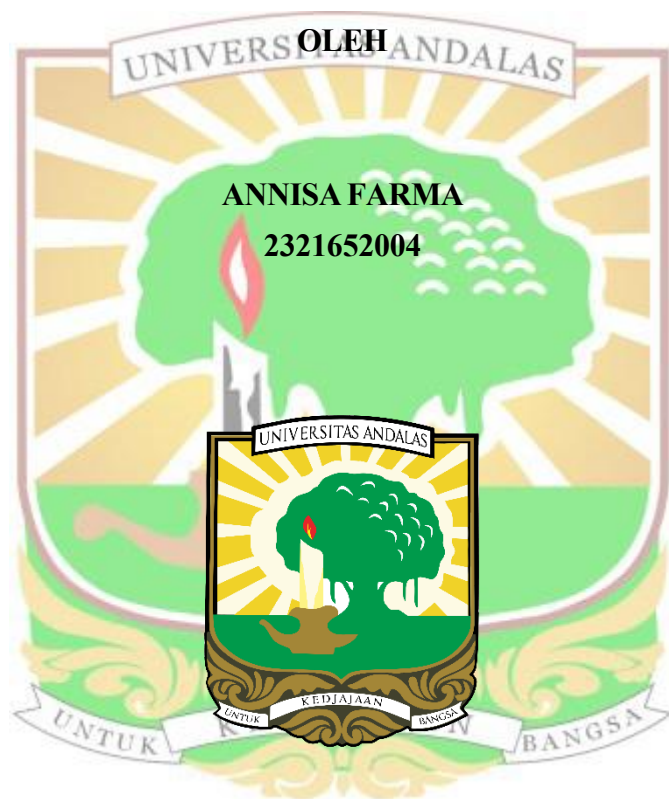


**POTENSI PROBIOTIK DARI SUSU KAMBING ETAWA UNTUK KEFIR  
DENGAN PENAMBAHAN EKSTRAK BUNGA TELANG (*Clitoria ternatea*  
L.) UNTUK MENINGKATKAN KESEHATAN MASYARAKAT**

**TESIS**



**OLEH**

**ANNISA FARMA**

**2321652004**

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOTEKNOLOGI  
SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS ANDALAS  
2026**

**POTENSI PROBIOTIK DARI SUSU KAMBING ETAWA UNTUK KEFIR  
DENGAN PENAMBAHAN EKSTRAK BUNGA TELANG (*Clitoria ternatea*  
L.) UNTUK MENINGKATKAN KESEHATAN MASYARAKAT**

Oleh

**ANNISA FARMA**

**2321652004**



**TESIS**

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh  
Gelar Magister Bioteknologi  
Program Pascasarjana  
Universitas Andalas**

**SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS ANDALAS**

**2026**

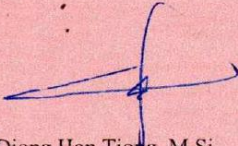
## HALAMAN PENGESAHAN


Judul : Potensi Probiotik Dari Susu Kambing Etawa Untuk Kefir  
Dengan Penambahan Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria  
Ternatea L.*) Untuk Meningkatkan Kesehatan Masyarakat

Nama Mahasiswa : Annisa Farma  
Nomor Pokok : 2321652004  
Program Studi : S2 Bioteknologi

Tesis telah diuji dan dipertahankan di depan sidang panitia ujian akhir  
Magister Bioteknologi pada Sekolah Pascasarjana Universitas Andalas dan  
dinyatakan lulus pada tanggal 18 Februari 2026

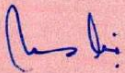
Menyetujui,  
1. Komisi Pembimbing

  
Prof. Dr. Djong Hon Tjong, M.Si  
Ketua

  
Prof. Drh. Hj. Endang Purwati Rahayu  
Ningsih, MS, Ph.D  
Anggota

2. Koordinator Program Studi

3. Direktur Sekolah Pascasarjana  
Universitas Andalas

  
Prof. apt. Marlina, MS., Ph.D  
NIP. 196203111989012001

Prof. apt. Henny Lucida, Ph.D  
NIP. 196701151991032002

*Allah yang meninggikan  
orang - orang yang beriman dan  
orang - orang yang diberi ilmu pengetahuan  
beberapa derajat  
(AlQur'an surat Mujaadilah ayat 11)*



