

**IDENTIFIKASI BAKTERI PENGHASIL ENZIM
KATALASE DAN PEROKSIDASE PADA
ECOENZYME DARI FOOD WASTE
MENGUNAKAN GEN 16S rRNA**

Skripsi

Diajukan untuk Memenuhi Sebagian Syarat
Guna Memperoleh Sarjana Sains dalam Ilmu

Biologi



Oleh:

Alfi Syaifuddin

NIM: 2108016040

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO
SEMARANG**

2025

PENYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Alfi Syaifuddin

NIM : 2108016040

Program Studi : Biologi

Menyatakan bahwa Skripsi yang berjudul:

**IDENTIFIKASI BAKTERI PENGHASIL ENZIM
KATALASE DAN PEROKSIDASE PADA
ECOENZYME DARI FOOD WASTE
MENGUNAKAN GEN 16S rRNA**

Secara keseluruhan merupakan hasil penelitian/karya sendiri, kecuali bagian tertentu yang dirujuk sumbernya.

Semarang, 21 April 2025



Alfi Syaifuddin
2108016040

PENGESAHAN



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
Jl. Prof. Dr. Hamka Ngaliyan Semarang
Telp. 024-7601295 Fax. 7615387

PENGESAHAN

Naskah skripsi berikut ini:

Judul : Identifikasi Bakteri Penghasil Enzim
Katalase Dan Peroksidase Pada *Ecoenzyme*
Dari Food Waste Menggunakan Gen 16S
rRNA

Nama : Alfi Syaifuddin

NIM : 2108016040

Jurusan : Biologi

Telah diujikan dalam sidang munaqosah oleh Dewan
Penguji Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo dan
diterima sebagai salah satu syarat memperoleh gelar
sarjana sains dalam bidang ilmu biologi.

Semarang, 28 April 2025

Dewan Penguji

Penguji I

Dr. Siti Mukhlisah Setyawati, M.Si
NIP.197611172009122001

Penguji II

Eke Purmomo, M.Si
NIP.198604232019031006

Penguji III

Andang Syaifudin, M.Sc.
NIP.1989071920192019031010

Penguji IV

Asri Febriana, M.Si.
NIP.198902012019032015

Pembimbing I

Andang Syaifudin, M.Sc.
NIP.1989071920192019031010

Pembimbing II

Asri Febriana, M.Si.
NIP.198902012019032015

NOTA DINAS

Semarang, 21 April 2025

Yth. Ketua Program Studi Biologi

Fakultas Sains dan Teknologi

UIN Walisongo Semarang

Assalamu ' alaikum wr,wb

Dengan ini diberitahukan bawasanya saya telah mengikuti bimbingan, arahan dan Koreksi Skripsi dengan:

Judul : Identifikasi Bakteri Penghasil Enzim Katalase dan Peroksidase Pada Ecoenzyme Dari Food Waste Menggunakan Gen 16S rRNA

Nama : Alfi Syaifuddin

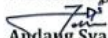
NIM : 2108016040

Program Studi : Biologi

Saya memandang bahwa naskah skripsi tersebut sudah dapat diajukan kepada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo untuk diujikan dalam Sidang Munaqosyah.

Wassalamualaikum wr.wb.

Pembimbing I


Andang Syaifudin, M.Sc
NIP. 98907192019031010

NOTA DINAS

Semarang, 21 April 2025

Yth. Ketua Program Studi Biologi

Fakultas Sains dan Teknologi

UIN Walisongo Semarang

Assalamu 'alaikum wr,wb

Dengan ini diberitahukan bawasanya saya telah mengikuti bimbingan, arahan dan Koreksi Skripsi dengan:

Judul : Identifikasi Bakteri Penghasil Enzim Katalase dan Peroksidase Pada Ecoenzyme Dari Food Waste Menggunakan Gen 16S rRNA

Nama : Alfi Syaifuddin

NIM : 2108016040

Program Studi : Biologi

Saya memandang bahwa naskah skripsi tersebut sudah dapat diajukan kepada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo untuk diujikan dalam Sidang Munaqosyah.
Wassalamualaikum wr.wb.

Pembimbing II


Asri Febriani, M.Si

NIP.198902012019032015

ABSTRAK

Limbah makanan (*Food Waste*) merupakan masalah global yang mempunyai dampak negatif terhadap lingkungan, dan masyarakat secara keseluruhan karena membahayakan keamanan pangan dan kelangsungan rantai pasokan makanan dalam jangka panjang. Salah satu upaya yang dilakukan dalam mengatasi masalah sampah dapur dan sampah *food waste* yaitu dengan membuat *ecoenzyme* yang terbuat dari fermentasi sampah dapur organik. *Ecoenzyme* tercipta secara alami melalui fermentasi limbah buah dan sayuran oleh bakteri anaerob. Diantara komponen *ecoenzyme* adalah enzim katalase dan peroksidase, yang membantu pemecahan kelebihan hidrogen peroksida. Salah satu sumber katalase dan peroksida adalah mikroorganisme seperti bakteri dan jamur, dalam identifikasi bakteri pada *ecoenzyme* dapat menggunakan uji molekuler dengan gen 16S rRNA karena dapat menentukan jenis bakteri yang spesifik. Adapun tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui jumlah isolat bakteri penghasil enzim Katalase dan Peroksidase pada *ecoenzyme* dari *food waste* selain itu untuk mengidentifikasi spesies bakteri pada *ecoenzyme* dari *food waste* penghasil enzim Katalase dan Peroksidase menggunakan DNA marker 16S rRNA. Penelitian ini menggunakan

jenis penelitian eksperimental yaitu dengan pendekatan kualitatif dan kuantitatif. Penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat tiga isolat (A, B, dan C) yang positif menghasilkan enzim katalase. Untuk aktivitas enzim peroksidase, isolat B menunjukkan nilai absorbansi tertinggi sebesar 0,563, diikuti oleh isolat C sebesar 0,072 dan isolat A sebesar 0,021. Berdasarkan hasil uji molekuler menggunakan gen 16S rRNA, ketiga isolat tersebut memiliki kekerabatan terdekat dengan spesies *B. subtilis*. Penelitian ini menunjukkan adanya aktivitas enzim katalase dan peroksidase pada *ecoenzyme* dari *food waste* dan adanya bakteri *B. subtilis* yang memiliki peran sebagai pengendalian penyakit pada tanaman.

Kata kunci: *food waste*, *ecoenzyme*, *Bacillus subtilis*

ABSTRACT

Food waste is a global issue that has a negative impact on the environment and society, as it threatens food security and the sustainability of the food supply chain in the long term. One of the efforts to address this issue is the utilization of kitchen and food waste to produce ecoenzymes, which are natural products formed through the fermentation of organic kitchen waste. Ecoenzymes are generated through anaerobic fermentation of fruit and vegetable waste and contain several active components, including catalase and peroxidase enzymes. These enzymes play a crucial role in breaking down excess hydrogen peroxide (H_2O_2), which can be toxic if accumulated. Microorganisms such as bacteria and fungi are known sources of catalase and peroxidase enzymes. To identify the bacteria present in ecoenzymes, molecular analysis using the 16S rRNA gene is employed, as it enables precise identification at the species level. This study aimed to determine the number of bacterial isolates capable of producing catalase and peroxidase enzymes in ecoenzymes derived from food waste, and to identify their species using the 16S rRNA DNA marker. This research used a eksperimental qualitative and quantitative methods. The results showed that

three bacterial isolates (A, B, and C) were positive for catalase activity. In terms of peroxidase activity, isolate B exhibited the highest absorbance value at 0.563, followed by isolate C (0.072) and isolate A (0.021). Molecular analysis using the 16S rRNA gene revealed that all three isolates had the closest phylogenetic relationship to *Bacillus subtilis*. These findings indicate that ecoenzymes derived from food waste possess catalase and peroxidase enzymatic activity and contain *B. subtilis*, a bacterium known for its role in plant disease control.

Keywords: food waste, ecoenzyme, *Bacillus subtilis*

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir dengan judul “Identifikasi Bakteri Penghasil Enzim Katalase dan Peroksidase Pada *Ecoenzyme* Dari *Food Waste* Menggunakan Gen 16S rRNA”. Tugas akhir ini digunakan sebagai syarat kelulusan di prodi biologi fakultas sains dan teknologi universitas islam negeri walisongo semarang.

Penyusunan tugas akhir ini juga diharapkan dapat memberikan manfaat bagi semua orang dan dapat digunakan dalam ilmu pengetahuan. Selain itu penelitian ini dapat digunakan sebagai referensi bagi akademisi maupun praktisi. Dalam penyusunan tugas akhir ini penulis mendapatkan bantuan, dukungan, serta saran dari berbagai pihak. Oleh karena itu peneliti mengucapkan banyak terimakasih atas bantuan serta doa doanya sehingga penelitian ini berjalan lancar. Ucapan terimakasih ditujukan kepada:

1. Prof. Dr. Nizar Ali, M.Ag., Rektor UIN Walisongo Semarang.
2. Prof. Dr. H. Musahadi, M.Ag., Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo Semarang;
3. Dr. Dian Ayuning Tyas, M.Biotech., Ketua Program Studi Biologi UIN Walisongo Semarang yang telah menyetujui topik penelitian penulis;
4. Andang Syaifudin, MSc. Selaku dosen pembimbing pertama yang telah memberikan saran dan masukan terhadap penelitian di bidang mikrobiologi serta penulisan tugas akhir ini. Terimakasih banyak telah memberikan semangat dan dukungan selama proses penelitian;
5. Asri Febriani, M.Si. Selaku dosen pembimbing kedua yang telah memberikan saran dan masukan terhadap penelitian serta penulisan tugas akhir. Terimakasih banyak telah membantu dalam proses pengiriman sampel dan saran masukan dalam proses pengolahan data hasil sekuensing;
6. Niken Kusumarini, M.S.c. selaku wali dosen yang telah memberikan dukungan dan bantuan serta arahan selama perkuliahan;
7. Arnia Sari Mukaromah, M.Sc., yang telah memberikan saran dan masukan penulis dalam proses PCR dan memberikan saran masukan pada saat penelitian;

8. Bu Erna, Bu lis, dan Bu kusrinah yang telah memberikan semangat dan dukungan selama penelitian dan penulisan tugas akhir;
9. Bu Sum, Pak Erwin, Pak Hedi yang telah memberikan izin penulis dalam melakukan penelitian dari pagi sampai magrib di laboratorium Uin Walisongo Semarang serta memberikan semangat dalam penelitian;
10. Kedua Orang Tua , Kakak dan Keluarga, yang telah memberikan dukungan baik materil maupun non materil dan doa atas kelancaran dalam peneletian serta penulisan tugas akhir;
11. Teman – teman riset *Ecoenzyme* Nia, Imel Fauzi yang telah memberikan semangat dalam penetian;
12. Teman teman riset mikrobiologi yang telah memberikan semangat penulis dalam melakukan peneletian sehinga penulis dapat menyelesaikan peneletian serta penulisan tugas akhir;
13. Teman teman asisten molekuler yang telah memberikan semangat penulis dalam melakukan peneletian sehinga penulis dapat menyelesaikan penelitian serta penulisan tugas akhir;
14. Teman - teman kamar darul maarif, lantai 2 squad yang telah memberikan semangat dan tempat sehingga dapat menyelesaikan penulisan tugas akhir;

Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu Penulis menyadari bahwa masih terdapat kekurangan dalam penyusunan tugas akhir, oleh karena itu penulis membutuhkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak untuk kesempurnaan dari penulisan ini.

Semarang, 21 April 2025



Alfi Syaifuddin
2108016040

DAFTAR ISI

PENGESAHAN	iii
NOTA DINAS	iv
NOTA DINAS	v
ABSTRAK	vi
<i>ABSTRACT</i>	viii
KATA PENGANTAR	x
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR TABEL	xx
DAFTAR LAMPIRAN	xxi
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah Penelitian	6
C. Tujuan Penelitian	7
D. Manfaat Penelitian	7
BAB II LANDASAN PUSTAKA	9
A. Kajian Teori	9
1. Bakteri	9

2.	<i>Ecoenzyme</i>	12
3.	<i>Food Waste</i>	15
4.	Enzim Katalase dan Peroksidase ...	17
5.	Identifikasi Bakteri Secara Molekuler	22
6.	Gen 16S rRNA.....	30
B.	Kajian Penelitian Relevan	34
C.	Kerangka Berpikir	42
BAB III	METODE PENELITIAN	43
A.	Tempat dan Waktu Penelitian	43
1.	Jenis Penelitian.....	43
2.	Tempat Dan Waktu Penelitian.....	44
B.	Alat dan bahan	44
1.	Alat.....	44
2.	Bahan.....	45
C.	Metode	46
1.	Pembuatan <i>Ecoenzyme</i>	46
2.	Persiapan Sampel	47
3.	Pengujian Enzim Katalase dan Peroxidase	48
4.	Uji BLOKIMIA	50

5.	Ekstraksi Genom Bakteri	52
6.	Amplifikasi Gen 16S rRNA	57
7.	Elektroforesis.....	58
8.	Analisis Data	60
BAB IV HASIL dan PEMBAHASAN		64
A.	Hasil Penelitian	64
1.	Isolasi Bakteri	64
2.	Karakterisasi Isolat Bakteri.....	66
3.	Uji Biokimia.....	73
4.	Identifikasi molekuler menggunakan Gen 16S rRNA.....	76
5.	Sekuensing dan Analisis Data.....	78
B.	Pembahasan Hasil Penelitian	93
1.	Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Katalase Peroksidase.....	93
2.	Karakterisasi Morfologi	94
3.	Uji Biokimia.....	101
4.	Identifikasi molekuler menggunakan Gen 16S rRNA.....	106
5.	Sekuensing dan Analisis Data.....	111
BAB V KESIMPULAN.....		125
A.	Kesimpulan.....	125

B. Saran	126
DAFTAR PUSTAKA	128
LAMPIRAN	156
RIWAYAT HIDUP	166

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Morfologi koloni Bakteri.....	10
Gambar 2.2 Bakteri <i>Bacillus</i> sp. dengan Perbesaran 400 X	11
Gambar 2.3 <i>Ecoenzyme</i>	13
Gambar 2.4 Diagram data sampah berdasarkan sumbernya.....	16
Gambar 2.5 Reaksi Enzim Katalase.....	19
Gambar 2.6 Hasil Positif Bakteri Penghasil Enzim Katalase Secara Kualitatif yang Menghasilkan Gelembung Gas	20
Gambar 2.7 Proses PCR pada DNA	25
Gambar 2.8 Hasil Elektroforesis pada sampel isolasi DNA	27
Gambar 2.9 Skema Struktur Gen 16S rRNA....	31
Gambar 2.10 Wilayah dan Siklus pada Gen 16S rRNA.....	32
Gambar 2.11 Identifikasi menggunakan 16S rRNA.....	33
 Gambar 4.1 Hasil isolasi bakteri pada <i>ecoenzyme</i> dari <i>food waste</i> dengan kode isolat A, B dan C64	
Gambar 4.2 Hasil Purifikasi Isolat bakteri pada <i>ecoenzyme</i>	65

Gambar 4.3 Hasil Gram negatif isolat A dan Gram positif isolat B dan C (kanan) berbentuk batang bakteri pada <i>ecoenzyme</i> dari <i>food waste</i> dengan Perbesaran 400x.....	69
Gambar 4.4 Hasil uji katalase positif pada isolat pada <i>ecoenzyme</i> dari <i>food waste</i> dengan kode isolat A, B dan C.....	70
Gambar 4.5 Hasil uji peroksidase pada tiap isolat A, B dan C	71
Gambar 4.6 Hasil visualisasi isolasi DNA isolat A, B dan C (kiri). Hasil PCR isolat A dan B	77
Gambar 4.7 Pola <i>peak</i> hasil sekuensing yang bagus <i>forward</i> sekuen isolat B	80
Gambar 4.8 Pola <i>peak</i> hasil sekuensing yang bagus <i>reverse</i> sekuen isolat B.....	80
Gambar 4.9 Pola <i>peak</i> hasil sekuensing yang tidak bagus	81
Gambar 4.10 Hasil pohon filogenik menggunakan metode maximum likelihood menggunakan substitusi 2- kimura.....	84
Gambar 4.11 Hasil pohon filogenik menggunakan metode UPGMA dengan substitusi substitusi <i>p-distance</i>	85

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Karakter hasil isolat bakteri pada <i>ecoenzyme</i> dari <i>food waste</i> dengan kode isolat A, B dan C	66
Tabel 4.2 Hasil uji peroksidase menggunakan spektrofotometer UV - Vis.	72
Tabel 4.3 Hasil Uji Biokimia pada <i>ecoenzyme</i>	74
Tabel 4.4 Hasil BLASTn isolat B.....	82
Tabel 4.5 Hasil komposisi nukleotida isolat B88	
Tabel 4.6 Hasil jarak genetik isolat <i>ecoenzyme</i> dengan sekuen pembanding menggunakan parameter 2- Kimura	91
Tabel 4.7 Vasil variasi genetik.....	92

DAFTAR LAMPIRAN

Gambar Lampiran 1.1 Persiapan Sampel <i>Ecoenzyme</i> dan persiapan media pertumbuhan bakteri.....	156
Gambar Lampiran 1.2 Persiapan Media Pertumbuhan Bakteri	156
Gambar Lampiran 1.3 Pengujian Enzim Katalase Dan Peroksidase.....	157
Gambar Lampiran 1.4 Isolasi DNA Bakteri..	157
Gambar Lampiran 1.5 Proses Visualisasi Menggunakan elektroforesis.....	158
Gambar Lampiran 1.6 Proses PCR.....	158
Gambar Lampiran 1.7 Hasil Blastn sekuen isolat B.....	159
Gambar Lampiran 1.8 Hasil MEGA XI sekuen isolat B.....	159
Gambar Lampiran 1.9 Hasil Aligmen Sekuen Isolat B	160
Gambar Lampiran 1.10 Hasil Komposisi Basa Nitrogen Isolat B	160
Gambar Lampiran 1.11 Hasil jarak genetik isolat <i>ecoenzyme</i> dengan sekuen pembanding menggunakan p- distance	161
Gambar Lampiran 1.12 Sekuen contig isolat B	161

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Limbah makanan (*Food Waste*) menjadi masalah global yang mempunyai dampak negatif terhadap lingkungan, dan masyarakat secara keseluruhan karena membahayakan keamanan pangan dan kelangsungan rantai pasokan makanan dalam jangka panjang (Saputri *et al.*, 2018). Sampah makanan di Indonesia meningkat menjadi 1,3 juta ton per tahun atau 300 kg per orang. Sampah sebanyak 1,3 juta ton itu bernilai Rp 27 triliun jika diubah menjadi uang tunai. Sebaliknya, 19,6 juta orang di Indonesia berjuang melawan malnutrisi, makanan ini mungkin dapat bermanfaat bagi 28 juta penduduk Indonesia setiap tahunnya (Usman, 2020).

Perilaku pemborosan makanan sering dikaitkan dengan aktivitas sehari-hari di rumah. BAPPENAS (Badan Perencanaan Pembangunan Nasional) (2022) menunjukkan bahwa 38,3% sampah makanan di Indonesia terjadi oleh rumah tangga dalam tahap konsumsi dan memiliki korelasi yang tinggi dan perilaku konsumen (Parfitt *et al.*, 2010). Berdasarkan penelitian SIPSAN (Sistem Informasi Pengelolaan Sampah Nasional Indonesia), menghasilkan 69,9 juta ton sampah pada tahun 2023. Sampah plastik menyumbang 18,71% dari

sampah Indonesia, sedangkan sampah makanan menyumbang 41,60%.

Sebuah cara berpikir baru tentang sampah yang menggambarkan sebagai sesuatu yang memiliki nilai ekonomis dan dapat dimanfaatkan, seperti tenaga listrik, bahan pupuk, atau bahan pengelolaan industri. Apabila suatu produk pada akhirnya menjadi limbah, maka produk tersebut sebaiknya dapat digunakan dan dibuang kembali ke lingkungan dengan aman (Prabekti, 2020).

Salah satu upaya yang dilakukan dalam mengatasi masalah sampah dapur dan sampah *food waste* yaitu dengan membuat pupuk yang berbahan organik. *Food and Agriculture Organization* (FAO) Pada tahun 2003, seorang Dokter Thailand bernama Dr. Rosukon Poompanvong mendapat pujian karena mengembangkan *ecoenzyme* yang terbuat dari fermentasi sampah dapur organik, terdiri dari air, gula (merah, atau tebu) (Megah *et al.*, 2018). *Ecoenzymes* adalah cara yang ramah lingkungan dan mudah digunakan untuk mengurangi sampah rumah tangga, khususnya sampah organik (Mahali *et al.*, 2022).

Sebagai bahan organik yang difermentasi oleh mikroba, aktivitas enzim menyebabkan terciptanya alkohol dan gas CO₂. Sifat-sifat produk biologi diubah dengan metode ini (Larasati, 2020). *Ecoenzyme* tercipta secara alami melalui fermentasi limbah buah dan sayuran oleh bakteri anaerob. *Ecoenzyme*

adalah metode penanganan sampah yang mengubah sisa makanan menjadi sesuatu yang bermanfaat bagi lingkungan dengan mempercepat peristiwa biologis di alam untuk menghasilkan enzim yang membantu mempercepat fermentasi sampah organik (Chandra *et al.*, 2020).

Unsur hara makro dan mikro yang berasal dari bahan organik, bersama dengan enzim amilase, protease, asam propionat, asam asetat, protease dan asam karbonat membentuk *ecoenzyme* (Galintin *et al.*, 2021). Komposisi kimia dan karakteristik sumber senyawa kimia yang digunakan untuk membuat *ecoenzyme* dari limbah buah dan sayuran berbeda-beda, sehingga mempengaruhi produk akhir (Glinton *et al.*, 2021). Menurut Megah (2018) *ecoenzyme* memiliki banyak manfaat untuk kehidupan sehari-hari misalnya sebagai pupuk organik, pestisida, insektisida, dan larutan pembersih misalnya sabun cuci piring, pembersih lantai, sampo, dan sabun mandi (Prasetio *et al.*, 2021).

Diantara komponen *ecoenzyme* adalah enzim katalase dan peroksidase, yang membantu pemecahan kelebihan hidrogen peroksida. Enzim katalase dan peroksidase dapat memecah kelebihan hidrogen peroksida dari tanaman menjadi oksigen dan udara (Cappuccino, 2001). Enzim katalase berfungsi sebagai pertahanan terhadap racun dan zat berbahaya pada

mahluk hidup (Philips, 2009). Aktivitas enzim peroksidase juga membuat tanaman lebih tahan penyakit. Menurut Passardi (2005) ketahanan tanaman terhadap penyakit meningkat seiring dengan aktivitas enzim peroksidase. Lignifikasi dinding sel merupakan cara kerja sistem pertahanan dalam mencegah penyakit pada tumbuhan (Van vuuren, 1988).

Salah satu sumber katalase dan peroksidase berasal dari mikroorganisme, seperti bakteri dari genus *Enterobacter*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, dan *Neisseria* (Sayuti *et al*, 2016). Banyaknya manfaat dan kemudahan yang diberikan, membuat para peneliti saat ini memilih pendekatan molekuler sebagai salah satu cara untuk mengidentifikasi bakteri (Bottger, 1989).

Metode yang paling banyak digunakan untuk mengidentifikasi bakteri yaitu dengan 16S rRNA sebagai penanda. Gen 16S rRNA memiliki kawasan yang dilestarikan sepanjang 1.550 bp (Clarridge, 2004). Metode pemanfaatan 16S rRNA memiliki kelebihan, termasuk kemampuan untuk meneliti bakteri yang tidak bisa dibiakkan dalam media kultur, akurasi yang sangat baik, dan waktu penyelesaian yang relatif singkat. (Akihary, 2020). Selain kelebihan tersebut, identifikasi bakteri menggunakan 16S rRNA juga memiliki beberapa kekurangan, di antaranya ketidakmampuan untuk

mengidentifikasi jenis morfologi dan anatomi bakteri, meskipun ada kesamaan urutan genetik. (Sacchi *et al.*, 2002).

