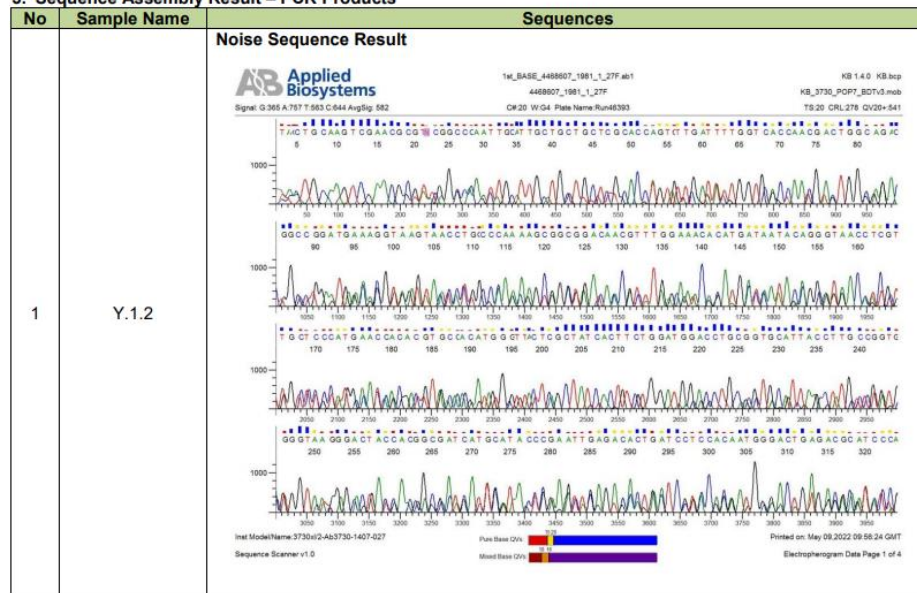
RESULTS					
1. Nucleic Acid (Genomic DNA) Quantification (Nanodrop)					
No	Sample Name	Conc. (ng/μl)	A _{260/280}	A _{260/230}	Volume (μl)
1	Y.1.2	4.7	1.70	0.16	30
2	Y.2.6	13.8	1.93	0.12	30
3	K.2.4	18.5	1.85	0.15	30

PT. GENETIKA SCIENCE INDONESIA
 Rukan Great Wall Blok C 19-21, Green Lake City, Kel. Petir, Kec. Cipondoh,
 Kota Tangerang, Banten, 15147, Indonesia.
 T. 021 5433 2034, 021 5433 2425, 021 5433 2701 | F. 021 5433 2701
info@ptgenetika.com | www.ptgenetika.com

2. Gel Photo – PCR Products



3. Sequence Assembly Result – PCR Products



PT. GENETIKA SCIENCE INDONESIA

Rukan Great Wall Blok C 19-21, Green Lake City, Kel. Petir, Kec. Cipondoh,
Kota Tangerang, Banten, 15147, Indonesia.