*Terimakasih pada Dosen Pembimbing :  
Prof. Dr. Djong Hon Tjong, M. Si dan Prof. drh. Hj. Endang  
Purwati Rahayu Ningsih, MS, PhD  
Serta semua pihak yang telah banyak membantu dalam semua proses  
terbentuknya tesis ini,  
Semoga Allah senantiasa menjaga dan  
memberikan keberkahan pada setiap langkah kita,*

*Terimalah karya ini  
sebagai titik awal baktiku  
Kepada Suami, Ayah, Ibu serta Anak-anakku tercinta*

## PERNYATAAN

Dengan ini saya, nama: Annisa Farma yang beralamat di Jl. Kubu Dalam RT.005 RW.002, Kel. Kubu dalam Parak Karakah, Kec. Padang Timur, Kota Padang, Sumatera Barat, menyatakan bahwa dalam tesis ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali secara tertulis dicantumkan dalam naskah dan disebutkan dalam daftar kepustakaan



Padang, Februari 2026

Annisa Farma

## RIWAYAT HIDUP



Penulis lahir di Padang, pada tanggal 2 Oktober 1995. Merupakan anak pertama dari dua orang bersaudara, putri dari pasangan Bapak Armen dan Ibu Fatriyanti. Penulis sudah menyelesaikan pendidikan dasar di SDN 11 Piai Tengah, Padang. Pendidikan Sekolah Menengah Pertama diselesaikan di SMPN 23 Padang, pada tahun 2010. Kemudian melanjutkan pendidikan di SMAK Padang dan selesai pada tahun 2014. Pada tahun 2015 terdaftar sebagai mahasiswa D3 Teknologi Laboratorium Medik STIKes Perintis Padang. Pada tahun 2018 terdaftar sebagai mahasiswa D4 Teknologi Laboratorium Medik STIKes Perintis Padang. Penulis memperoleh gelar Sarjana Sains Terapan pada Program Studi D4 Teknologi Laboratorium Medik STIKes Perintis Padang pada tahun 2019. Pada tahun 2023 memperoleh kesempatan melanjutkan pendidikan pada Program Studi Magister Bioteknologi Universitas Andalas di Padang.

Padang, Januari 2026



Annisa Farma

**POTENSI PROBIOTIK DARI SUSU KAMBING ETAWA UNTUK KEFIR DENGAN PENAMBAHAN EKSTRAK BUNGA TELANG (*Clitoria ternatea* L.) UNTUK MENINGKATKAN KESEHATAN MASYARAKAT**

Oleh: ANNISA FARMA (2321652004)

(Dibawah bimbingan: Prof. Dr. Djong Hon Tjong, M.Si dan Prof. Drh. Hj. Endang Purwati Rahayu Ningsih, MS, Ph.D)

**Abstrak**

Penelitian ini bertujuan memperoleh isolat bakteri asam laktat (BAL) dari susu kambing Etawa yang berpotensi sebagai probiotik dan dapat diaplikasikan sebagai starter kefir. Penelitian dilaksanakan dalam tiga tahap. Tahap I dan II menggunakan metode deskriptif, sedangkan Tahap III menggunakan metode eksperimen. Tahap I meliputi analisis kandungan gizi susu kambing Etawa yang mencakup kadar air, kadar lemak, kadar protein, dan nilai pH. Tahap II meliputi isolasi dan identifikasi BAL berdasarkan morfologi koloni, bentuk serta ukuran sel, pewarnaan Gram, dan uji biokimia. Identifikasi spesies dilakukan secara molekuler melalui analisis gen 16S rRNA. Tahap III menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) pola faktorial  $3 \times 3$  dengan tiga kali ulangan. Hasil analisis menunjukkan bahwa perlakuan KG menghasilkan kualitas susu terbaik dengan kadar air  $88,93 \pm 0,98\%$ , protein  $4,17 \pm 0,01\%$ , lemak  $5,00 \pm 0,35\%$ , dan pH  $7,00 \pm 0,07$ . Isolasi BAL menghasilkan isolat terbaik, yaitu PD, yang merupakan bakteri Gram positif berbentuk basil, katalase negatif, dan heterofermentatif dengan total koloni  $30,66 \times 10^8$  cfu/mL. Isolat PD memiliki sifat probiotik dengan viabilitas pada pH 3 sebesar  $32,50 \pm 17,67\%$  dan ketahanan terhadap oxgall 0,3% sebesar  $80,60 \pm 26,21\%$ . Aktivitas antimikroba tertinggi ditunjukkan terhadap *Escherichia coli* O157 dengan zona hambat  $15,94 \pm 2,06$  mm. Berdasarkan analisis molekuler, isolat teridentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum* strain CAU10666. Hasil penelitian menunjukkan adanya pengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) pada masing-masing perlakuan terhadap pH, kadar lemak, total asam tertitrasi (TTA), total koloni BAL, dan aktivitas antioksidan. Uji organoleptik menunjukkan kefir dapat diterima panelis dengan skor rasa 3,34; aroma 3,50; tekstur 3,31; dan warna 3,08. Secara keseluruhan, isolat BAL berpotensi dikembangkan sebagai starter probiotik kefir susu kambing Etawa.