Gen 16S rRNA dipilih dalam mengidentifikasi bakteri karena sifatnya yang universal dalam melihat hubungan filogeni antar spesies bakteri (Woese *et al.*, 1985). Membandingkan urutan gen 16S rRNA secara umum memungkinkan adanya perbedaan tingkat genus antar organisme di semua filum bakteri utama, dengan maksud untuk mengklasifikasikan strain pada beberapa tingkatan, termasuk tingkat spesies dan subspecies (Clarridge, 2004). Variasi sekuens sering digunakan untuk mengidentifikasi spesies pada spesies mikroba prokariotik, termasuk bakteri dan *archaea*, sebagai dasar untuk mengetahui keanekaragaman bakteri dalam suatu lingkungan (Schmeisser *et al.*, 2007). Urutan basa memiliki beberapa wilayah yang relatif konservatif serta beberapa wilayah dengan variasi urutan basa yang tinggi. (Stackebrandt, 1995).

Beberapa penelitian terkait dengan aktivitas enzim yang terdapat pada *ecoenzyme* telah dilakukan, seperti penelitian oleh Ningtyas (2022) yang mengidentifikasi bakteri amilolitik yang berasal dari *ecoenzyme* secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA dan penelitian Susnawita (2022) yang mengidentifikasi kandungan enzim amilase, protease dan

lipase pada *ecoenzyme* menggunakan metode titrasi untuk menguji kandungan enzim yang terdapat di dalamnya. Penelitian tentang identifikasi bakteri penghasil enzim katalase dan peroksidase dari *ecoenzyme* yang berasal dari food waste masih jarang dilakukan, dan belum banyak yang menggunakan gen 16S rRNA untuk mengidentifikasi jenis bakteri tersebut.

Berdasarkan latar belakang tersebut identifikasi bakteri penghasil enzim katalase dan peroksidase pada *ecoenzyme* dari *food waste* menggunakan gen 16S rRNA belum banyak dilakukan. Penggunaan gen 16S rRNA dapat digunakan untuk identifikasi bakteri tersebut dengan lebih pasti. Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri penghasil enzim katalase dan peroksidase menggunakan gen 16S rRNA. Diharapkan dapat bermanfaat dalam mengidentifikasi bakteri penghasil enzim katalase dan peroksidase pada *ecoenzyme* dari *food waste*, serta mendukung pemanfaatan *ecoenzyme* sebagai sumber agen biokontrol alami.

B. Rumusan Masalah Penelitian

1. Berapa jumlah isolat bakteri penghasil enzim Katalase dan Peroksidase pada *ecoenzyme* dari *food waste*?

2. Bagaimana hasil identifikasi spesies bakteri penghasil enzim Katalase dan Peroksidase pada *ecoenzyme* dari *food waste* menggunakan DNA marker 16S rRNA?

C. Tujuan Penelitian

1. Berapa jumlah isolat bakteri penghasil enzim Katalase dan Peroksidase pada *ecoenzyme* dari *food waste*.
2. Mengidentifikasi spesies bakteri pada *ecoenzyme* dari *food waste* penghasil enzim Katalase dan Peroksidase menggunakan DNA marker 16S rRNA.

D. Manfaat Penelitian

1. Manfaat teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi secara teoritis dalam memperkaya kajian ilmiah di bidang mikrobiologi dan bioteknologi pertanian, khususnya mengenai peran bakteri penghasil enzim katalase dan peroksidase dalam mekanisme pertahanan tanaman terhadap serangan patogen. Hasil penelitian ini juga dapat menambah referensi ilmiah terkait pemanfaatan *ecoenzyme* sebagai sumber agen biokontrol alami yang mendukung konsep pertanian ramah lingkungan dan berkelanjutan.

2. Manfaat praktis

- a. Bagi peneliti

Penelitian ini bermanfaat untuk menambah pengetahuan terkait *Plant Growth Promoting Rhizobia* serta menjadi kesempatan untuk secara langsung mempraktekkan ilmu yang

telah didapatkan di bangku perkuliahan dalam bidang riset mikrobiologi, molekuler.

b. Bagi masyarakat

Manfaat penelitian ini diharapkan dapat menjadi gambaran umum untuk mengetahui bakteri penghasil enzim katalase dan peroksidase yang bermanfaat bagi masyarakat.

c. Bagi instansi

Penelitian ini meningkatkan reputasi institusi sebagai pusat riset biologi yang inovatif dan berorientasi pada solusi. Sehingga diharapkan meningkatkan visibilitas dan minat para peneliti serta mahasiswa dalam bidang mikrobiologi, fisiologi tumbuhan serta molekuler.

BAB II LANDASAN PUSTAKA

A. Kajian Teori

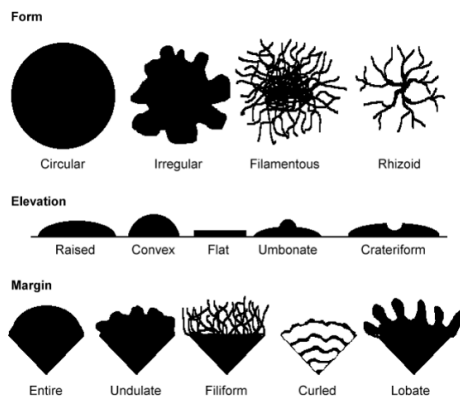
1. Bakteri

Bakteri adalah organisme bersel satu atau uniseluler yang tidak memiliki membran inti atau prokariotik, tidak memiliki klorofil, dan bereproduksi menggunakan pembelahan sel, atau reproduksi aseksual. Karena ukuran bakteri yang kecil, pengamatan bakteri memerlukan bantuan mikroskop (Putri *et al*, 2017). Bakteri dapat hidup bebas, parasitik, saprofitik, patogen pada manusia dan hewan. Beberapa jenis bakteri bahkan hidup di dalam tubuh manusia sebagai flora normal (Suryani *et al*, 2021).

Pemberian nama bakteri mencakup nama genus, spesies, dan galur (strain). Nama spesies terkadang mencerminkan karakteristik, warna, atau orang yang menemukannya. Sebagai contoh Bakteri tergolong dalam kelas *Schizomycetes* dan terdiri dari beberapa ordo, yaitu *Pseudomonadales*, *Eubacteriales*, *Actinomycetales*, *Myxobacteriales*, dan *Spirochaetales*. *Bacillus stearothermophilus* (bersifat termofilik) *Mycobacterium tuberculosis* (penyebab tuberkulosis) *Streptococcus albus* (berwarna putih), *Clostridium welchii*, dan *Propionibacterium shermanii* (Sari, 2010).

Dalam *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Sari (2010) menegaskan bahwa bakteri diklasifikasikan berdasarkan morfologinya, karakteristik pewarnaan Gram, dan kebutuhan oksigen. Pengelompokannya adalah sebagai berikut:

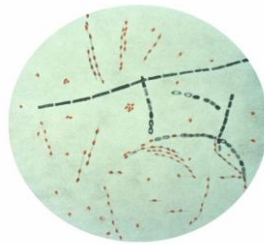
- a. Bakteri yang bersifat aerob dan bakteri Gram Negatif
- b. Fakultatif bakteri anaerob dan Gram Negatif.
- c. Basil anaerob Gram Negatif
- d. Coccobacilli dan basil Gram Negatif
- e. Bakteri koki yang Gram Positif
- f. Gram Positif pada basil non-sporulasi
- g. Bakteri yang mengandung spora atau Gram Positif
- h. Bakteri sel bercabang



Gambar 2. 1 Morfologi koloni Bakteri
(Leboffe, 2012)

Bakteri dikategorikan menjadi dua kategori: Gram Positif atau Gram Negatif menurut kemampuannya menyerap pewarna gram. Bakteri gram positif mengambil pewarna awal, kristal violet, yang memberi mereka tampilan ungu. Sebaliknya, bakteri Gram negatif menjadi merah karena menyerap safranin (Sari, 2014).

Bakteri yang ada di sampah organik atau *food waste* yaitu bakteri dengan genus *Enterobacter*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, dan *Neisseria* (Sayuti *et al*, 2016). Berdasarkan kajian bakteri dengan genus *Streptococcus* lebih dominan dan banyak dijumpai pada jenis sampah organik karena pertumbuhannya lebih cepat dan dalam jumlah yang tinggi.



Gambar 2. 2 Bakteri *Bacillus* sp. dengan Perbesaran 400 X
(Koehler, 2009)

Kapasitas bakteri yang memiliki enzim katalase untuk mengubah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 membantu menurunkan dan sebagai pertahanan dari partikel hidrogen peroksida.

Enzim katalase, yang dapat mengubah hidrogen peroksida menjadi oksigen dan udara, dilepaskan sebagai bagian dari prosedur ini (Wati, 2020).

Pelarutan H_2O_2 menjadi oksigen dan udara dibantu oleh enzim katalase bakteri katalase adalah hemoprotein ke empat kelompok heme, sehingga dapat bereaksi dengan molekul peroksida. Bakteri dapat menghasilkan hidrogen peroksida dalam situasi tertentu. Hidrogen peroksida merupakan racun yang dapat merusak metabolisme bakteri. Jika bakteri tidak mampu mengubah hidrogen peroksida menjadi senyawa yang tidak berbahaya, mereka akan mengalami kematian. Proses penguraian ini dapat terjadi jika terdapat enzim katalase (Cappuccino, 2001). Rumus kimia senyawa peroksida adalah H_2O_2 merupakan molekul kimia yang sangat merusak sel dan mempunyai sifat oksidan yang keras. Mutasi sel dapat timbul dari penumpukan peroksida di dalam sel.

2. *Ecoenzyme*

Ecoenzyme adalah larutan yang terbuat dari limbah bahan organik yang telah difermentasi. Larutan ini berwarna coklat gelap dan memiliki aroma asam segar yang khas (Hemalatha, 2020). Bahan organik terbuat dari sisa buah dan sayur, antara lain kulit mangga, jeruk, dan nanas, dapat digunakan untuk membuat *ecoenzyme*. Kulit buah salak, durian, dan alpukat tidak dapat dimanfaatkan karena kadar airnya sangat rendah,

sehingga memerlukan waktu yang lebih lama untuk terurai (Supriyani, 2020).

Ecoenzyme adalah larutan hasil fermentasi yang berwarna coklat gelap dan memiliki aroma asam yang kuat. Penelitian tentang *ecoenzyme* ini ditemukan oleh Dr. Rosukon Poompanvong, seorang dokter asal Thailand, dengan tujuan membantu petani mendapatkan hasil panen yang lebih unggul dan ramah lingkungan. *Ecoenzyme* diproduksi dengan menggunakan sampah organik sebagai sumber baku dan air serta gula sebagai substrat. *Ecoenzyme* dapat menjadi alternatif pupuk organik cair yang ramah lingkungan yang dapat mempercepat perkembangan tanaman (Megah *et al.*, 2018).



Gambar 2. 3 *Ecoenzyme*

(Orami.co.id)

Ecoenzyme membutuhkan waktu sekitar tiga bulan untuk proses fermentasi dan membutuhkan ember tertutup atau botol bekas untuk memudahkan fermentasi (Supriyani *et al.*, 2020).

Reaksi yang terjadi setelah proses fermentasi berlangsung yaitu: $2\text{CO}_2 + \text{N}_2\text{O} + 5\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{NO}_3 + 2\text{CO}_3$. Gas ozon tercipta ketika oksigen bergabung dengan karbon dioksida dan natrium dioksida (O_3), nitrat (NO_3) dan karbon dioksida (CO_3). *Ecoenzyme* akan berkembang setelah proses fermentasi selesai. Selain itu, hasil akhir ini menciptakan residu bahan organik yang tersuspensi (sedimen) di dasar. Limbah ini dapat dimanfaatkan sebagai pupuk organik (Rochyani *et al*, 2020).

Ada beberapa aspek dalam proses pembuatan *ecoenzyme* yang dapat menghasilkan barang berkualitas tinggi, seperti pemilihan komponen utama yang sesuai, seperti buah atau sayuran (Supriyani *et al*, 2020). Kecuali buah dan sayuran matang, *ecoenzyme* dapat dihasilkan dari limbah buah dan sayuran. Gula adalah komponen lain yang dibutuhkan untuk membuat *ecoenzyme* jenis gula yang dapat digunakan seperti gula cair, gula kering, gula aren, gula kelapa, dan gula lontar. Bahan lain yang digunakan adalah air yang bersih seperti air dari sumur atau air dari sumber yang lain.

Ecoenzyme membantu mempercepat pertumbuhan berbagai jenis sayuran dan bermanfaat sebagai pupuk organik cair. Manfaat *ecoenzyme* sendiri adalah dapat menurunkan atau menaikkan pH keasaman tanah dan membatasi jumlah logam berat yang ada (Zhu *et al*. 2020). Karena *ecoenzyme* jauh lebih murah dibandingkan pupuk organik cair, maka *ecoenzyme*

dapat membantu petani mengatasi tingginya harga pupuk organik cair (Ramli, *et al.*, 2021).

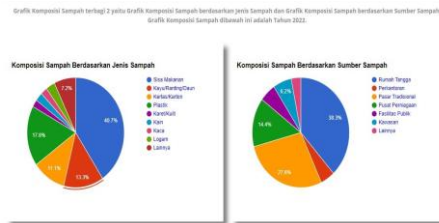
3. *Food Waste*

Food waste atau sampah makanan adalah makanan sisa hasil dari rumah tangga atau industri yang sudah tidak layak untuk di konsumsi. Makanan yang dimasak serta makanan yang layak dijual untuk dikonsumsi merupakan sumber utama sisa makanan. Limbah pangan dapat terjadi pada rantai pasok pangan, mulai dari titik produksi hingga konsumsi, (Wahyono, 2019). Buah-buahan dan sayur-sayuran, buah-buahan, daging, kaleng, dan makanan beku yang sudah rusak dan dibuang merupakan sisa makanan.

Munculnya sampah makanan dapat menyebabkan ketidakseimbangan lingkungan. Menurut FAO (2019), sampah makanan memiliki dampak buruk yang signifikan terhadap lingkungan. 4,4 giga ton limbah makanan dihasilkan secara menyeluruh di dunia, yang merupakan sekitar 8% dari seluruh emisi gas rumah kaca. Sampah makanan menyumbang 21% dari total ruang pembuangan sampah di AS pada tahun 2013. Selain itu, sampah makanan yang menyumbang 23% emisi terurai di tempat pembuangan sampah, sehingga menjadi salah satu kontributor utama.

Penelitian menunjukkan bahwa 40% sampah sisa berasal dari produk pertanian. Sayuran dan buah-buahan mempunyai

potensi besar dalam menurunkan sampah makanan (Herrero *et al.*, 2019). Salah satu penelitian bertujuan untuk menginvestigasi pengaruh kondisi pasar, lokasi pasar, serta interaksi antara keduanya terhadap konsumen dalam membeli sayuran (Masyithoh *et al.*, 2017).



Gambar 2. 4 Diagram data sampah berdasarkan sumbernya
(BPS , 2022)

Direktur Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan menyatakan bahwa sampah rumah tangga merupakan penyumbang sebagian besar sampah makanan (38,3%), pengelolaan sampah yang efektif harus dimulai dari tingkat rumah tangga (Alfarizi, 2020). Residu dan sisa pengolahan pangan merupakan sumber sisa pangan, oleh karena itu pengurangan jumlah sampah pangan yang dibuang ke lingkungan memerlukan tindakan yang metodis. Sampah rumah tangga telah dimanfaatkan untuk berbagai tujuan, seperti pembuatan *ecoenzyme*, kompos organik, dan pakan ternak. Salah satu yang dilakukan dalam mengatasi sampah

rumah tangga yaitu dengan menjadikan pupuk cair. Sampah organik yang difermentasi dapat digunakan untuk membuat pupuk organik cair (Indriani, 2004). Selain itu kandungan dari limbah buah buahan yang meliputi Nitrogen, Fosfor, Vitamin, Zing, yang bermanfaat bagi tanah dalam proses penyerapan dan memperbaiki struktur tanah (Syarifudin, 2024).

4. Enzim Katalase dan Peroksidase

Molekul protein yang disebut enzim memiliki kemampuan untuk mempercepat proses kimia dalam sistem biologis makhluk hidup. Demand (1989) menyebut bahwa enzim adalah elemen tambahan yang berkontribusi terhadap banyak aspek perubahan kualitas pangan. Dalam dunia industri enzim memiliki peran yaitu sebagai pengawet dan meningkatkan masa simpan makanan enzim tersebut enzim peroksidase (Al-baarri *et al.*, 2015) selain digunakan sebagai pengawet enzim peroksidase juga dapat meningkatkan kandungan antioksidan (Cahyana *et al.*, 2006).

Enzim peroksidase termasuk dalam kategori oksidoreduktase, yang meliputi enzim yang dapat mengkatalisis proses oksidasi atau reduksi suatu zat, menurut Marganingsari (2003). Enzim oksidase dan dehidrogenase adalah dua sub kelompok yang memisahkan kategori ini. Salah satu jenis enzim oksidase yang dapat mengkatalisis reaksi antara molekul oksigen dan substrat adalah peroksidase.

Enzim ini berfungsi paling baik dengan jenis substrat tertentu yang memiliki karakteristik yang khas (Ardjito, 2014). Kemampuan suatu enzim untuk berdiferensiasi dalam substratnya berdasarkan perubahan afinitas substrat terhadap situs aktif enzim disebut sifat spesifik, dan spesifisitas enzim (August, 2000). Substrat Peroksida yang terbuat dari hidrogen merupakan substrat enzim peroksidase dan bahan aktifnya (H_2O_2). Peroksidase menguraikan hidrogen peroksida menjadi H_2 dan $\text{O}^\cdot$ (Deman, 1989). Menurut Al-Barari *et al.*, peroksidase dapat menghasilkan senyawa *hypothiocyanite* (OSCN^-) jika di gabung dengan H_2O_2 dan SCN^- . Enzim peroksidase dapat diperoleh dari berbagai jenis jaringan baik dari tanaman, hewan dan jamur (Balasubramanian, 2013).

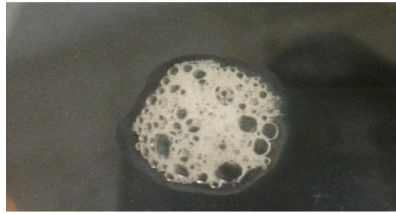
Organisme tubuh termasuk molekul peroksida, yang dipecah oleh enzim katalase akan memecah hidrogen peroksida melalui beberapa langkah dan dipecah menjadi oksigen dan air (Sumardjo, 2009). Hidrogen peroksida, merupakan racun bagi bakteri itu sendiri, yang diproduksi oleh mikroorganisme yang bergantung pada oksigen (Mirsa *et al.*, 2009). Bakteri bertahan dengan anti-metabolit karena mereka menghasilkan enzim katalase, yang dapat mengubah hidrogen peroksida menjadi oksigen dan udara melalui proses tersebut.



Gambar 2. 5 Reaksi Enzim Katalase

(Silvia, 2009)

Katalase adalah enzim yang berfungsi untuk menguraikan hidrogen peroksida menjadi H_2O dan O_2 (Lay, 1994). Hidrogen peroksida memiliki kemampuan untuk menonaktifkan enzim seluler, yang berbahaya bagi sel. Pemecahan hidrogen peroksida dapat dikatalisis oleh enzim katalase. (H_2O_2) melalui cara kerja katalitik dan peroksidatif (Silvia, 2009). Jenis enzim yang dapat menguraikan hidrogen peroksida adalah enzim katalase, jika hidrogen peroksida (H_2O_2) tidak diuraikan oleh sel akan menyebabkan kematian. Oleh karena itu, enzim katalase sangat penting untuk mengubah hidrogen peroksida menjadi oksigen dan air. (Kumar *et al.*, 2008). Untuk melindungi sel dari kerusakan oksidatif, enzim katalase akan mengkatalisis pemecahan hidrogen peroksida menjadi oksigen dan udara (Mirsa *et al.*, 2009).



Gambar 2. 6 Hasil Positif Bakteri Penghasil Enzim Katalase
Secara Kualitatif yang Menghasilkan Gelembung Gas

(Shafwan, 2018)

Uji katalase akan menunjukkan hasil positif adanya gelembung pada gelas objek. Gelembung oksigen tersebut muncul berdasarkan reaksi yang melibatkan H_2O_2 . Bakteri tidak dapat melepaskan hidrogen peroksida menjadi senyawa yang tidak berbahaya, hidrogen peroksida dapat berperan sebagai racun atau merusak sistem metabolisme bakteri. Namun, jika bakteri memiliki enzim katalase, proses penguraian dapat dilakukan. Bakteri dapat hidup dengan mengubah hidrogen peroksida menjadi oksigen dan air melalui enzim katalase. Koloni bakteri yang ditetesi hidrogen peroksida (H_2O_2) akan menghasilkan gelembung, menandakan bahwa bakteri bersifat aerobik yaitu, mereka memerlukan oksigen untuk tetap hidup. Secara umum, enzim katalase dibuat oleh semua makhluk hidup secara aerobik (H. Liu *et al.*, 2017).

Mekanisme enzim katalase adalah menguraikan H_2O_2 saat bakteri melakukan respirasi. Enzim katalase, yang merupakan bagian dari enzim peroksidase, akan membentuk pertahanan dengan mengkatalisis hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi H_2O dan gas O_2 , sehingga sifat beracun dari hidrogen peroksida akan hilang (Santoyo *et al.*, 2016).

Kemanfaatan mikroba dan peranannya secara umum termasuk sebagai penghasil enzim katalase dan peroksidase merupakan salah satu contoh dari hikmah ciptaan Allah. Allah berfirman dalam ayat Al-qur'an dalam Surah Shad Ayat 27 :

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَاطِلًا ۚ ذَٰلِكَ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا فَوَيْلٌ لِلَّذِينَ
كَفَرُوا مِنَ النَّارِ ۚ

Dan kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada di antara keduanya dengan sia-sia. Itu anggapan orang-orang kafir, maka celakalah orang-orang yang kafir itu karena mereka akan masuk neraka.

As-Suyuthi (1994) dalam tafsir Jalalain menjelaskan bahwa semua ciptaan Allah SWT pasti memiliki hikmah termasuk enzim. Enzim dapat diproduksi oleh tanaman, hewan dan mikroba, tetapi enzim mikroba memiliki hasil yang lebih tinggi dan lebih mudah untuk diperbaiki (Jarosch, 2019).

Mikroba seperti jamur dan bakteri sering digunakan untuk menghasilkan enzim (Lestari *et al.*, 2018). Dalam surat Shad ayat 27 dijelaskan Allah SWT menciptakan semuanya itu tanpa

sia sia jadi semua ciptaannya itu memiliki manfaat salah satunya enzim yang dihasilkan dari mikroorganisme. Unsur-unsur seperti hidrogen dan oksigen bergabung membentuk manusia, hewan, dan tumbuhan. Hal ini dapat digunakan untuk menjelaskan lebih lanjut mengapa makhluk hidup mengandung bakteri dan mikroorganisme lain yang dapat dipelajari bersama dengan manusia, hewan, dan tumbuhan.

5. Identifikasi Bakteri Secara Molekuler

Standar baru identifikasi bakteri mulai dikembangkan pada tahun 1980an. Para peneliti menemukan adanya hubungan filogenetik pada bakteri yang dapat diketahui lewat perbandingan daerah tertentu dari kode genetik yang dihasilkan meliputi gen 5S, 16S dan 23S rRNA (Woese *et al.*, 1985). Diantara ketiga gen tersebut, 16S rRNA (*Ribosomal Ribonucleic Acid*) merupakan yang paling banyak digunakan untuk identifikasi bakteri karena gen 5S dan 23S dinilai terlalu sulit untuk digunakan. Selain untuk identifikasi, gen yang mengkodekan rRNA digunakan juga untuk penentuan filogeni, taksonomi, dan memperkirakan jarak keragaman antar spesies bakteri (Akihary, 2020). Langkah-langkah dalam identifikasi bakteri secara molekuler terdiri dari ekstraksi DNA, amplifikasi dengan gen 16S rRNA, elektroforesis, sekuensing DNA, dan analisis bioinformatika (Noer, 2021).

a) Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA adalah metode yang digunakan untuk memurnikan DNA dengan menerapkan teknik fisik dan/atau kimia dari sampel, serta memisahkan DNA dari membran sel, protein, dan komponen seluler lainnya. Friedrich Miescher pada tahun 1869 merupakan orang pertama yang melakukan ekstraksi DNA. Prinsip utama dari ekstraksi DNA melibatkan pelisisan sel dan pelarutan DNA yang diikuti dengan metode kimia atau enzimatik untuk menghilangkan makromolekul, lipid, RNA, atau protein pengotor (Gupta, 2019).

