

PAPER NAME

39 Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Pada Fermentasi Spontan Biji Kop i Robusta Asal Banta

WORD COUNT

5765 Words

CHARACTER COUNT

34593 Characters

PAGE COUNT

12 Pages

FILE SIZE

1.0MB

SUBMISSION DATE

May 15, 2023 11:45 AM GMT+8

REPORT DATE

May 15, 2023 11:46 AM GMT+8

● **10% Overall Similarity**

The combined total of all matches, including overlapping sources, for each database.

- 3% Publications database
- Crossref database
- Crossref Posted Content database
- 10% Submitted Works database

● **Excluded from Similarity Report**

- Internet database
- Bibliographic material
- Quoted material
- Cited material
- Small Matches (Less than 10 words)

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT PADA FERMENTASI SPONTAN BIJI KOPI ROBUSTA ASAL BANTAENG

Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria in Spontaneous Fermentation of Robusta Coffee Beans from Bantaeng

Izmi Azhara, Muhammad Rais, Andi Sukainah, Reski Praja Putra*

Program Studi Pendidikan Teknologi Pertanian - Fakultas Teknik - Universitas Negeri Makassar
Jl. Daeng Tata - Makassar 90224
Penulis Korespondensi, email : reski.prajaputra@unm.ac.id

Disubmit : 7 Februari 2022

Direvisi : 22 Maret 2022

Diterima : 19 April 2022

ABSTRAK

Penelitian ini adalah penelitian eksperimen yang bertujuan mengisolasi bakteri asam laktat (BAL) indigenus yang terlibat dalam fermentasi spontan biji kopi robusta asal Bantaeng pada interval waktu fermentasi 0, 3, 6, 9, 24, 48, dan 72 jam serta untuk mengetahui aktivitas enzim dari isolat bakteri asam laktat indigenus sebagai upaya pengembangan kultur starter dalam fermentasi biji kopi secara terkontrol. Hasil penelitian menunjukkan isolasi berhasil dilakukan pada 37 isolat bakteri yang terlibat dalam fermentasi spontan biji kopi robusta. Hasil identifikasi sederhana yang dilakukan secara bertahap menunjukkan hanya 12 isolat bakteri yang bersifat katalase negatif, Gram positif, non spora, non motil, tidak menghasilkan gas (homofermentatif), tumbuh pada suhu 10 °C, 37 °C, 45 °C serta mampu tumbuh pada konsentrasi garam 4% dan 6,5%. Selanjutnya, 2 isolat BAL yang diisolasi pada waktu fermentasi 24 jam diuji lebih lanjut untuk dikembangkan sebagai kultur starter fermentasi biji kopi secara terkontrol. Kedua isolat BAL terpilih, yaitu BT24I1 dan BT24I2, diuji kemampuannya dalam menguraikan selulosa dan pektin. Hasil pengujian kualitatif menunjukkan kedua isolat BAL mampu menghasilkan selulase dan pektinase sehingga keduanya berpotensi dikembangkan sebagai kandidat kultur starter dalam fermentasi terkontrol biji kopi robusta dalam upaya pengembangan mutu dan cita rasa kopi

Kata Kunci: Bakteri Asam Laktat; Biji Kopi Robusta; Fermentasi; Isolasi

ABSTRACT

This study is an experimental study aimed at isolating lactic acid bacteria (BAL) indigenus involved in the spontaneous fermentation of robusta coffee beans from Bantaeng at fermentation time intervals of 0, 3, 6, 9, 24, 48, 72 hours and to find out the enzyme activity of the isolate of indigenus lactic acid bacteria as an effort to develop a starter culture in controlled coffee bean fermentation. The results showed that isolation was successfully carried out on 37 bacterial isolates involved in spontaneous fermentation of robusta coffee beans. The results of a simple identification carried out gradually showed only 12 bacterial isolates that were catalase negative, Gram positive, non spore, non-motile, non-gas-producing (homofermentative), growing at temperatures of 10 °C, 37 °C, 45 °C and able to grow at salt concentrations of 4% and 6.5%. Furthermore, 2 BAL isolates isolated at the fermentation time of 24 hours were further tested to be developed as a controlled coffee bean fermentation starter culture. The two selected BAL isolates, BT24I1 and BT24I2, tested their ability to decompose cellulose and pectin. Qualitative test results show that both BAL isolates can produce cellulase and pectinase so that both have the potential to be developed as candidates for starter cultures in controlled fermentation of robusta coffee beans in an effort to develop the quality and taste of coffee.

Keywords: Fermentation; Isolation; Lactic Acid Bacteria; Robusta Coffee Beans

PENDAHULUAN

Kabupaten Bantaeng terletak di daerah pantai yang memanjang pada bagian barat ke timur kota. wilayah daratannya mulai dari tepi laut Flores sampai ke pegunungan sekitar Gunung Lompobattang dengan ketinggian tempat dari permukaan laut 0-25 m sampai dengan ketinggian lebih dari 1000 m dpl. Kondisi ini menjadikan Kabupaten Bantaeng sebagai salah satu daerah di Sulawesi Selatan yang memiliki potensi untuk pengembangan kopi karena areal penanaman yang luas serta keadaan lingkungan dan agroklimatologi yang sangat mendukung (BPS Sulawesi Selatan, 2014).

Lokasi penanaman kopi terluas di Kabupaten Bantaeng berada di Kecamatan Tompobulu dengan luas 1.093 Ha untuk kopi robusta dan 423,50 Ha untuk kopi arabika. Hasil produksi masing-masing pada tahun 2021 adalah 659,4 ton kopi robusta dan 291,95 ton kopi arabika. Total produksi tanaman kopi di Kabupaten Bantaeng tahun 2021 menghasilkan 961,29 ton kopi robusta dan 442,75 ton kopi arabika (BPS Kabupaten Bantaeng, 2022). Tingginya produksi jenis kopi robusta tersebut sangat baik untuk dikembangkan dalam hal pemeliharaan maupun pengolahannya.

Pengolahan biji kopi robusta di Kabupaten Bantaeng dilakukan dengan cara proses fermentasi. Menurut Siregar *et al.* (2020), proses fermentasi biji kopi dapat melibatkan aktivitas mikroorganisme. Penambahan mikroorganisme, salah satunya bakteri asam laktat (BAL), dapat meningkatkan mutu kopi yang dihasilkan. Namun di kabupaten Bantaeng, penggunaan BAL pada fermentasi biji kopi robusta belum pernah dilakukan sehingga dapat menjadi pengetahuan baru.