Kata Kunci: Bakteri asam laktat; Susu kambing Etawa; Probiotik; Kefir; *Lactobacillus plantarum*; Bunga telang

# PROBIOTIC POTENTIAL OF ETAWA GOAT MILK FOR KEFIR WITH THE ADDITION OF BUTTERFLY PEA (*CLITORIA TERNATEA* L.) EXTRACT TO IMPROVE PUBLIC HEALTH

By: ANNISA FARMA (2321652004)

(Supervised by: Prof. Dr. Djong Hon Tjong, M.Si dan Prof. Drh. Hj. Endang Purwati Rahayu Ningsih, MS, Ph.D)

## Abstract

This study aimed to obtain lactic acid bacteria (LAB) isolates from Etawa goat milk with probiotic potential and applicability as a kefir starter culture. The research was conducted in three stages. Stages I and II employed descriptive methods, while Stage III used an experimental method. Stage I involved the analysis of the nutritional composition of Etawa goat milk, including moisture, fat, protein content, and pH value. Stage II included the isolation and identification of LAB based on colony morphology, cell shape and size, Gram staining, and biochemical tests. Species identification was carried out molecularly through 16S rRNA gene analysis. Stage III applied a  $3 \times 3$  factorial Randomized Block Design (RBD) with three replications. The results showed that the KG treatment produced the best milk quality, with moisture content of  $88.93 \pm 0.98\%$ , protein  $4.17 \pm 0.01\%$ , fat  $5.00 \pm 0.35\%$ , and pH  $7.00 \pm 0.07$ . LAB isolation yielded the best isolate, PD, which was Gram-positive, rod-shaped, catalase-negative, and heterofermentative, with a total colony count of  $30.66 \times 10^8$  cfu/mL. The PD isolate demonstrated probiotic properties, with viability at pH 3 of  $32.50 \pm 17.67\%$  and resistance to 0.3% oxgall of  $80.60 \pm 26.21\%$ . The highest antimicrobial activity was observed against *Escherichia coli* O157, with an inhibition zone of  $15.94 \pm 2.06$  mm. Molecular analysis identified the isolate as *Lactobacillus plantarum* strain CAU10666.

Statistical analysis indicated significant effects ( $P < 0.05$ ) of treatments on pH, fat content, total titratable acidity (TTA), total LAB count, and antioxidant activity. Organoleptic evaluation showed that the kefir product was acceptable to panelists, with average scores of 3.34 for taste, 3.50 for aroma, 3.31 for texture, and 3.08 for color. Overall, the LAB isolate has strong potential for development as a probiotic starter culture in Etawa goat milk kefir production.

Keyword: Lactic acid bacteria; Etawa goat milk; Probiotic; Kefir; *Lactobacillus plantarum*; Butterfly pea flower extract

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan Tesis yang berjudul “**Potensi Probiotik Dari Susu Kambing Etawa Untuk Kefir Dengan Penambahan Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) Untuk Meningkatkan Kesehatan Masyarakat**”. Tesis ini ditulis dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk melaksanakan penelitian pada Program Studi Bioteknologi Pasca Sarjana Universitas Andalas Padang.

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih banyak kepada Bapak Prof. Dr. Djong Hon Tjong, M.Si sebagai pembimbing I, dan Ibu Prof. drh. Hj. Endang Purwati Rahayu Ningsih, MS., Ph.D. sebagai Pembimbing II yang telah banyak memberikan bimbingan, masukan dan saran selama proses pembuatan sampai selesainya proposal penelitian ini. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Direktur Pascasarjana, Ketua Program Studi Bioteknologi serta seluruh Dosen Program Studi Bioteknologi Pascasarjana Universitas Andalas.

Penulis menyadari bahwa dalam pembuatan tesis ini masih banyak kekurangan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritikan yang sifatnya membangun.

