

BAB IV

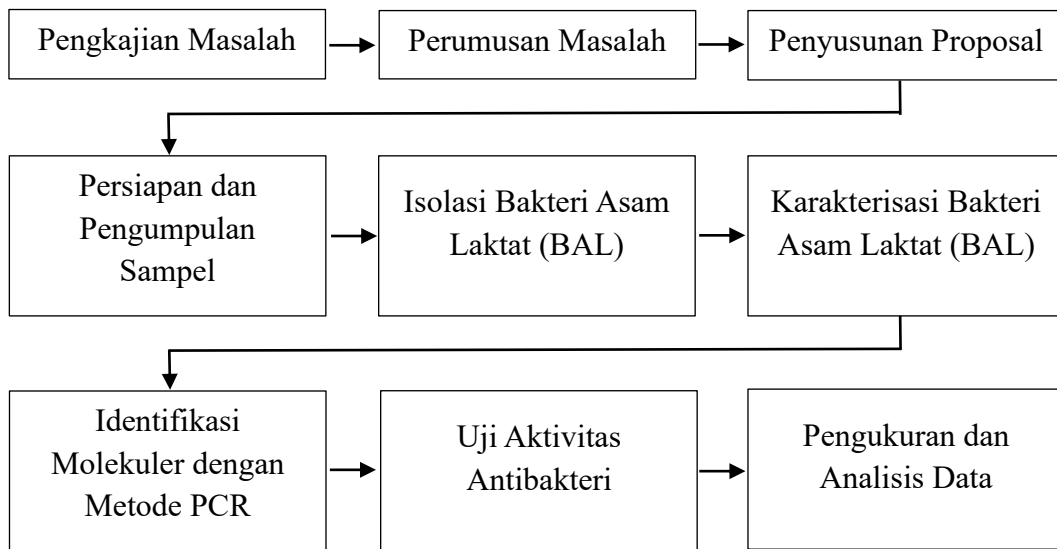
METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorium yang bertujuan untuk melakukan identifikasi molekuler serta menguji aktivitas antibakteri isolat bakteri asam laktat secara *in vitro*. Menurut Sugiyono (2019), penelitian eksperimen merupakan metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap objek penelitian dalam kondisi yang terkendali. Perlakuan dalam penelitian ini meliputi identifikasi molekuler isolat bakteri asam laktat menggunakan teknik PCR dengan primer spesifik *Lactobacillus*, kemudian dilanjutkan dengan pengujian aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Penelitian ini juga bersifat eksploratif, karena bertujuan untuk menggali dan mengeksplorasi potensi aktivitas antibakteri bakteri asam laktat yang diisolasi dari limbah cair tempe, yang sebelumnya belum banyak dilaporkan secara spesifik. Selain itu, penelitian ini melibatkan tahapan isolasi, identifikasi awal, identifikasi secara molekuler isolat yang diperoleh, serta pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, sehingga diharapkan dapat memberikan gambaran ilmiah mengenai potensi bakteri asam laktat sebagai sumber agen antibakteri alami (Sugiyono, 2019).

B. Alur Penelitian



Gambar 5 Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Pengambilan sampel dilakukan di tiga industri tempe yang berlokasi di Jalan Kebo Iwa, Banjar Batukandik, Desa Padangsambian Kaja, Kecamatan Denpasar Barat, Kota Denpasar. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Februari hingga April 2026.

D. Unit Analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah setiap isolat murni bakteri asam laktat yang berhasil diperoleh. Setiap isolat tunggal menghasilkan satu set data lengkap yang mencakup hasil identifikasi morfologi dan sel, uji biokimia, hasil identifikasi molekuler dengan primer 16S rRNA dan primer spesifik *Lactobacillus*, serta hasil pengukuran zona hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

Proses untuk memperoleh unit analisis ini diawali dengan pengambilan sampel sumber, yaitu limbah air rendaman kedelai dalam proses produksi tempe. Pengambilan sampel sumber dilakukan dengan teknik *purposive sampling* yakni sampel dipilih berdasarkan pertimbangan dan kriteria spesifik yang telah ditetapkan (Campbell *et al.*, 2020). Kriteria inklusi mencakup limbah cair dari proses produksi tempe tradisional yang diambil pada pagi hari setelah direndam selama 24 jam, berwarna keruh putih kekuningan, dan berbau asam. Kriteria eksklusi meliputi sampel yang menunjukkan tanda kontaminasi makroskopik atau telah disimpan lebih dari 2 jam pada suhu ruang sebelum diawetkan.

Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 3 botol sampel limbah cair tempe yakni air rendaman kedelai dalam proses produksi tempe yang berasal dari tiga industri tempe yang berbeda sebanyak 100 ml. Volume sampel diambil sebesar 100 ml karena volume tersebut merupakan volume yang lazim digunakan dalam analisis mikrobiologi sampel cair. Volume 100 ml dianggap cukup representatif untuk mendeteksi dan mengisolasi mikroorganisme dari sampel, serta masih praktis untuk diproses di laboratorium (Miller *et al.*, 2022). Kemudian masing-masing sampel yang diperoleh ditambahkan ke dalam tabung yang berisi media MRS Broth sebanyak 1ml dan diinkubasi selama 48 jam dalam kondisi anaerob, lalu diisolasi pada media MRS Agar.