T. 021 5433 2034, 021 5433 2425, 021 5433 2701 | F. 021 5433 2701

info@ptgenetika.com | www.ptgenetika.com



No	Sample Name	Sequences
		Note: Terdapat double peak pada sequence Sampel Y.1.2 yang biasanya diakibatkan karena terdapat lebih dari satu template dalam reaksi PCR, hal ini mengakibatkan pembacaan Sanger sequencing menjadi noise. Saran dari Genetika Lab, untuk mendapatkan full sequence 16s dari sampel ini bisa dilakukan pemurnian isolat terlebih dahulu atau dilakukan PCR product cloning untuk selanjutnya disequencing dari plasmid yang mengandung gen insert.
2	Y.2.6	Sequence Assembly 1403bp 1 AGTCGAACGG TAACAGGAAG CAGCTTGCTG CTTGCTGAC GAGTGGCGGA CGGGTGAGTA 61 ATGTCCTGGGA AACTGCCCGA TGGAGGGGGA TAACACTAGG AACCGGTAGC TAATACCGCA 121 TAACGTCGCC AGACCAAGA GGGGACCTT CGGGCCTCTT GCCATCGGAT GTGCCAGAT 181 GGGATTAGCT AGTAGTGGG GTAACGGCTC ACCTAGGCGA CGATCCCTAG CTGGTCTGAG 241 AGGATGACCA GCCACACTGG AACTGAGACA CGGTCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG 301 GGGAAATATT CACAATGGGC GCAAGCCTGA TGCAGCCATG CCCTGTGTAT GAAGAAGGCC 361 TTCGGGTTGT AAAGTACTTT CAGCGGGGAG GAAGGCGATG AGGTTAATAA CCTCGTCGAT 421 TGACGTTACC CGCAGAAGAA GCACCGGCTA ACTCCGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGGA 481 GGGTGCAAGC GTTAATCGGA ATTACTGGGC GTAAAGCGCA CGCAGGCGGT CTGTCAAGTC 541 GGATGTGAAA TCCCGGGGCT CAACCTGGGA ACTGCATTGC AAACCTGGCAG CTTGAGTCT 601 CGTAGAGGGG GGTAGAATTC CAGGTGTAGC GGTGAAATGC GTAGAGATCT GGAGGAATAC 661 CGGTGGCGAA GCGGCGCCCC TGGACGAAGA CTGACGCTCA GGTGCGAAGG CGTGGGGAGC 721 AAACAGGATT AGATACCTGT GTAGTCCACG CCGTAAACGA TGCTACTTGT GAGGCTGTTC 781 CCTTGAGGAG TGGCTTCCGG AGCTAACGCG TTAAGTAGAC CGCTTGGGGA GTACGCGCCG 841 AAGGTTAAAA CTCAAATGAA TTGACGGGGG CCGGCACAA GCGTGGAGCA TGTGGTTTAA 901 TTCGATGCAA CGCAAGAAGC CTTACTACTT CTTGACATCC AGAGAACTTA GCAGAGATGC 961 TTTGGTGCCT TCGGGAACCT TGAGACAGGT GCTGCATGGC TGTCTCAGC TCGTGTGTGT 1021 AAATGTTGGG TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AACCTTATC CTTTGTGTCC AGCGGTTCCG 1081 CCGGGAACCT AAAGGAGACT GCCAGTGACA AACTGGAGGA AGGTGGGGAT GACCTCAAGT 1141 CATCATGGCC CTTACGAGTA GGGGTACACA CGTGCTACAA TGGCGCATAC AAAGAGAAAG 1201 GACCTCGCGA GAGCAAGCGG ACCTCATAAA GTGCGTCGTA GTCCGGATCG GAGCTGCGAA 1261 CTCGACTCCG TGAAGTCGGA ATCGCTAGTA ATCGTGGATC AGAATGCCAC GGTGAATACG 1321 TTCGCGGGCC TTGTACACAC CGCCCGTCAC ACCATGGGAG TGGGTTGCCA AAGAAGTAGG 1381 TAGCTTAACC TTCGGGAGGG CGC
3	K.2.4	Sequence Assembly 1414bp 1 GTCGAGCGAA CAGATAAGGA GCTTGCTCCT TTGACGTTAG CGGCGGACGG GTGAGTAACA 61 CGTGGGTAAC CTACCTATAA GACTGGGATA ACTTCGGGAA ACCGGAGCTA ATACCGGATA 121 ACATTITGGAA CCGCATGTTT CTAAGTGAA AGATGGTTTT GCTATCACTT ATAGATGGAC 181 CCGCGCCGTA TTAGCTAGTT GGTAAAGTAA CGGCTTACCA AGGCGACGAT ACGTAGCCCA 241 CCTGAGAGGG TGATCGGCCA CACTGGAAC TGAACACGGT CCAGACTCCT ACGGGAGGCA 301 GCAGTAGGGA ATCTTCGCGA ATGGGCGAAA GCCTGACGGA GCAACGCGCG GTGAGTGTATG 361 AAGGGTTTCG GCTCGTAAAA CTCTGTTATT AGGGAAGAAC AAACGTGTAA GTAACTGTGC 421 ACGTCTTGAC GGTACCTAAT CAGAAAGCCA CGGCTAACTA CGTGCCAGCA GCCCGGTA 481 TACGTAGGTG GCAAGCGTTA TCCGGAATTA TTGGGCGTAA AGCGCGCGTA GCGGTTTCT 541 TAAGTCTGAT GTGAAAGCCC ACGGCTCAAC CGTGGAGGGT CATTGGAAC TGGGAACTT 601 GAGTGACGAA GAGGAAAGTG GAATTCATG TGTAGCGGTG AAATGCGCAG AGATATGGAG 661 GAACACCAAG GCGGAAGCGC ACTTCTGGT CTGTAACCTG CGTGATGTG CGAAAGCGTG 721 GGGATCAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCGT AAACGATGAG TGCTAAGTGT 781 TAGGGGGTTT CCGCCCTTA GTGCTGCAGC TAACGCATTA AGCACTCCG CTGGGGAGTA 841 CGACCGCAAG GTTGAACTC AAAGGAATTG ACGGGGACCC GCACAGCGG TGGAGCATGT 901 GGTTTAATTC GAAGCAACGC GAAGAACCTT ACCAAATCTT GACATCCTTT GAAACTCTA 961 GAGATAGAGC CTTCCCTTC GGGGACAAA GTGACAGGTG GTGATGTTT GTCTGAGCT 1021 CGTGCTGTA GATGTTGGGT TAAGTCCGCA AACGAGCGCA ACCCTTAAGC TTAGTTGCCA 1081 TCATTAAGTT GGGCACTCTA GGTGACTGCG CGGTGACAAA CCGGAGGAAG GTGGGGATGA 1141 CGTCAAAATCA TCATGCCCTT TATGATTGG GCTACACAG TGCTACAATG GACAAATCAA