Bakteri Asam Laktat (BAL) memiliki karakteristik yang khas, yaitu berukuran sedikit lebih besar dibandingkan bakteri-bakteri lain pada umumnya dengan bentuk mikroskopis lonjong, batang, bulat maupun koma. Seluruh BAL termasuk bakteri Gram positif, artinya memiliki dinding peptidoglikan yang tersusun dari peptida (asam-asam amino) dan glikan (karbohidrat) (Zoumpoulou *et al.*, 2018).

Karakteristik lain yang khas dari BAL adalah tidak berspora dan pada umumnya tidak ber-flagella (Cousin *et al.*, 2015). BAL pada umumnya ditemukan bergerombol dalam bentuk-bentuk tertentu (Ni *et al.*, 2015). BAL memiliki beberapa keunggulan seperti dapat menghasilkan senyawa yang memberikan rasa dan aroma spesifik pada makanan fermentasi (Dongmo *et al.*, 2017). BAL juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain seperti bakteri pembusuk dan bakteri patogen pada produk pangan serta produk fermentasi lainnya (Emmawati *et al.*, 2015).

Upaya yang dapat dilakukan untuk memperoleh BAL yaitu dengan melakukan isolasi. Isolasi BAL pada biji kopi merupakan cara yang dilakukan agar memperoleh isolat murni yang akan digunakan sebagai kultur starter. Isolasi dilakukan pada koloni BAL indigenus yang terlibat selama proses fermentasi spontan biji kopi robusta asal Bantaeng dengan interval waktu 0, 3, 6, 9, 24, 48, 72 jam. Tujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi BAL indigenus yang terlibat pada fermentasi spontan biji kopi robusta asal Bantaeng serta mengetahui aktivitas enzim dari isolat BAL indigenus sebagai upaya untuk mengembangkannya sebagai kultur starter dalam fermentasi biji kopi secara terkontrol.

METODE

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *pulper*, baskom, laminar air flow, autoklaf Gea model YX-24 LDJ, mikroskop binokuler, jarum ose, Erlenmeyer, cawan petri, rak tabung reaksi, tabung Durham, timbangan analitik Kern ABJ 220-4NM, labu ukur, gelas ukur, korek api, tabung reaksi, bunsen, *bulb* karet, pipet ukur, mikropipet, botol semprot, batang pengaduk, *hot plate*, oven, kaca objek.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu buah kopi robusta, air mineral, MRSB Merck, MRSA Merck, NaCl 0,85%, spiritus, aluminium foil, plastik klip, kapas, kristal violet, larutan iod, alkohol 70%, safranin, minyak emersi, *malachite green*, akuades, larutan hidrogen peroksida (H₂O₂) 3%, *Sulfide Indole Motility* (SIM), *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) dan Pektin.

Prosedur Penelitian

Penelitian ini meliputi dua tahapan. Tahap pertama adalah fermentasi biji kopi robusta secara spontan. Pada tahap ini, fermentasi dilakukan selama 72 jam, dan pada waktu fermentasi 0, 3, 6, 9, 24, 48, dan 72 jam dilakukan isolasi bakteri. Tahap kedua adalah tahap identifikasi dan uji aktivitas enzim isolat bakteri asam laktat terpilih.

Penelitian Tahap Pertama

1. Fermentasi Spontan Buah Kopi Robusta

Buah ceri kopi robusta disortasi dengan memisahkan buah ceri kopi yang memiliki warna merah dan warna hijau. Buah ceri kopi robusta yang digunakan adalah buah ceri kopi dengan warna merah karena kandungan gulanya tinggi sehingga dapat dimanfaatkan oleh mikroorganisme sebagai sumber karbon selama fermentasi. Buah ceri kopi robusta ditimbang sebanyak 7 kg. Buah ceri kopi kemudian *dipulping* menggunakan mesin *pulper* untuk memisahkan kulit buah kopi dengan biji kopi. Rendemen yang didapatkan adalah ± 600 g biji kopi (gabah kopi) dalam setiap 1 kg buah ceri kopi. Biji kopi selanjutnya direndam menggunakan air. Biji kopi yang terapung dibuang karena biji kopi tersebut rusak. Biji kopi (gabah kopi) yang diselimuti lendir difermentasi dengan cara direndam dalam air mineral dengan rasio 1:1 (600 ml air:600 g kopi) selama 0, 3, 6, 9, 24, 48, dan 72 jam.

2. Isolasi Kultur Bakteri Asam Laktat (BAL) (Todorov dan Dicks, 2004)

Koloni ditumbuhkan di media MRSA lalu diinkubasi selama 48 jam. Koloni bakteri yang memiliki kekhasan dan berbeda dengan koloni lainnya diambil satu ose dan dimurnikan menggunakan metode *quadran streak* dalam media MRSA yang selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam. Isolat diamati secara makroskopis dengan melihat bentuk dan warnanya.

Penelitian Tahap Kedua

Tahap Identifikasi dan Pengujian Aktivitas Enzim Isolat

1. Total Pertumbuhan Koloni pada Media MRSA

Cairan fermentasi biji kopi robusta diambil sebanyak 10 ml. Pengenceran

dilakukan menggunakan larutan pengencer NaCl 0,85% berseri hingga 10^{-8} , kemudian diinokulasi ke dalam MRSA menggunakan metode tuang (*pour plate*). Selanjutnya, inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 48 jam dan koloni yang tumbuh dihitung menggunakan rumus pada Persamaan 1.

$$N = \frac{\sum c}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)] \times (d)} \dots \dots \dots (1)$$

Keterangan :

- N = Jumlah koloni produk (koloni/ml atau koloni/g),
- $\sum c$ = Jumlah koloni pada semua cawan yang dihitung,
- n_1 = Jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung,
- n_2 = Jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung,
- d = pengenceran pertama yang dihitung

2. Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL)

Identifikasi bakteri asam laktat diawali dengan pengujian katalase, kemudian pewarnaan Gram, dilanjutkan uji pewarnaan endospora. Kandidat Isolat yang dihasilkan pada pengujian tersebut dilanjutkan dengan uji motilitas, uji produksi gas, uji pertumbuhan suhu berbeda (10 °C, 37 °C, dan 45 °C) dan uji konsentrasi garam yang berbeda (4% dan 6,5%).