Koloni dengan morfologi berbeda yang tumbuh kemudian dimurnikan untuk mendapatkan kultur murni. Isolat murni yang diperoleh diidentifikasi melalui uji katalase, pewarnaan Gram, pewarnaan endospora, dan uji tipe fermentasi sebagai karakteristik dasar BAL. Selanjutnya, setiap isolat murni (unit analisis) diidentifikasi secara molekuler menggunakan PCR dengan primer gen 16S rRNA

untuk tahap awal, kemudian dikonfirmasi menggunakan primer spesifik *Lactobacillus* untuk menentukan kecenderungan genus dari isolat bakteri asam laktat yang diperoleh. Setelah itu, diuji aktivitas antibakterinya terhadap *Staphylococcus aureus* menggunakan metode *agar well diffusion* pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Kontrol positif menggunakan antibiotik standar seperti gentamisin, sedangkan kontrol negatif menggunakan media pertumbuhan steril.

Setiap pengujian aktivitas antibakteri pada satu isolat bakteri asam laktat sebagai unit analisis dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan (triplo) (Hanafiah, 2016). Diameter zona hambat di sekitar sumuran diukur menggunakan jangka sorong. Selanjutnya, nilai rata-rata dari ketiga hasil pengukuran dihitung dan digunakan sebagai data akhir yang merepresentasikan potensi aktivitas antibakteri dari masing-masing isolat.

E. Prosedur Kerja

1. Alat

Alat yang digunakan berupa: botol kaca steril, neraca analitik, spatula, erlenmeyer 250 ml, gelas ukur 500 ml, *hotplate stirrer*, autoklaf, rak tabung reaksi, tabung steril, cawan petri, pipet tetes, tabung reaksi, tabung Durham, *Biosafety Cabinet Level II*, *anaerobic jar*, ose bulat, api bunsen, kaca objek, rak pengecatan, vortex mixer, McFarland densitometer, inkubator, mikroskop binokuler, jangka sorong, mikropipet beserta tip steril, *centrifuge*, *water bath*, rak microtube, microtube steril, *refrigerated microcentrifuge*, PCR tube, *spindown*, *thermal cycler* (PCR), alat elektroforesis gel beserta *power supply*, *UV transilluminator* atau *gel documentation system*, *cool box*, dan *cork borer*.

2. Bahan

Bahan yang digunakan yaitu: sampel limbah cair tempe, *De Man Rogosa and Sharpe* (MRS) Broth, *De Man Rogosa and Sharpe* (MRS) Agar, Kalsium Karbonat (CaCO_3), akuades, isolat *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Mueller Hinton Agar* (MHA), reagen pewarnaan Gram, minyak imersi, larutan hidrogen peroksida (H_2O_2) 3%, alkohol 70%, aluminium foil, kapas lemak, antibiotik gentamisin, larutan NaCl 0,9%, kapas steril dan swab steril, gula (glukosa, laktosa, sukrosa, maltosa, manitol), reagen *Phenol red*, reagen *Phenol Chloroform Isoamil Alcohol* (PCIA), Lysis buffer, alkohol absolut, proteinase K, lisozim, kloroform, TE buffer, primer *Forward* gen 16S rRNA (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'), primer *Reverse* gen 16S rRNA (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3'), primer *Forward Lactobacillus* (5'-CACCGCTACACATGGAG-3'), primer *Reverse Lactobacillus* (5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3'), agarosa, buffer TAE, Taq Mix, loading dye, *Nuclease Free Water* (NFW), staining gel, serta DNA ladder.

3. Prosedur penelitian

a. Pengambilan sampel

- 1) Siapkan botol kaca steril untuk pengambilan sampel.
- 2) Masukkan 100 mL sampel limbah cair air rendaman kedelai proses produksi tempe yang direndam selama 24 jam ke dalam botol kaca steril secara aseptis.
- 3) Pastikan botol kaca tertutup rapat dan letakkan di dalam *coolbox* untuk dibawa ke laboratorium.

b. Pembuatan media

Pembuatan media dalam penelitian ini mengacu pada prosedur Mansur & Hidayat (2019) serta dimodifikasi sesuai kebutuhan penelitian. Prosedur kerja dari pembuatan media dijelaskan sebagai berikut:

1) Media MRSB

- a) Siapkan neraca analitik, aluminium foil, kapas lemak, kertas buram, *hotplate stirrer*, erlenmeyer, tabung, dan media MRS *Broth*.
- b) Hitung jumlah media yang akan digunakan sesuai dengan etiket yang tertera pada wadah yaitu 55,15 gram per 1000 mL, maka untuk membuat 200 mL media menggunakan 11,03 gram bubuk media MRSB.
- c) Timbang media MRSB sebanyak 11,03 gram, kemudian dimasukkan ke erlenmeyer dan dilarutkan dengan 200 mL akuades.
- d) Tutup erlenmeyer menggunakan kapas lemak dan aluminium foil.
- e) Media yang telah disterilkan selanjutnya didinginkan hingga mencapai suhu sekitar 40-50°C, kemudian dibagi secara merata ke dalam 20 tabung steril dengan volume 9 mL pada setiap tabung.
- f) Sterilkan media MRSB menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit dihitung dari suhu sudah tercapai.