Proses lisis bertujuan melepas DNA dari sel dengan cara menghancurkan membran sel dengan komponen utama sel bakteri, peptidoglikan, akan dipecah oleh enzim lysozyme dan SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) kemudian akan digunakan untuk mengenkripsi lapisan lemak pada membran sel. Langkah terakhir adalah menghilangkan protein dari DNA dengan menambahkan proteinase K yang dapat mengendapkan protein (Clark, 2016).

b) *Polymerase chain reaction* (PCR)

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dikenal sebagai salah satu teknik yang digunakan untuk memperbanyak segmen DNA tertentu secara *in vitro* (Ghannam, 2022). Metode PCR dapat menghasilkan jutaan salinan fragmen DNA tertentu dari beberapa μ l DNA *template* (Kadri, 2019). Teknik PCR

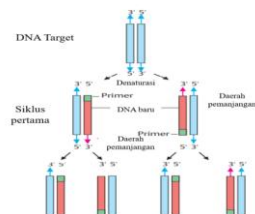
didasarkan pada replikasi DNA secara enzimatis. Melalui teknik PCR, segmen pendek DNA akan diamplifikasi menggunakan enzim yang dimediasi primer. Selanjutnya DNA polimerase akan mensintesis untai DNA baru yang komplementer dengan DNA *template* (Joshi, 2011).

Dalam proses PCR, diperlukan komponen utama yang terdiri dari: DNA *template*, primer, buffer, nukleotida (dNTP), dan enzim Taq polimerase. DNA *template* adalah DNA yang telah diekstraksi dan akan diperbanyak. Primer, di sisi lain, adalah fragmen DNA dengan ukuran 18-30 basa yang bersifat komplementer terhadap fragmen DNA *template* yang akan diperbanyak (Ghannam, 2022). Primer berfungsi sebagai titik awal replikasi, pembatas fragmen DNA target yang akan diperbanyak, serta penyedia gugus hidroksil ($-OH$) pada ujung 3' untuk proses eksistensi DNA (Eling Sasmito *et al.*, 2014).

Enzim Taq polimerase berperan dalam sintesis dan amplifikasi untai DNA. Penggunaan enzim ini perlu disesuaikan dengan buffer dan DNA *template* yang digunakan. Penggunaan yang berlebihan dapat menyebabkan amplifikasi DNA pada sekuens yang bukan target, sehingga menghasilkan produk yang tidak spesifik. Enzim Taq polimerase diisolasi dari bakteri *Thermus Aquaticus* yang tahan panas (Engelke *et al.*, 1990). *Deoxynucleotide triphosphate* (dNTP) merupakan campuran yang mengandung dATP (*deoxyadenosine*

triphosphate), DGTP (*deoxyguanosine triphosphate*), DCTP (*deoxycytidine triphosphate*), dan DTTP (*deoxythymidine triphosphate*) bekerja sebagai elemen metode yang dikenal sebagai PCR. DNTP akan menempel pada gugus -OH di ujung 3' primer untuk membentuk untai komplementer pada cetakan DNA (Mohsen *et al.*, 2019). Reaksi PCR membutuhkan PH tertentu agar bisa berjalan, sehingga memerlukan buffer PCR. Selain itu diperlukan juga ion Mg^{2+} yang didapat dari $MgCl^2$ yang berfungsi sebagai kofaktor untuk proses stimulasi DNA polimerase (Schmidt *et al.*, 2014).

Proses PCR dibagi menjadi tiga fase: *denaturation*, *annealing*, dan *extension*. Amplifikasi eksponensial menjadi mungkin karena hasil setiap langkah sintesis berfungsi sebagai templat untuk langkah berikutnya. Menurut Hou *et al.*, (2018); Sebastião *et al.*, (2015); Yuan *et al.*, (2016) fase *pre-denaturation* dan *final extension* di tambahkan dalam penelitiannya.

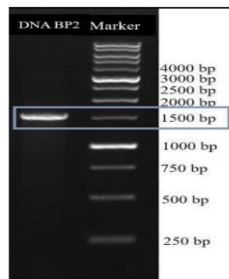


Gambar 2. 7 Proses PCR pada DNA
(Passarge, 2007)

Pada tahap denaturasi, dua untai DNA dipisahkan dengan memanaskannya pada suhu 94-95°C untuk melepaskan ikatan hidrogen antar untai DNA sehingga diperoleh DNA beruntai tunggal (*single-strand*) (Ghannam, 2022). Primer menghubungkan (*annealing*) ke cetakan DNA pada tahap kedua setelah DNA dipecah menjadi satu untai. Proses tersebut terjadi dengan kisaran suhu 36-72°C (Korbie & Mattick, 2008). Menurut Strien (2013) *annealing* bekerja pada suhu antara 40-60°C, tetapi jika DNA *template* GC memiliki kandungan yang tinggi maka suhu akan ditingkatkan menjadi 72°C. Hal ini karena semakin banyak kandungan basa G dan C ikatan hidrogen nya akan semakin kuat. Tahap PCR ketiga dilakukan pada suhu 72°C, yang disebut pemanjangan. Enzim taq polimerasenya akan mengikat DNA dengan untai tunggal yang membentuk dan mengkatalisis replikasi pada suhu 72°C menggunakan deoksinukleotida trifosfat yang ada dalam campuran reaksi, jumlah DNA yang dapat dianalisis (sekitar 0,1 µg) memerlukan 20–40 siklus PCR. Setiap siklus secara teoritis menggandakan jumlah DNA yang ada pada siklus sebelumnya (Kadri, 2019). Beberapa peneliti menyarankan untuk menambahkan siklus pemanjangan terakhir pada suhu 72°C, Urutan yang diperlukan harus berukuran besar lebih besar dari 1 kb untuk hasil yang optimal. (Verkuil *et al.*, 2008).

c) Elektroforesis

Elektroforesis mengacu pada proses pemisahan molekul bermuatan berdasarkan mobilitasnya dalam medan listrik. Elektroforesis digunakan untuk berbagai tujuan seperti pemisahan, pemurnian, dan karakterisasi asam nukleat dan protein. Elektroforesis memanfaatkan molekul bermuatan yang dibiarkan bermigrasi di bawah pengaruh medan listrik menuju elektroda masing-masing baik secara bebas maupun melalui media pendukung seperti gel (Rana *et al*, 2023).



Gambar 2. 8 Hasil Elektroforesis pada sampel isolasi DNA
(Rozaq, 2020)

Elektroforesis gel agarosa adalah teknik yang sering digunakan untuk memisahkan protein, DNA, atau RNA. Molekul asam nukleat kecil membelah oleh medan listrik yang mendorong molekul bermuatan negatif berlawanan arah dengan kutub anoda (positif). Molekul yang lebih kecil bergerak lebih cepat daripada molekul yang lebih besar, dan

aliran migrasi bervariasi berdasarkan berat molekul (Gummadi & Kandula, 2020).

d) DNA Sekuensing

Salah satu kemajuan signifikan dalam biologi molekuler yang memungkinkan pengurutan cepat adalah teknik pengurutan (Muladno, 2002). Pengurutan DNA adalah proses menentukan urutan nukleotida suatu molekul DNA, yang merupakan cara informasi genetik disimpan dalam DNA (Novel *et al.*, 2010). Target DNA yang diamplifikasi PCR akan diurutkan untuk menentukan urutan basa nukleotida yang dikodekan, yang berguna untuk identifikasi spesies. Metode Maxam-Gilbert dan metode Sanger merupakan dua teknik sekuensing yang telah dibuat dan digunakan pertama kali pada tahun 1977.

Meskipun konsep kerja di balik metode kedua ini berbeda, namun kedua teknik tersebut menghasilkan rangkaian yang dimulai di satu tempat dan berakhir tempat yang sama (Novel *et al.*, 2010). Metode sanger banyak dikembangkan karena lebih mudah, praktis, dan berhasil. (Muladno, 2002), metode Sanger saat ini menjadi metode pilihan untuk pengurutan DNA (Arkham, 2015).

Metode Maxam-Gilbert menggunakan proses degradasi kimia, sedangkan metode Sanger menggunakan teknik terminasi rantai untuk pengurutannya (Brown, 2002 dalam Arham, 2015).

Kode DNA yang diperoleh dari sekuensing merupakan urutan huruf-huruf yang mewakili struktur primer molekul DNA yang terdiri dari empat huruf berupa A, G, T, dan C yang masing-masing mewakili satu basa adenin, sitosin, guanin, dan timin. (Abbott, 1995). Karakterisasi awal dari sekuen DNA umumnya dilakukan dengan pencarian dan pencocokan gen yang didapat dengan basis data yang bertujuan untuk mengetahui apakah urutan DNA tersebut tersedia atau tidak sehingga dapat diketahui spesies dari gen yang didapat (Koonin & Galperin, 2003). Beberapa pendekatan untuk memprediksi kesesuaian urutan gen telah dikembangkan dan program populer yang paling sering digunakan untuk analisis hasil sekuensing ini salah satunya adalah BLAST

BLAST merupakan singkatan dari *Basic Local Alignment Search Tool* yang mengacu pada rangkaian program yang digunakan untuk menghasilkan keselarasan antara urutan nukleotida atau protein. Program BLAST akan membandingkan urutan nukleotida atau protein dengan urutan dalam database dan menghitung signifikansi statistik dari kecocokan tersebut (Clarridge, 2004).

Sekuen pembanding yang digunakan pada umumnya disimpan dalam database seperti genbank yang dapat diakses melalui <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, database data bank of japan (DDJB) <http://www.ddjb.nig.ac.jp/> serta european

bioinformatics institute (EBI) yang dapat diakses melalui <http://www.ebi.ac.uk/> dimana ketiga database ini saling terhubung dan bertukar data (Chen *et al*, 2009).

6. Gen 16S rRNA

Salah satu teknik yang paling banyak digunakan untuk mengidentifikasi bakteri adalah penggunaan 16S rRNA. Selain cepat dan terbilang sederhana, akurasi dan tingkat keberhasilan cara ini juga sangat tinggi. Gen yang digunakan (sekitar 500 bp) di dekat akhir rangkaian, yang dikenal sebagai wilayah hipervariabel, atau seluruh gen sepanjang 1500 bp dapat digunakan untuk pengurutan. (Noer, 2021).

Gen 16S rRNA mencakup wilayah dengan urutan basa konservatif serta wilayah dengan urutan basa yang sangat berbeda. Jika perbandingan urutan basa konservatisme berguna untuk menciptakan pohon filogenetik universal, urutan basa variabel dapat digunakan untuk melacak keanekaragaman dan menemukan lokasi strain dalam satu spesies (Yohandini *et al*, 2015).

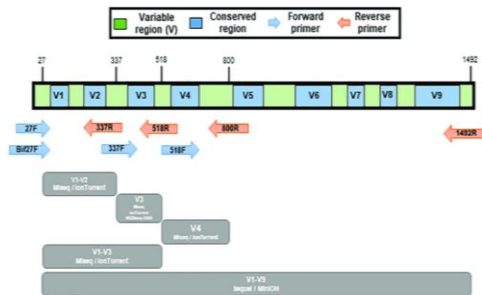
Gen 16S rRNA saat ini digunakan sebagai standar untuk klasifikasi dan identifikasi mikroba karena terdapat pada sebagian besar mikroba (Yarza *et al*, 2014). Gen 16S rRNA memiliki panjang sekitar 1600 base pair dan mencakup sembilan daerah hipervariabel dengan berbagai konservasi (V1-V9) seperti pada gambar 2.8. Wilayah *conserved* seperti

ditunjukkan pada gambar 2.3 berguna untuk menentukan taksa dengan peringkat lebih tinggi, sedangkan wilayah yang hypervariable dapat membantu mengidentifikasi genus atau spesies (Kim *et al.*, 2011).

Gen 16S rRNA digunakan untuk studi filogenetik karena sangat terkonservasi antara berbagai spesies bakteri dan *archaea*. Carl Woese memelopori penggunaan 16S rRNA ini pada tahun 1977. Gen 16S rRNA juga dapat digunakan sebagai penanda molekuler yang handal karena urutan 16S rRNA dari garis keturunan bakteri yang berkerabat jauh terbukti memiliki fungsi serupa .



Gambar 2. 9 Skema Struktur Gen 16S rRNA
(Wensel *et al.*, 2022)

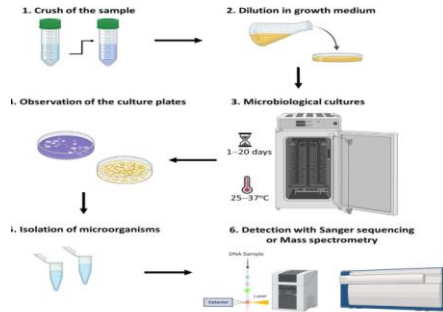


Gambar 2. 10 Wilayah dan Siklus pada Gen 16S rRNA

Wilayah dan Siklus pada Gen 16S rRNA

(Park *et al.*, 2021)

Alur kerja pengurutan 16S rRNA mencakup beberapa langkah utama, termasuk ekstraksi DNA genom, amplifikasi PCR yang ditargetkan, konstruksi perpustakaan, pengurutan, dan analisis bioinformatika. Selama pengambilan sampel, dilakukan tindakan pencegahan kontaminasi dan menjaga integritas sampel dengan sangat teliti. DNA yang diekstraksi selanjutnya menjalani penilaian kualitas dan konsentrasi yang ketat. Amplifikasi PCR yang menargetkan daerah tertentu dari gen 16S rRNA dilakukan menggunakan primer khusus gen. Optimalisasi kondisi PCR sangat penting untuk memastikan spesifisitas dan efisiensi amplifikasi. Setelah amplifikasi, elektroforesis gel digunakan untuk memverifikasi ukuran dan kemurnian produk PCR. Pemurnian produk PCR dari sistem reaksi kemudian dilakukan menggunakan kit ekstraksi gel atau kit pemurnian produk PCR (Yang, *et al.*, 2016).



Gambar 2. 11 Identifikasi menggunakan 16S rRNA
(Athanasopoulou *et al.*, 2023)

Langkah selanjutnya melibatkan konstruksi pustaka sekuensing dan alur kerja sekuensing, dengan sekuensing 16S rRNA umumnya menggunakan panjang bacaan pendek untuk mencakup area spesifik gen 16S rRNA. Fase akhir melibatkan kontrol kualitas dan penyaringan data sekuensing, diikuti dengan pemanfaatan perangkat lunak analisis sekuens 16S rRNA (seperti QIIME atau Mothur) untuk melakukan pengelompokan, anotasi, dan klasifikasi sekuens. Membuat unit taksonomi operasional atau varian sekuens ampikon, anotasi taksonomi, dan analisis keanekaragaman. Lebih jauh, hasilnya dapat digunakan untuk membandingkan komposisi mikroba di berbagai sampel, mengeksplorasi hubungan antara struktur komunitas mikroba dan faktor lingkungan, dengan analisis statistik potensial yang dilakukan untuk memverifikasi setiap perbedaan yang diamati (Case *et al.*, 2007).

B. Kajian Penelitian Relevan

No	Judul Dan Author	Metode	Hasil	Gap Penelitian
1.	The effectiveness of using eco <i>enzyme</i> based on several kinds of fruit on the growth of lettuce (<i>Lactuca Sativa L.</i>) (Yunita Dondo, 2023)	Teknik yang digunakan terdiri dari enam perlakuan dengan tiga ulangan, maka terdapat delapan belas parameter satuan	Penggunaan eco enzim yang berasal dari berbagai macam buah-buahan bermanfaat untuk perkembangan tanaman selada, menurut hasil penelitian yang telah dilakukan.	Penelitian tersebut dilakukan dengan uji kuantitatif yaitu dengan spektrofotometri UV-Vis sedangkan pada penelitian ini menggunakan uji kualitatif yaitu dengan uji katalase

		percobaan yaitu jumlah daun, bobot segar, dan bobot akar		
2.	Effect of <i>eco-enzyme's</i> storage duration on hydrogen peroxide level and its antibacterial activity (Ni Putu Vidya Primarista , 2023	Metode yang digunakan yaitu dengan metode kertas cakram dan titrasi dalam mengidentifik asi aktivitas bakteri	<i>Ecoenzyme</i> tidak lagi menunjukkan aktivitas antibakteri setelah penyimpanan 15 bulan. Secara keseluruhan, lama penyimpanan ekoenzim	Penelitian sebelumnya lebih focus kepada pengaruh antibakteri <i>ecoenzmy</i> terhadap kadar peroksida sedangkan penelitian ini lebih focus pada identifikasi jenis bakteri penghasil enzim katalase dan Peroksidase

			mempengaruhi kadar hidrogen peroksida dan aktivitas antibakteri terhadap <i>Escherichia Coli</i> dan <i>Staphylococcus Aureus</i>	
3.	<i>Ecoenzyme</i> dari fermentasi sampah organik (sampah buah dan rimpang)	Prosedurnya memerlukan perakitan bioreaktor dan penyiapan bahan	Warna cairan <i>ecoenzyme</i> dari tujuh reaktor menunjukkan bahwa penampakan cairan telah	Penelitian tersebut dilakukan pengujian perbedaan pH terhadap <i>eco-enzyme</i> yang di buat dan tidak melakukan identifikasi bakteri

	(Piyantina Rukmini, 2023)	organik untuk produksi eko-enzim. Temukan juga pH setiap sampel.	berubah, menjadi kabur dan lebih coklat dibandingkan pada awal fermentasi. Cairan <i>ecoenzyme</i> rimpang berwarna coklat pucat.	pada <i>ecoenzyme</i> yang dibuat Penelitian sebelumnya mengidentifikasi jenis bakteri amilase sedangkan penelitian ini mengidentifikasi jenis bakteri penghasil enzim katalase dan peroksidase. Dilanjut dengan uji molekuler agar lebih spesifik
4.	Bakteri penghasil amilase yang	Untuk mengidentifikasi jenis dan	Melalui aktivitas amilolitik yang positif, eko	Penelitian sebelumnya mengidentifikasi

	diisolasi dari <i>eco enzyme</i> limbah buah-buahan (Hadi Wibowo, 2022)	spesies bakteri, peneliti menggunakan pengujian kuantitatif, identifikasi genom dan molekuler, serta eksperimen.	bakteri penghasil enzim amilase mampu memecah pati pada pati kecil (starch agar penghasil enzim amilase	jenis bakteri amilase sedangkan penelitian ini mengidentifikasi jenis bakteri penghasil enzim katalase dan peroksidase. Dilanjut dengan uji molekuler agar lebih spesifik
5.	Penapisan dan karakterisasi amilase dari bakteri asal <i>eco enzyme</i>	Metode Bradford, Bernfeld, dan metode molekuler	Berdasarkan hasil isolat pkl 2 aktivitas amilase efektif diperoleh kembali dari 26	Penelitian sebelumnya menguji enzim yang terdapat karakter amilase jenis <i>eco enzyme</i>

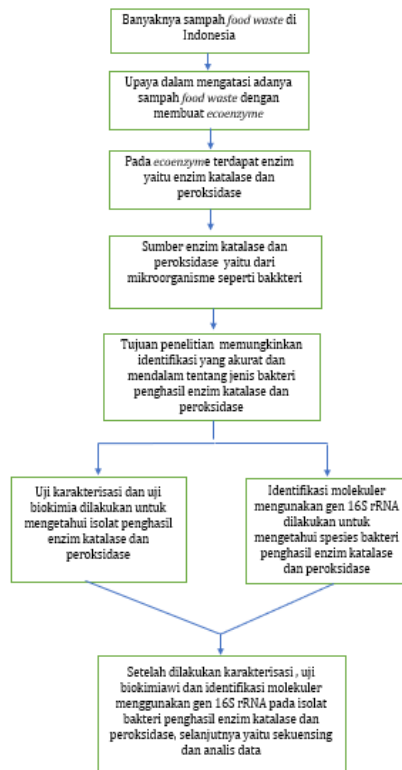
	(Ningtyas, 2022	menggunakan 16S rRNA digunakan untuk menguji protein.	isolat bakteri penghasil enzim amilolitik	yang digunakan juga berbeda yaitu dari kulit buah jeruk sedangkan penelitian ini menggunakan bahan dari <i>food waste</i> dan menguji adanya enzim peroksidase katalase di lanjut dengan uji molekuler
6.	Karakteristik dan potensi enzimatis bakteri asal tanah sampah dapur dan kotoran ternak	Pencarian dimulai dengan isolasi bakteri dan pengambilan sampel. Evaluasi	Hasil skrining menunjukkan tiga isolat memiliki aktivitas proteolitik, tujuh isolat memiliki	Penelitian sebelumnya menguji tiap enzim dari bakteri asal sampah dapur sedangkan pada penelitian yang akan dilakukan focus

	sebagai kandidat agen biodegradasi sampah organik (Taruna Dwi Satwika, 2021)	kualitatif dilakukan terhadap potensi enzimatik isolat yang diperoleh, termasuk aktivitas amilolitik, selulolitik, dan proteolitiknya	aktivitas selulolitik, dan enam isolat memiliki aktivitas amilolitik	pada uji enzim katalase dan peroksida pada sampel juga berbeda yaitu menggunakan <i>eco enzym</i> dari <i>food waste</i> di lanjut uji molekuler dalam identifikasi jenis bakteri penghasil enzim katalase dan peroksidase
7.	Pengaruh konsentrasi peroksida terhadap	Inokulum limbah buah diolah dengan HCL selama	Ketika hidrogen peroksida ditambahkan, jumlah hidrogen	Pada penelitian tersebut dilakukan dengan uji kuantitatif yaitu dengan

	produksi biohidrogen dari limbah buah jeruk melalui metode fermentasi gelap. (Atika Dwi Farini, 2019)	24 jam hingga pH-nya mencapai 3. Setelah prosedur selesai, pH kembali naik menjadi sekitar 4,5–5, dan ditambahkan NaOH.	yang dihasilkan jauh berbeda dibandingkan jika tidak ditambahkan. Penambahan H_2O_2 menghasilkan pembentukan gas hidrogen terbesar, dengan rendemen sebesar 801,14 Ml.G/Vs.	spektrofotometri UV-Vis sedangkan pada penelitian ini menggunakan uji kualitatif yaitu dengan uji katalase dan di lanjut uji molekuler dalam identifikasi jenis bakteri penghasil enzim katalase dan peroksidase
--	--	--	---	---

C. Kerangka Berpikir

Berikut kerangka berpikir dalam penelitian identifikasi bakteri penghasil enzim katalase dan peroksidase pada *ecoenzyme* dari *food waste* menggunakan Gen 16S rRNA



BAB III

METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian campuran yaitu dengan pendekatan kualitatif dan kuantitatif. Pendekatan kualitatif yaitu dengan melihat dari morfologis dan mikroskopis bakteri penghasil enzim katalase dan peroksidase selain itu metode kualitatif digunakan untuk melihat hasil positif bakteri penghasil enzim katalase dengan melihat ada atau tidaknya gelembung. Pendekatan kuantitatif yaitu dengan pengujian menggunakan spektrofotometer UV -Vis dengan adanya nilai absorbansi bakteri penghasil enzim peroksidase, selain itu Pendekatan kuantitatif molekuler digunakan untuk mengidentifikasi bakteri penghasil

enzim katalase peroksidase menggunakan DNA marker 16S rRNA.

2. Tempat Dan Waktu Penelitian

Pembuatan *ecoenzyme* di Kos Oemah Sakinah Jl. Gatot Subroto No 16.A, Perumahan Pasadena, Ngaliyan dan pengujian di laboratorium akan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Dan Bioteknologi, Fakultas Sains Dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang dengan waktu penelitian yaitu bulan Mei – Desember 2024.