3. Uji Katalase (Harley, 2005)

Larutan H₂O₂ 3% diteteskan pada kaca preparat steril sebanyak satu tetes. Isolat diambil satu ose dan digores-goreskan di kaca preparat yang telah ditetesi H₂O₂ 3%. Pengamatan dilakukan pada kaca preparat.

4. Pewarnaan Gram (Gram, 1884)

Isolat diambil satu ose dan digoreskan di permukaan kaca preparat dan difiksasi di atas bunsen. Preparat kemudian diberi kristal violet 1 tetes dan didiamkan 1 menit. Preparat dibilas menggunakan akuades. Kaca preparat dikeringkan di atas bunsen. Preparat diberi larutan iod 1 tetes dan didiamkan hingga 1 menit. Preparat kemudian dibilas dengan alkohol 70% hingga warna luntur dan

kembali dicuci menggunakan akuades. Preparat diberi 1 tetes safranin dan didiamkan selama 45 detik. Preparat lalu diberi akuades dan dikeringkan dengan tissue. Preparat diberi minyak emersi 1 tetes dan pengamatan dilakukan pada mikroskop perbesaran 100x.

5. Pewarnaan Endospora (Harley, 2005)

Isolat diambil satu ose digoreskan di permukaan preparat dan difiksasi. *Malachite green* ditambahkan satu tetes di kaca preparat dan dipanaskan selama 2-3 menit. Jika terjadi penguapan, *malachite green* kembali ditetesi di kaca preparat. Setelah itu, kaca preparat kembali dibilas menggunakan akuades dan dikeringkan menggunakan tissue. Safranin ditetaskan ke permukaan preparat kemudian didiamkan hingga 1 menit. pengamatan isolate dilakukan dengan mikroskop perbesaran 100x.

6. Uji Motilitas (Harley, 2005)

Isolat 1 ose dimasukkan dalam media tegak SIM secara vertikal. Kemudian, isolat tersebut diinkubasi dengan suhu ruang dengan lama 48 jam. Isolat kemudian diamati pada media SIM.

7. Uji Produksi Gas (Romadhon *et al.*, 2012)

Media MRSA sebanyak 9 ml dimasukkan dalam tabung reaksi sebagai media pertumbuhan. Tabung Durham dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan kondisi terbalik agar dapat menangkap gas. Isolat 1 ml diambil dan dipindahkan ke media cair MRSB yang berisi tabung Durham yang kemudian disimpan pada suhu 37 °C selama 48 jam. Tabung Durham kemudian diamati untuk melihat gelembung udara (oksigen) yang dihasilkan oleh isolat tersebut.

8. Uji Pertumbuhan pada Temperatur (10 °C, 37 °C, dan 45 °C) (Modifikasi Anastiawan, 2014)

Media cair MRSB dibuat kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 9 ml sebagai media pertumbuhan BAL. Isolat diinokulasikan sebanyak 1 ml dalam tabung reaksi. Isolat lalu disimpan selama 48 jam pada suhu 10 °C (lemari es), 37 °C, dan 45 °C (oven). Isolat kemudian diamati pertumbuhannya dengan melihat kekeruhan dalam tabung reaksi. Pertumbuhan optimum terlihat pada media yang lebih keruh.

9. Uji Pertumbuhan pada Konsentrasi Garam (4% dan 6.5%) (Thakkar *et al.*, 2015)

MRSB dibuat dan dicampur dengan NaCl 4% dan 6.5%, selanjutnya dimasukkan dalam tabung reaksi sebanyak 9 ml. Isolat diinokulasikan dalam media sebanyak 1 ml. Isolat selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang dengan lama 48 jam. Isolat kemudian diamati pertumbuhannya dengan melihat kekeruhan dalam tabung reaksi. Pertumbuhan optimum terlihat pada media yang lebih keruh.

10. Uji Aktivitas Enzim

Pengujian aktivitas enzim yang dilakukan adalah uji aktivitas enzim selulase dan uji aktivitas enzim pektinase.

11. Enzim Selulase (Setya, 2013)

Akuades steril sebanyak 9 ml ditambahkan *Carboxy Methyl Cellulosa* (CMC) 1%, MRSA 1%. Media kemudian ditetesi indikator *congo red* 0,1%. Isolat kemudian dimasukkan pada media tersebut. Isolat diinkubasi pada suhu ruang dengan lama 48 jam penyimpanan. Isolat diamati untuk melihat aktivitas enzim *selulase* yang dihasilkan ditandai perubahan warna pada media, perubahan media dari warna merah berubah menjadi warna kuning menandakan isolat menghasilkan selulase.

12. Enzim Pektinase (Modifikasi Setya, 2013)

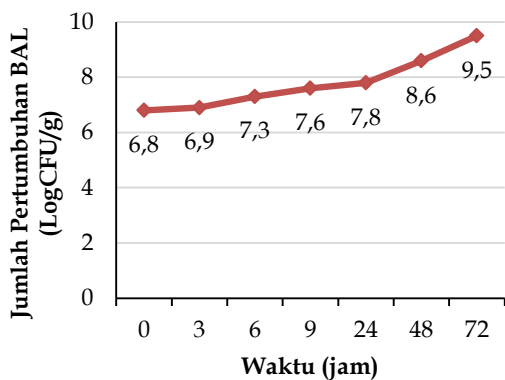
Akuades steril sebanyak 9 ml ditambahkan pektin 1% dan MRSA 1%. Media kemudian ditetesi indikator *congo red* 0,1%. Isolat kemudian dimasukkan ke dalam media tersebut. Isolat diinkubasi pada suhu ruang dengan lama 48 jam penyimpanan. Isolat diamati untuk melihat aktivitas enzim *pektinase* melalui perubahan warna pada media. Isolat positif menghasilkan pektinase jika terjadi perubahan pada media dari warna merah kecoklatan berubah menjadi warna kuning kecoklatan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan Koloni Kandidat BAL pada Media MRSA

Koloni yang berhasil tumbuh setelah diinkubasi selama 48 jam diamati dan dihitung. Pengamatan dilakukan dengan menghitung total koloni bakteri untuk

melihat kurva pertumbuhan koloni kandidat BAL yang disajikan pada Gambar 2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa koloni bakteri asam laktat yang tumbuh pada media MRSA terdiri dari 2 fase pertumbuhan yaitu fase lag (adaptasi) dan fase eksponensial. Fase lag terjadi pada 0 jam hingga 3 jam, dengan jumlah koloni berada pada kisaran 6.8-6.9 Log CFU/g. Fase adaptasi adalah fase pertumbuhan koloni berlangsung secara lambat, karena sedang dalam proses beradaptasi dengan kondisi lingkungan (pH, suhu dan nutrisi). Fase pertumbuhan BAL terdiri dari 4 fase yaitu fase lag, fase eksponensial, fase stasioner dan fase kematian. Pada fase lag peningkatan jumlah bakteri berlangsung lambat hal ini disebabkan bakteri sedang melakukan proses aklimatisasi terhadap kondisi lingkungan (pH, suhu, dan nutrisi) (Urnemi *et al.*, 2012).