2) Media MRSA

- a) Siapkan neraca analitik, aluminium foil, kapas lemak, *hotplate stirrer*, erlenmeyer, CaCO₃, cawan petri disposable, dan media MRS *Agar*.
- b) Hitung jumlah media yang akan digunakan sesuai dengan etiket yang tertera pada wadah yaitu 67,15 gram per 1000 mL, maka untuk membuat 400 mL media menggunakan 26,86 gram bubuk media MRSA.

- c) Timbang media MRSA sebanyak 26,86 gram dan 4 gram CaCO_3 , kemudian dimasukkan ke erlenmeyer dan dilarutkan dengan 400 mL akuades.
- d) Panaskan media menggunakan *hotplate* dan aduk hingga homogen.
- e) Tutup erlenmeyer menggunakan kapas lemak, lalu dilapisi dengan aluminium foil.
- f) Sterilkan media menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit dihitung dari suhu tersebut tercapai.
- g) Media yang telah disterilkan selanjutnya didinginkan hingga mencapai suhu sekitar $40\text{-}50^\circ\text{C}$, kemudian dihomogenkan kembali, lalu dituangkan ke dalam cawan petri secara aseptik sebanyak 20 mL pada masing-masing cawan, dan diamkan hingga padat.
- h) Media yang telah padat diletakkan dengan posisi terbalik. Media dapat disimpan pada suhu $2\text{-}8^\circ\text{C}$ apabila media tidak segera digunakan.

3) Media MHA

- a) Siapkan neraca analitik, aluminium foil, kapas lemak, kertas buram, *hotplate stirrer*, erlenmeyer, cawan petri, dan media MHA.
- b) Hitung jumlah media yang akan digunakan sesuai dengan etiket yang tertera pada wadah yaitu 38 gram per 1000 mL, maka untuk membuat 200 mL media menggunakan 7,6 gram bubuk media MHA.
- c) Timbang media MHA sebanyak 7,6 gram, kemudian dimasukkan ke erlenmeyer dan dilarutkan dengan 200 mL akuades.
- d) Panaskan media menggunakan *hotplate* dan aduk hingga homogen.
- e) Tutup erlenmeyer menggunakan kapas lemak, lalu dilapisi dengan aluminium foil.

- f) Sterilkan media menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit dihitung dari suhu tersebut tercapai.
- g) Media yang telah disterilkan selanjutnya didinginkan hingga mencapai suhu sekitar 40-50°C, kemudian tuangkan ke dalam cawan petri secara aseptik sebanyak 20 mL, dan diamkan hingga padat.
- h) Media yang telah padat diletakkan dengan posisi terbalik. Media dapat disimpan pada suhu 2-8°C apabila media tidak segera digunakan.

c. Isolasi bakteri asam laktat

Metode isolasi bakteri asam laktat mengacu pada Amaliah, Bahri, & Amelia (2018) dengan beberapa modifikasi sesuai kebutuhan penelitian. Prosedur isolasi bakteri asam laktat dilakukan sebagai berikut:

- 1) Sampel limbah cair tempe sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 9 mL MRSB, lalu diinkubasi dalam kondisi anaerob pada suhu 37°C selama 48 jam.
- 2) Inokulasikan kultur hasil pengayaan dari media MRSB ke media MRSA dengan CaCO_3 sebanyak 1 ose dengan metode *fourway streak*.
- 3) Inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dalam kondisi anaerob.
- 4) Koloni bakteri asam laktat yang tumbuh selanjutnya dipindahkan dan ditanam kembali pada media MRSA menggunakan teknik *fourway streak* untuk memperoleh koloni murni, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.
- 5) Dari koloni murni yang diperoleh, diambil koloni tunggal untuk dilakukan uji katalase dan uji pewarnaan gram.

d. Uji katalase

Prosedur uji katalase yang digunakan mengacu pada metode mikrobiologi standar yang dilaporkan oleh Cappuccino & Welsh (2017) dengan beberapa modifikasi sesuai kebutuhan penelitian. Prosedur uji katalase yang dilakukan sebagai berikut:

- 1) Bersihkan kaca objek dengan alkohol 70%.
- 2) Ambil koloni tunggal dari media MRSA menggunakan ose lalu diletakkan pada kaca objek.
- 3) Tambahkan 1 tetes larutan hidrogen peroksida (H_2O_2) 3%.
- 4) Diamkan beberapa saat dan amati. Terbentuknya gelembung menandakan hasil positif, sedangkan tidak terbentuknya gelembung menandakan hasil negatif. Bakteri asam laktat dicirikan dengan hasil negatif pada uji katalase.