B. Alat dan bahan

1. Alat

Alat yang akan digunakan dalam penelitian adalah tabung reaksi (Iwaki), cawan petri (Anumbra), erlenmeyer (Schott Durant), gelas ukur (Schott Durant), gelas beaker (Schott Durant), lakon, vortex (Bio-Rad BR2000), neraca analitik (Mettler Toledo ME 204), autoklaf (Hirayama Hiclave™ HVE 50), *hot plate magnetic stirrer* (Benchmark h3760-HSE),

inkubator (INB 400 Memmert), oven (UN 55 Memmert), freezer (*ESCO* HP2-4003-1), kulkas (Samsung RT29K503JBI/SE), cooled incubator (*FOC-120 E*), *Bio Safety Cabinet* (*ESCO* AC2-4E8), kit elektroforesis (Mupid-EX), spektrofotometer UV- Vis (Thermo Fisher Scientific GENESYS 30), mikropipet (Bio-Rad), tip (1000 µl, 200 µl, dan 10 µl), *refrigerated micro centrifuge* (Eppendorf 5424R), *laminar air flow* (LAF) (*ESCO* LVG-4AG-F8), *thermal cycler* (SimpliAmp ENGL326), *gel documentation* (*Gel Doc™ Ez Imager*), spatula, batang spreader, ose bulat, conical tube 50 ml, cutter , blender (Maspion), mortal.

2. Bahan

Adapun bahan yang akan di gunakan yaitu *ecoenzim* yang berasal dari sisa makanan (*food waste*), NA (*Nutrien Agar*), NB (*Nutrien Broth*), aquades, reagen peroksida (H_2O_2), Presto™ Mini GDNA Bacteria Kit (Geneaid Lot No:

FH36208- S (100 Preps)), gliserol (Merck), ladder 3000 bp (PROMEGA), *bromothymol blue* (Merck), *hydrochloric acid* (HCL) (Merck), *sodium hydroxide* (NaOH) (Merck), *sodium hypochlorite* (NaOCL) (Merck), microtube 1,5 ml, proteinase K, lysozyme, gram + buffer, GT buffer, GB buffer, *elution* buffer, GD column, W1 buffer, *wash buffer*, collection tube 1,5 ml, gel red, ddH₂O, *Tris-Borate-Edta* (TBE 1x), *loading dye*, primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R(-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') PCR mix, bubuk agarose, nuclease free water.

C. Metode

1. Pembuatan *Ecoenzyme*

Buah-buahan, sayuran, molase, dan air semuanya dimasukkan ke dalam campuran sampah makanan organik, khususnya dengan perbandingan 10:1:3. Langkah pertama dalam pembuatan *ecoenzyme* adalah mengisi wadah

dengan 10 liter air murni. Tambahkan buah dan sayuran, potong kecil-kecil, dan timbang 3 Kg. Selanjutnya aduk hingga semua bahan tercampur dan tambahkan 1 gram larutan molase. Mikroba menggunakan molase sebagai sumber energi untuk melakukan fermentasi. Wadah fermentasi *ecoenzyme* perlu disimpan di tempat yang teduh serta ditutup rapat guna mencegah masuknya udara luar. Untuk hasil yang optimal, proses fermentasi anaerob memerlukan waktu tiga bulan.

2. Persiapan Sampel

Sebanyak 1 ml sampel *ecoenzyme* diambil dan diletakkan pada tabung reaksi selanjutnya dilakukan metode *serial dilution*, atau juga disebut pengenceran bertingkat yang berfungsi dalam proses pemisahan. Untuk mencegah pertumbuhan bakteri yang tumpang tindih, digunakan pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , dan 10^{-3} (Utami, 2018). Setelah itu diambil 12 mikrolit

ecoenzyme subkultur pada media *Nutrient Agar* (NA), dengan metode *spread plate* (teknik sebar) merupakan teknik isolasi bakteri dengan cara menyebarkan kultur di atas media agar padat (Damayanti, 2020). Isolat bakteri kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 31°C. Setelah sampel isolat tumbuh, setiap isolat bakteri digores kembali pada media *Nutrient Agar* (NA). Setelah koloni bakteri tumbuh, koloni tersebut akan dipindahkan ke media *Nutrient Broth* (NB) dan diinkubasi selama 48 jam dengan suhu 31°C.

3. Pengujian Enzim Katalase dan Peroksidase

Pengujian enzim katalase dan peroksidase dilakukan secara kualitatif yaitu dengan melihat adanya gelembung gas yang dihasilkan tiap isolat bakteri pada *ecoenzyme*. Uji katalase yang melibatkan satu loop isolat bakteri dengan menggunakan jarum ose, setelah itu digoreskan pada gelas objek dan ditetesi

dengan hidrogen peroksida, dapat mengidentifikasi kelompok bakteri yang dapat menghasilkan enzim katalase.

Hasil positif terdapat gelembung udara, sedangkan hasil negatif tidak menyebabkan terbentuknya gelembung udara (Lay, 1994).

Aktivitas enzim peroksidase dapat diuji menggunakan metode Saravan *et al* (2004) menggunakan alat spektrofotometer UV- Vis. Adanya enzim peroksidase dapat dilihat dengan adanya nilai absorbansi semakin tinggi nilai absorbansi maka adanya enzim peroksidase juga tinggi. Panjang gelombang yang digunakan dalam pengukuran adalah 420 nm.

Uji peroksidase yaitu dengan sampel isolat yang telah diinkubasi selama 48 jam setelah itu di vortex atau disentrifugasi agar pelet dan supernatan terpisah pada tahap ini supernatan yang digunakan. Diambil sebanyak 1 ml sampel

isolat *ecoenzyme* diletakan pada kuvet dan ditambah dengan hidrogen peroksida sebanyak 1 ml setelah itu dikocok dan diletakan di spektrofotometer UV- Vis yang telah diatur panjangnya yaitu 420, setelah itu dilihat hasil absorbansi pada tiap sampel isolat semakin tinggi nilai absorbansi maka aktivitas enzim peroksida tinggi.

4. Uji BIOKIMIA

a. Uji *Simmon Citrat Agar* (SCA)

Uji SCA merupakan uji biokimia yang berfungsi untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menggunakan sitrat sebagai sumber karbon dan energi, kemampuan bakteri dalam mengubah sitrat menjadi sumber karbon sehingga mengubah media bakteri dari hijau menjadi biru dikarenakan Ph yang tinggi. Uji SCA dilakukan dengan cara mengambil satu ose isolat bakteri dan menusukkan isolat menggunakan jarum ose jarum ke dalam media

miring dan di inkubasi selama 48 jam (Sunarjo, 1994).

b. Uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)

Uji TSIA untuk menguji aktivitas bakteri dalam memfermentasikan glukosa. Pengujian ini dilakukan dengan cara mengambil satu ose isolat bakteri dan menusukkan isolat menggunakan jarum ose jarum ke dalam media miring dan diinkubasi selama 48 jam. Hasil positif uji TSIA yaitu adanya perubahan warna dan adanya endapan warna hitam pada media yang artinya menghasilkan gas H_2S (Hidrogen Sulfida) (Downes, 2001).

c. Uji *Metyl Red* (MR)

Uji MR berfungsi untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menggunakan glukosa menjadi asam. Uji ini dilakukan dengan cara memasukkan kultur bakteri ke dalam media MR, setelah itu diinkubasi selama 48 jam dengan suhu $31^{\circ}C$. Isolat yang sudah diinkubasi

selanjutnya ditetesi reagen MR, hasil positif yaitu perubahan warna menjadi merah (Sunarjo, 1994).

5. Ekstraksi Genom Bakteri

a. Preparasi sampel

Genom bakteri akan diekstraksi menggunakan protokol Presto™ Mini GDNA *Bacteria Kit Protocol*. Protokol isolasi sebagai berikut:

Satu isolat dari masing-masing sampel dengan hasil uji aktivitas tertinggi ditumbuhkan pada media NB dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Selanjutnya biakan divortex hingga homogen kemudian akan disiapkan microtube 1,5 ml dan diberi label sesuai sampel masing-masing. Isolat bakteri Gram negatif dan gram positif akan diperlakukan secara berbeda karena Perbedaan struktur.

a) Gram Negatif

Sebanyak 200µl biakan bakteri yang telah dihomogenkan akan dimasukkan ke microtube 1,5 ml kemudian disentrifugasi pada kecepatan 15.000 rcf selama 1 menit. Selanjutnya supernatan yang dihasilkan akan dibuang dan jika pelet yang didapat masih kurang langkah tersebut akan diulangi hingga pelet dirasa cukup. Setelah pelet mencukupi akan ditambahkan 180µl GT buffer kedalam microtube dan dihomogenkan dengan vortex. Setelah homogen akan ditambahkan 20µl proteinase K dalam microtube dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit dengan setiap 3 menit sekali microtube akan dibalik untuk meratakan proses pemanasan.

b) Gram Positif

Sebanyak 200µl biakan bakteri yang telah dihomogenkan akan dimasukkan kedalam microtube 1,5 ml kemudian disentrifugasi pada

kecepatan 15.000 rcf selama 1 menit. Selanjutnya supernatan yang dihasilkan akan dibuang dan jika pelet yang didapatkan dirasa kurang maka akan diulangi lagi langkah pertama. Langkah selanjutnya sebanyak 0,8 mg bubuk lysozyme akan ditimbang dan dimasukkan kedalam microtube baru kemudian ditambahkan 200 μ l gram + buffer dan dihomogenkan dengan vortex. Kemudian sebanyak 200 μ l larutan lysozyme akan dipindahkan kedalam microtube berisi pelet dan dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dengan setiap 10 menit sekali microtube akan dibalik untuk meratakan pemanasan. Selanjutnya akan ditambahkan 20 μ l proteinase K dan dihomogenkan kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit dan akan dibolak-balik tiap 3 menit.

b. Tahap Lisis

Sebanyak 200µl GB buffer akan ditambahkan kedalam sampel hasil preparasi dan dihomogenkan selama 10 detik menggunakan vortex. Selanjutnya akan diinkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit dan dibolak-balik tiap 3 menit sekali guna memastikan sampel benar-benar lisis. Pada tahap ini elution buffer yang akan digunakan pada tahap elusi akan dipanaskan pada suhu 70°C.

c. Tahap DNA Binding

Sebanyak 200µl etanol absolut dingin akan ditambahkan kedalam sampel dan dikocok dengan kuat, apabila ada endapan yang muncul akan dihancurkan dengan mikropipet. Selanjutnya akan diletakkan GD column pada collection tube 2 ml dan campuran sebelumnya akan dipindahkan menggunakan mikropipet dan disentrifugasi pada kecepatan 15.000 rcf selama 2 menit. Collection tube yang berisi

cairan akan dibuang dan GD column akan dipindahkan ke collection tube yang baru.

d. Tahap Washing

Setelah ditambahkan 400 μ l buffer W1 pada kolom GD sebelumnya, selanjutnya disentrifugasi selama 30 detik pada 15.000 rcf. Setelah cairan dibuang ke dalam tabung pengumpul, 600 μ l buffer pencuci akan dituangkan ke dalam GD dan disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 15.000 rcf. Selanjutnya cairan pada collection tube akan dibuang dan GD column akan disentrifugasi kembali pada kecepatan 15.000 rcf selama 3 menit untuk mengeringkan matriks kolomnya.

e. Tahap Elusi

Untuk memastikan buffer elusi terserap sempurna, 100 μ l buffer elusi yang telah dipanaskan sebelumnya akan ditambahkan ke tengah matriks kolom setelah kolom GD dipindahkan ke microtube 1,5 ml yang baru.

Proses ini akan dilanjutkan selama tiga menit. DNA hasil isolasi selanjutnya akan dielusi dengan cara disentrifugasi selama 30 detik pada kecepatan 15.000 rcf.

6. Amplifikasi Gen 16S rRNA

Hasil ekstraksi yang didapat kemudian akan diamplifikasi pada mesin thermal cycler menggunakan gen 16S rRNA dengan primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (3'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') (Weisburg *et al.*, 1991). Primer tersebut dipilih karena bersifat universal, proses amplifikasi dapat mengamplifikasi gen 16S rRNA yang biasanya berukuran sepanjang 1500 bp (Ethica *et al.*, 2018). Proses amplifikasi DNA akan dilakukan dalam volume total 50 µl yang berisi 4 µl DNA *template*, masing-masing primer *forward* dan *reverse* diberikan 1 µl PCR mix konsentrasi akhir 25 µl dan sisanya akan ditambahkan nuclease free water atau ddh₂O

sebanyak 19 µl. Proses PCR akan dikondisikan mulai dari *pre denaturation* (94°C, 5 menit), *denaturation* (94°C, 30 detik), *annealing* (55°C, 45 detik), *extension* (72°C, 1 menit 30 detik), dan *final extension* (72°C, 10 menit). Tahap *denaturation* hingga *extension* akan dilakukan sebanyak 35 siklus (Marchesi *et al.*, 1998). Pemilihan jumlah siklus didasarkan pada studi yang dilakukan Renaud *et al.*, (2022) yang menyatakan penggunaan lebih dari 35 siklus akan berpotensi menyebabkan terjadinya amplifikasi non spesifik, sehingga menyebabkan hasil PCR tidak akurat. Hasil amplifikasi akan dikonfirmasi menggunakan gel elektroforesis 1% dengan tegangan 100-volt selama 30 menit.

7. Elektroforesis
 - a. Pembuatan Gel Agarose

Sebanyak satu gram agarose bubuk akan ditimbang dan dimasukkan dalam erlenmeyer

250 ml, kemudian akan ditambahkan 100 ml (TBE 1x) dan digojog hingga larut. Larutan kemudian akan dipanaskan menggunakan microwave selama delapan menit pada tegangan 300-volt dengan tiap satu menit erlenmeyer akan digojog untuk memastikan gel agarose larut dengan sempurna. Setelah larut gel agarose akan didiamkan hingga suam-suam kuku kemudian akan ditambahkan 2µl gel red dan digojog. Selanjutnya gel agarose akan dituang dalam cetakan yang telah dipasang sisir dan ditunggu hingga menjendal.

b. Proses Elektroforesis

Setelah gel agarose menjendal, sisir pada cetakan akan dilepas dengan perlahan dan gel agarose dipindahkan ke dalam elektroforesis chamber. Selanjutnya akan ditambahkan *Tris-Borate-EDTA* (TBE) 1x hingga gel agarose terendam. Berikutnya sebanyak 3µl genome DNA hasil ekstraksi akan dicampur dengan 1µl

loading dye dan dimasukkan dalam sumuran. Setelah semua sampel DNA dimasukkan selanjutnya akan dimasukkan sebanyak 3µl DNA marker kedalam sumuran pertama. Elektroforesis chamber akan dinyalakan pada tegangan 100-volt selama 30 menit, setelah proses elektroforesis selesai hasilnya akan diamati dibawah sinar UV menggunakan UV transilluminator.

8. Analisis Data

Hasil amplifikasi masing-masing dari sampel yang memenuhi kriteria tidak terdapat smear pada gel agarose dan DNA berwarna putih. Setelah didapatkan hasil yang baik maka dikirim ke perusahaan 1st base malaysia untuk disekuensing menggunakan metode sanger sequencing (Putri *et al.*, 2020).

Hasil pengurutan dipangkas menggunakan metode contig yang mempunyai panjang yang sama dengan pembandingnya (Mukaromah *et al.*, 2023). Urutan contig akan dibuat dengan

membaca dan mengolah data sekuensing gen 16S rRNA dari sampel yang dikumpulkan dalam format AL1 menggunakan software BioEdit 7.2. Setelah perolehan sekuens contig, perangkat lunak Alat Pencarian Penyelarasan Lokal Dasar untuk Nukleotida akan digunakan untuk membandingkannya dengan data sekuens yang ditemukan di bank gen (Blastn). Sekuen yang keluar selanjutnya akan diunduh berdasarkan nilai *e-value* (*expectation value*), *query cover*, serta *percent identity* tertinggi yang muncul.

Sekuen yang diperoleh dari analisis sekuensing dan sekuen contig akan disejajarkan dengan Clustal-X pada aplikasi MEGA 11 Sekuens dari seluruh taxa yang telah dikumpulkan selanjutnya disimpan dalam format FASTA dan dianalisis dengan menggunakan software MEGA 11 (Kumar *et al.*, 2018) untuk *Neighbor-Joining* dengan 1000x

bootstrap (Zahid *et al.*, 2015). Metode *Neighbor-Joining* dipilih karena metode ini akan membangun pohon dengan menghitung laju tiap kemungkinan evolusi yang terjadi dan dapat digunakan pada data yang besar dimana metode lain seperti *maximum likelihood*, *minimum evolution*, *maximum parsimony*, dan *unweighted pair group method with arithmetic mean* tidak dapat melakukannya (Pavlopoulos *et al.*, 2010).

Data sekuensing akan ditambahkan ke database NCBI mengikuti ketentuan untuk spesies apa pun yang sekuennya memiliki similaritas >97% dengan sekuen yang dipublikasikan dengan identifikasi tingkat spesies, spesies tersebut akan diberi identifikasi tingkat spesies dari sekuen yang dipublikasikan; untuk spesies apa pun yang sekuennya memiliki similaritas ≥ 90 tetapi <97% dengan sekuen yang dipublikasikan

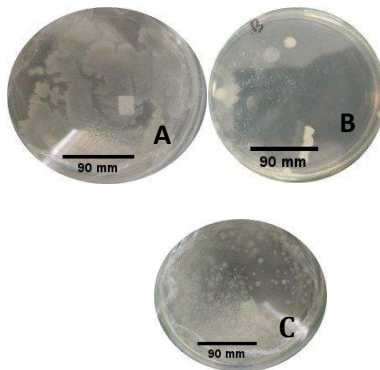
dengan identifikasi tingkat spesies atau genus, spesies tersebut akan diberi identifikasi tingkat genus dari sekuen yang dipublikasikan untuk setiap spesies yang sekuennya memiliki similaritas $\geq 80\%$ tetapi $< 90\%$ dengan sekuen yang dipublikasikan dengan identifikasi tingkat spesies, genus, atau famili, spesies tersebut akan diberi sekuen identifikasi tingkat famili dari sekuen yang dipublikasikan (Andersen *et al.*, 2019).

BAB IV

HASIL dan PEMBAHASAN

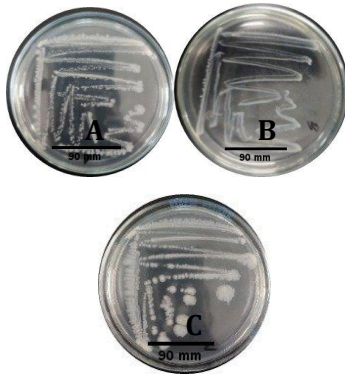
A. Hasil Penelitian

1. Isolasi Bakteri



Gambar 4. 1 Hasil isolasi bakteri pada *ecoenzyme* dari *food waste* dengan kode isolat A, B dan C
(Sumber: Dokumentasi Penelitian, 2025)

Isolasi bakteri dari sampel *ecoenzyme* dilakukan menggunakan metode *spread plate*. Sebelum isolasi bakteri dilakukan pengenceran bertingkat, hasil pengenceran yang digunakan yaitu pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3} dengan kode A, B dan C.



Gambar 4. 2 Hasil Purifikasi Isolat
bakteri pada *ecoenzyme*
dari *food waste*
dengan kode isolat A, B dan C

(Sumber: Dokumentasi Penelitian, 2025)

Hasil isolasi yang dapat dilihat pada gambar 4.1 kemudian dilakukan purifikasi menggunakan metode *streak plate* untuk mendapatkan isolat yang murni dan setelah itu diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 31°C. Setelah proses purifikasi selanjutnya dilakukan proses karakterisasi secara makroskopis maupun dengan

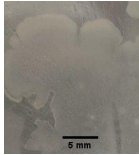
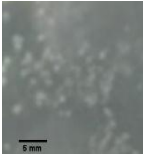
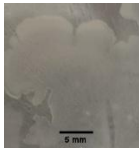
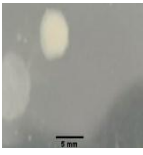
mikroskopis. Pengamatan secara makroskopis yaitu dengan melihat warna, bentuk, tepian dan elevasi sedangkan mikroskopis yaitu dengan pewarnaan Gram. Hasil purifikasi dari tiga isolat dapat dilihat dalam gambar 4.2.

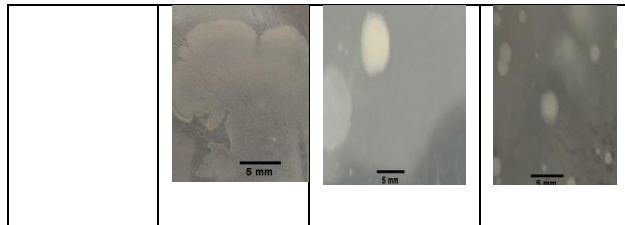
2. Karakterisasi Isolat Bakteri

a. Pengamatan Morfologi

Isolat bakteri hasil purifikasi dilakukan identifikasi morfologi secara makroskopis meliputi bentuk, elevasi, warna dan tekstur (Saidah, 2014). Hasil karakterisasi dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4. 1 Karakter hasil isolat bakteri pada *ecoenzyme* dari *food waste* dengan kode isolat A, B dan C

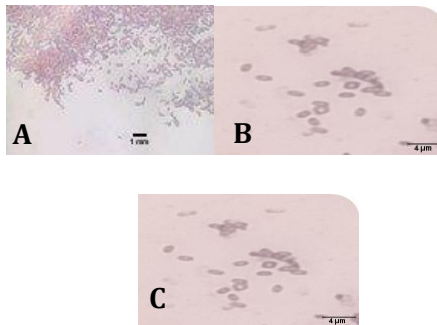
Karakter yang di- amati	Kode Sampel		
	A	B	C
Bentuk	<i>Irregular</i>  5 mm	Bulat  5 mm	Bulat  5 mm
Elevasi	Rata  5 mm	Cembung  5 mm	Cembung  5 mm
Warna	Krem  5 mm	Krem  5 mm	Krem  5 mm
Tekstur	Halus	Halus	Halus



Hasil pengamatan makroskopis dilakukan dengan cara pengamatan langsung, dalam pengamatan tersebut komponen yang diamati yaitu bentuk, warna, tekstur dan elevasi. Hasil makroskopis pada tabel 4.1 yaitu bentuk bulat, elevasi cembung, warna kuning, tekstur halus serta tepian rata. Setelah dilakukan pengamatan makroskopis selanjutnya dilakukan pengamatan mikroskopis.

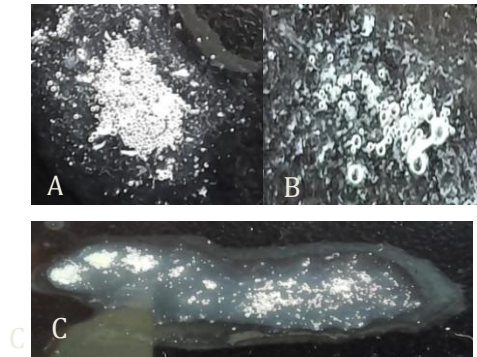
Hasil isolasi bakteri selanjutnya dilakukan pengamatan mikroskopis, bakteri dengan cara pewarnaan Gram setelah itu diamati di bawah mikroskop. Hasil pengamatan Gram dapat dilihat pada gambar 4.3 yang menunjukkan bakteri masuk ke dalam jenis Gram positif dan

Gram negatif pada perbesaran 400x. Adapun ciri-ciri Gram positif yaitu berbentuk batang dan memiliki warna ungu pada dinding selnya sedangkan Gram negatif berbentuk batang dan memiliki warna merah pada dinding selnya (Nau *et al*, 2022).