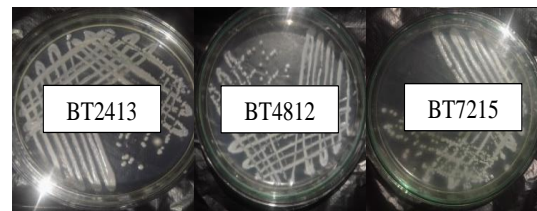


Gambar 2. Kurva Pertumbuhan Koloni Kandidat BAL pada media MRSA

Setelah melewati fase adaptasi, fase selanjutnya adalah fase eksponensial yang dilihat dengan bertambahnya jumlah koloni secara signifikan. Fase eksponensial koloni dimulai pada waktu fermentasi jam ke-3 sampai waktu fermentasi jam ke-72. Pertumbuhan eksponensial koloni bakteri asam laktat dikarenakan bakteri telah mengalami fase adaptasi dan telah mendapatkan lingkungan (pH, nutrisi, dan suhu) yang sesuai dengan pertumbuhannya. Fase logaritmik atau fase eksponensial merupakan fase dimana pertumbuhan bakteri berlangsung sangat cepat karena nutrient dalam media sangat cukup (Urnemi *et al.*, 2012).

Isolasi Bakteri Asam Laktat pada Fermentasi Spontan Biji Kopi Robusta

Hasil isolasi koloni kandidat BAL dapat dilihat pada Gambar 1. Isolasi dilakukan pada koloni bakteri yang tumbuh pada media selektif BAL, yaitu media MRSA. Hasil penelitian ditemukan ada 37 koloni bakteri indigenus yang memiliki bentuk yang khas dan menyerupai morfologi bakteri asam laktat. Morfologi koloni bakteri yang ditumbuhkan dalam media pertumbuhan bakteri berbentuk bulat, warna putih susu dan putih kekuningan, permukaan yang cembung dan tepi yang rata. Morfologi koloni bakteri asam laktat yaitu menghasilkan warna putih kekuningan, bentuk yang bulat, tepi yang rata dan permukaan yang cembung (Hayu *et al.*, 2013). Selanjutnya, 37 isolat ini selanjutnya diisolasi dengan metode *quadran streak* pada media MRSA dan diidentifikasi.



Keterangan: B = Bakteri Asam Laktat; T = Waktu Fermentasi; dan I = Isolasi

Gambar 1. Hasil Isolasi Koloni Kandidat BAL

Identifikasi Bakteri Asam Laktat Uji Katalase

Uji katalase dilakukan pada 37 isolat, terdapat 29 isolat yang tidak membentuk gelembung gas (oksigen) pada saat ditetesi dengan H₂O₂ 3%, ini menandakan bahwa isolat tersebut adalah katalase negatif. Hasil penelitian terdapat 8 isolat yang membentuk gelembung gas pada saat ditetesi dengan H₂O₂ 3% yaitu pada isolat BT7215, BT7211, BT4814, BT4815, BT913, BT911, BT316, ini menandakan bahwa isolat tersebut bersifat katalase positif. Pengamatan terhadap uji katalase isolat kandidat BAL dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Uji katalase Isolat Kandidat BAL

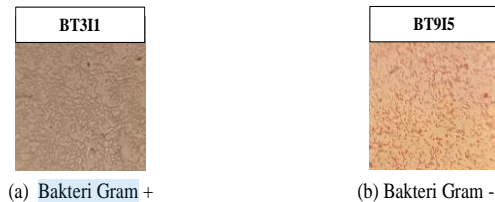
Ketika isolat disuspensikan dengan larutan H_2O_2 , katalase negatif dilihat dengan tidak adanya gelembung gas (oksigen) yang dihasilkan dan katalase positif ditunjukkan dengan adanya gelembung gas yang dibentuk. Gelembung gas yang dihasilkan menunjukkan adanya enzim katalase yang dihasilkan pada isolat sehingga dapat mendegradasi H_2O_2 . Enzim katalase dapat memecah H_2O_2 (hidrogen peroksida) menjadi H_2O dan O_2 (oksigen). Menurut Ibrahim *et al.* (2015), katalase ditandai dengan adanya aktivitas bakteri yang dapat menghasilkan enzim katalase yang ditandai dengan terbentuknya gelembung gas. Bakteri asam laktat tidak menghasilkan enzim katalase yang dapat memecah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen.

21 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram hanya dilakukan pada isolat yang memiliki sifat katalase negatif, yaitu 29 isolat. Hasil pengujian pewarnaan Gram menunjukkan terdapat 17 isolat yang menghasilkan warna ungu pada saat pewarnaan yaitu isolat BT011, BT012, BT014, BT015, BT311, BT312, BT315, BT317, BT612, BT613, BT614, BT615, BT2411, BT2412, BT2414, BT4812, BT7212, hal ini menandakan bahwa isolat tersebut adalah bakteri Gram positif. Hasil penelitian terdapat 12 isolat yang menghasilkan warna merah pada saat pewarnaan Gram, hal ini menunjukkan bahwa isolat tersebut tergolong bakteri Gram negatif. Bentuk sel setelah diamati secara mikroskopis yaitu berbentuk basil (batang). Hasil pengamatan terhadap pewarnaan Gram isolat kandidat BAL dilihat pada Gambar 4.

Bakteri Gram positif menghasilkan warna ungu pada akhir pewarnaan, sedangkan bakteri dengan Gram negatif menghasilkan warna merah pada akhir pewarnaan. Bakteri Gram positif

mempunyai dinding sel (lapisan peptidoglikan) tebal, sedangkan bakteri Gram negatif memiliki peptidoglikan yang tipis. Warna ungu pada Gram positif tidak dapat luntur pada saat dibilas dengan akuades karena lapisan peptidoglikan mampu mempertahankan warna ungu dari reaksi antara kristal violet dan larutan iod yang membentuk senyawa kristal violet iodium. Bakteri Gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis dan lipopolisakarida. Pada saat pemberian alkohol, lipopolisakarida pada dinding sel bakteri Gram negatif terekstrak sehingga tidak dapat mempertahankan warna ungu kristal violet.