Padang, Januari 2026

Penulis

## DAFTAR ISI

|   |      |
|---|------|
| ABSTRAK .....   | i    |
| ABSTRACT .....  | ii   |
| KATA PENGANTAR.....                                     | iii  |
| DAFTAR ISI.....   | iv   |
| DAFTAR TABEL .....                                      | vi   |
| DAFTAR GAMBAR.....                                      | viii |
| BAB I PENDAHULUAN.....                                  | 1    |
| Latar Belakang .....                                    | 1    |
| Rumusan Masalah .....                                   | 4    |
| Tujuan Penelitian .....                                 | 4    |
| Manfaat Penelitian .....                                | 4    |
| Hipotesis Penelitian.....                               | 5    |
| BAB II Tinjauan Pustaka.....                            | 6    |
| Susu Kambing Etawa .....                                | 6    |
| Bakteri Asam Laktat .....                               | 8    |
| Probiotik.....  | 9    |
| Susu Kefir .....  | 10   |
| Bunga Telang .....                                      | 12   |
| Identifikasi Molekuler 16S rRNA.....                    | 14   |
| Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Elektroforesis..... | 16   |
| Analisis Sekuensing dan Filogenetik .....               | 17   |
| BAB III Metode Penelitian .....                         | 19   |
| Waktu dan Tempat Penelitian .....                       | 19   |
| Penelitian Tahap I .....                                | 19   |
| Penelitian Tahap II .....                               | 23   |
| Penelitian Tahap III.....                               | 33   |
| BAB IV Hasil dan Pembahasan .....                       | 44   |
| Penelitian Tahap I .....                                | 44   |
| Penelitian Tahap II .....                               | 46   |
| Penelitian Tahap III.....                               | 59   |

|                      |    |
|----------------------|----|
| BAB V Penutup .....  | 78 |
| Kesimpulan .....     | 78 |
| Saran.....           | 78 |
| DAFTAR PUSTAKA ..... | 79 |
| LAMPIRAN.....        | 98 |



## DAFTAR TABEL

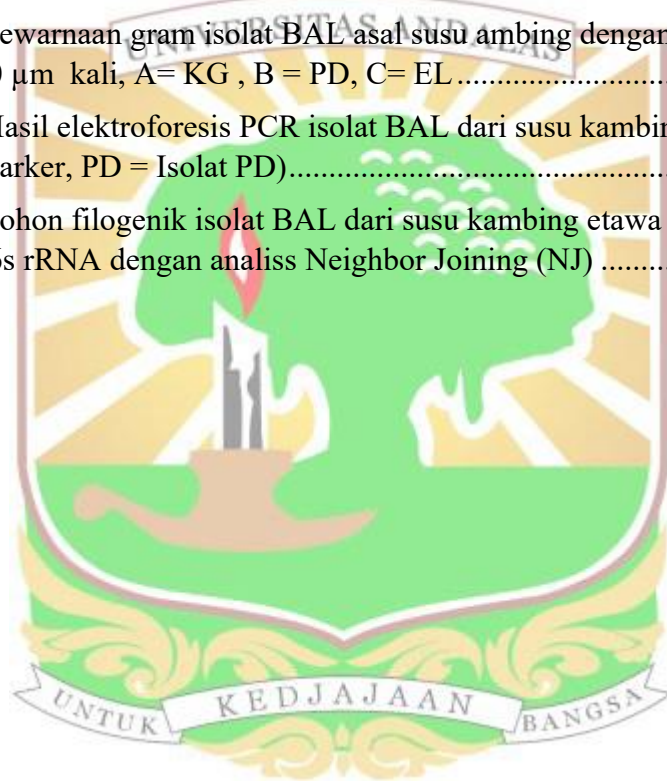
|  |    |
|--|----|
| Tabel 1. Kandungan gizi pada susu kambing etawa (Sutama, 2007).....  | 7  |
| Tabel 2. Kadar nutrisi kefir .....   | 11 |
| Tabel 3. Kocktail PCR .....  | 31 |
| Tabel 4. Program PCR .....   | 31 |
| Tabel 5. Rerata hasil analisis proksimat dan pH susu kambing etawa.....  | 44 |
| Tabel 6. Rerata total koloni BAL .....   | 46 |
| Tabel 7. Hasil pengamatan isolat BAL susu kambing etawa.....   | 48 |
| Tabel 8. Hasil uji biokimia BAL asal susu kambing etawa .....  | 50 |
| Tabel 9. Rerata viabilitas ketahanan pH asam dan garam empedu BAL .....  | 51 |
| Tabel 10. Rerata diameter zona bening uji aktivitas antimikroba (mm) .....   | 53 |
| Tabel 11. Analisis BLAST similarity index isolat BAL susu kambing etawa ....   | 57 |
| Tabel 12. Rataan nilai pH kefir dengan konsentrasi ekstrak bunga telang dan konsentrasi starter BAL .....                          | 59 |
| Tabel 13. Rataan kadar air kefir dengan konsentrasi ekstrak bunga telang dan konsentrasi starter BAL.....                          | 61 |
| Tabel 14. Rataan kadar protein kefir dengan konsentrasi ekstrak bunga telang dan konsentrasi starter BAL.....                      | 62 |
| Tabel 15. Rataan kadar lemak kefir dengan konsentrasi ekstrak bunga telang dan konsentrasi starter BAL.....                        | 64 |
| Tabel 16. Rataan nilai TAT kefir dengan konsentrasi ekstrak bunga telang dan konsentrasi starter BAL .....                         | 66 |
| Tabel 17. Rataan total BAL kefir (10 <sup>7</sup> CFU/ml) dengan konsentrasi ekstrak bunga telang dan konsentrasi starter BAL..... | 68 |
| Tabel 18. Rataan aktivitas antioksidan kefir dengan konsentrasi ekstrak bunga telang dan konsentrasi starter BAL .....             | 70 |
| Tabel 19. Rataan nilai organoleptik rasa kefir dengan konsentrasi ekstrak bunga telang dan konsentrasi starter BAL.....            | 72 |
| Tabel 20. Rataan nilai organoleptik aroma Kefir dengan konsentrasi ekstrak bunga telang dan konsentrasi starter BAL.....           | 73 |
| Tabel 21. Rataan nilai organoleptik warna kefir dengan konsentrasi ekstrak bunga telang dan konsentrasi starter BAL.....           | 75 |