PT. GENETIKA SCIENCE INDONESIA

Rukan Great Wall Blok C 19-21, Green Lake City, Kel. Petir, Kec. Cipondoh,
Kota Tangerang, Banten, 15147, Indonesia.

T. 021 5433 2034, 021 5433 2425, 021 5433 2701 | F. 021 5433 2701

info@ptgenetika.com | www.ptgenetika.com



No	Sample Name	Sequences						
1201		AGGGCAGCTA	AACCGCGAGG	TCATGCAAA	CCCATAAAGT	TGTTCTCAGT	TCGGATTGTA	
1261		GTCTGCAACT	CGACTACATG	AAGCTGGAAT	CGTAGATAAT	CGTAGATCAG	CATGCTACGG	
1321		TGAATACGTT	CCCGGGTCTT	GTACACACCG	CCGTCACAC	CACGAGAGTT	TGTAACACCC	
1381		GAAGCCGGTG	GAGTAACCAT	TTATGGAGCT	AGCC			

4. Top 10 Hit BLAST Results Against NCBI Database, Excluding Uncultured Sample Sequences

No	Sample Name	Result Links							
1	Y.1.2	Noise Sequence Result							
2	Y.2.6	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession	
		☒ Phaenobacter putrus strain 168 rRNA gene, hve strain G9012450T	2582	2582	100%	0.0	99.86%	LN875036.1	
		☒ Phaenobacter putrus strain 168 rRNA gene, partial sequence	2582	2582	100%	0.0	99.86%	EF050884.1	
		☒ Enterobacter sp. NAB01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2549	2549	100%	0.0	99.43%	AY395008.1	
		☒ Phaenobacter putrus strain 533.12.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2532	2532	98%	0.0	99.71%	MG858616.1	
		☒ Enterobacter sp. NAB01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2516	2516	100%	0.0	98.94%	AY395007.1	
		☒ Enterobacter homachei strain CPD 4 200 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2508	2508	100%	0.0	98.93%	MN730328.1	
		☒ Enterobacter homachei strain 1541 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2508	2508	100%	0.0	98.93%	MN264583.1	
		☒ Enterobacter homachei strain 1541 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2508	2508	100%	0.0	98.93%	MN264583.1	
		☒ Enterobacter homachei strain 1541 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2508	2508	100%	0.0	98.93%	MN264583.1	
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LN875036.1,EF050884.1,AY395008.1,MG858616.1,AY395007.1,MN730328.1,MN264583.1,MN294583.1,MN258703.1,MG576153.1									
3	K.2.4	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession	
		☒ Stenotrophomonas maltophilia strain 1771-045 chromosome, complete genome	2612	15577	100%	0.0	100.00%	CP054831.1	
		☒ Stenotrophomonas maltophilia strain 1771-045 chromosome, complete genome	2612	2612	100%	0.0	100.00%	MN826552.1	
		☒ Stenotrophomonas maltophilia strain 1771-045 chromosome, complete genome	2612	15610	100%	0.0	100.00%	CP054831.1	
		☒ Stenotrophomonas maltophilia strain 1771-045 chromosome, complete genome	2612	2612	100%	0.0	100.00%	MN826552.1	
		☒ Stenotrophomonas maltophilia strain 1771-045 chromosome, complete genome	2612	2612	100%	0.0	100.00%	MT573756.1	
		☒ Stenotrophomonas maltophilia strain 1771-045 chromosome, complete genome	2612	2612	100%	0.0	100.00%	MT507214.1	
		☒ Stenotrophomonas maltophilia strain 1771-045 chromosome, complete genome	2612	2612	100%	0.0	100.00%	MT386290.1	
		☒ Stenotrophomonas maltophilia strain 1771-045 chromosome, complete genome	2612	2612	100%	0.0	100.00%	MT269536.1	
		☒ Stenotrophomonas maltophilia strain 1771-045 chromosome, complete genome	2612	2612	100%	0.0	100.00%	MN851079.1	
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP054831.1,MN826552.1,CP054438.1,MT573756.1,MT507214.1,MT386290.1,MT269536.1,MN851079.1,MN851078.1,MF457583.1									