Gambar 4. Pewarnaan Gram isolat Kandidat BAL

Menurut Nuryady *et al.* (2013) dan Nurhidayati *et al.* (2015), bakteri Gram positif berwarna ungu karena mampu mempertahankan warna ungu kristal violet. Warna tersebut terikat dengan baik pada lapisan peptidoglikan pada sel bakteri dan tidak dapat luntur oleh alkohol. Bakteri dengan Gram positif memiliki struktur dinding sel (peptidoglikan) yang lebih tebal dan lipid yang lebih tipis.

Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop, sel isolat bakteri asam laktat berbentuk basil (batang) dan susunan selnya kebanyakan berantai dan menggerombol. BAL pada umumnya ditemukan bergerombol dalam bentuk-bentuk tertentu (Ni *et al.*, 2015).

Pewarnaan Endospora

Pewarnaan endospora hanya dilakukan pada 17 isolat yang bersifat Gram positif. Hasil pengujian pewarnaan endospora menunjukkan terdapat 5 isolat bakteri yang menghasilkan warna hijau pada bagian selnya yaitu pada isolat BT311, BT612, BT614, BT2414, BT7212, hal ini menandakan bahwa isolat tersebut

menghasilkan spora, sehingga kelima isolat ini tidak tergolong bakteri asam laktat. Hasil penelitian terdapat 12 isolat bakteri asam laktat yang tidak mengalami perubahan warna sel menjadi hijau setelah diberikan larutan *malachite green* pada bagian selnya. Hasil ini menunjukkan bahwa isolat tersebut tidak menghasilkan spora. Hasil pengamatan terhadap pewarnaan endospora isolat kandidat BAL dilihat pada Gambar 5.



(a) Non spora (b) Endospora
Gambar 5. Pewarnaan Endospora Isolat Kandidat BAL

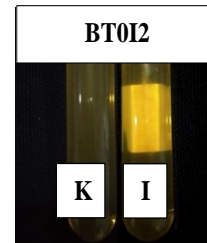
Bakteri asam laktat adalah bakteri yang tidak menghasilkan spora pada saat pewarnaan (Laily *et al.*, 2013). Bakteri asam laktat pada saat pewarnaan yang terlihat hanya sel vegetatif yang berwarna merah. Ketika diamati di bawah mikroskop. Bakteri yang tidak memiliki spora cenderung tidak tahan terhadap pewarnaan karena hanya memiliki sel vegetatif. Saat diwarnai dengan *malachite green*, sel vegetatif akan mampu berikatan dengan pewarna tersebut tetapi dapat dilunturkan setelah dilakukan pencucian karena tidak berikatan kuat dengan pewarna *malachite green*. Endospora adalah bentuk dari bakteri untuk mempertahankan diri dari kondisi yang kurang mendukung untuk kehidupan dari bakteri tersebut (Wulandari dan Purwaningsih, 2019).

Hasil identifikasi dari 37 isolat didapatkan 12 isolat yang bersifat katalase negatif, Gram positif, tidak menghasilkan spora. Ketiga sifat ini merupakan ciri-ciri utama dari bakteri asam laktat. 12 isolat tersebut diidentifikasi lebih lanjut melalui uji motilitas, produksi gas, serta pengujian pertumbuhan pada suhu dan konsentrasi garam yang berbeda.

Uji Motilitas

Hasil uji motilitas terhadap 12 isolat BAL indigenus tidak memperlihatkan

adanya pertumbuhan bakteri secara menyebar. Pertumbuhan isolat BAL hanya ditemukan sepanjang tusukan pada media SIM. Hasil pengamatan terhadap motilitas isolat BAL disajikan pada Gambar 6.

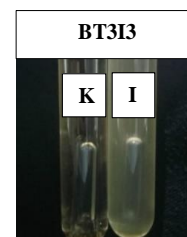


Gambar 6. Uji motilitas Isolat Kandidat BAL

Hasil pengujian motilitas menunjukkan seluruh isolat BAL indigenus bersifat non motil karena tidak memiliki flagella. Bakteri yang digolongkan bersifat non motil adalah bakteri yang hanya mampu tumbuh di sepanjang tusukan media tegak, sedangkan bakteri motil adalah bakteri yang mampu tumbuh tidak hanya di sepanjang tusukan media agar tegak. Isolat BAL bersifat non motil karena tidak dapat tumbuh di sekitar bekas tusukan ose (Susilawati, 2016).

Produksi Gas

Hasil uji produksi gas pada 12 isolat terpilih tidak memperlihatkan adanya gelembung yang dihasilkan dalam tabung Durham. Hasil pengamatan terhadap uji produksi gas isolat BAL dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Uji Produksi Gas Isolat BAL

Hasil uji produksi gas menunjukkan bahwa 12 isolat BAL tidak menghasilkan gas atau bersifat tipe fermentasi homofermentatif. BAL yang bersifat homofermentatif adalah BAL yang hanya menghasilkan asam laktat dari metabolismenya, sedangkan BAL

heterofermentatif adalah BAL yang dapat menghasilkan senyawa lain selain ⁵ dari asam laktat. Menurut Nuryady *et al.* (2013), fermentasi asam laktat dibedakan menjadi dua kelompok yaitu BAL homofermentatif dan heterofermentatif. Proses fermentasi

homofermentatif menghasilkan satu jenis komponen saja, yaitu asam laktat, sedangkan fermentasi heterofermentatif menghasilkan berbagai senyawa atau komponen lainnya, misalnya etanol, asetat, asam laktat dan ²⁴ karbodioksida.



Gambar 8. Uji Pertumbuhan BAL pada Suhu 10 °C, 37 °C, dan 45 °C

Pertumbuhan Suhu 10 °C, 37 °C, dan 45 °C

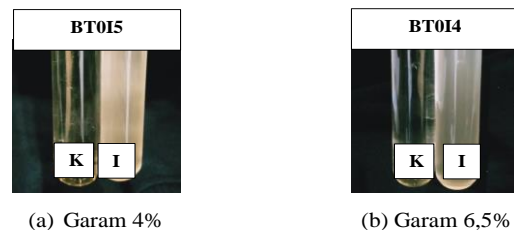
Uji pertumbuhan pada suhu yang berbeda dilakukan dengan menumbuhkan 12 isolat BAL pada suhu 10 °C, 37 °C, dan 45 °C. Hasil memperlihatkan terbentuknya kekeruhan pada media setelah dilakukan inkubasi. Hal ini menandakan bahwa isolat dapat tumbuh pada suhu tersebut. Kekeruhan yang sangat jelas terlihat pada isolat yang disimpan pada suhu 37 °C dan kekeruhan yang sangat sedikit dihasilkan pada suhu 10 °C. Hasil pengamatan kemampuan pertumbuhan isolat BAL pada suhu yang berbeda disajikan pada Gambar 8.