Tabel 22. Rataan nilai organoleptik tekstur kefir dengan konsentrasi ekstrak  
bunga telang dan konsentrasi starter BAL..... 76



## DAFTAR GAMBAR

|   |    |
|---|----|
| Gambar 1. Susu kambing .....  | 6  |
| Gambar 2. Bunga telang ( <i>Clitoria ternatea</i> L.).....  | 13 |
| Gambar 3. Skema penelitian tahap 1.....   | 23 |
| Gambar 4. Skema penelitian tahap II.....  | 33 |
| Gambar 5. Tahapan pembuatan kefir .....   | 36 |
| Gambar 6. Skema penelitian tahap III.....   | 43 |
| Gambar 7. Pewarnaan gram isolat BAL asal susu kambing dengan pembesaran<br>10 $\mu$ m kali, A= KG , B = PD, C= EL .....         | 49 |
| Gambar 8. Hasil elektroforesis PCR isolat BAL dari susu kambing etawa (M =<br>Marker, PD = Isolat PD).....                      | 55 |
| Gambar 9. Pohon filogenik isolat BAL dari susu kambing etawa berdasarkan<br>16s rRNA dengan analiss Neighbor Joining (NJ) ..... | 57 |



## BAB I. PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Kesehatan masyarakat dewasa ini dihadapkan pada tantangan meningkatnya prevalensi penyakit tidak menular seperti diabetes, hipertensi, dan obesitas, yang sebagian besar berkaitan dengan pola konsumsi rendah pangan fungsional. Pangan fungsional diartikan sebagai bahan pangan yang tidak hanya memenuhi kebutuhan gizi dasar, tetapi juga memberikan efek fisiologis yang menguntungkan bagi kesehatan. Meningkatnya kesadaran masyarakat modern terhadap pentingnya pola hidup sehat turut mendorong ketertarikan terhadap konsumsi pangan fungsional. Secara umum, pangan fungsional berasal dari bahan alami yang terdapat dalam makanan sehari-hari dan memiliki aktivitas biologis tertentu saat dikonsumsi, salah satunya adalah probiotik. Probiotik merupakan mikroorganisme hidup yang apabila dikonsumsi dalam jumlah memadai dapat memberikan manfaat kesehatan bagi inangnya. Mikroorganisme ini biasanya ditambahkan ke dalam produk pangan untuk membantu menjaga keseimbangan mikrobiota saluran pencernaan (Agagunduz *et al.*, 2021). Salah satu sumber potensial probiotik adalah susu kambing.