e. Pewarnaan Gram

Prosedur uji pewarnaan Gram yang digunakan mengacu pada metode mikrobiologi standar yang dilaporkan oleh Cappuccino & Welsh (2017) dengan beberapa modifikasi sesuai kebutuhan penelitian. Prosedur uji pewarnaan Gram yang dilakukan sebagai berikut:

- 1) Bersihkan kaca objek dengan alkohol 70%, kemudian disterilisasikan dengan cara dilewatkan di api bunsen.
- 2) Sebanyak satu tetes NaCl 0,9% diteteskan pada kaca objek.
- 3) Isolat bakteri diambil dari media MRSA diletakkan pada kaca objek menggunakan ose dan dibuat apusan.
- 4) Fiksasi apusan dengan menggunakan api bunsen kemudian diletakkan pada rak pengecatan.

- 5) Teteskan kristal violet pada hapusan hingga seluruh permukaannya tergenang, diamkan selama 1 menit, lalu bilas dengan akuades.
- 6) Teteskan lugol pada hapusan hingga seluruh permukaannya tergenang, diamkan selama 30 detik, lalu bilas dengan akuades.
- 7) Teteskan alkohol 95% pada hapusan hingga seluruh permukaannya tergenang, diamkan selama 10 detik, lalu bilas dengan akuades.
- 8) Teteskan safranin pada hapusan hingga seluruh permukaannya tergenang, diamkan selama 10 detik, lalu bilas dengan akuades.
- 9) Keringkan preparat dengan cara diangin-anginkan.
- 10) Preparat diamati di bawah mikroskop. Pengamatan awal dilakukan dengan perbesaran 10x untuk menemukan dan memusatkan area pengamatan. Setelah itu, perbesaran ditingkatkan ke 40x untuk konfirmasi lapang pandang, kemudian ditetaskan minyak imersi untuk pengamatan detail dengan lensa objektif 100x. Bakteri gram positif akan berwarna ungu, sedangkan bakteri yang berwarna merah termasuk gram negatif. Sebagai salah satu karakteristik utamanya, bakteri asam laktat umumnya menunjukkan hasil gram positif.

f. Uji Endospora

Prosedur uji pewarnaan endospora yang digunakan mengacu pada metode Schaeffer–Fulton sebagai metode mikrobiologi standar yang dilaporkan oleh Cappuccino & Welsh (2017) dengan beberapa modifikasi sesuai kebutuhan penelitian. Prosedur uji pewarnaan endospora yang dilakukan sebagai berikut:

- 1) Siapkan kultur bakteri yang diinkubasi selama 72 jam.
- 2) Bersihkan kaca objek dengan alkohol 70%.
- 3) Sebanyak satu tetes NaCl 0,9% ditetaskan pada kaca objek.

- 4) Isolat bakteri diambil dari media MRSA diletakkan pada kaca objek menggunakan ose dan dibuat apusan.
- 5) Fiksasi apusan dengan menggunakan api bunsen kemudian diletakkan pada rak pengecatan.
- 6) Siapkan hotplate dan panaskan air pada *beaker glass* kecil. Setelah air mendidih, letakkan preparat apusan di atas *beaker glass*.
- 7) Teteskan *malachite green* hingga menutupi seluruh area pada apusan selama 10 menit (jangan sampai mengering), tambahkan pewarna jika mulai mengering.
- 8) Setelah 10 menit, diamkan preparat selama 5 menit. Kemudian bilas dengan air.
- 9) Teteskan fuchin 5%, tunggu 10 detik lalu bilas dengan air.
- 10) Keringkan preparat dengan cara diangin-anginkan.
- 11) Preparat diamati di bawah mikroskop. Pengamatan awal dilakukan dengan perbesaran 10x untuk menemukan dan memusatkan area pengamatan. Setelah itu, perbesaran ditingkatkan ke 40x untuk konfirmasi lapang pandang, kemudian ditetaskan minyak imersi untuk pengamatan detail dengan lensa objektif 100x. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endospora berwarna hijau dan sel vegetatif berwarna merah, sedangkan hasil negatif ditunjukkan dengan tidak terbentuknya endospora dan hanya terdapat sel vegetatif berwarna merah. Bakteri asam laktat merupakan bakteri yang tidak menghasilkan endospora sehingga hanya terdapat sel vegetatif saat diamati.

g. Uji tipe fermentasi

Uji tipe fermentasi bakteri asam laktat yang digunakan mengacu pada metode karakterisasi biokimia bakteri asam laktat berdasarkan kemampuan fermentasi karbohidrat yang dilaporkan dalam Surbakti & Hasanah (2019) dengan beberapa

modifikasi sesuai kebutuhan penelitian. Prosedur uji tipe fermentasi yang dilakukan sebagai berikut:

- 1) Sebanyak 15 tabung reaksi yang telah dilengkapi dengan tabung Durham disiapkan. Selanjutnya, tabung reaksi tersebut dikelompokkan menjadi lima kelompok berdasarkan jenis sumber karbohidrat, di mana setiap kelompok terdiri atas 3 tabung reaksi. Masing-masing kelompok kemudian diisi dengan 5 mL media MRSB yang telah diperkaya dengan satu jenis gula, yaitu glukosa, laktosa, sukrosa, maltosa, dan manitol.
- 2) Masing-masing isolat bakteri asam laktat diinokulasikan ke dalam setiap tabung reaksi sesuai jenis gula yang diuji.
- 3) Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.
- 4) Setelah inkubasi, diamati terbentuknya perubahan warna media dan gas pada tabung Durham.
- 5) Hasil positif fermentasi ditunjukkan dengan perubahan warna media (asam) dan/atau terbentuknya gas pada tabung Durham, sedangkan hasil negatif ditandai dengan tidak adanya perubahan.
- 6) Isolat dikategorikan sebagai homofermentatif apabila hanya menghasilkan asam tanpa gas, sedangkan heterofermentatif apabila menghasilkan asam disertai pembentukan gas.

h. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan mengacu pada metode isolasi DNA bakteri yang dilaporkan dalam *Bio-protocol* (2023), dengan beberapa modifikasi yang disesuaikan dengan kebutuhan penelitian. Prosedur ekstraksi DNA yang dilakukan sebagai berikut:

- 1) Preparasi sampel
 - a) Masukkan kultur bakteri ke dalam tabung sentrifugasi.
 - b) Sentrifugasi pada 4.500 – 8.000 rpm selama 5 menit.
 - c) Buang supernatan (sisa media broth) dan sisakan pelet bakteri.
 - d) Vortex pellet ± 15 detik. hingga terdispersi kembali.
 - e) Pipet 100 μL suspensi pelet ke dalam microtube steril 1,5 mL.
 - f) Tambahkan 200–300 μL NaCl steril untuk pencucian.
 - g) Sentrifugasi pada 8.000–15.000 rpm selama 5–10 menit.
 - h) Buang supernatan dengan hati-hati tanpa mengganggu pelet.
 - i) Ulangi proses pencucian sebanyak 2 kali hingga pelet bebas dari sisa media broth.
- 2) Ekstraksi
 - a) Siapkan sampel yang sudah dipreparasi.
 - b) Tambahkan 30 μL lisozim ke dalam pellet, kemudian inkubasi pada 37°C selama 30 menit dan vortex ringan setiap 10 menit selama inkubasi.
 - c) Tambahkan 12,5 μL Proteinase K dan 500 μL buffer lisis, vortex hingga homogen, kemudian inkubasi 10 menit pada suhu ruang.
 - d) Lanjutkan inkubasi pada 55°C (*water bath*) selama 45 menit.
 - e) Tambahkan 500 μL PCIA (*Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol* 25:24:1), lalu vortex ± 15 detik.
 - f) Diamkan hingga fase terpisah, kemudian sentrifugasi 15.000 rpm selama 5 menit.
 - g) Ambil fase atas (*aqueous phase*) secara hati-hati ke tube baru.
 - h) Tambahkan 300 μL kloroform, kemudian vortex hingga homogen.

- i) Diamkan hingga fase terpisah, lalu disentrifugasi 15.000 rpm selama 5 menit.
- j) Ambil kembali fase atas ke tube baru.
- k) Tambahkan 500 μ L etanol 96% dingin, lalu vortex hingga tercampur.
- l) Inkubasi pada -80°C selama 30 menit, lalu sentrifugasi 15.000 rpm selama 5 menit, kemudian buang supernatan dengan hati-hati.
- m) Tambahkan etanol dingin 70% untuk mencuci pellet, lalu vortex.
- n) Sentrifugasi 15.000 rpm selama 5 menit, kemudian buang supernatan.
- o) Keringkan pelet pada suhu ruang selama 5–10 menit.
- p) Tambahkan 100 μ L TE buffer, lalu homogenkan perlahan hingga larut. Kemudian, disimpan pada suhu -20°C .
- i. Elektroforesis hasil ekstraksi

Prosedur elektroforesis gel agarosa yang digunakan mengacu pada prosedur dalam Wang *et al.* (2023), dengan beberapa modifikasi. Prosedur elektroforesis yang dilakukan sebagai berikut:

- 1) Siapkan TAE Buffer 50X, lalu diukur sebanyak 10 mL dengan gelas ukur kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 500mL.
- 2) Tambahkan 490 mL aquades ke dalam Erlenmeyer.
- 3) Homogenkan, kemudian disimpan dengan label TAE buffer 1X.
- 4) Ditimbang agarose sebanyak 2,25 gram, kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL, lalu tambahkan dengan 150 mL TAE buffer 1X.
- 5) Tutup dengan aluminium foil lalu panaskan dan dihomogenkan dengan stirrer hingga larut.
- 6) Setelah larut (dari agak keruh menjadi bening) ditambahkan 6 μ L staining gel, kemudian homogenkan.