Pada kolom result link terdapat enam kolom informasi meliputi:

- 1) **Description (Deskripsi)** merupakan judul informasi yang biasanya terdiri dari genus, spesies, jenis strain, jenis fragmen gen/DNA, dan tipe kelengkapan sekuens DNA yang ditampilkan per informasi tersebut (partial sequence berarti hanya sebagian sekuens DNA dari total gen/fragmen yang sebenarnya, sedangkan full CDS adalah sekuens DNA pengkode gen yang lengkap)
- 2) **Max Score** adalah total nilai yang didapatkan dari pensejajaran antara sekuens masukan (*input sequence/query*) dengan sekuens database. Nilai tersebut didapatkan dari perhitungan matriks, yang merupakan matriks substitusi (*substitution matrix*)
- 3) **Total Score** adalah total nilai yang didapatkan dari **semua** pensejajaran antara sekuens masukan (*input sequence/query*) dengan sekuens database yang sejajar. Nilai ini bisa berbeda dengan **max score** jika terdapat **lebih dari satu** pensejajaran yang terjadi

PT. GENETIKA SCIENCE INDONESIA

Rukan Great Wall Blok C 19-21, Green Lake City, Kel. Petir, Kec. Cipondoh,
Kota Tangerang, Banten, 15147, Indonesia.

T. 021 5433 2034, 021 5433 2425, 021 5433 2701 | F. 021 5433 2701

info@ptgenetika.com | www.ptgenetika.com



- 4) **Query Coverage** adalah persentase yang menggambarkan seberapa besar/panjang kesesuaian sekuens masukan jika dibandingkan dengan sekuens DNA target. Jika sekuens DNA masukan sepanjang/menyelimuti (*covering*) seluruh sekuens DNA target pada database NCBI, maka persentase tersebut adalah 100%.
- 5) **E Value** adalah merupakan nilai pengharapan (*expectation value*) merupakan suatu ukuran yang mana penyejajaran ini terjadi secara kebetulan (*by chance*). E value yang baik adalah mendekati nol. Sehingga tidak ada kemungkinan bahwa kejadian penyejajaran tersebut terjadi secara kebetulan.
- 6) **Percentage Identity** merupakan suatu persentase yang menunjukkan seberapa sesuai antara sekuens DNA masukan dengan sekuens DNA target.
Untuk sampel mikroorganisme jika menggunakan marka 16S rRNA maka dikatakan identikal (similar) pada level spesies jika nilai "percentage identity" nya diatas 97.5%, dan pada level genus jika nilai "percentage identity" nya diatas 95%(Stackebrandt and Goebel, 1994).
 - 1) Description is annotation information about genus, species, strain, gen fragment
 - 2) Max score is the alignment score between query sequence and target sequence in DNA database.
 - 3) Total score is the total score of all alignment which are exist between query and target sequence in DNA database. The total score can be different with max score if the query sequence match to more then one site with the target sequence
 - 4) Query coverage is percentage of length of the query sequence with the target equence. If the query sequence covers all of the target sequence then the query coverage is 100%
 - 5) E value is a number that describes how many times you would expect a match by chance in a database of that size. The lower the Evalue is, the more significant the match
 - 6) Percentage identity shows similarity between query sequence and target sequence. For microorganisms, using 16srRNA primers, similar to species level (above 97.5%), genus level (above 95%)

5. Phylogenetic Tree – Neighbor Joining (Unrooted Tree) by NCBI Blast Tree Method

Please refers to images in result folder.