Pertumbuhan BAL yang optimum terdapat pada pertumbuhan suhu 37 °C dan mulai terjadi pertumbuhan pada suhu 10 °C. Pertumbuhan suhu 37 °C adalah suhu yang baik untuk pertumbuhan sebagian besar mikroorganisme salah satunya termasuk BAL. Ada tiga kelompok suhu pertumbuhan bagi mikroorganisme yaitu psikrofil (7-30 °C), mesofilik (30-40 °C) dan termofilik (45-60 °C). BAL mampu hidup pada suhu 10 °C dan 45 °C (Laily *et al.*, 2013).

Pertumbuhan Konsentrasi Garam 4% dan 6,5%

Uji kemampuan pertumbuhan 12 isolat BAL pada konsentrasi garam 4% dan 6,5% memperlihatkan terbentuknya kekeruhan pada media yang mengindikasikan bahwa isolat dapat tumbuh pada konsentrasi garam tersebut. Warna keruh sangat jelas pada konsentrasi

garam 4%. Hasil pengamatan terhadap uji pertumbuhan konsentrasi garam 4% dan 6,5% isolat BAL dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Uji Pertumbuhan Konsentrasi Garam 4% dan 6,5% isolat BAL

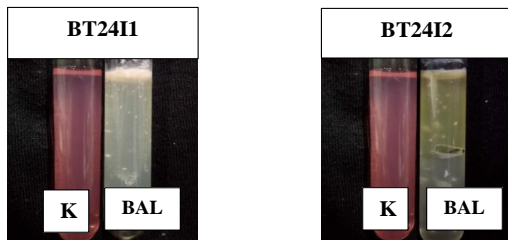
Media pertumbuhan pada media yang mengandung garam 4% lebih keruh dibandingkan media yang mengandung garam 6.5%. Hal ini menandakan bahwa konsentrasi garam yang rendah membuat bakteri bertumbuh lebih optimal. NaCl dengan konsentrasi yang rendah memberikan kondisi yang isotonik dan juga fisiologis bagi mikroorganisme, karena banyaknya NaCl dan air sama pada kedua sisi membran sel, sehingga air bergerak melalui membran sel bersamaan dari kedua arah. NaCl ²⁴ yang tinggi dapat menyebabkan terjadinya plasmolisis yaitu air dalam sel keluar dan mengganggu pertumbuhan mikroorganisme bahkan dapat menyebabkan kematian pada mikroorganisme. BAL dapat hidup pada konsentrasi garam 4% dan 6,5% (Laily *et al.*, 2013).

Aktivitas Enzim

Isolat yang diuji aktivitas enzimnya adalah isolat BAL yang diisolasi pada waktu fermentasi 24 jam. Pemilihan ini didasarkan pada pertimbangan BAL yang tumbuh pada waktu fermentasi tersebut memiliki ketahanan yang lebih baik pada kondisi asam, sehingga lebih berpotensi dikembangkan sebagai starter pada fermentasi biji kopi secara terkontrol. Isolat yang akan diuji aktivitas enzimnya adalah isolat BT24I1 dan BT24I2.

Enzim Selulase

Enzim selulase adalah enzim yang dapat menguraikan atau menghidrolisis selulosa menjadi glukosa dengan cara menghidrolisis ikatan 1,4 pada selulosa dan turunannya (Budi *et al.*, 2018; Nababan *et al.*, 2019). Hasil uji kualitatif aktivitas enzim selulase menunjukkan bahwa isolat dapat mengubah warna merah yang dihasilkan oleh indikator *congo red* menjadi warna kuning pada media. Hasil pengamatan terhadap uji aktivitas enzim selulase isolat BAL dilihat pada Gambar 10.



(a) Isolat BT24I1 (b) Isolat BT24I2
Gambar 10. Uji Aktivitas Selulase Isolat BAL

Hasil uji aktivitas enzim selulase menunjukkan kedua isolat BAL mampu menghasilkan enzim selulase. Kedua jenis BAL ini dapat digolongkan sebagai bakteri selulolitik karena mampu tumbuh pada media yang mengandung selulosa (CMC). Menurut Begum *et al.*, (2013) kemampuan bakteri selulolitik yang tumbuh pada media spesifik CMC agar menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu memanfaatkan selulosa sebagai salah satu sumber nutrient terutama sebagai sumber karbon.

Bakteri ini mampu memanfaatkan selulosa (CMC) dalam media sebagai sumber energi untuk pertumbuhan. Hal ini ditunjukkan oleh terjadinya perubahan warna media selama proses inkubasi. Awalnya, media berwarna merah karena mengandung indikator *congo red*, di akhir inkubasi media menjadi berwarna kuning. Perubahan warna pada media disebabkan oleh keasaman (pH) pada media meningkat. Peningkatan asam pada media dihasilkan sebagai produk hasil metabolisme penguraian selulosa oleh aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh BAL menjadi asam-asam organik.

Enzim Pektinase

Enzim pektinase merupakan enzim yang menghidrolisis pektin melalui reaksi depolimerisasi dan esterifikasi (Yopi *et al.*, 2013). Hasil uji kualitatif aktivitas enzim pektinase menunjukkan bahwa kedua isolat BAL dapat mengubah warna merah yang dihasilkan oleh indikator *congo red* menjadi warna kuning kecoklatan pada media. Hasil pengamatan terhadap uji aktivitas enzim pektinase isolat BAL dapat dilihat pada Gambar 11.



(a) Isolat BT24I1 (b) Isolat BT24I2
Gambar 11. Uji Aktivitas Pektinase Isolat BAL

Hasil uji aktivitas enzim pektinase memperlihatkan kedua isolat BAL mampu menghasilkan enzim pektinase sehingga terjadi perubahan warna *congo red* pada media. *Congo red* merupakan pewarna yang sensitif terhadap asam. Perubahan warna media mengindikasikan terjadinya perubahan pH pada media akibat terbentuknya asam-asam organik hasil metabolisme dari penguraian pektin oleh enzim pektinase. Kondisi sangat asam dapat merusak struktur pektin karena

adanya hidrolisis pektin. Enzim pektinase adalah enzim kompleks yang dapat mendegradasi polimer pektin (Satriana *et al.*, 2014; Yulianti dan Herawati, 2020).