- 7) Dalam keadaan masih hangat dimasukan ke dalam cetakan agarose dan ditambahkan sisir untuk membuat lubang pada agarose. Lalu ditutup dengan aluminium foil hingga memadat. Kemudian cabut sisir dari cetakan secara perlahan.
- 8) Ambil cetakan agarose kemudian letakan ke dalam chamber.
- 9) Tambahkan TAE buffer 1X sampai menggenangi seluruh gel agarose.
- 10) Tambahkan 3 μ L DNA ladder pada sumur pertama.
- 11) Siapkan para film di atas meja. Pipet 1 μ L loading dye, kemudian diletakan pada parafilm sejumlah sampel yang akan di running.
- 12) Ditambahkan 5 μ L sampel DNA ke dalam loading dye pada parafilm, lalu homogenkan dengan pipetting.
- 13) Dipipet 6 μ L hasil campuran DNA dengan loading dye, kemudian dimasukan ke dalam sumur pada gel agarose.
- 14) Lakukan bertahap sampai semua sampel masuk ke dalam agarose.
- 15) Letakan kabel dan penutup arus listrik di atas chamber gel agarose.
- 16) Setting:

Kuat arus listrik	= 200 A
Tegangan	= 77 volt
Waktu	= 60 menit
- 17) Klik Timer, kemudian klik START.
- 18) Pastikan arus listrik sudah berjalan.
- 19) Setelah alat selesai, ambil gel agarose, kemudian dipindahkan ke alat *Gel documentation*, diamati terbentuknya pita band DNA dibawah sinar UV.

j. *Polymerase Chain Reaction (PCR) gen 16s rRNA dan Lactobacillus*

Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) berdasarkan metode yang dilaporkan dalam Wang *et al.* (2023), dengan beberapa penyesuaian sesuai kondisi penelitian. Prosedur uji PCR yang dilakukan sebagai berikut:

- 1) Siapkan mikro tube untuk PCR mix dan tube PCR.
- 2) Pastikan reagen mencair sempurna.
- 3) Buat reagen master mix PCR sebanyak 9X reaksi sesuai table berikut:

Komponen	Volume 1X	Konsentrasi
Taq 2x Master Mix	12,5 uL	1X
Primer forward gen 16s 10uM	0,5 uL	0.2 uM
Primer reverse gen 16s 10uM	0,5 uL	0.2 uM
Water (NFW)	10,5 uL	
Template DNA	@1 uL	
Volume akhir	25 uL	

- 4) Lalu di spindown agar reagen atau cairan yang ada di dinding dapat turun ke dasar tabung.
- 5) Masukkan Master Mix sebanyak 24 uL dan 1 uL DNA ke dalam tube PCR.
- 6) Homogenkan, lalu kemudian di tutup dan di spindown kembali.

7) Lalu masukkan ke dalam alat PCR dan atur suhu sesuai tabel berikut:

	Waktu	Temperatur	Siklus
Initial activation	5 menit	94 °C	1X
Denaturasi	30 detik	94 °C	30X
Anneling	30 detik	60 °C	
extension	1 menit 30 detik	72 °C	
Final extension	5 menit	72 °C	1X

8) Tunggu sampel selesai running

9) Simpan hasil PCR pada suhu 4 C sebelum di elektroforesis

k. Elektroforesis hasil PCR

Prosedur elektroforesis gel agarosa yang digunakan mengacu pada prosedur dalam Wang *et al.* (2023), dengan beberapa modifikasi. Prosedur elektroforesis yang dilakukan sebagai berikut:

- 1) Siapkan TAE Buffer 50X, lalu diukur sebanyak 10 mL dengan gelas ukur kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 500mL.
- 2) Tambahkan 490 mL aquades ke dalam Erlenmeyer.
- 3) Homogenkan, kemudian disimpan dengan label TAE buffer 1X.
- 4) Ditimbang agarose sebanyak 2,25 gram, kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL, lalu tambahkan dengan 150 mL TAE buffer 1X.
- 5) Tutup dengan aluminium foil lalu panaskan dan dihomogenkan dengan stirrer hingga larut.
- 6) Setelah larut (dari agak keruh menjadi bening) ditambahkan 6 µL staining gel, kemudian homogenkan.
- 7) Dalam keadaan masih hangat dimasukkan ke dalam cetakan agarose dan ditambahkan sisir untuk membuat lubang pada agarose. Lalu ditutup dengan

aluminium foil hingga memadat. Kemudian cabut sisir dari cetakan secara perlahan.

- 8) Ambil cetakan agarose kemudian letakan ke dalam chamber.
- 9) Tambahkan TAE buffer 1X sampai menggenangi seluruh gel agarose.
- 10) Tambahkan 3 μ L DNA ladder pada sumur pertama.
- 11) Dipipet 4 μ L hasil PCR, kemudian dimasukan ke dalam sumur pada gel agarose.
- 12) Lakukan bertahap sampai semua sampel masuk ke dalam agarose.
- 13) Letakan kabel dan penutup arus listrik di atas chamber gel agarose.
- 14) Setting:

Kuat arus listrik = 200 A

Tegangan = 77 volt

Waktu = 60 menit

- 15) Klik Timer, kemudian klik START.
- 16) Pastikan arus listrik sudah berjalan.
- 17) Setelah alat selesai, ambil gel agarose, kemudian dipindahkan ke alat *Gel documentation*, diamati terbentuknya pita band DNA dibawah sinar UV.