Gambar 4. 3 Hasil Gram negatif isolat A dan Gram positif isolat B dan C (kanan) berbentuk batang bakteri pada *ecoenzyme* dari *food waste* dengan Perbesaran 400x
(Sumber: Dokumentasi Penelitian, 2025)

b. Uji Biokimia

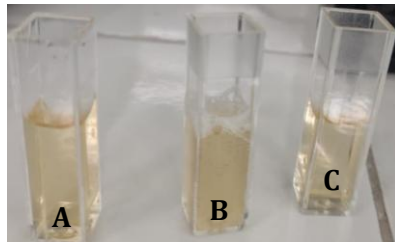


Gambar 4. 4 Hasil uji katalase positif pada isolat pada *ecoenzyme* dari *food waste* dengan kode isolat A, B dan C

(sumber Dokumentasi Penelitian, 2025)

Pengujian katalase pada isolat bakteri A, B dan C yaitu dengan reagen H_2O_2 (hidrogen peroksida), sebanyak satu tetes setelah itu, diamati dengan munculnya gelembung gas yang membuktikan isolat bakteri tersebut positif katalase dan peroksidase. Dari hasil uji tersebut didapatkan dari tiga isolat dengan hasil positif yang dapat dilihat pada gambar 4.4.

Uji adanya hidrogen peroksida yaitu menggunakan alat spektrofotometer UV- Vis dengan melihat adanya peningkatan nilai absorbansi ketika diberikan hidrogen peroksida pada tiap isolat. Dalam uji ini, dari tiga isolat didapatkan hasil nilai absorbansi yang berbeda untuk hasil uji peroksidase dapat dilihat pada tabel 4.2 dan gambar 4. 5.



Gambar 4. 5 Hasil uji peroksidase pada tiap isolat A, B dan C

(Sumber: Dokumentasi Penelitian, 2025)

Tabel 4. 2 Hasil uji peroksidase menggunakan spektrofotometer UV - Vis.

Kode isolat	Nilai Absorbansi
A	0,067
B	0,563
C	0,072

Hasil uji peroksidase menggunakan spektrofotometer UV – Vis dengan panjang gelombang 420 didapatkan hasil yaitu pada isolat A nilai absorbansi 0,067, isolat B dengan nilai 0,563 sedangkan pada isolat C dengan nilai 0,072. Dari hasil tersebut didapatkan hasil tertinggi yaitu pada isolat B dengan nilai 0,563 karena memiliki nilai absorbansi yang tinggi karena adanya peningkatan kadar peroksidase pada isolat. Setelah dilakukan uji adanya enzim katalase dan peroksidase juga dilakukan uji

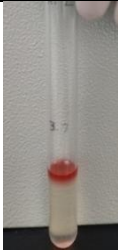
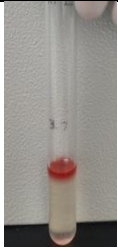
biokimia adanya uji sebagai pembanding dan memperkuat dalam melakukan identifikasi bakteri penghasil enzim katalase dan enzim peroksidase. Dalam penelitian ini dilakukan tiga uji biokimia yaitu uji *Simmon Citrat Agar* (SCA), *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), *Methyl Red* (MR).

3. Uji Biokimia

Uji biokimia yang lain digunakan sebagai pembanding yaitu pengujian sitrat dengan media SCA untuk menguji adanya kemampuan bakteri dalam menggunakan sitrat sebagai sumber karbon, TSIA untuk menguji aktivitas bakteri dalam memfermentasikan glukosa dan terakhir MR untuk menguji aktivitas bakteri dalam menggunakan glukosa menjadi asam (Haryatik, 2020). Hasil uji SCA, TSIA, MR dapat dilihat pada tabel 4.3

Tabel 4. 3 Hasil Uji Biokimia pada *ecoenzyme* dari *food waste* dengan kode isolat A, B dan C

Uji Biokimia	Kode isolat		
	A	B	C
SCA			
Hasil	- (Hijau)	+ (Biru)	+(Biru)
TSIA			
Hasil	+	+	+

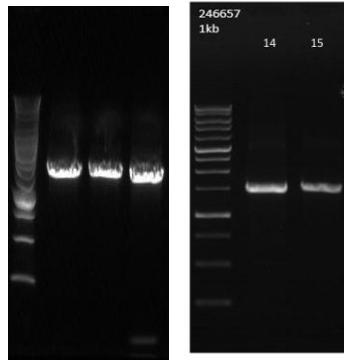
MR			
Hasil	+ (Merah)	+ (Merah)	-(Kuning)

Uji biokimia yang lain digunakan sebagai pembanding dalam karakterisasi bakteri penghasil enzim katalase dan peroksidase yaitu pengujian sitrat dengan media SCA, TSIA untuk menguji aktivitas bakteri dalam memfermentasikan glukosa dan terakhir MR untuk menguji aktivitas bakteri dalam menggunakan glukosa menjadi asam. Hasil uji SCA, TSIA, MR dapat dilihat pada tabel 4.3

4. Identifikasi molekuler menggunakan Gen 16S rRNA

Tahapan selanjutnya adalah identifikasi molekuler dari isolat bakteri penghasil enzim katalase dan peroksidase dengan mengikuti protokol presto™ mini gDNA *Bacteria Kit* dilanjut dengan amplifikasi menggunakan gen 16S rRNA. Isolasi DNA dan amplifikasi selanjutnya divisualisasi menggunakan elektroforesis dengan buffer TBE 1X selama 30 menit pada tegangan 100 volt dengan DNA *ladder* 3000 bp pada gambar 4.6 untuk hasil visualisasi.

1. 500 bp



Gambar 4. 6 Hasil visualisasi isolasi DNA isolat A, B dan C (kiri). Hasil PCR isolat A dan B (kanan)

(Sumber: Dokumentasi Penelitian, 2025)

Visualisasi menggunakan elektroforesis didapatkan hasil dari tiga isolat A, B, dan C menunjukkan hasil yang tergolong baik dengan hasil DNA yang tebal dan tunggal. Namun pada isolat C masih terdapat pengotor sehingga masih dikatakan belum baik, sehingga tidak dilanjutkan ke tahap sekuensing. Selain itu ukuran dari tiga isolat telah sesuai dengan panjang

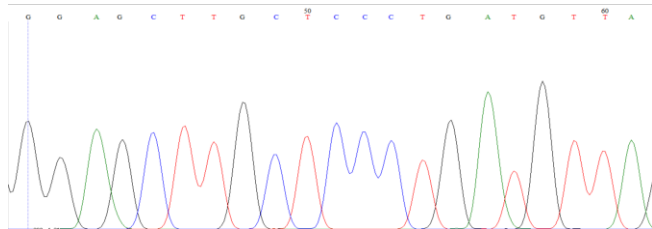
target gen 16S rRNA yaitu sekitar 1500 bp. Dari hasil PCR yang dilihat pada gambar 4.6 didapatkan hasil isolat A dan B menunjukkan hasil yang baik dengan pita yang tebal dan sesuai dengan target gen 16S rRNA sehingga dilakukan amplifikasi ulang sebanyak 50 μ L dan di kirim PT Genetika Science.

5. Sekuensing dan Analisis Data

Hasil isolasi molekuler dari tiga isolat penghasil enzim katalase dan peroksidase A, B dan C yang sudah divisualisasi menggunakan elektroforesis menghasilkan pita yang tebal dan tunggal. Isolat yang bagus dan layak masuk ke tahap sekuensing yaitu pada isolat A dan B dengan hasil pita yang bersih dan tebal. Hasil amplifikasi yang sudah diulang selanjutnya masuk ke tahap sekuensing dengan metode Sanger. Hasil analisis sekuensing sampel isolat A dan B diperoleh dalam bentuk data digital yang terdapat dua file yaitu *forward* dan *reverse* dalam format A dan B. Data hasil dari *forward*

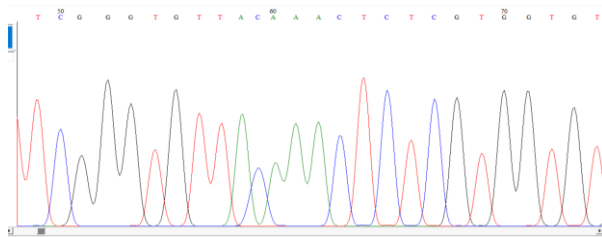
dan *reverse* kemudian dimasukkan ke dalam *software* BioEdit 7 untuk dilakukan pemotongan elektroferogram yang tidak bagus.

Hasil elektroferogram yang baik yaitu dengan adanya *peak* yang berwarna merah, hijau, biru, hitam dan tidak bertumpuk yang mewakili basa nukleotida (A, T, G dan C). Hasil yang bagus dapat dilihat pada gambar 4. 7 dan 4. 8 yang menampilkan hasil elektroferogram dari isolat dengan kode B dengan panjang *forward* dan *reverse* 1.400 bp. Hasil elektroferogram yang tidak bagus yaitu *peak* yang saling bertumpuk dan garis elektroferogram tidak menghasilkan *peak* yang sempurna. Hasil *peak* yang tidak bagus dapat dilihat pada gambar 4. 9.



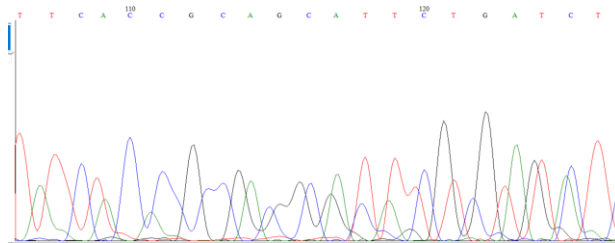
Gambar 4. 7 Pola *peak* hasil sekuensing yang bagus *forward* sekuen isolat B

(Sumber: Dokumentasi Penelitian, 2025)



Gambar 4. 8 Pola *peak* hasil sekuensing yang bagus *reverse* sekuen isolat B

(Sumber: Dokumentasi Penelitian, 2025)



Gambar 4. 9 Pola *peak* hasil sekuensing yang tidak bagus

(Sumber: Dokumentasi Penelitian, 2025)

Data sekuen *forward* dan *reverse* yang sudah dipotong menggunakan *software* BioEdit untuk mendapatkan sekuen *contig* yang merupakan hasil pembacaan sekuensing yang saling bertumpuk yang telah dijadikan satu kesatuan yang saling berkesinambungan (Mount, 2004). Sekuen hasil *contig* digunakan dalam BLASTn atau pengurutan sekuen pada *website* NCBI yang digunakan dalam identifikasi secara filogenetik (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Setelah dimasukkan ke dalam data NCBI kemudian dilakukan BLASTn dalam *website*

NCBI (BLASTn) yang akan mencari kesamaan dengan spesies yang sama dan telah ada dalam *database*. Dari data hasil BLASTn didapatkan 10 spesies yang memiliki kemiripan yaitu dengan spesies *Bacillus subtilis*. Pemilihan 10 spesies yang sama didasarkan pada nilai *percent query cover* yang tinggi yaitu dengan nilai 100%, nilai *percent identity* pada rentang nilai 98.80% dan nilai *expectation* yang rendah yaitu dengan nilai 0. Berikut data hasil BLASTn yang menunjukkan kemiripan dengan spesies *B. subtilis* yang dilihat pada tabel 4.4.

Tabel 4. 4 Hasil BLASTn isolat B

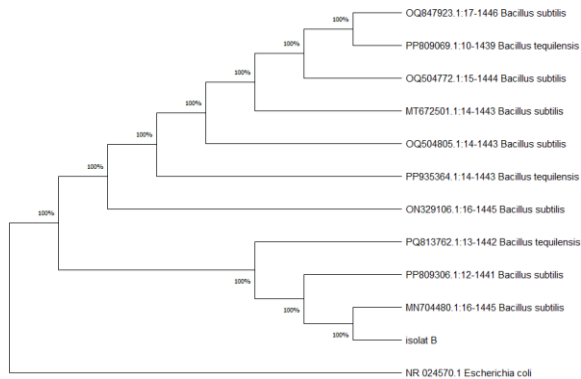
Spesies	% ID	Query Cover	E Value	Acc.Number
<i>B. subtilis</i>	98.80%	100%	0.0	MN704480.1
<i>B. subtilis</i>	98.80%	100%	0.0	PP809306.1
<i>B. tequilensis</i>	98.80%	100%	0.0	PQ813782.1
<i>B. subtilis</i>	98.80%	100%	0.0	ON329106.1
<i>B. tequilensis</i>	98.80%	100%	0.0	PP935364.1

<i>B. tequilensis</i>	98.80%	100%	0.0	PQ813762.1
<i>B. subtilis</i>	98.80%	100%	0.0	OQ847923.1
<i>B. subtilis</i>	98.80%	100%	0.0	MT67250.1
<i>B. subtilis</i>	98.80%	100%	0.0	OQ504805.1
<i>B. subtilis</i>	98.80%	100%	0.0	OQ504772.1

Dari data tabel 4.4 di atas dapat diketahui dari 10 spesies pembanding sekuen B memiliki kemiripan dengan *B. subtilis* dengan hasil 98.80% yang menunjukkan kemiripan yang sangat tinggi dengan spesies tersebut. Setelah didapatkan hasil yang sesuai kemudian dilanjutkan dengan memasukkan sekuen dan sekuen pembanding ke dalam *software* MEGA 11 untuk dilakukan proses pemotongan basa dan membuat pohon filogenetik.

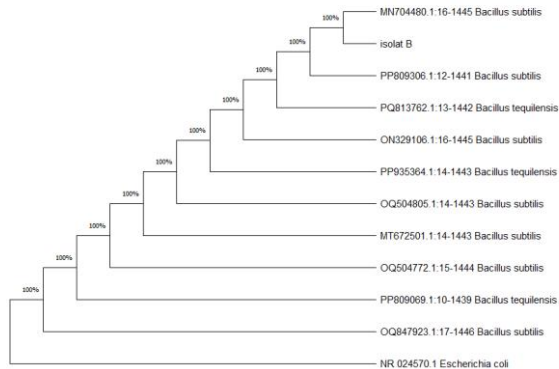
Pembuatan pohon filogenetik menggunakan MEGA 11 dengan metode *maximum likelihood* dan UPGMA dengan pengulangan 1000X. *Maximum likelihood* menggunakan parameter 2- kimura sedangkan

UPGMA menggunakan metode substitusi *p-distance*. Dalam pembuatan pohon filogenetik ini digunakan spesies *Escherichia coli* sebagai *outgroup*. Untuk hasil pohon filogenetik dapat dilihat pada gambar 4.10 dan 4.11.



Gambar 4. 10 Hasil pohon filogenik menggunakan metode maximum likelihood menggunakan substitusi 2- kimura

(Sumber: Dokumentasi Penelitian, 2025)



Gambar 4. 11 Hasil pohon filogenik menggunakan metode UPGMA dengan substitusi substitusi *p-distance*

(Sumber: Dokumentasi Penelitian, 2025)

Pohon filogenetik dapat dibangun menggunakan berbagai metode, seperti UPGMA dan *Maximum Likelihood* (ML). UPGMA menggunakan pendekatan *distance-based* dan mengasumsikan laju evolusi konstan, sedangkan ML lebih kompleks dan akurat karena mempertimbangkan variasi laju evolusi. Dalam penelitian ini, metode ML dipilih karena memberikan hasil yang lebih realistis dan

didukung nilai bootstrap yang tinggi (Hall, 2013).

Berdasarkan hasil rekonstruksi pohon filogenetik di atas didapatkan hasil bahwa sekuen B berada dalam satu *klad* dengan *B. subtilis* MN704480.1 sehingga dapat digunakan untuk menguatkan hasil analisis BLASTn. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan metode UPGMA dan *maximum likelihood* menunjukkan pola yang sama dengan nilai *bootstrap* 100%. Hal ini menunjukkan bahwa isolat *B. subtilis* baik secara karakter dan jarak genetik memiliki kesamaan yang kuat dengan dengan *B. subtilis* MN704480.1 dan sekuen pembanding lainnya. Nei (2000) menyatakan bahwa semakin tinggi nilai *bootstrap* dapat dikatakan memiliki tingkat kesamaan yang kuat. Selanjutnya dilakukan karakterisasi untuk melihat komposisi basa nukleotida.

Proses karakterisasi untuk melihat komposisi basa nukleotida yang terdiri dari beberapa basa nitrogen yaitu (A) adenin, (G) guanin, (T) timin dan (C) sitosin. Tujuan dalam analisis komposisi basa nukleotida yaitu untuk mengetahui kemiripan makhluk hidup dalam tingkat laju mutasi dan evolusi yang dibandingkan dengan pasangan basa nukleotida (Claverie, 2007).

Dalam melihat komposisi nukleotida dilakukan dengan MEGA 11 menggunakan *Compute Pairwise Distance*. Hasil analisis tersebut didapatkan hasil komposisi basa nukleotida dengan persentase yang sama pada spesies *Bacillus tequilensis*, *B. subtilis* dan sekuen B dengan total 1400 bp. Untuk hasil komposisi basa nukleotida dapat dilihat pada tabel 4.5.

Tabel 4. 5 Hasil komposisi nukleotida isolat B

Sekuen	ACC. Number	Komposisi Nukleotida %				Total
		A	T	G	C	
<i>subtilis</i>	MN704480 .1	25,1	20,2	31,3	23,4	1400
<i>B. tequilensis</i>	PQ813782. 1	25,1	20,2	31,2	23,5	1400
<i>B. subtilis</i>	PP809306. 1	25,1	20,2	31,2	23,5	1400
<i>B. tequilensis</i>	PP935364. 1	25,1	20,2	31,2	23,5	1400
<i>B. subtilis</i>	ON329106. 1	25,1	20,2	31,2	23,5	1400
<i>B. subtilis</i>	OQ847923. 1	25,1	20,2	31,2	23,5	1400
<i>B. tequilensis</i>	PQ813762. 1	25,1	20,2	31,2	23,5	1400
<i>B. subtilis</i>	MT67250. 1	25,1	20,2	31,2	23,5	1400
<i>B. subtilis</i>	OQ504772. 1	25,1	20,2	31,2	23,5	1400
Isolat B		25,1	20,2	31,2	23,5	1400

Jarak genetik berfungsi untuk menentukan kemiripan genetik antara B dengan spesies yang lain. Dalam penentuan jarak genetik

dilakukan setelah membuat pohon filogenetik dan melihat komposisi basa nitrogen. Data jarak genetik dapat menggunakan *software* MEGA 11. Data hasil jarak genetik dapat diunduh dalam bentuk *excel* dan dapat dilihat pada tabel 4.6.

Hasil penghitungan jarak genetik dengan menggunakan pendekatan substitusi kimura 2 parameter (Tabel 4.6) maupun menggunakan *p-distance* (Lampiran 11) menunjukkan isolat B identik dengan *B. subtilis* dan *B. tequilensis* yang ditunjukkan dengan nilai jarak genetik sebesar 0,000. Hal ini menunjukkan memiliki kedekatan karena semakin kecil nilai jarak genetik maka spesies memiliki kedekatan yang sama (Tallei *et al.*, 2016).

Isolat B memiliki nilai jarak genetik sebesar 0,02396 dengan *B. subtilis* OQ847923.1. *B. subtilis* OQ847923.1 juga memiliki nilai jarak sebesar 0,02396 dengan *B. subtilis* dan *B.*

tequilensis lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa isolat B tidak identik dengan *B. subtilis* OQ847923.1.

Tabel 4.6 Hasil jarak genetik isolat *ecoenzyme* dengan sekuen pembanding menggunakan parameter 2- Kimura

[illegible]

Selain data hasil komposisi nukleotida dan jarak genetik juga terdapat analisis hasil variasi genetik dari sekuen B yaitu dengan melihat data *Conserved site* (C), *Variable site* (V), dan *Singleton site* (S). Hasil dari variasi genetik dapat dilihat pada tabel 4.7.

Tabel 4. 7 Vasil variasi genetik

<i>Conserved site</i>	372/1400
<i>Variable site</i>	1028/1400
<i>Singleton site</i>	1019/1400

Tabel 4.7 merupakan hasil variasi genetik yang diperoleh dari 10 sekuen berdasarkan gen 16S rRNA yang telah dianalisis melalui *software* MEGA 11. Dari tabel tersebut didapatkan nilai *Conserved site* dengan nilai 372/1400 yang lestari dan memiliki nilai *Variable site* dengan nilai 1028/1400 yang dapat menggambarkan adanya variasi genetik. Selain itu terdapat juga *Singleton site* dengan nilai 1019/1400. Hasil variasi tersebut digunakan sebagai pembeda setiap taksa (Aprilyanto, 2016).

B. Pembahasan Hasil Penelitian

1. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Katalase Peroksidase

Isolasi bakteri bertujuan untuk seleksi bakteri penghasil enzim katalase dan peroksidase yang diawali dengan *serial dilution* atau pengenceran bertingkat dengan tujuan untuk mengurangi jumlah mikroba dalam sampel (Yunita, 2015). Metode isolasi yang digunakan yaitu dengan *streak plate* atau

teknik sebar yang memiliki kelebihan yaitu dapat memperkirakan jumlah bakteri yang tumbuh (Damayanti, 2020). Hasil tiga isolat dengan kode A, B, dan C didapatkan hasil yang berbeda pada tiap isolat yang ditumbuhkan yang selanjutnya dilakukan purifikasi untuk mendapatkan hasil isolat yang murni.

2. Karakterisasi Morfologi

Identifikasi bakteri bertujuan mempermudah dalam proses identifikasi jenis bakteri baik secara biokimia maupun molekuler (Wahyuni, 2018). Uji morfologi yang dilakukan yaitu mengamati morfologi koloni meliputi bentuk koloni bakteri, warna koloni, tepi koloni, dan elevasi koloni bakteri (Nurhari 2009).

Identifikasi morfologi dan koloni sel pada tabel 4.1 menunjukkan hasil rata-rata koloni yang berbentuk bulat. Pada penelitian Setiawan (2016), melaporkan isolat yang ditemui pada

ecoenzyme dari kulit jeruk memiliki koloni putih, pertumbuhan koloni rata dan tebal. Teknik paling dasar untuk mengklasifikasikan bakteri didasarkan pada bentuk dan susunan sel bakteri (Mohamad *et al.*, 2014).

Selain identifikasi bakteri yang didasarkan pada bentuk koloni bakteri, warna koloni, tepi koloni, dan elevasi. Salah satu cara mengklasifikasikan bakteri adalah dengan pewarnaan Gram adapun tujuan dari pewarnaan Gram yaitu untuk mengetahui bakteri masuk ke dalam golongan bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif (Willey *et al.*, 2008). Bakteri Gram negatif berwarna merah, sedangkan bakteri Gram positif berwarna ungu (Nau *et al.*, 2022).

Berdasarkan hasil pewarnaan Gram, isolat A tergolong bakteri Gram negatif, sedangkan isolat B dan C tergolong bakteri Gram positif. Gram negatif dibuktikan dengan warna merah

pada dinding selnya sedangkan Gram positif memiliki warna ungu pada dinding selnya (Nau *et al.*, 2022). Warna merah akibat dari peptidoglikan bakteri Gram yang tipis sebesar <10 nm dibandingkan dengan Gram positif yang memiliki peptidoglikan yang tebal, sehingga mudah larut oleh alkohol dan safranin masuk ke dalam sel (Mai-Prochnow *et al.*, 2016). Bakteri yang masuk ke dalam jenis Gram positif akan mempertahankan kristal violet sebagai zat pewarna sedangkan bakteri Gram negatif tidak dapat mempertahankan karena dibilas dengan safranin (Susanto, 2016). Fungsi safranin pada pengujian Gram yaitu sebagai pembeda terhadap zat pewarna kristal violet (Hidayat, 2012).

Hasil pengamatan sel pada tiap isolat yaitu berbentuk batang atau basil. Menurut (Irianto, 2014), bakteri berbentuk batang dapat dijumpai pada famili *Enterobacteriaceae*

seperti *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae* maupun famili *Bacillaceae* seperti genus *Clostridium* dan genus *Bacillus*.

Pengujian katalase dilakukan dengan menggunakan reagen hidrogen peroksida (H_2O_2), uji dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri yang mampu menghasilkan enzim katalase peroksidase. Enzim ini mendetoksifikasi hidrogen peroksida dengan memecahnya menjadi air dan gas oksigen (Rahmi *et al.*, 2015).

Bakteri enzim katalase berfungsi untuk mengurai (H_2O_2) yang terbentuk dari proses respirasi aerob terhadap bakteri, menjadi air (H_2O) dan oksigen (O_2) (Purba, 2013). Hidrogen peroksida diubah menjadi air dan oksigen agar tidak berbahaya bagi bakteri karena dapat menyebabkan toksik sehingga tidak bisa hidup pada lingkungan yang terdapat hidrogen peroksida (Hadioetomo, 1990). Pada gambar 4.