SIMPULAN

Sel bakteri yang berhasil diisolasi selama proses fermentasi spontan biji kopi robusta ada 37 isolat, namun hanya 12 isolat yang terindikasi sebagai BAL yang ditunjukkan dengan sifat katalase negatif, Gram positif, dan tidak menghasilkan spora. 12 isolat BAL bersifat non motil, tidak menghasilkan gas (homofermentatif), tumbuh pada suhu 10 °C, 37 °C, dan 45 °C, serta memiliki kemampuan untuk tumbuh pada konsentrasi garam 4% dan 6.5%.

Isolat BAL BT24I1 dan BT24I2 merupakan isolat yang terpilih untuk dikembangkan sebagai starter dalam fermentasi kopi secara terkontrol. Kedua isolat ini diperoleh dari fermentasi spontan biji kopi Robusta berumur 24 jam. Isolat BAL dengan lama fermentasi 24 jam menunjukkan ketahanannya yang lebih baik pada kondisi asam, sehingga lebih berpotensi dikembangkan sebagai starter. Kedua isolat BAL terpilih memiliki kemampuan menghasilkan enzim selulase dan enzim pektinase yang dibutuhkan selama proses fermentasi kopi.

DAFTAR PUSTAKA

Anastiawan. 2014. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Probiotik yang Berasal dari Saluran Pencernaan Itik Pedaging *Anas domesticus*. Skripsi. Universitas Hasanuddin. Makassar

Begum, I, -F., Meignanalaksmi, -S., Devi, M. -P., 2013. Isolation and characterization of cellulase producing *Paracoccus pantotrophus* FMR19 (JX012237) from goat rumen fluid and its Effects on pH, temperature and carbon sources. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. 4, 384-390. <https://bipublication.com/files/IJABR-V4I3-2013-14.pdf>

BPS Kabupaten Bantaeng. 2022. *Kabupaten*

Bantaeng dalam Angka 2022. Badan Pusat Statistik (BPS) Kabupaten Bantaeng, Bantaeng

BPS Sulawesi Selatan. 2014. *Sulawesi Selatan dalam Angka 2014*. Badan Pusat Statistik (BPS) Provinsi Sulawesi Selatan, Makassar

Budi, K, -L., Wijanarka, -W., Kusdiyantini, -E., 2018. Aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri *Serratia marcescens* pada substrat jerami. *Jurnal Akademika Biologi*. 7, 35-42. <https://ejournal3.undip.ac.id/index.php/biologi/article/view/19624>

Cousin, F, -J., Lynch, S, -M., Harris, H, M. -B., McCann, -A., Lynch, D, -B., Anne Neville, -B., Irisawa, -T., Okada, -S., Endo, -A., O'Toole, P. -W., 2015. Detection and genomic characterization of motility in *Lactobacillus curvatus*: Confirmation of motility in a species outside the *Lactobacillus salivarius* clade. *Applied and Environmental Microbiology*. 81, 1297-1308. <https://doi.org/10.1128/AEM.03594-14>

Dongmo, S, -N., Sacher, -B., Kollmannsberger, -H., Becker, -T., 2017. Key volatile aroma compounds of lactic acid fermented malt based beverages-impact of lactic acid bacteria strains. *Food Chemistry*. 229, 565-573. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.091>

Emmawati, -A., Jenie, B, S, L, -S., Nuraida, -L., Syah, -D., 2015. Karakterisasi isolat bakteri asam laktat dari mandai yang berpotensi sebagai probiotik. *Agritech*. 35, 146-155. <https://doi.org/10.22146/agritech.9400>

Gram, -C., 1884. Ueber die isolirte farbung der schizomyceten in Schnitt-und Trockenpreparaten. *Fortschritte der Medizin*. 2, 185-189. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1209285>

Harley, JP. 2005. *Laboratory Exercises in Microbiology, Sixth ed*. McGraw-Hill Publishing Company, New York

Hayu, T, -R., Murruckmihadi, -M., Mutmainah, 2013. Pengaruh konsentrasi minyak atsiri kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.) dalam pasta gigi terhadap karakteristik fisik dan daya antibakteri *Streptococcus mutans*. *Majalah Farmasetik*. 9, 243-247. <https://doi.org/10.22146/farmasetik.v9i1.24104>