1. Preparasi *Cell-Free Supernatant* (CFS) *Lactic Acid Bacteria* (LAB)

Preparasi *Cell-Free Supernatant* (CFS) bakteri asam laktat mengacu pada metode preparasi supernatan kultur BAL yang dilaporkan oleh Adeniyi *et al.* (2015) dengan beberapa modifikasi sesuai kebutuhan penelitian. Prosedur preparasi CFS yang dilakukan sebagai berikut:

- 1) Siapkan subkultur bakteri asam laktat yang sudah ditumbuhkan pada media MRSB.

- 2) Pisahkan supernatan dan bakterinya menggunakan centrifuge dengan kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit.
- 3) Pipet supernatan sebanyak 1 ml kemudian pindahkan pada tabung centrifuge steril, ulangi sebanyak 3 kali hingga didapatkan *Cell-Free Supernatant* LAB.

m. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

Prosedur pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* yang digunakan mengacu pada penelitian yang telah dilakukan oleh Hainil, Sammulia & Adella (2022) dengan beberapa modifikasi sesuai kebutuhan penelitian. Prosedur pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* yang dilakukan sebagai berikut:

- 1) Satu ose koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dari biakan murni diambil, kemudian diremajakan dengan menumbuhkannya pada media MHA.
- 2) Biakan kemudian diinkubasikan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam agar bakteri yang diuji mampu tumbuh secara optimal.
- 3) Beberapa ose koloni bakteri *Staphylococcus aureus* berumur 24 jam diambil, kemudian disuspensikan ke dalam tabung steril yang berisi 5 mL larutan NaCl 0,9%, kemudian dihomogenkan dengan *vortex*.
- 4) Kekeruhan suspensi bakteri diukur menggunakan McFarland densitometer hingga diperoleh kekeruhan 0,5 McFarland.

n. Uji aktivitas antibakteri

Prosedur uji aktivitas antibakteri yang digunakan mengacu pada penelitian yang telah dilakukan oleh Putri dkk. (2023) dengan beberapa modifikasi sesuai kebutuhan penelitian. Prosedur uji aktivitas antibakteri yang dilakukan sebagai berikut:

- 1) Siapkan media MHA, cotton swab steril, *cork borer* steril, tip kuning steril, suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, dan *Cell-Free Supernatant* LAB.
- 2) Celupkan cotton swab steril pada suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, lalu gores secara merata pada permukaan media MHA.
- 3) Buat sumuran menggunakan *cork borer* pada media MHA.
- 4) Pipet 50 μ l *Cell-Free Supernatant* LAB, lalu tambahkan pada masing-masing sumuran.
- 5) Inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- 6) Zona hambat yang terbentuk diamati dan diukur menggunakan jangka sorong.
- 7) Antibiotik gentamisin digunakan sebagai kontrol positif dan media MRSB steril digunakan sebagai kontrol negatif.

F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

a. Data primer

Data primer dalam penelitian ini adalah seluruh hasil pengukuran yang diperoleh dari eksperimen laboratorium, yaitu data karakterisasi isolat berupa hasil uji pewarnaan gram, uji katalase, pewarnaan endospora, uji tipe fermentasi, dan hasil identifikasi molekuler dengan metode PCR, serta diameter zona hambat (mm) setiap isolat bakteri asam laktat (BAL) yang diuji terhadap *Staphylococcus aureus*.

b. Data sekunder

Data sekunder yang digunakan dalam penelitian ini adalah segala bentuk informasi yang diperoleh dari berbagai sumber pustaka yang relevan dengan topik penelitian.

2. Cara pengumpulan data

Dalam penelitian ini data dikumpulkan melalui observasi, studi literatur, serta pemeriksaan laboratorium. Adapun teknik pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini meliputi:

a. Observasi

Teknik observasi pada penelitian ini dilakukan melalui pengamatan langsung dan pencatatan sistematis terhadap seluruh tahapan awal isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat (BAL). Observasi meliputi pengamatan morfologi melalui pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora pada setiap isolat, serta pencatatan hasil uji katalase untuk memastikan karakteristik BAL. Selain itu, dilakukan pula uji tipe fermentasi untuk mengetahui kemampuan fermentasi isolat terhadap beberapa jenis gula berdasarkan perubahan warna media dan pembentukan gas. Seluruh hasil pengamatan tersebut digunakan untuk mendukung identifikasi awal isolat bakteri asam laktat yang diperoleh.