4 dapat dilihat adanya gelembung gas yang membuktikan adanya kemampuan bakteri dalam mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen.

Hasil positif pada uji katalase dibuktikan dengan adanya gelembung gas yang berarti adanya kemampuan bakteri dalam mengubah hidrogen peroksida menjadi air hal itu sesuai dengan Dewi (2014) yang menyatakan bakteri yang menghasilkan gelembung oksigen termasuk bakteri aerob, senyawa hidrogen peroksida terbentuk pada saat metabolisme aerob sehingga bakteri tumbuh pada lingkungan yang terdapat oksigen.

Proses enzim katalase mengubah H_2O_2 yaitu pada saat melakukan respirasi yang menghasilkan beberapa macam komponen salah satunya adalah H_2O_2 , bakteri yang dapat memecah H_2O_2 dengan enzim katalase akan segera mengubah menjadi oksigen dan air

dengan adanya gelembung oksigen agar tidak bersifat racun (Murali, 2017). Dari percobaan yang telah dilakukan dari tiga isolat A, B dan C menunjukkan hasil positif dan sesuai dengan teori yang telah dilakukan yaitu munculnya gelembung gas pada saat ditetesi hidrogen peroksida.

Enzim peroksidase merupakan enzim yang berperan dalam peningkatan produksi senyawa fenol dan mekanisme peligninan yang dapat mencegah adanya patogen pada dinding sel tanaman (Nicholson *et al.*, 2002). Adanya dinding sel yang kuat pada tanaman akan menjaga dari aktivitas patogen dan penyakit yang menyerang (Silva *et al.* 2004).

Adanya aktivitas enzim peroksidase dapat dilihat pada tabel 4.2, dari hasil uji didapatkan nilai absorbansi yaitu pada isolat A dengan nilai 0,067, isolat B dengan nilai 0,563, isolat C dengan nilai 0,072. Dari hasil spektrofotometer

UV- Vis didapatkan hasil absorbansi tertinggi yaitu pada isolat B.

Semakin tinggi nilai absorbansi maka kandungan enzim peroksida juga tinggi, hal tersebut terjadi karena adanya hidrogen peroksida yang dapat memicu aktivitas enzim peroksida dalam mengurai hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen (Vicuna *et al.* 2011). Selain hidrogen peroksida sebagai senyawa yang bersifat toksik bagi patogen, enzim peroksidase juga dapat menjadi katalisator dalam pembentukan lignin (Patel, 2007).

Setelah dilakukan uji katalase dan peroksidase yang bertujuan untuk melihat adanya aktivitas enzim katalase dan peroksidase selanjutnya dilakukan uji biokimia yang lain. Dilakukan uji biokimia dengan tujuan untuk mengidentifikasi bakteri berdasarkan sifat biokimia dan untuk memperkuat dalam identifikasi bakteri (Harti, 2015).

3. Uji Biokimia

Uji biokimia yang dilakukan yaitu uji TSIA, SCA dan MR. Uji TSIA adalah salah satu uji biokimia yang berfungsi untuk mengidentifikasi bakteri yang memiliki kemampuan dalam memfermentasikan gula baik asam maupun basa (Antriana, 2014). Selain dalam menguji kemampuan bakteri dalam fermentasi gula, uji TSIA juga dapat untuk menguji kemampuan bakteri dalam menghasilkan gas dan hidrogen sulfida (H_2S) (Wahyuni *et al*, 2018).

Hasil isolat A, B dan C didapatkan hasil yang negatif yaitu dengan adanya perubahan menjadi merah yang dapat dilihat pada tabel 4.3. Pada ketiga isolat yang membuktikan bakteri bersifat basa dan gula dapat difermentasi sebagai sumber energi (Cheesbrough, 2010). Isolat A, B dan C yang telah diuji tidak menghasilkan gas hidrogen sulfida (H_2S) yang dibuktikan dengan tidak

adanya warna hitam pada dinding tabung yang digores. warna hitam pada tabung reaksi membuktikan bakteri dapat menghasilkan gas (H_2S) (Sari *et al*, 2018). Setelah uji TSIA dilanjutkan dengan uji SCA dan MR.

Uji SCA merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mengubah sitrat sebagai sumber karbon dengan bantuan enzim sitrat sehingga terjadi perubahan warna pada media (Kismiyati *et al*, 2009). Hasil positif dari uji SCA yaitu adanya perubahan warna media dari hijau menjadi biru (Anggraini *et al*, 2016)

Hasil uji SCA pada isolat A, B dan C pada tabel 4.3 terdapat hasil yang positif dan negatif. Hasil positif yaitu pada isolat C sedangkan isolat A dan B hasilnya negatif. Hasil uji negatif karena bakteri tidak memiliki kemampuan dalam mengubah sitrat sebagai sumber karbon sehingga pada media masih berwarna hijau

(Hadioetomo 1993). Hasil yang positif pada isolat C karena dapat mengubah media dari hijau menjadi biru yang membuktikan bakteri memerlukan sitrat sebagai sumber karbon (Sulistiyaningsih, 2010).

Uji MR merupakan uji yang bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mengubah glukosa dengan menghasilkan asam pada produk akhir (Sunatmo, 2007). Hasil positif pada uji MR yaitu perubahan warna ketika ditetesi dengan reagen *Methyl Red* yaitu menjadi merah sedangkan jika tidak terjadi perubahan warna maka bakteri tidak memiliki kemampuan dalam mengubah glukosa sehingga warna media masih berwarna kuning (Holt *et al.*, 2000).

Hasil uji MR menunjukkan bahwa isolat A dan B memberikan hasil positif, sedangkan isolat C menunjukkan hasil negatif. Hal itu membuktikan pada isolat bakteri tidak dapat

mengubah glukosa karena bersifat basa sehingga warna dan media tetap kuning, sedangkan pada isolat A, B hasilnya positif dengan adanya perubahan menjadi warna merah yang artinya isolat tersebut dapat mengubah glukosa menjadi asam sehingga terjadi perubahan pada media (Sardiani *et al*, 2015).

Berdasarkan hasil karakterisasi dan uji biokimia yang dilakukan pada tabel 4.2 dan 4.3 dapat diidentifikasi jenis bakteri dari isolat A, B dan C yaitu genus *Pseudomonas* pada isolat A sedangkan isolat B dan C adalah genus *Bacillus*. *Pseudomonas* termasuk dalam famili Pseudomonadaceae, kelas Gammaproteobacteria, dan saat ini memiliki 255 spesies dan 18 subspecies (LPSN, 2020). Sedangkan *Bacillus* termasuk ke dalam genus *Rhizobacteria* adapun beberapa jenis spesies *Bacillus* yang sering ditemui yaitu *B.*

subtilis, *Bacillus cereus* dan *Bacillus coagulans* (Sumardi, 2012).

Dari data tabel 4.3 bakteri *Pseudomonas* termasuk ke dalam Gram negatif dengan bentuk batang yang dapat dilihat pada isolat A digambar 4.3. Pada uji katalase positif, uji sitrat positif, uji glukosa negatif. Bakteri *Pseudomonas* termasuk bakteri aerob, katalase positif, tidak dapat memfermentasikan tetapi dapat mengoksidasi glukosa dan terdapat flagel (Wajdi *et al.*, 2017).

Genus *Bacillus* termasuk ke dalam Gram positif dengan hasil uji biokimia pada tabel 4.3 dengan katalase positif, uji sitrat negatif dan isolat mampu memfermentasikan gula. Berdasarkan ciri-ciri di atas genus *Bacillus* sama seperti isolat B dan C pada gambar 4.3 yang memiliki bentuk batang (basil) (Yulvizar, 2013).

4. Identifikasi molekuler menggunakan Gen 16S rRNA

Dari hasil karakterisasi dan uji biokimia pada isolat bakteri penghasil enzim katalase dan peroksidase, kemudian dilanjutkan dengan Identifikasi molekuler menggunakan Gen 16S rRNA. Identifikasi molekuler dilakukan melalui empat tahapan yaitu isolasi DNA, PCR, elektroforesis, dan analisis sekuensing. Isolasi DNA bertujuan untuk memisahkan DNA dari sel sehingga memperoleh DNA yang murni. Isolasi dilakukan dengan merusak dinding sel mikroorganisme sehingga DNA dapat keluar dari dalam sel (Harvianti, 2017).

Isolasi DNA mengikuti protokol presto TM mini gDNA *Bacteria Kit* dengan penambahan proteinase K yang berfungsi dalam membantu menghentikan RNase/ DNase sehingga mencegah degradasi asam nukleat (Gautam, 2022). Proses PCR pada penelitian ini menggunakan gen 16S rRNA karena bersifat

universal untuk bakteri sehingga dapat digunakan untuk mengukur hubungan filogeni spesies bakteri (Woese *et al.*, 1985).

Gen 16S rRNA adalah komponen struktural utama dalam subunit ribosom bakteri yang digunakan dalam sintesis protein pada sel organisme (Alzubaidy *et al.* 2016; Bibi *et al.* 2017). Dalam penelitian sebelumnya gen 16S rRNA banyak digunakan dalam proses identifikasi bakteri misal, pada penelitian Ningtyas (2023) yang menemukan bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* hasil isolasi dari *ecoenzyme* dan Safitri (2018) dengan hasil *B. thuringiensis* pada sampel bakteri penghasil enzim protease pada oncom.

Tahapan selanjutnya yaitu PCR menggunakan Gen 16S rRNA yang dilakukan sebanyak 30 siklus, hal tersebut karena jika menggunakan lebih dari 30 siklus tidak akan meningkatkan ketepatan primer dan jika

kurang dari 30 akan menurunkan tingkat kuantitas hasil PCR (Lorenz, 2012). Primer yang digunakan dalam amplifikasi ini adalah primer 27F-1492R (Weisburg *et al.*, 1991).

Setelah proses amplifikasi selanjutnya dilakukan elektroforesis untuk melihat pita DNA yang dihasilkan, konfirmasi hasil menunjukkan hasil yang sejajar dengan *ladder* yaitu pada ukuran 1500 bp, selanjutnya dibandingkan dengan marka DNA sebagai pembanding dalam analisis. Hasil PCR dari tiga isolat A, B dan C mendapatkan hasil yang baik dengan pita yang tebal dan sejajar dengan *ladder* yang digunakan yaitu sekitar 1.500 bp, sehingga sesuai dengan Yuenleni (2019) yaitu ciri-ciri hasil PCR yang bagus yaitu hasil pita atau *band* yang tebal (jelas), tidak ada *smear*, dan ukuran sesuai DNA.

Namun dari isolat C masih terdapat *smear* sehingga belum dikatakan bagus dan sesuai

karena masih ditemukan *smear* pada bagian bawah *band*. *Smear* yang muncul pada saat visualisasi dapat disebabkan oleh dua faktor yaitu adanya degradasi pada DNA dan adanya kontaminasi dari produk yang dihasilkan (Mulyani *et al.*, 2011), adanya degradasi DNA disebabkan proses ekstraksi yang kurang baik sehingga dapat menyebabkan terputusnya rantai ikatan DNA (Harahap, 2018). Adanya optimasi yang tidak sesuai dan suhu *annealing* juga mempengaruhi, suhu yang rendah menyebabkan primer tidak melekat pada DNA *template* yang sesuai, sehingga menghasilkan produk PCR yang tidak sesuai dengan target (Aulia *et al.*, 2021). DNA *template* yang berlebih juga mempengaruhi kualitas hasil sehingga diperlukan purifikasi untuk mendapatkan hasil yang sesuai (Zrimec *et al.*, 2013).

Primer 27F dan 1492R merupakan primer universal yang banyak digunakan dalam

penelitian untuk identifikasi bakteri melalui amplifikasi gen 16S rRNA. Primer 27F menempel pada ujung 5' gen 16S rRNA, sedangkan primer 1492R menempel pada ujung 3', sehingga dapat mengamplifikasi hampir seluruh panjang gen 16S rRNA, yakni sekitar 1500 bp. Wilayah gen yang ditarget mencakup daerah konservatif dan variabel (V1-V9), yang sangat penting untuk analisis taksonomi karena memungkinkan perbedaan antar spesies bakteri secara akurat (Janda *et al*, 2007).

Penggunaan primer 27F-1492R sering digunakan dalam penelitian identifikasi bakteri pada pupuk organik dan *ecoenzyme* karena bersifat universal dan akurasi yang tinggi dalam identifikasi bakteri, misal pada penelitian Feren (2022) dengan hasil *Bacillus cereus*.

5. Sekuensing dan Analisis Data

Hasil sekuensing isolat A dan B yang sudah diamplifikasi selanjutnya dianalisis menggunakan metode Sanger. Metode Sanger otomatis dipilih karena banyak digunakan untuk mendeteksi beberapa mutasi dengan ukuran yang tidak lebih dari 1.000 bp (Gomes, 2018). Dari hasil sekuensing pada isolat A dan B yang diperoleh dalam bentuk data digital yang berisikan dua file yaitu *forward* dan *reverse*. Data tersebut dalam bentuk elektroforegram yang berisi setiap basa nitrogen, disimbolkan dalam bentuk warna yaitu hijau (adenin), merah (timin), biru (sitosin), dan hitam (guanin) (Winarsih *et al.*, 2022).

Hasil elektroforegram yang diperoleh dari dua isolat A dan B menghasilkan data yang berbeda-beda, pada isolat A pada format *forward* dan *reverse* masih banyak ditemukan adanya *peak* yang saling bertumpuk. Adanya

peak yang saling bertumpuk dapat menyebabkan data yang dibaca tidak jelas karena menurut, Untu *et al.*, (2015) menyatakan hasil sekuensing dapat dikatakan baik jika puncak grafik tinggi dan tidak saling bertumpuk satu sama lain.

peak yang saling bertumpuk disebabkan oleh keberadaan *template* DNA yang bercampur, primer yang tidak spesifik, atau masalah struktur sekunder pada DNA. Campuran *template* dapat berasal dari produk PCR yang mengandung lebih dari satu amplicon atau dari plasmid yang mengandung insert berbeda, sehingga menyebabkan pembacaan basa menjadi tumpang tindih. Primer yang menempel pada lebih dari satu lokasi juga dapat memicu pembacaan simultan dari beberapa lokasi. Selain itu, struktur sekunder seperti hairpin dapat mengganggu kerja DNA

polymerase, menghasilkan sinyal tidak stabil (Sanger, 1997).

Berdasarkan dari kedua data yang didapatkan hasil yang sesuai dan dapat dikatakan baik yaitu pada isolat B dengan *peak* yang tidak saling bertumpuk dan tidak terpisah satu sama lain. Menurut Bangol (2014) hasil sekuensing yang bagus ditunjukkan dengan grafik yang puncaknya tinggi dan tidak saling berpisah satu sama lain sedangkan hasil yang tidak bagus yaitu grafik pada puncak landai dan saling terpisah serta adanya puncak ganda.

Data yang ditampilkan dalam bentuk grafik dengan puncak dan lengkungan yang dijadikan indikator kualitas baik atau tidaknya suatu sekuen. Data hasil dari elektroforegram menghasilkan data dan hasil yang berbeda yaitu pada sekuen isolat B menghasilkan *forward* dengan panjang 1.260 bp sedangkan *reverse* dengan panjang 1.250 bp

Hasil data dari kedua isolat A dan B dapat dilihat pada gambar 4. 7 dan 4. 8 dengan hasil baik yaitu hasil grafik yang tinggi dan saling berpisah satu sama lain pada isolat B sedangkan pada gambar 4. 9 dengan hasil yang kurang bagus pada isolat A, karena adanya banyak *peak* yang bertumpuk dan tidak terbentuk yang disebabkan adanya *template* sekuen yang ganda sehingga dapat mengganggu penentuan posisi basa DNA (Naipospos *et al.*, 2014). Adanya *peak* yang bertumpuk pada tiap basa dapat diatasi dengan cara memotong basa yang berlebih secara manual dengan BioEdit 7.

Pemotongan basa yang berlebih atau bertumpuk pada tiap sekuen yaitu dengan memotong basa pada awal *forward* dan *reverse* menurut Shuhaib (2023) pasangan basa yang berlebih pada sekuen biasanya terdapat pada awal sehingga dapat menyebabkan pembacaan

basa yang tidak akurat sehingga harus dipotong. Selain itu pemotongan basa sekuen umumnya dilakukan pada bagian ujung 5' awal dan 3' akhir karena memiliki kromatogram yang kurang baik (Anafarida, 2020). Adanya perbedaan sifat kimia pada ujung awal 5', 3' akhir dan bagian tengah sehingga dapat mempengaruhi fase diam dan fase gerak, yang dapat berdampak pada pemisahan dan analisis molekul sampel (Sambrook, 2001).

Setelah dilakukan pemotongan sekuen berdasarkan hasil grafik hal tersebut dilakukan karena prinsip dari proses *editing* dan pemotongan digunakan dalam identifikasi adanya mutasi gen (Eidhamer, 2004).

Setelah proses *editing* menggunakan BioEdit 7 dilanjut dengan proses BLASTn yang bertujuan untuk menemukan wilayah dari sekuen yang memiliki kemiripan dengan sekuen yang terdapat pada *database* (Bejerano

et al., 2001). Pada BLAST terdapat fitur BLASTn yang digunakan untuk membandingkan suatu *query* berdasarkan *database* sekuen nukleotida yang tersedia pada NCBI (Hennebry *et al.*, 2012). Dari hasil BLASTn ditemukan hasil adanya 100 sekuen yang memiliki kemiripan dengan sekuen B.

Hasil BLASTn yang terdapat 100 sekuen yang mirip kemudian diambil 10 dari atas yang dapat dilihat pada tabel 4. 4. Hasil pemilihan 10 sekuen didasarkan pada *percen query cover*, *expectation value*, dan *percent identity* yang tinggi. Hasil nilai *percent query cover* yang tinggi yaitu dengan nilai 100%, nilai *percent identity* pada rentang nilai 98.80% dan nilai *expectation* yang rendah yaitu dengan nilai 0 (Akbar, 2021). Nilai *query cover* dan nilai *percent identity* yang tinggi serta *expectation value* yang mendekati 0 akan membuat data sekuen semakin baik, serta data yang di analisis

sesuai dengan sekuen target dalam database (Roslim *et al.*, 2023).

Dari hasil BLASTn didapatkan hasil sekuen B memiliki kemiripan dengan genus *B. subtilis* hal tersebut dibuktikan dengan hasil 98.80% sehingga memiliki kemiripan lebih dari 97% dapat dikatakan mirip pada tingkat spesies atau genus (Andersen, 2019). Selain dari genus *Bacillus* terdapat juga kemiripan dengan *B. subtilis* dan *B. tequilensis* adanya kemiripan dua spesies tersebut dikarenakan memiliki hubungan filogenetik yang dekat, menurut Gatson *et.al* (2006) *B. subtilis* dan *B. tequilensis* memiliki hubungan filogenetik yang dekat pada pohon filogenetik menggunakan metode *maximum likelihood*.

Proses selanjutnya yaitu pensejajaran sekuen menggunakan MEGA 11 dengan bantuan program Clustral W (Thompson *et al.*, 1994). Spesies sekuen hasil BLAST sebanyak 10

sekuen, kemudian dimasukkan ke dalam MEGA 11 dan dimasukkan juga satu spesies sebagai *outgroup* yaitu *E. coli*. Penggunaan *outgroup* dibutuhkan karena dalam pembuatan pohon filogenetik untuk memberikan polarisasi kekerabatan atau karakter antara apomorfik dan plesiomorfik (Hidayat, 2008). Karakter apomorfik merupakan karakter yang dapat berubah sehingga dapat diturunkan pada *ingroup* sedangkan plesiomorfik yang terdapat pada *outgroup* yang digunakan untuk memperkuat hasil sekuen (Pangestika *et al.*, 2015). Dari hasil penyejajaran selanjutnya dilanjut dengan pembuatan pohon filogenetik.

Rekonstruksi pembuatan pohon filogenetik analisis filogenetika menggunakan metode *maximum likelihood* dengan *bootstrap* sebanyak 1000 menggunakan model Kimura 2-parameter. Hasil pohon yang terbentuk yaitu terbagi menjadi 2 jenis yaitu original dan

dengan hasil *bootstrap* (Anafarida, 2020). Model kimura 2- dipilih karena dapat mengetahui kesamaan antar sekuen serta cepat dan mudah dalam analisis kelompok sekuen (Bhambri, 2012). Panjang garis yang berbeda pada pohon menunjukkan tingkat evolusi masing-masing spesies. Garis yang semakin panjang menunjukkan jarak evolusi semakin jauh sedangkan garis yang lebih pendek yaitu adanya kedekatan antar jarak evolusi suatu spesies (Anafarida, 2020)

Maximum likelihood dengan 1000 *bootstrap* hal tersebut dipilih karena menggunakan *bootstrap* sebanyak 1000 ulangan dapat meningkatkan kepercayaan dalam pembuatan pohon filogenetik (Hall, 2001). Selain itu menurut Ubadillah (2009) semakin besar nilai *bootstrap* dapat meningkatkan tingkat kepercayaan dalam hasil rekonstruksi pohon. Dari hasil pohon filogenetik menunjukkan hasil

bahwa nilai *bootstrap* pada pohon filogenetik yaitu 100% yang membuktikan bahwa tingkat kepercayaan sangat tinggi sesuai dengan pernyataan Hidayat (2008) bahwa nilai *bootstrap* tinggi apabila lebih dari 50.

Hasil pohon filogenetik yaitu pada sekuen B satu *klad* dengan spesies *B. subtilis* yaitu dengan nilai *bootstrap* 100% sehingga membuktikan antara spesies tersebut masih memiliki kekerabatan yang sangat dekat selain itu juga diperkuat dengan nilai *percent query cover* yang tinggi yaitu dengan nilai 100%, nilai *percent identity* pada rentang nilai 98.80% dan nilai *expectation* yang rendah yaitu dengan nilai 0 sehingga dapat memperkuat bahwa isolat bakteri B memiliki hubungan kekerabatan yang erat dengan spesies referensi yang teridentifikasi (Altschul, 1990). Hasil pohon filogenetik tersebut sesuai dengan Ludwig (2012) yang menyatakan keberadaan dua isolat

dengan cabang yang sama menunjukkan adanya kesamaan spesies.

Untuk memperkuat adanya kedekatan antar spesies juga dilakukan identifikasi jarak genetik yang digunakan untuk membandingkan antara persamaan dan perbedaan antar spesies. Dari hasil jarak genetik yang sudah dianalisis pada tabel 4.6 dengan hasil yaitu dari 10 sekuen pembanding didapatkan hasil yaitu 0,00 yang membuktikan jarak genetiknya sangat dekat karena menurut Menurut Pinem *et. al.* (2015), jarak genetik yang dekat atau rendah menunjukkan hubungan genetik yang dekat sedangkan jarak genetik yang tinggi dan menunjukkan kekerabatan yang jauh.

Selain jarak genetik dilakukan juga uji variasi genetik untuk melihat adanya variasi sekuen isolat B pada tabel 4.7, yaitu adanya variasi genetik *Conserved site* (situs terlestarikan) merupakan urutan DNA, RNA,

protein yang mirip dalam berbagai spesies dalam satu homolog, *Conserved site* pada sekuen B yaitu dengan nilai 372/1400 dapat dikatakan lestari. *Variable site* dengan nilai 1028/1400 menunjukkan adanya variasi asam amino di antara taksa variasi tersebut menunjukkan adanya variasi genetik yang dapat digunakan dalam membedakan taksa. *Singleton site* dengan nilai 1019/1400 menunjukkan adanya variasi yang unik dan berbeda pada tiap taksa yang memiliki kesamaan, situs tersebut menunjukkan adanya variasi genetik yang bersifat unik namun tidak dapat dapat digunakan dalam menentukan hubungan evolusi antar takson dengan metode parsimoni (Steenwyk, 2020).