- Ibrahim, -A., Fridayanti, -A., Delvia, -F., 2015. Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat (BAL) dari buah mangga (*Mangifera indica* L.). *Jurnal Ilmiah Manuntung*. 1, 159-163. <https://doi.org/10.51352/jim.v1i2.29>
- Laily, I, -N., Utami, -R., Widowati, -E., 2013. Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat penghasil riboflavin dari produk fermentasi sawi asin. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 2, 179-184. <https://core.ac.uk/download/pdf/294882895.pdf>
- Nababan, -M., Gunam, I, B, -W., Wijaya, I, M, -M., 2019. Produksi enzim selulase kasar dari bakteri selulolitik. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. 7, 190-199. <https://doi.org/10.24843/JRMA.2019.v07.i02.p03>
- Ni, -K., Wang, -Y., Li, -D., Cai, -Y., Pang, -H., 2015. Characterization, identification and application of lactic acid bacteria isolated from forage paddy rice silage. *PLoS One* 10, e0121967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121967>
- Nurhidayati, -S., Faturrahman, Ghazali, -M., 2015. Deteksi bakteri patogen yang berasosiasi dengan *Kappaphycus alvarezii* (Doty) bergejala penyakit ice-ice. *Jurnal Sains Teknologi & Lingkungan*. 1, 24-30. <https://doi.org/10.29303/jstl.v1i2.53>
- Nuryady, M, -M., Istiqomah, -T., Faizah, -R., Ubaidillah, -S., Mahmudi, -Z., Sutoyo, 2013. Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat asal youghurt. *UNEJ Jurnal*. 1, 1-11. <https://adoc.pub/isolasi-dan-identifikasi-bakteri-asam-laktat-asal-youghurt-i.html>
- Romadhon, Subagiyo, Margino, -S., 2012. Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat dari usus udang penghasil bakteriosin sebagai agen antibakteria pada produk-produk hasil perikanan. *Saintek Perikanan Indonesia Journal of Fisheries Science and Technology*. 8, 59-64. <https://doi.org/10.14710/ijfst.8.1.59-64>
- Satriana, Roosdiana, -A., Prasetyawan, -S., 2014. Pengaruh ion kalsium (Ca²⁺) terhadap aktivitas pektinase hasil isolasi dari *Bacillus firmus*. *Kimia Student Journal*. 2(1), 345-350. <https://www.neliti.com/id/publications/248352/pengaruh-ion-kalsium-ca2-terhadap-aktivitas-pektinase-hasil-isolasi-dari-bacillus>
- Setya, AK. 2013. *Parasitologi: Praktikum Analisis Kesehatan*. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta
- Siregar, Z, -A., Suthamihardja, -R., Susanty, -D., 2020. Karakterisasi kopi arabika (*Coffea arabica* L.) hasil fermentasi dengan bakteri asam laktat (*Lactobacillus sp*). *Jurnal Sains Natural*. 10, 87-94. <https://doi.org/10.31938/jsn.v10i2.285>
- Susilawati, S. 2016. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Fermentasi Air Cucian Beras. Skripsi. UIN Syarif Hidayatullah. Jakarta
- Thakkar, -P., Modi, H, -A., Prajapati, J, -B., 2015. Isolation, characterization and safety assessment of lactic acid bacterial isolates from fermented food products. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 4, 713-725. <https://www.ijcmas.com/vol-4-4/Pooja%20Thakkar,%20et%20al.pdf>
- Todorov, -S., Dicks, L, M, -T., 2004. Partial characterization of bacteriocins produced by four lactic acid bacteria isolated from regional South African barley beer. *Annals of Microbiology*. 54, 403-413. https://www.researchgate.net/publication/237831841_Partial_characterization_of_bacteriocins_produced_by_four_lactic_acid_bacteria_isolated_from_regional_South_African_barley_beer
- Urnemi, Syukur, -S., Purwati, -E., Ibrahim, -S., Jamsari., 2012. Potensi bakteri asam laktat sebagai kandidat probiotik penghasil bakteriosin terhadap mikroba patogen asal fermentasi kakao varietas Criollo. *Jurnal Riset Teknologi Industri*. 6, 67-76. <https://doi.org/10.26578/jrti.v6i12.1519>
- Wulandari, -D., Purwaningsih, -D., 2019. Identifikasi dan karakterisasi bakteri amilolitik pada umbi *Colocasia esculenta* L. secara morfologi, biokimia, dan molekuler. *Journal of Biotechnology & Bioscience*. 6, 247-258. <https://doi.org/10.29122/jbbi.v6i2.3084>
- Yopi, Rahmani, -N., Andriani, -A., Dewi, -F., Meryandini, -A., 2013. Purifikasi dan karakterisasi enzim pektinase dari *Aspergillus ustus* BL5. *Berita Biologi*. 12, 375-381. <https://doi.org/10.14203/beritabiologi.v12i3.646>

Yulianti, -D., Herawati, M. -M., 2020. Produksi enzim pektinase dari limbah kulit pisang oleh kapang *Aspergillus niger* dan aplikasinya terhadap klarifikasi minuman fungsional jahe lemon. *Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia*. 12, 86-92. <https://doi.org/10.17969/jtipi.v12i2.17891>

Zoumpopoulou, -G., Tzouvanou, -A., Mavrogonatou, -E., Alexandraki, -V., Georgalaki, -M., Anastasiou, -R.,

Papadelli, -M., Manolopoulou, -E., Kazou, -M., Kletsas, -D., Papadimitriou, -K., Tsakalidou, -E., 2018. Probiotic features of lactic acid bacteria isolated from a diverse pool of traditional greek dairy products regarding specific strain-host interactions. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 10, 313-322. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9311-9>

● **10% Overall Similarity**

Top sources found in the following databases:

- 3% Publications database
- Crossref database
- Crossref Posted Content database
- 10% Submitted Works database

TOP SOURCES

The sources with the highest number of matches within the submission. Overlapping sources will not be displayed.

1	Universitas Atma Jaya Yogyakarta on 2016-10-14 Submitted works	3%
2	State Islamic University of Alauddin Makassar on 2021-01-29 Submitted works	<1%
3	Deptford Township High School on 2021-01-20 Submitted works	<1%
4	Universitas Sultan Ageng Tirtayasa on 2021-10-29 Submitted works	<1%
5	Universitas Jenderal Soedirman on 2019-02-06 Submitted works	<1%
6	Andi Muhammad Irfan, Nunik Lestari, Arimansyah Arimansyah, A Ramli... Crossref	<1%
7	Sasmita Sasmita, Aliansyah Halim, Aisyah Nur Sapriati, Sukriani Kursia... Crossref	<1%
8	Sriwijaya University on 2020-07-20 Submitted works	<1%
9	Rodiah Nurbaya Sari, Sugiyono Sugiyono, Luthfi Assadad. "Optimasi W... Crossref	<1%

10	Universitas Brawijaya on 2017-01-27	<1%
	Submitted works	
11	Universitas Jember on 2020-03-10	<1%
	Submitted works	
12	Universitas Muhammadiyah Makassar on 2020-11-24	<1%
	Submitted works	
13	Universitas Tadulako on 2021-04-21	<1%
	Submitted works	
14	Yasa Putri, Riwan Kusmiadi, Sitti Nurul Aini. "Peningkatan Kualitas Lad...	<1%
	Crossref	
15	Alfi Rumidatul, Bunga Wahyuniah, Deni Zamaludin, Wasayah Khusna, Fe...	<1%
	Crossref	
16	Anggia Nurhamidah, Warsidah Warsidah, Nora Idiawati. "Isolasi dan ka...	<1%
	Crossref	
17	Nurahman M. E., E. Pangestu, F. Wahyono. "Degradabilitas Nutrien Bag...	<1%
	Crossref	
18	Siska Nuryanti, Fitriana Fitriana. "POTENSI ANTIBAKTERI EKSTRAK ET...	<1%
	Crossref	
19	Udayana University on 2016-02-04	<1%
	Submitted works	
20	Unika Soegijapranata on 2015-03-12	<1%
	Submitted works	
21	Unika Soegijapranata on 2015-03-19	<1%
	Submitted works	

22	Unika Soegijapranata on 2015-11-17 Submitted works	<1%
23	Universitas Airlangga on 2019-05-24 Submitted works	<1%
24	Universitas Airlangga on 2019-08-09 Submitted works	<1%