Susu kambing segar dikenal memiliki kandungan gizi yang tinggi, relatif lengkap, dan seimbang sehingga bermanfaat bagi kesehatan manusia. Susu kambing Etawa semakin diminati karena berbagai manfaat kesehatan yang dikandungnya. Dibandingkan susu sapi, susu kambing Etawa memiliki kandungan protein dan asam lemak yang lebih tinggi sehingga menjadi alternatif sumber nutrisi berkualitas. Temuan tersebut didukung oleh Wanniatie *et al.* (2021) yang menyatakan bahwa susu kambing memiliki komposisi gizi yang unggul. Selain itu, komponen nutrisi dalam susu kambing juga mendukung pertumbuhan mikroorganisme, terutama bakteri asam laktat yang secara alami banyak ditemukan dalam susu.

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri anaerob fakultatif yang mampu beradaptasi di berbagai lingkungan, seperti tanaman, saluran pencernaan, serta produk pangan dan minuman hasil fermentasi. Kelompok bakteri ini termasuk Gram-positif, tidak membentuk spora, berbentuk kokus atau basil, serta menghasilkan asam

laktat sebagai produk akhir fermentasi karbohidrat. BAL terdiri atas beberapa genus, antara lain *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Weissella*, dan *Lactobacillus* (Indriyati, 2010). Dalam industri pangan, BAL dimanfaatkan dalam pengolahan susu untuk memperpanjang masa simpan, meningkatkan kualitas, serta menambah nilai ekonomis produk. Salah satu bentuk pengolahan susu yang banyak diterapkan adalah fermentasi.

Fermentasi susu menghasilkan berbagai produk olahan, seperti yogurt dan kefir. Kefir merupakan minuman hasil fermentasi susu yang menggunakan granula kefir sebagai starter, yang mengandung kombinasi bakteri asam laktat dan khamir (yeast), sehingga menghasilkan minuman dengan cita rasa, warna, konsistensi, serta aroma khas menyerupai tape (Usmiati, 2007). Asam organik terbentuk melalui aktivitas BAL, sedangkan alkohol dan CO<sub>2</sub> dihasilkan oleh khamir. Mutu kefir dipengaruhi oleh jenis dan jumlah mikroba starter serta bahan baku yang digunakan. Dominasi aktivitas BAL diharapkan mampu menekan produksi alkohol oleh khamir (Ramadhanti, 2021).

Konsentrasi starter yang digunakan dalam proses pembuatan kefir berperan penting dalam menentukan tekstur dan cita rasa produk akhir. Ferawati *et al.* (2019) dalam patennya melaporkan bahwa penambahan starter sebanyak 4% pada susu sapi menghasilkan tekstur dan rasa yang optimal. Sementara itu, penelitian Martharini dan Indratiningsih (2017) menunjukkan bahwa penggunaan starter 2% pada susu kambing menghasilkan kualitas terbaik. Lama fermentasi juga memengaruhi karakteristik sensori kefir susu kambing. Ferawati (2019) melaporkan bahwa fermentasi bertingkat selama 12 jam memberikan hasil produk dengan tekstur dan rasa terbaik. Komposisi nilai gizi kefir dipengaruhi oleh jenis dan sumber susu, kandungan lemak, komposisi granula kefir, serta teknik fermentasi yang diterapkan.

Manfaat kesehatan kefir telah banyak dilaporkan, terutama terkait aktivitas antimikrobanya yang terdokumentasi secara luas dalam berbagai penelitian mutakhir. Aktivitas ini terutama disebabkan oleh keberadaan asam organik, seperti asam laktat, serta peptida antimikroba yang terbentuk selama proses fermentasi. Berbagai studi menunjukkan bahwa kefir mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti

*Escherichia coli* dan *Salmonella* sp., sehingga tidak hanya berkontribusi pada kesehatan individu tetapi juga mendukung aspek keamanan pangan. Selain itu, konsumsi kefir dikaitkan dengan peningkatan toleransi terhadap laktosa, sehingga sesuai bagi individu dengan intoleransi laktosa (Yuniarti *et al.*, 2021).

Upaya peningkatan mutu kefir dapat dilakukan melalui inovasi produk, salah satunya dengan penambahan bubuk bunga telang (*Clitoria ternatea* L.). Tanaman ini mengandung berbagai senyawa bioaktif yang bermanfaat bagi kesehatan, seperti antioksidan, antiinflamasi, analgesik, antidiabetes, antikanker, dan antihistamin. Kandungan antosianinnya menghasilkan warna biru alami yang potensial sebagai pewarna pangan berbasis tumbuhan (Ummah *et al.*, 2022).