b. Studi literatur

Studi literatur dalam penelitian ini dilakukan dengan cara mengumpulkan, membaca, dan menelaah berbagai sumber pustaka yang relevan dengan topik penelitian, seperti buku teks, jurnal ilmiah, artikel penelitian, serta publikasi ilmiah lainnya yang berkaitan dengan bakteri asam laktat, limbah cair tempe, metode isolasi dan karakterisasi BAL, identifikasi molekuler dengan PCR, serta pengujian aktivitas antibakteri. Studi literatur digunakan sebagai dasar dalam penyusunan kerangka teori, penentuan metode penelitian, pemilihan media dan prosedur kerja laboratorium, serta sebagai bahan pembandingan dalam pembahasan hasil penelitian yang diperoleh.

c. Pemeriksaan laboratorium

Pemeriksaan laboratorium pada penelitian ini mencakup pelaksanaan pengujian eksperimental terhadap sampel. Teknik yang digunakan meliputi identifikasi molekuler melalui proses ekstraksi DNA isolat bakteri asam laktat (BAL) dan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer 16S rRNA sebagai tahap awal, kemudian dilanjutkan dengan PCR menggunakan primer spesifik *Lactobacillus*. Hasil amplifikasi DNA kemudian divisualisasikan melalui elektroforesis gel agarosa untuk mengamati keberadaan pita DNA sebagai indikasi identifikasi molekuler isolat. Selain itu, dilakukan pengukuran diameter zona hambat (mm) menggunakan jangka sorong setelah uji difusi sumuran untuk mengetahui kemampuan isolat dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

3. Instrumen pengumpul data

Instrumen pengumpulan data dalam penelitian ini meliputi:

- a. Jas laboratorium, masker, dan *handscoon* sebagai APD.
- b. Kertas dan pensil, untuk mencatat hasil pengumpulan data.
- c. Handphone, sebagai alat untuk mendokumentasikan aktivitas saat penelitian.
- d. Botol kaca steril, sebagai alat untuk pengambilan sampel.
- e. Mikroskop cahaya, sebagai alat untuk memperoleh data hasil pengamatan pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora.
- f. Kaca objek, sebagai alat untuk memperoleh data hasil pengamatan uji katalase.
- g. Jangka sorong, sebagai alat untuk mengukur diameter zona hambat.
- h. Thermal cycler sebagai alat untuk proses amplifikasi DNA pada teknik PCR.

- i. Perangkat elektroforesis (gel agarosa, *gel tank*, dan *power supply*) untuk visualisasi hasil PCR.

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

Pengolahan data bertujuan untuk mengatur dan menyusun data agar siap digunakan dalam proses analisis. Pada penelitian ini, data hasil identifikasi bakteri asam laktat dan pengukuran diameter zona hambat yang diperoleh melalui pengujian aktivitas antibakteri yang berasal dari limbah cair tempe terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, kemudian dinyatakan dalam satuan milimeter (mm) dan disajikan melalui teknik penyusunan data (*tabulating*) untuk memudahkan pengamatan, analisis, dan evaluasi sehingga menghasilkan pemahaman yang lebih jelas terhadap hasil penelitian.

2. Analisis data

Analisis data pada penelitian ini dilakukan secara deskriptif untuk menggambarkan hasil yang diperoleh dari setiap tahapan pengujian. Analisis deskriptif digunakan untuk menyajikan data dalam bentuk tabel serta uraian naratif sehingga memudahkan dalam interpretasi hasil penelitian. Data yang diperoleh dari uji aktivitas antibakteri berupa diameter zona hambat yang dianalisis dengan menghitung nilai rerata dan standar deviasi sebagai gambaran aktivitas antibakteri bakteri asam laktat terhadap *Staphylococcus aureus*.

Sementara itu, hasil identifikasi molekuler dianalisis berdasarkan keberadaan pita DNA hasil amplifikasi menggunakan primer gen 16S rRNA dan primer spesifik *Lactobacillus* yang divisualisasikan melalui elektroforesis gel agarosa. Sebaliknya, tidak munculnya pita DNA mengindikasikan bahwa isolat tersebut tidak terdeteksi

oleh primer yang digunakan. Dengan demikian, analisis ini digunakan sebagai konfirmasi awal secara molekuler untuk mendukung hasil identifikasi fenotipik yang telah dilakukan sebelumnya.

H. Etika Penelitian

Penelitian ini menerapkan prinsip *beneficence* dan *non-maleficence*. Prinsip *beneficence* diterapkan melalui upaya memberikan kontribusi bagi pengembangan ilmu pengetahuan dengan mengidentifikasi potensi antibakteri baru dari limbah industri pangan, yang diharapkan dapat mendukung pengembangan agen antimikroba alternatif di masa mendatang (Resnik, 2020). Prinsip *non-maleficence* diwujudkan melalui penanganan materi biologis, khususnya *Staphylococcus aureus*, secara hati-hati sesuai protokol Biosafety Level 1, serta penerapan prosedur laboratorium dan interpretasi data yang cermat untuk meminimalkan risiko dan mencegah kesalahan pelaporan (National Academies of Sciences, Engineering, 2017).