Berdasarkan hasil identifikasi morfologi dan uji biokimia serta diperkuat dengan sekuensing menggunakan gen 16S rRNA dan analisis data, ditemukan jika spesies bakteri

pada *ecoenzyme* isolat B yaitu *B. subtilis* yang merupakan bakteri dari genus *Bacillus* yang memiliki ciri-ciri berbentuk batang, Gram positif, menghasilkan spora dan katalase positif (Awais, 2010). Sedangkan berdasarkan uji molekuler isolat B memiliki kedekatan dengan spesies *B. subtilis* karena memiliki nilai *percent query cover* yang tinggi yaitu dengan nilai 100%, nilai *percent identity* pada rentang nilai 98.80% dan nilai *expectation* yang rendah yaitu dengan nilai 0 sehingga dapat memperkuat bahwa isolat bakteri B memiliki hubungan kekerabatan dengan *B. subtilis* selain itu juga diperkuat dengan hasil pohon filogenetik yang menunjukkan nilai *bootstrap* 100% dan nilai jarak genetik hasil yaitu 0,00 yang membuktikan jarak genetiknya sangat dekat.

Bakteri *B. subtilis* merupakan salah satu jenis bakteri yang dapat bermanfaat dalam bidang pertanian. Manfaat dari *B. subtilis* yaitu

dapat menghambat perkembangan patogen melalui mekanisme persaingan, antibiosis, dan pemacuan pertumbuhan selain itu juga berperan dalam biodegradasi bahan organik sehingga dapat berperan sebagai bakteri PGPR (Tang *et al.* 2012).

Zongzheng *et al.* (2009) menyatakan bahwa *B. subtilis* dapat menghambat reproduksi cendawan patogen melalui efek persaingan dan antibiotik. Keefektifan *B. subtilis* dapat menghambat reproduksi cendawan patogen dalam mengendalikan penyakit pada berbagai tanaman menunjukkan hasil yang cukup signifikan, seperti penyakit busuk buah kakao yang disebabkan oleh cendawan *Phytophthora palmivora*, *Rhizoctonia solani*, dan *Colletotrichum panacicola* (Suriani *et al.* 2014).

BAB V

KESIMPULAN

A. Kesimpulan

- a. Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh tiga isolat bakteri dari *ecoenzyme* food waste yang menghasilkan enzim katalase, yaitu isolat A, B, dan C, yang ditunjukkan dengan munculnya gelembung gas setelah penambahan hidrogen peroksida. Uji enzim peroksidase menunjukkan bahwa isolat B memiliki nilai absorbansi tertinggi (0,563), diikuti oleh isolat C (0,072) dan isolat A (0,067).
- b. Berdasarkan hasil penelitian, identifikasi spesies bakteri penghasil enzim katalase dan peroksidase pada *ecoenzyme* dari *food waste* menggunakan DNA marker 16S rRNA yaitu pada sekuen B memiliki kekerabatan dengan spesies *B. Subtilis* karena memiliki nilai bootstrap pada pohon filogenetik yaitu 100%

yang membuktikan bahwa tingkat kepercayaan sangat tinggi .

B. Saran

- a. Penelitian selanjutnya disarankan adanya isolasi bakteri pada *ecoenzyme* dari *food waste* untuk mengetahui adanya enzim protease.
- b. Penelitian selanjutnya disarankan untuk menguji *ecoenzyme* dari *food waste* secara langsung pada tanaman, khususnya dalam uji peroksidase, guna melihat kemampuan *ecoenzyme* dalam mendukung kesuburan tanaman.
- c. Penggunaan primer Gen 16S rRNA yang lebih spesifik untuk mencegah hasil peak kurang maksimal serta diperlukan pengujian secara biokimia lanjutan dan analisis molekuler menggunakan hibridisasi DNA-DNA guna mengidentifikasi strain sekuen yang didapatkan.

- d. Pengujian selanjutnya disarankan untuk *ecoenzyme* dari *food waste* adanya uji antibakteri yang memungkinkan *ecoenzyme* dari *food waste* dapat digunakan sebagai antiseptik dan bahan dalam pembuatan sabun cuci tangan yang ramah lingkungan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbott, A. (1995). *Sequence Analysis: New Methods For Old Ideas. Annual Review of Sociology*, 21(1), 93–113.
<https://doi.org/10.1146/Annurev.Soc.21.1.93>
- 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.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Andersen, (2019). Antimicrobial Activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26:343-356.
- Akbar. F. (2021). Konservasi Genetik Hantap (*Sterculia oblongata* R. Br.) Menggunakan DNA Barcoding Sekuen psbA-trnH. *[Skripsi]*. Semarang: Universitas Islam Negeri Walisongo.
- Anafarida, O., & Badruzsaufari. (2020). Analisis Filogenetik Mangga (*Mangifera spp.*)

Berdasarkan Gen 5,8S RRNA. *Ziraa'ah Majalah Ilmiah Pertanian*. 45 (2): 120-126.

- Alzubaidy, H., Essack, M., Malas, T. B., Bokhari, A., Motwalli, O., Kamanu, F. K., Jamhor S. A., Mokhtar, N. A., Antunes, A., Simoes, M. F., Alam, I., Bougouffa, S., Lafi, F. F., Bajic, V. B., & Archer, J. A. (2016). Rhizosphere microbiome metagenomics of gray mangroves (*Avicennia marina*) in the Red Sea. *Gene*, 576(2), 626-636.
- Agustina, D., C. Yulvizar, Risa N. (2013). Isolasi dan karakterisasi bakteri pada ikan kembung (*rastrelliger* sp.) asin berkitosan. *Biospecies*. Vol(6)1: 15-19.
- Al-Baarri, A. N., M. Hayashi, M. Ogawa, And S. Hayakawa. (2015). *Effects Of Mono- And Disaccharides on The Antimicrobial Activity Of Bovine Lactoperoxidase System.*, 74(1): 134-139.
- Anggraini, M. (2016). Pengaruh Konsentrasi *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) dan Lama Penyimpanan Pada Suhu Dingin Terhadap Stabilitas dan Karakteristik Minuman Probiotik Sari Buah Nanas. *Skripsi*. Universitas Lampung, Bandar Lampung.
- Antriana, N. (2014). *Isolasi Bakteri Asal Saluran Pencernaan Rayap Pekerja (Macrotermes spp.)*, *Saintifika*; Jurusan PMIPA, 16(1): 18-28.

- As-Suyuthi, Jalaluddin. (1994). *al-Durr al-Mantsur fi al-Tafsir al-Ma'tsur*. Bairut: Darr al- Fikr.
- Athanasopoulou, K., Adamopoulos, P.G., Scorilas, A. (2023). *Unveiling the Human Gastrointestinal Tract Microbiome: The Past, Present, And Future of Metagenomics*. *Biomedicines*, 11, 827 <https://doi.org/10.3390/biomedicines11030827>. PMID: 36979806; PMCID: PMC10045138.
- Atika Dwi Farini, Sarto, Suryo Purwono. (2019). *Pengaruh Konsentrasi Peroksida Terhadap Produksi Biohidrogen Dari Limbah Buah Jeruk Melalui Metode Fermentasi Gelap*. Jurusan Teknik Kimia Universitas Gadjah Mada.
- Aulia, S. L., Suwignyo, R. A., & Hasmeda, M. (2021). Optimasi Suhu Annealing untuk Amplifikasi Dna Padi Hasil Persilangan Varietas Tahan Terendam dengan Metode Polymerase Chain Reaction. *Sainmatika: Jurnal Ilmiah Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam*. 18(1), 44.
- Awais M, Pervez A, Yaqub A, and Shah MM. (2010). *Production of antimicrobial metabolites by Bacillus cereus immobilized in polyacrylamide gel*. *J Zool*. 42(33):267–275.
- Al-Shuhaib, M.B.S. and H.O. Hashim. (2023). Mastering DNA chromatogram analysis in Sanger sequencing for reliable clinical analysis.

Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 21(1): 115.

- Balasubramian, M. Dan Boopaty, D. (2013). Purification And Characterization of Peroxidases from Liquid Endosperm of *Cocos Nucifera (L.)*: Biotransformation. *Journal Of Molecular Catalysis B Enzymatic*. Vol 90: 33-24.
- Bangol, I., L. I. Momuat., dan M. Kumaunang. (2014). Barcode DNA Tumbuhan Pangi (*Pangium edule*). Berdasarkan Gen matK. *Jurnal MIPA UNSRAT ONLINE*, 3 (2): 113-119.
- Bhambri, P., & Gupta, O. P. (2012). *Development of phylogenetic tree based on Kimura's Method. Proceedings of 2012 2nd IEEE International Conference on Parallel, Distributed and Grid Computing, PDGC 2012*, 1-3. <https://doi.org/10.1109/PDGC.2012.6449910>
- Bibi, F., Ullah, I., Alvi, S. A., Bakhsh, S. A., Yasir, M., Al-Ghamdi, A. A. K., & Azhar, E. I. (2017). Isolation, diversity, and biotechnological potential of rhizo-and endophytic bacteria associated with mangrove plants from Saudi Arabia. *Genetics and Molecular Research*, 16(2).
- Bejerano G, Pheasant M, Makunin I, Stephen S, Kent WJ, Mattick JS, Haussler D. (2004). *Ultraconserved elements in the human genome*. *Science*. 28;304(5675):1321-5.

- Bappenas. (2021). *Laporan Kajian Food Loss and Waste di Indonesia*.
- Bateman, D. F. (1967). *Increase in peroxidase desecrsed plant tissue*. In Source Book of Laboratory Exercises In Plant Pathology. W. H. Freeman and Co. San Fransisco.
- BPS. (2022). *Statistik Lingkungan Hidup Indonesia*.
- Brown, T.A. (2002). *Genomes, 2nd Edition Oxford*: Garland Science Ltd. Isbn-10: 0-471- 25046-5.
- Cahyana, Y. A., Muchroji Dan M. Bakrun., (2001). *Jamur Tiram*. Penebar Swadaya, Jakarta. Hal 1, 8, 37, 38.
- Cappuccino, J. G., Sherman. N. (2001). *Microbiology: A Laboratory Manual*. Edisi Kedua. New York: Benjamin Cummings Publishing Company.
- Chandra, Y. N., Hartati, C. D., Wijayanti, G., & Gunawan, H. G. (2020). *Sosialisasi Pemanfaatan Limbah Organik Menjadi Bahan Pembersih Rumah Tangga*. Prosiding Seminar Nasional Pengabdian Kepada Masyarakat. Jakarta. 20 Desember.
- Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2016). *Chapter 5 - Rna-Based Technologies*. Biotechnology (Second Edition), 131–179

- Clarridge, J. E. (2004). *Impact Of 16s Rrna Gene Sequence for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infections Disease*. Clinical Microbiology Reviews 17(4): 840--862.
- Cheesbrough, M. 2000. *District Laboratory Practice Intropical Countries*. Press Edition. Cambridge University, Inggris.
- Damayanti NWE, Abadi MF, & Bintari NWD. (2020). *Perbedaan Jumlah Bakteriuri Pada Wanita Lanjut Usia Berdasarkan Kultur Mikrobiologi Menggunakan Teknik Cawan Tuang Dan Cawan Sebar*. Meditory 8(1): 1–4
- Demam, J.M. (1989). *Principle Of Food Chemistry (Terjemahan) Kimia Makanan*. Bandung: Itb. Hal 50-214.
- Dewi, Mita Kusuma. (2014). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Majapahit (*Crescentia cujete*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Ralstonia solanacearum* Penyebab Penyakit Layu. *Jurnal Lentera Bio*. 3(1) : 51-57.
- Downes, F.P. dan Ito K. (2001). *Compendium of Methode for Microbiological Experience of Foods*, 4th Ed. Washington DC :APHA.
- Eling Sasmito, D. K., Kurniawan, R., & Muhimmah, I. (2014). *Karakteristik Primer Pada Polymerase Chain Reaction (Pcr) Untuk Sekuensing DNA*:

Mini Review. In Seminar Nasional Informatika Medis.

Ethica, S.N. (2018). *Buku Referensi Bioremediasi Limbah Biomedik Cair*. Sleman: Deepublish.

Eidhammer, I., Janassen, I., and Taylor, W. R. (2004). *Protein Bioinformatics: an Algorithmic Approach to Sequence and Structure Analysis*. Wiley.

Fao Food and Agriculture Organization. (2018). Faostat. *Food And Agriculture Organization of The United Nations*. [Http://Www.Fao.Org/Faostat/En/#Data/Qc](http://www.fao.org/faostat/en/#Data/Qc) (Diakses 2 Oktober 2021).

Ghannam, M. G., & Varacallo, M. (2022). *Biochemistry, Polymerase Chain Reaction*. Statpearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/Nbk535453/>

Gomes A & Korf B. (2018). *Chapter 5 – Genetic Testing Techniques*. Robin NH, Farmer MB, Editors. In *Pediatrics Cancer Genetics* (pp 47-64).

Giri, A., Khandayataray, P., Murthy, M. K., & Samal, D. (2021). Biochemical and molecular identification of lipolytic bacteria isolated from beverage industrial wastewater and

optimization of lipase-secreting bacteria.
Biomass Conversion and Biorefinery, 1-12.

Gummadi, S., & Kandula, V. N. (2020). A Review On Electrophoresis, Capillary Electrophoresis And Hyphenations. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(12), 6038.

[https://doi.org/10.13040/IJPSR.09758232.11\(12\).6038-56](https://doi.org/10.13040/IJPSR.09758232.11(12).6038-56)

Gupta, N. (2019). DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Journal Of Cytology*, 36(2), 116.

https://doi.org/10.4103/joc.joc_110_18

Gomes A & Korf B. (2018). Chapter 5 – Genetic Testing Techniques. Robin NH, Farmer MB, Editors. *In Pediatrics Cancer Genetics* (pp 47-64).

Gatson, J. W., Benz, B. F., Chandrasekaran, C., Satomi, M., Venkateswaran, K., Hart, M. E. (2006). *Bacillus tequilensis* sp. nov., Isolated from a 2000- year-old Mexican Shaft-Tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56, 1475-1484.

Gautam, A. (2022). *DNA Isolation by Lysozyme and Proteinase K. In: DNA and RNA Isolation Techniques for Non-Experts*. Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert.

Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-94230-4_11.

- Harvianti, Y. (2017). *Identifikasi Molekuler Bakteri Endofit Penghasil Fitase Asal Tanaman Jagung (Zea maysL.) Berbasis Gen 16S rRNA*. Skripsi. Fakultas Sains Dan Teknologi Uin Alauddin. Makassar.
- Hall, B.G. (2001). *Phylogenetic Trees Made Easy: A How - To Manual for Molecular Biologists*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA.
- HaryatiK. (2020). Pengujian Kualitas Mikrobiologi Ikan Ekor Kuning Asap dari Pasar Youtefa Papua: *Microbiological Quality of Smoke Yellow Tail Fish from Youtefa Market Papua*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 23(3), 486-494.
<https://doi.org/10.17844/jphpi.v23i3.32434>
- Harahap, A. S. (2018). Uji kualitas dan kuantitas DNA beberapa populasi pohon kapur Sumatra. *Jurnal of Animal Science and Agronomy*, 2(2), 1–6.
- Hadioetomo, RS, (1993), *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*, Gramedia, Jakarta
- Holt, J.G and N.R. Krieg. (2000). *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology*, 9th Edition.

Lippincott Williams & Wilkins. A Wolters
Kluwer Company. Philadelphia, USA.

Harti A S. (2015.) *Mikrobiologi Kesehatan*.
Yogyakarta: ANDI.

Hidayat, T. dan Adi P. 2008. Kajian Filogenetika
Molekuler dan Peranannya dalam
Menyediakan Informasi Dasar untuk
Meningkatkan Kualitas Sumber Genetik
Anggrek. *Jurnal AgroBiogen* 4(1): 35-40.

Herny C. R, Yudistira, A., Herny E. I. S., (2018),
Isolasi, Identifikasi Secara Molekuler
Menggunakan Gen 16s rRNA, Dan Uji
Aktivitas Antibakteri Bakteri Simbion
Endofit Yang Diisolasi Dari Alga Halimeda
opuntia PHARMACON *Jurnal Ilmiah Farmasi-
UNSRAT* Vol. 7 No. 2.

Hennebry, Sarah C., Sait, Leanne C., Mantena, Raju,
Humphrey, Thomas J., Yang, Ji, Scott, Timothy,
Kupz, Andreas, Richardson, Samantha J., &
Strugnell, Richard A. (2012). Salmonella
typhimurium's transthyretin-like protein is a
host-specific factor important in fecal survival
in chickens. *PLoS One*, 7(12), e46675.

Hadioetomo, R. S. (1990). *Mikrobiologi dasar
dalam praktek teknik dan prosedur dasar
laboratorium*. Jakarta: Gramedia.

- Hall, B. G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1229–1235. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst012>
- Irianto, Koes. (2014). *Bakteriologi, Mikologi, dan Virologi. Panduan Medis dan Klinis*. Bandung: Penerbit Alfabeta.
- Janda, J.M., & Abbott, S.L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764.
- Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2011). Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research*, 81–97. www.ssjournals.com
- Kadri, K., & Kadri, K. (2019). Polymerase Chain Reaction (Pcr): Principle and Applications. *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86491>
- Koonin, E. V, & Galperin, M. Y. (2003). Principles And Methods of Sequence Analysis. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/Nbk20261/>
- Kumar, G.P., Yadav, S.K., Thawale, P.R., Singh, S.K. and Juwarkar, A.A. (2008). Robbins and Cotran

Pathologic Basic of Disease.^{8th Ed.} *Journal of Cellular Adaptations, Cell Injury, and Cell Death*, Vol 34(1) 16-18.No

- Kismiyati, Subekti S, Yusuf RWN, dan Kusdarwati R. (2009). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Gram Negatif pada Luka Ikan Maskoki Akibat Infestasi Ektoparasit. . *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. 1(2): 129–134.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: *molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms*. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547. <https://doi.org/10.1093%2Fmolbev%2Fmsy096>
- Liu Yc, Wilkins M, Kim T, Malyugin B, Mehta Js. (2017); *Cataract. Lancet Us National Library of Medicine*. 390: P. 600-612.
- Leboffe, MJ., dan Pierce, B.E. (2012). *Brief Microbiology Laboratory Theory & Application 2nd Edition*. Englewood: Morton Publishing.
- List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclatur (LPSN). (2020). *Campylobacter Jejuni*.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized*

Experiments : JoVE, 63(63), 3998.
<https://doi.org/10.3791/3998>

- Ludwig, W., Klenk, H.P. (2012). *Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, c. 49
 DOI: [10.1007/978-0-387-21609-6_8](https://doi.org/10.1007/978-0-387-21609-6_8)
- Marchesi, J.R., T. Sato, A.J. Weightman, T.A. Martin and J.C. Fry Et Al., (1998). *Design And Evaluation of Useful Bacterium-Specific Pcr Primers That Amplify Genes Coding For Bacterial 16s Rrna*. Applied Environ. Microbiol. 64: 795-799.
- Mount, D.W., (2004). *Bioinformatics: sequence and genome analysis, 2nd ed*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mai-Prochnow A., Maryse C., Jungmi H. and Anthony B.M. (2016). Gram Positive and Gram Negative Bacteria Difer in Their Sensitivity to Cold Plasma. *Scientific Reports*. 6: 38610.
- Mulyani, N. A., Purwanto, I., & Nurruhwati. (2011). Perbandingan beberapa metode isolasi DNA untuk deteksi dini koi herpes virus (KHU) pada ikan mas (*Crypinus carpio* L.). *Jurnal Akuatika*, 7(1).
- Marganingsari A. (2003). *Isolasi Dan Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim Peroksidase Dari Kedelai (Glycine Max)*. Undergraduate Thesis.

Chemistry Department. Faculty Of Mathematics and Science. Universitas Dipenogoro. Semarang. Indonesia.

- Megah, S. I., Dewi, D. S., & Wilany, E. (2018). *Pemanfaatan Limbah Rumah Tangga Digunakan Untuk Obat Dan Kebersihan*. Minda Baharu, 2(1), 50.
<https://doi.org/10.33373/lmb.V2i1.2275>.
- Mukaromah, A. S., Ulfah, M., Rachmah, A. N., Arfan, M. R., Kusumarini, N., & Febriana, A. (2023). Authentication of Wax Apple (*Syzygium samarangense*(Blume) Merr . & L . M Perry) Delima and Citra Cultivars by Morphological and Molecular Approach. *Al-Hayat: Journal of Biology and Applied Biology*,6(1).
<https://doi.org/10.21580/ah.v6i1.18713>
- Muladno. (2002). *Seputar Teknologi Rekayasa Genetika*. Pustaka Wirausaha Muda. Bogor.
- Murali, A. and Patel, S., (2017). The Effect of Different Heavy Metal Acetate Solutions on the Inhibition of Catalase Enzyme. *Journal of the South Carolina Academy of Science*, 15(2), p.13.
- Nurhari. (2009). Mikrobiologi UjiIMVIC. *Open Jurnal of Medical Mikrobiology*. 2:133-137.

- Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Naipospos.N., Miftahuddin.M., dan Sobir,S. (2014). Identifikasi morfologi dan marka molekuler terpaut sifat tidak berbunga jantan pada mutan pisang kepok. *Jurnal Hortikultura* .24(1):23-31.
- NauE, D. B., Karneli, Syailendra, A., Syafitri, I., Wulandari, S., & Julianti, W. (2022). Buah BIT (*Beta vulgaris L.*) Sebagai Alternatif Safranin Pada Pewarnaan Gram. *Husada Mahakam: Jurnal Kesehatan*, Vol 24(12), 19-24.
- Ningtyasn., Mubarikn. R., & Rahayuningsihm. (2023). Penapisan Dan Karakterisasi Amilase Dari Bakteri Asal Ekoenzim. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 28(3), 441-448.
<https://doi.org/10.18343/jipi.28.3.441>.
- Noer, S. (2021). Identifikasi Bakteri Secara Molekular Menggunakan 16S rRNA. *Edubiologia: Biological Science 85 And Education Journal*, 1(1), 1.
<https://doi.org/10.30998/Edubiologia.V1i1.8596>
- Parfitt, J., Barthel, M. & Macnaughton, S. (2010). *Food Waste Within Food Supply Chains: Quantification and Potential for Change To*

2050, Phil. Trans. R. Soc., Vol. 365, Pp. 3065-3081.

- Park, C., Kim, S.B., Choi, S.H., Kim, S. (2021). *Comparison Of 16S rRNA Gene Based Microbial Profiling Using Five Next-Generation Sequencers and Various Primers*. *Frontiers In Microbiology* 12, 15500
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.715500>
- Pavlopoulos, G. A., Soldatos, T. G., Barbosa-Silva, A., & Schneider, R. (2010). *A Reference Guide for Tree Analysis And Visualization*. *Biodata Mining*, 3(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/1756-0381-3-1/Tables/6>
- Phillips, Singh, Lai. (2009). Electromagnetic Fields and DNA Damage. *Pathophysiology Elsevire Journal* ;16: 88-79.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., & Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24(5), 255–265. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0972-6>
- Pangerapan, F., Simanjuntak, S., & Kamagi, D. (2022). Identifikasi Molekuler Bakteri Pupuk Organik Sistim Biopori Menggunakan Gen 16s Rrna. *Indonesian BiodiversityJournal*, 3(1).
<https://doi.org/10.53682/ibj.v3i1.4414>

- Pangestika, Y., Budiharjo, A., Pancasakti, H., & Kusumaningrum. (2015). Analisis Filogenetik Curcuma Zedoaria (Temu Putih) Berdasarkan Gen Internal Transcribed Spacer (ITS). *Jurnal Akademika Biologi*, 4(4), 8–13.
- Patel VK, RSS Yadav and KDS Yadav. (2007). Enzymatic characteristic of lignin peroxidases of indigenous lignolytic fungal strains-1. *Indian Journal of Biotechnology* 6 : 553-556.
- Pinem, U., Hamdan, N.D. Hanafi. (2015). Estimasi Jarak Genetik dan Faktor Peubah Pembeda Rumpun Kelinci Melalui Analisis Oorfometrik. *J. Peternakan integratif*, 2(3) : 264 – 284
- Pratiwi, A., Sari, R., & Apridamayanti, P. 2019. Optimasi suhu desain primer gen blaZ resistensi pada bakteri Staphylococcus aureus secara in silico. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*. 4(1), 3–12.
- Pham, V. H. T., Kim, J., Shim, J., Chang, S., & Chung, W. (2021). Purification and characterization of strong simultaneous enzyme production of protease and α -Amylase from an extremophile-Bacillus sp. FW2 and its possibility in food waste degradation. *Fermentation*, 8(1), 12.
- Putri, A., Putri, A. L., Purbani, D. C., Kanti, A., Kusmiati, M., & Habibi, M. (2020). Isolation And Identification Of *Actinomycetes* Associated With

Moss On The Surface Of The Borobudur Temple Stone. Biosaintifika: *Journal of Biology*.