References:

Stackebrandt, E., Goebel, B.M., 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44, 846–849. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-846>

- END OF REPORT -

PT. GENETIKA SCIENCE INDONESIA

Rukan Great Wall Blok C 19-21, Green Lake City, Kel. Petir, Kec. Cipondoh,
Kota Tangerang, Banten, 15147, Indonesia.

T. 021 5433 2034, 021 5433 2425, 021 5433 2701 | F. 021 5433 2701

info@ptgenetika.com | www.ptgenetika.com

Lampiran 4. Berkas Penelitian

	FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN Kampus 3 FKIK Gedung Ibnu Thufail Lantai 2 Jalan Locari, Tlekung Kota Batu E-mail: kenk.fkik@uin-malang.ac.id - Website : http://www.kepk.fkik.uin-malang.ac.id
KETERANGAN KELAIKAN ETIK (ETHICAL CLEARANCE) No. 050/EC/KEPK-FKIK/2021	

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN(KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG TELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN :

Judul : Metabolite Profiling Cell Free Supernatant Isolat Bakteri Asam Laktat dari Yoghurt di Kabupaten Malang

Sub Judul : Metabolite Profiling Cell Free Supernatant Isolat Bakteri Asam Laktat dari Yoghurt di Kabupaten Malang

Peneliti :
 - apt. Alif Firman Firdausy, S.Farm., M.Biomed.
 - Nofita Diyah Ningrum
 - Afnan Adila
 - Azizah Nurul Rahmadhany
 - Kurnia Mufidah

Unit / Lembaga : Program Studi Pendidikan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

Tempat Penelitian : laboratorium Prodi Pendidikan Farmasi FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN TERSEBUT TELAH MEMENUHI SYARAT ATAU LAIK ETIK.

Malang, 30 September 2021
 Ketua


 dr. Doby Indrawan, MMRS
 NIP. 1978100120170101113

Keterangan :

- Keterangan Laik Etik Ini berlaku 1 (satu) tahun sejak tanggal dikeluarkan
- Pada akhir penelitian, laporan Pelaksanaan Penelitian harus diserahkan kepada KEPK-FKIK dalam bentuk *soft copy*.
- Apabila ada perubahan protokol dan/atau Perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).

Nomor : -

Malang, 12 Oktober 2021

Perihal : Perizinan Menggunakan Lab Mikrobiologi

Kepada Yth :

Ketua Laboratorium Mikrobiologi
Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
Di Malang

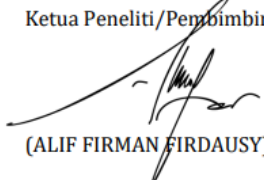
Sehubungan dengan penyelenggaraan penelitian kolaborasi Dosen dan Mahasiswa Program Studi Farmasi FKIK UIN Malang. Adapun konfigurasi tim penelitian kami adalah sebagai berikut:

Nama	NIM/NIP	Jabatan
Alif Firman Firdausy	199206072019031017	Peneliti Utama
Nofita Diyah Ningrum	18930072	Anggota Peneliti
Afnan Adila	18930078	Anggota Peneliti
Azizah Nurul Rahmadhany	18930091	Anggota Peneliti
Kurnia Mufidah	18930102	Anggota Peneliti
Judul Penelitian: Metabolite Profiling Cell Free Supernatant Isolat Bakteri Asam Laktat dari Yoghurt di Kabupaten Malang		

Dengan ini kami mohon agar dapat diizinkan untuk menggunakan laboratorium sesuai dengan syarat dan ketentuan yang berlaku.

Demikian atas perhatian dan kerjasamanya kami ucapkan terima kasih

Ketua Peneliti/Pembimbing



(ALIF FIRMAN FIRDAUSY)