- Purba, T. M. (2013). Isolasi dan karakteristik bakteri endofitik dari umbi tanaman dahlia (*Dahlia variabilis*). *Skripsi (tidak dipublikasikan)*. Universitas Riau. Pekanbaru
- Putri, AVAA, Hafida, N & Megawati, V. (2017). Pengaruh Daya Antibakteri Ekstrak Daun Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) pada Konsentrasi 5%, 10%, 20%, 40% dan 80% terhadap *Streptococcus mutans* (In Vitro), *Jurnal Ilmu Kedokteran Gigi*, vol. 1, no. 1, hal. 9-14
- Ramli, I., & Jap, Y. P. (2021). *Eco-Enzyme* Pemberdayaan Kelompok Petani Desa Ciranjang Cianjur Tahun 2021. *Jurnal Bakti Masyarakat Indonesia*, 4(2), 389–397.
- Rahmi, Y., Darmawi, Abrar, M., Jamin, F., Fakhrurrazi, and Fahrimal, Y. (2015). Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus* Pada Preputium dan Vagina Kuda (*Equus caballus*). *Jurnal Medika Veterinaria*, 9(2), 154-158.
- Ramnath, L., Sithole, B., & Govinden, R. (2017). Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to Eucalyptus wood species for application in the pulping industry. *Biotechnology Reports*, 15, 114-124.

- Roslim, D.I., Herman, Adiwirman, Lestari, W. (2023). *Barkoding DNA Jilid 1*. Yogyakarta: Penerbit KBM Indonesia.
- Rochyani, N., Utpalasari, R. L., & Dahliana, I. (2020). Analisis Hasil Konversi Eco Enzyme Menggunakan Nenas (*Ananas Comosus*) Dan Pepaya (*Carica Papaya L.*). *Jurnal Redoks*, 5(2), 135–140.
<https://doi.org/10.31851/Redoks.V5i2.5060>
- Safitri, R., Novel, S. S., (2010)., *Medium Analisis Mikrorganisme (Isolasi Dan Kultur)*., Jakarta: Trans Info Media. P. 29-34.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467.
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Suriani, N. Amin, dan L. Daha. (2014). *Pemanfaatan ekstrak kompos sampah rumah tangga dan Bacillus spp. dalam mengendalikan penyakit busuk buah (Phytophthora palmivora Butler) pada kakao di Kabupaten Soppeng*. Disampaikan pada seminar dua mingguan Balitsereal, Malang.

- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed.)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saidah AN,. (2014). *Isolasi Bakteri Proteolitik Termofilik dari Sumber Air Panas Pacet Mojokerto dan Penguji Aktivitas Enzim Protease*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Safitri, R., Muchlissin, S.I., Mukaromah, A.H., Darmawati, S., Ethica, S.N., (2018). Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease *Bacillus thuringiensis* Pada Oncom Merah Pasca Fermentasi 24 Jam dan Identifikasi Molekuler Bakteri Berbasis Gen 16S rRNA. *Semin. Nas. Edusainstek* 31–39.
- Steenwyk, J. L., Buida, T. J., 3rd, Li, Y., Shen, X. X., & Rokas, A. (2020). ClipKIT: A multiple sequence alignment trimming software for accurate phylogenomic inference. *PLoSbiology*, 18(12),e3001007.<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001007>.
- Sunarjo, (1994). *Penyehatan Air dalam Program Penyediaan dan Pengolahan Air Bersih*. Jakarta
- Sari, E., Flatian, N. A., Sari, I. Z. dan Sulaeman, E. (2018). Isolasi dan Karakterisasi Rhizobium dari Glycine Max L. dan Mimosa pudica Linn.

Jurnal Penelitian Biologi, Botani, Zoologi dan Mikrobiologi. 3(2). ISSN. 2443-2393.

Santoyo G, Hagelsieb Gm, Mosqueda Mdco, Glick Br. (2016). *Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes*. Microbiol Res. 183:92–99. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>.

Saputri, E. M., Rojroongwasinkul, N., & Tangsuphoom, N. (2018). *Effect of food serving style on quantity and composition of food waste generated from university canteens: a study at Mulawarman University, Indonesia*. In 3rd International Conference of Integrated Intellectual Community (ICONIC).

Sunatmo TI. (2007). *Eksperimen Mikrobiologi dalam Laboratorium*. Jakarta: Ardy Agency.

Sjafaraenan, Sjafaraenan, (2018). "Profil Dna Gen Follicle Stimulating Hormone Reseptor (Fshr) pada Wanita Akne dengan Teknik Pcr dan Sekuensing Dna." *Bioma*, vol. 3, no. 1, pp. 1-11,.

Sardiani, N, Litaay, M, Budji, RG, Priosambodo, D, Syahribulan & Dwyana, Z, (2015), 'Potensi Tunikata Rhopalaea sp sebagai Sumber Inokulum Bakteri Endosimbion Penghasil Antibakteri; 1. Karakterisasi Isolat', *Jurnal Alam dan Lingkungan*, Vol. 6, No. 11.

- Soleha, S., & Retnaningrum, E. (2020). Screening and molecular identification of lipolytic bacteria from spent bleaching earth. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(9).
- Setiawan, A, M, Hasnawati, Sernita, Sulistia, L., (2016), Uji Daya Hambat Antibakteri Fungi Endofit Kulit Jeruk (Citrus Aurantifolia) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*, *Jurnal Sains Farmasi dan Klinis*, 3(1) : 14 – 18.
- Schmeisser S, Talamin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. (2007). *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Spesific to Dengue Virus Type-1 Nonstructural Protein Ns1 Reveals Circulation of The Antigen In The Blood During The Acute Phase of Disease In Patients Experiencing Primary Or Secondary Infections*. J. Of Clinical Microbiol. 40(2): 376-381.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. (1995). A Place for DNA-DNA Reassociation And 16s Rrna Sequence Analysis In The Present Species Definition In Bacteriology. *International Jurnal of Systematic Bacteriology*, 44, Hlm. 846-849.
- Susanto, H. (2016). *Pemeriksaan Protozoa, Helminthes*. Depok : PPPPTK Bisnis dan Pariwisata .

- Silva, H.A.S., Romeiro, R.S.R., Macagnan, D., Vieira, B.A.H., Pereira, M.C.B., Mounteer, A. 2004. *Rhizobacterial Induction of Systemic Resistance in Tomato plants Non Specific Protection and Increase in Enzyme Activities*. Biol Control 29:288-295.
- Sulistiyarningsih. (2010). Uji Kepekaan Beberapa Sediaan *Antiseptik Terhadap Bakteri Pseudomonas aeruginosa Multi Resisten (PAMR)*. Tesis. Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran, Jatinangor
- Sumardi, d. (2012). Isolasi dan karakterisasi *Bacillus* sp. Penghasil Antimikroba dari Saluran Pencernaan Ayam kampung *Gallus doesticus*. *Jurnal Prosiding SNSMAIP III*, 307.1-3.
- Supriyani, Astuti, A.P. And Maharani, E.T.W. (2020) '*Pengaruh Variasi Gula Terhadap Produksi Ekoenzim Menggunakan Limbah Buah Dan Sayur*', Seminar Nasional Edusainstek, Pp. 470-479.
- Susilawati, and H. Wahyono.,(2019). "Kinerja Pelayanan Pengelolaan Sampah Berdasarkan Pendapat Pedagang Dan Pengelola Pasar Di Pasar Talang, Kecamatan Gunung Talang Kabupaten Solok," *Jurnal Pembangunan Wilayah dan Kota*, vol. 15, no. 1, pp. 58-69, May. <https://doi.org/10.14710/pwk.v15i1.17718>

- Syaifudin, A., Avitasari, R., Lestari, Y. D., Lutfi, J., Maula, I. S., Mauludi, A., Karnila, K., Nadhiroh, A. L., Sari, S. P. N. W., & Astuti, F. P. (2024). Pemberdayaan Masyarakat Desa Dalam Pemanfaatan Sampah Organik Melalui Pelatihan Pembuatan Pupuk Organik. *Prima Abdika: Jurnal Pengabdian Masyarakat*, 4(1), 175-183.
<https://doi.org/10.37478/abdika.v4i1.3326>
- The Economist Intelligence Unit. (2015). *Global Food Security Index 2015 : An annual measure of the global food security*. London: The Economist Intelligence Unit.
- Tang, M., M. You. (2012). Isolation, identification and characterization of novel triazophos-degrading *Bacillus* sp. (TAP-11). *Microbiol Res*. 167: 299-305. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.10.004>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.
<https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Ubaidillah R, Sutrisno H. (2009). *Pengantar Biosistemik: Teori dan Praktik*. Jakarta: LIPI Press.

- Usman, A. F. (2020). *Setahun 1,3 juta ton sampah makanan di Indonesia*, Kementan : Stop Food
- W. Lay, Bibiana. (1994). *Analisis Mikroba Di Laboratorium*. Jakarta: Raja Grafindo Persada.
- Wahyuni, R.M., A. Sayuti, M. Abrar, Erina, M. Hasan, dan Zainuddin. (2018). *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Enterik Patogen Pada Badak Sumatera (Dicerorhinus Sumatrensis) di Suaka Rhino Sumatera (SRS), Taman Nasional Way Kambas (TNWK)*, Lampung, JIMVET, 2(4):474- 487.
- Woese, C. R., Stackebrandt, R., Macke, T. J., & Fox, G. E. (1985). A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst. Appl. Microbiol*, 6, 143–151.
- Winarsih, S., Noorhamdani, N., Ardyati, T., & Adriani, A. (2022). Isolation and screening endophytic bacteria producing a-glucosidase inhibitor from Sanrego plant (*Lunasia amara Blanco*). In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2513, No. 1). AIP Publishing.
- Wati, R. I. (2020). *Uji Kemampuan Biodegradasi Sampah Plastik Polyethylene (Pe) Oleh Bakteri Pendegradasi Plastik Yang Diisolasi Dari Tempat Pembuangan Akhir (Tpa) Jabon Sidoarjo*. Skripsi. Tidak Diterbitkan. Surabaya: Fakultas Sains Dan Teknologi Uin Sunan Ampel Surabaya.

- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., & Lane, D.J. (1991). 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*.
- Wajdi S A, Kasmiyati S, & Hastuti SP (2017). Uji Aktivitas Antibakteri Campuran Ekstrak Biji Kelor (*Moringa oleifera*) dan Daun Kersen (*Muntingia calabura*) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis*. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 2(1), 10–15. <https://doi.org/10.22146/jtbb.13728>
- Wibowo, Risky H., Et Al. "Bakteri Penghasil Amilase Yang Diisolasi Dari Ekoenzim Limbah Buah-Buahan." *Jurnal Biosilampari*, Vol. 4, No. 2, (2022), Pp. 107-117, Doi:[10.31540/Biosilampari.V4i2.1531](https://doi.org/10.31540/Biosilampari.V4i2.1531).
- Woese, C. R., Stackebrandt, E., Macke, T. J., & Fox, G. E. (1985). A Phylogenetic Definition of The Major Eubacterial Taxa. *Systematic And Applied Microbiology*, 6(2), 143–151. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(85\)80047-3](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(85)80047-3).
- Vicuna, D., Malone, R. P., Dix, P. J. (2011). Increased tolerance to abiotic stresses in tobacco plants expressing a barley cell wall peroxidase. *Journal of Plant Sciences*. 6: 1-13.
- Yarza Hl, Irawati L. (2015). *Artikel Penelitian Hubungan Tingkat Pengetahuan Dan Sikap*

Dengan Penggunaan Antibiotik Tanpa Resep Dokter.;4(1):151–6.

- Yuenleni, Y. (2019). Langkah-Langkah Optimasi PCR. *Indonesian Journal of Laboratory*, 1(3), 51–56. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.22146/ijl.v1i3.48723>.
- Yunita, M., Y. Hendrawan, dan R. Yulianingsih. (2015). Analisis Kualitatif Mikrobiologi Pada Makanan Penerbangan (Aerofood ACS) Garuda Indonesia Berdasarkan TPC (Total Plate Count) Dengan Metode Pour Plate. *Jurnal Keteknikaan Pertanian Tropis dan Biosistem*. 3(3): 237-248.
- Zongzheng, Y., L. Xin, L. Zhong, P. Jinzhao, Q. Jin, and Y. Wenyan. (2009). *Effect of Bacillus cereus SYS on antifungal activity and plant growth*. *Int'l. J. Agric. Biol. Engin.* 2(4): 55– 61
- Zahid, M., Kaleem Abbasi, M., Hameed, S., & Rahim, N. (2015). *Isolation And Identification of Indigenous Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Himalayan Region Of 98 Kashmir and Their Effect on Improving Growth and Nutrient Contents of Maize (Zea Mays L.)*. *Frontiers In Microbiology*, 6(Mar), 126946. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00207/Bibtex>
- Zrimec, J., Kopinc , R., Rijavec, T., Zrimec, T., & Lapanje, A. (2013). Band smearing of PCR

amplified bacterial 16S *rRNA genes: dependence on initial* PCR target diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 95(2), 186–194.
<https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2013.08.002>

LAMPIRAN

Gambar Lampiran 1.1 Persiapan Sampel *Ecoenzyme* dan persiapan media pertumbuhan bakteri



Gambar Lampiran 1. 2 Persiapan Media Pertumbuhan Bakteri



Gambar Lampiran 1. 3 Pengujian Enzim Katalase Dan Peroksidase



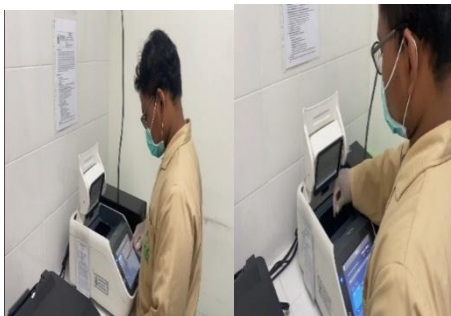
Gambar Lampiran 1. 4 Isolasi DNA *Bakteri*



Gambar Lampiran 1. 5 Proses Visualisasi Menggunakan elektroforesis



Gambar Lampiran 1. 6 Proses PCR



Gambar Lampiran 1. 7 Hasil Blastn sekuen isolat B

✓	Bacillus subtilis subsp. stercoris strain ECG218.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus stercoris	2641	2641	100%	0.0	100.00%	1456	MN704480.1
✓	Bacillus subtilis strain SS.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus subtilis	2641	2641	100%	0.0	100.00%	1453	PP800306.1
✓	Bacillus tequilensis strain Bac28.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus tequilensis	2641	2641	100%	0.0	100.00%	1455	EG813762.1
✓	Bacillus subtilis strain BXC11.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus subtilis	2641	2641	100%	0.0	100.00%	1448	OQ103366.1
✓	Bacillus subtilis strain A93.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus subtilis	2641	2641	100%	0.0	100.00%	1459	OK9329106.1
✓	Bacillus tequilensis strain GXL0064.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus tequilensis	2641	2641	100%	0.0	100.00%	1449	EP935364.1
✓	Bacillus sp. (in: firmicutes) strain rls-58.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: firmicutes)	2641	2641	100%	0.0	100.00%	1450	OH393026.1
✓	Bacillus subtilis strain SS7.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus subtilis	2641	2641	100%	0.0	100.00%	1459	OQ504805.1
✓	Bacillus subtilis strain DE111.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus subtilis	2641	2641	100%	0.0	100.00%	1458	MT872501.1
✓	Bacillus subtilis strain S24.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus subtilis	2641	2641	100%	0.0	100.00%	1456	OQ504772.1
✓	Bacillus sp. (in: Bacteria) strain SNH_82.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: firmicutes)	2641	2641	100%	0.0	100.00%	1443	MN6577368.1
✓	Bacillus tequilensis strain G128.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus tequilensis	2641	2641	100%	0.0	100.00%	1445	PP800606.1
✓	Bacillus subtilis strain Y20M05.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus subtilis	2641	2641	100%	0.0	100.00%	1481	OQ847923.1
✓	Bacillus subtilis strain SFA-H43.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus subtilis	2641	2641	100%	0.0	100.00%	1434	KF318713.1
✓	Bacillus sp. (in: firmicutes) strain 0500L10070.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: firmicutes)	2641	2641	100%	0.0	100.00%	1443	OQ876169.1
✓	Bacillus subtilis strain S4.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus subtilis	2641	2641	100%	0.0	100.00%	1454	OQ504752.1
✓	Bacillus subtilis strain TBMAX30.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus subtilis	2641	2641	100%	0.0	100.00%	1431	MK6334868.1
✓	Bacillus subtilis strain B.02.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus subtilis	2641	2641	100%	0.0	100.00%	1443	EC857479.1

Gambar Lampiran 1. 8 Hasil MEGA XI sekuen isolat B

DNA Sequences Translated Protein Sequences	
Species/Strain	
1. 00847023.1:17-1448 Bacillus subtilis	ATGCCGCGGTGAATACGTTCCGCGCTTGTAACACACCCGCCCTCACCCACGAGTTTGTAACCCGAAAGTCGGTGAAGTAACCTTTTGGG
2. PP800606.1:10-1439 Bacillus tequilensis	ATGCCGCGGTGAATACGTTCCGCGCTTGTAACACACCCGCCCTCACCCACGAGTTTGTAACCCGAAAGTCGGTGAAGTAACCTTTTGGG
3. OQ504772.1:15-1444 Bacillus subtilis	ATGCCGCGGTGAATACGTTCCGCGCTTGTAACACACCCGCCCTCACCCACGAGTTTGTAACCCGAAAGTCGGTGAAGTAACCTTTTGGG
4. MT872501.1:14-1443 Bacillus subtilis	ATGCCGCGGTGAATACGTTCCGCGCTTGTAACACACCCGCCCTCACCCACGAGTTTGTAACCCGAAAGTCGGTGAAGTAACCTTTTGGG
5. OQ504805.1:14-1443 Bacillus subtilis	ATGCCGCGGTGAATACGTTCCGCGCTTGTAACACACCCGCCCTCACCCACGAGTTTGTAACCCGAAAGTCGGTGAAGTAACCTTTTGGG
6. PP800306.1:14-1443 Bacillus tequilensis	ATGCCGCGGTGAATACGTTCCGCGCTTGTAACACACCCGCCCTCACCCACGAGTTTGTAACCCGAAAGTCGGTGAAGTAACCTTTTGGG
7. OK9329106.1:16-1445 Bacillus subtilis	ATGCCGCGGTGAATACGTTCCGCGCTTGTAACACACCCGCCCTCACCCACGAGTTTGTAACCCGAAAGTCGGTGAAGTAACCTTTTGGG
8. PQ015702.1:13-1442 Bacillus tequilensis	ATGCCGCGGTGAATACGTTCCGCGCTTGTAACACACCCGCCCTCACCCACGAGTTTGTAACCCGAAAGTCGGTGAAGTAACCTTTTGGG
9. PP800606.1:12-1441 Bacillus subtilis	ATGCCGCGGTGAATACGTTCCGCGCTTGTAACACACCCGCCCTCACCCACGAGTTTGTAACCCGAAAGTCGGTGAAGTAACCTTTTGGG
10. MN704480.1:16-1445 Bacillus subtilis	ATGCCGCGGTGAATACGTTCCGCGCTTGTAACACACCCGCCCTCACCCACGAGTTTGTAACCCGAAAGTCGGTGAAGTAACCTTTTGGG
11. B.EZ	ATGCCGCGGTGAATACGTTCCGCGCTTGTAACACACCCGCCCTCACCCACGAGTTTGTAACCCGAAAGTCGGTGAAGTAACCTTTTGGG

Gambar Lampiran 1. 11 Hasil jarak genetik isolat ecoenzyme dengan sekuen pembanding menggunakan p- distance

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. OQ847923.1:17-1446 <i>Bacillus subtilis</i>												
2. PP809069.1:10-1439 <i>Bacillus tequilensis</i>	0.000000000											
3. OQ504772.1:15-1444 <i>Bacillus subtilis</i>	0.000000000	0.000000000										
4. MT672501.1:14-1443 <i>Bacillus subtilis</i>	0.000000000	0.000000000	0.000000000									
5. OQ504805.1:14-1443 <i>Bacillus subtilis</i>	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000								
6. PP935364.1:14-1443 <i>Bacillus tequilensis</i>	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000							
7. ON329106.1:16-1445 <i>Bacillus subtilis</i>	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000						
8. PQ813762.1:13-1442 <i>Bacillus tequilensis</i>	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000					
9. PP809306.1:12-1441 <i>Bacillus subtilis</i>	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000				
10. MN704480.1:16-1445 <i>Bacillus subtilis</i>	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000			
11. isolat B	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000		
12. NR 024570.1 <i>Escherichia coli</i>	0.208988764	0.208988764	0.208988764	0.208988764	0.208988764	0.208988764	0.208988764	0.208988764	0.208988764	0.208988764	0.208988764	0.208988764

d [11,10] (isolat B-MN704480.1:16-1445 *Bacillus subtilis*) / Nucleotide: p-distance

Gambar Lampiran 1. 12 Sekuen contig isolat B
>5307952_B_F

GCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAG
CTTGCTCCCGTGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTA
ACACGTGGGTAACCTGCCTGAACTGGGATAACT
CCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTT
TGCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGC
ACCACTACACCCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAG
GAACGGCACCAGGCAACGATGCGTACGACCTGA
GAGGGTGATCGGCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCGTAGGGAATC
TTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG
CCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGC

TCTGTTGTTAGGGAGAACAAGTACCGTTCGAAT
AGGGCGGTACCTTGACGGTACCTACCAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCAGCAGCCGCGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG
CGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTG
ATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTG
ATTGGAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGG
AGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG
ACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGA
AAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG
TTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAA
CGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCG
CAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACAT
CCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTT
CGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTC
CTCACCTCGT

>5307953_B_R

TTCGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACC
GACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGAC
GGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCA
CCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATC
CAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATC
CGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAA

CCTCGCGGTTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATT
GTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCA
TGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGT
TTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAATA
ATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGT
TGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAG
CTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCC
CCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCA
GAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGT
TGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTGT
GCGGGCCCCCCTGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGC
TTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAAG
CGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCC
TAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGAC
TACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGC
TTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGA
GTGGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCT
ACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCTC
TCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAAT
GACCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATC
AGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGC
CCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGT
ATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTG
GCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCC
TATTGGAACGGTACTTGTTCCTCCCTAACAAACA
GAACTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCAC
GCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCC
GAAGATCCCTACTGCTGCC

>consensus

GCTATACATGCAAGTCGAGCGGATGGGAGCTTG
CTGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG
TAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGA
AACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACC
GCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTA
CCACTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTA
GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGAT
GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA
AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAA
GGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
AGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTT
GACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA
AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCT
CGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
CCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTG
GGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATT
CCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGG
AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTC
TGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGA
GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
CGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTT
CCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCA

CTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAA
CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGG
TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA
GAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAAT
CCTAGAGATAGGACGTCCCCCTTCGGGGGCAGAG
TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCTTCAGTTG
GGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGG
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG
GACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTA
AGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGAT
CGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAA
TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG
AATACGTTCCGCCTTGTACACACCGCCCGTCACA
CCACGAGAGTTTGTAAACACCCAGTCGGTGAGGT
AACCTTTTAGGA

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas Diri

Nama : Alfi Syaifuddin
NIM : 2108016040
Tempat Tanggal Lahir : Kudus, 23 Juli 2003
Email : Syaifuddinalfi23@gmail.com

Riwayat Pendidikan

Formal:

1. MAN 1 kudus (2018- 2021)
2. UIN Walisongo Semarang (2021-2025)

Non Formal:

1. Pondok Pesantren Almarufiyah Semarang
(2021-2025)