Sejumlah penelitian melaporkan bahwa penambahan ekstrak bunga telang pada kefir susu kambing berdampak positif terhadap kualitas mikrobiologis, kimia, dan fungsional produk. Suprinata *et al.* (2022) menyatakan bahwa penambahan bubuk bunga telang hingga 2,5% tidak menurunkan jumlah BAL, yang tetap berada pada kisaran 9,2–9,4 log CFU/ml, bahkan meningkatkan kadar asam laktat serta menurunkan pH, menunjukkan proses fermentasi berlangsung optimal. Hasil ini menegaskan adanya peningkatan nilai fungsional pada kefir susu kambing dengan fortifikasi bunga telang. Selain itu, Pertiwi *et al.* (2022) melaporkan bahwa penambahan bunga telang mampu meningkatkan aktivitas antioksidan produk.

Penelitian ini bertujuan mengkaji potensi probiotik yang berasal dari susu kambing Etawa serta aplikasinya sebagai starter dalam pembuatan kefir. BAL yang diisolasi dari susu kambing Etawa akan digunakan sebagai starter untuk menghasilkan kefir sebagai produk pangan fungsional. Tahapan penelitian meliputi isolasi dan skrining BAL, identifikasi morfologi, karakterisasi biokimia, identifikasi molekuler DNA, serta analisis filogenetik untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar isolat. Isolat BAL yang diperoleh diharapkan dapat dimanfaatkan dalam produksi kefir susu kambing Etawa yang bernilai fungsional tinggi. Produk ini berpotensi memberikan nilai tambah bagi konsumen, membuka peluang bisnis yang menjanjikan, meningkatkan keuntungan pelaku usaha, serta mendukung penguatan ekonomi UMKM dan kesehatan masyarakat. Berdasarkan uraian tersebut, penelitian

ini dirumuskan dengan judul “Potensi Probiotik Dari Susu Kambing Etawa Untuk Kefir Dengan Penambahan Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) Untuk Meningkatkan Kesehatan Masyarakat”.

## **B. Rumusan Masalah**

Rumusan masalah dalam penelitian ini antara lain:

1. Bagaimana karakteristik Bakteri Asam Laktat (BAL) yang terdapat pada susu kambing etawa dari Kota Padang yang berpotensi sebagai probiotik untuk dapat digunakan sebagai starter kefir?
2. Bagaimana pengaruh penambahan konsentrasi starter BAL probiotik dan ekstrak bunga telang yang memberikan hasil terbaik terhadap kadar air, kadar protein, kadar lemak, jumlah total koloni BAL, nilai pH, TTA, aktivitas antioksidan, dan uji organoleptik frozen kefir?

## **C. Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini sebagai berikut:

1. Untuk mendapatkan karakteristik BAL yang terdapat pada susu kambing etawa dari Kota Padang yang berpotensi sebagai probiotik untuk dapat digunakan sebagai starter kefir.
2. Untuk mengetahui pengaruh penambahan konsentrasi starter BAL probiotik dan ekstrak bunga telang yang memberikan hasil terbaik terhadap kadar air, kadar protein, kadar lemak, jumlah total koloni BAL, nilai pH, TTA, aktivitas antioksidan, dan uji organoleptik kefir.

## **D. Manfaat Penelitian**

Penelitian ini dapat memberikan informasi ilmiah tentang identifikasi molekuler BAL isolat susu kambing etawa yang berpotensi sebagai probiotik untuk dapat digunakan sebagai starter kefir. Mendapatkan adanya interaksi dan pengaruh kombinasi perlakuan yang memberikan pengaruh terbaik dilihat dari kadar air, kadar

protein, kadar lemak, jumlah total koloni BAL, nilai pH, TTA, aktivitas antioksidan, dan uji organoleptik kefir.

### **E. Hipotesis Penelitian**

Hasil isolasi dan identifikasi susu kambing etawa asal Kota Padang didapatkan BAL yang dapat digunakan sebagai starter BAL probiotik untuk pembuatan kefir, penambahan starter BAL probiotik sebanyak 2%, 4% dan 6% dengan ekstrak bunga telang 10%, 20% memberikan perlakuan terbaik pada kefir.



## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Susu Kambing Etawa

Salah satu jenis kambing yang cukup populer di Indonesia adalah kambing Peranakan Etawa (PE), yang dikenal sebagai ternak dwiguna karena dimanfaatkan sebagai penghasil susu sekaligus daging. Bobot badan kambing PE umumnya berada pada kisaran 32–37 kg, dengan kemampuan produksi susu sekitar 1,5–3 liter per hari. Selain itu, kambing PE memiliki laju pertumbuhan yang relatif cepat, dengan jumlah anak (litter size) rata-rata mencapai dua ekor, serta frekuensi reproduksi yang memungkinkan beranak hingga tiga kali dalam kurun waktu dua tahun (Setiawan dan Tanius, 2005).



Gambar 1. Susu Kambing

Susu kambing merupakan bahan pangan yang memiliki keistimewaan tersendiri bagi manusia karena cita rasanya yang khas serta komposisi gizinya yang relatif lengkap. Susu mengandung berbagai zat yang dibutuhkan tubuh, mudah dicerna, bernilai gizi tinggi, dan dikonsumsi oleh berbagai kelompok usia (Gambar 1) (Zakaria *et al.*, 2011). Selain itu, susu kambing diketahui memiliki kandungan vitamin A serta vitamin B, khususnya riboflavin dan niasin, dalam jumlah yang lebih tinggi dibandingkan susu sapi (Arum dan Purwidiani, 2014). Susu kambing juga mengandung asam lemak rantai pendek, serta mineral penting seperti zinc, besi, dan magnesium (Paz *et al.*, 2014).

Kandungan lemak dan protein pada susu kambing relatif lebih mudah dicerna karena ukuran globula lemak dan partikel proteinnya lebih kecil dibandingkan susu sapi, serta mengandung asam lemak rantai pendek dengan ukuran partikel yang lebih halus (Moeljanto, 2002). Secara umum, susu kambing memiliki kandungan gizi yang cukup tinggi, antara lain karbohidrat sebesar 4,40 g/100 g, protein 3,10 g/100 g, dan lemak 3,50 g/100 g (Arora *et al.*, 2013). Komposisi kandungan gizi susu kambing Etawa secara lebih rinci dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan gizi pada susu kambing etawa (Sutama, 2007)

| Komposisi           | Nilai  |
|---------------------|--------|
| Energi (kcal)       | 4,60   |
| Karbohidrat (gram)  | 67     |
| Lemak (gram)        | 4      |
| Protein (gram)      | 4,10   |
| Kalsium (mg)        | 129    |
| Fosfor (mg)         | 106    |
| Besi (mg)           | 0,05   |
| Seng (mg)           | 0,24   |
| Magnesium (mg)      | 13     |
| Vitamin A (IU)      | 207,40 |
| Vitamin B-1 (mg)    | 0,04   |
| Vitamin B-2 (mg)    | 0,01   |
| Vitamin B-3 (mg)    | 0,19   |
| Vitamin B-6 (mg)    | 0,07   |
| Vitamin B-12 (mg)   | 0,06   |
| Vitamin C (mg)      | 1,50   |
| Vitamin D (IU)      | 2,40   |
| Vitamin E (IU)      | 0,5    |
| Asam lemak esensial | 4,10   |

Susu kambing Etawa banyak dikonsumsi karena dipercaya memiliki berbagai manfaat kesehatan, antara lain mengatasi tekanan darah tinggi dan tuberkulosis (TBC) (Wanniatie *et al.*, 2021). Selain itu, susu kambing juga dilaporkan berperan dalam membantu regenerasi jaringan otak, sel-sel tubuh, sistem saraf, serta mendukung fungsi mental. Susu kambing juga dimanfaatkan sebagai alternatif bagi individu yang memiliki alergi terhadap susu sapi. Alergi susu sapi sering dikaitkan dengan kondisi seperti infeksi telinga kronis, asma, eksim, dan artritis. Konsumsi susu kambing dapat mengurangi gejala akibat alergi susu sapi tersebut (Erlita, 2017).

## B. Bakteri Asam Laktat

Secara umum, bakteri asam laktat (BAL) memiliki karakteristik mampu memfermentasi glukosa menjadi asam laktat, tidak membentuk spora, menunjukkan reaksi Gram positif, serta bereaksi negatif terhadap uji katalase (Romadhon *et al.*, 2012). Berdasarkan produk akhir fermentasinya, BAL dikelompokkan menjadi dua tipe, yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. BAL homofermentatif hanya menghasilkan asam laktat sebagai produk utama, sedangkan BAL heterofermentatif menghasilkan asam laktat, asam asetat, etanol, dan CO<sub>2</sub> (Finanda *et al.*, 2021). BAL banyak ditemukan pada produk fermentasi karena kemampuannya mendukung proses fermentasi sekaligus menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk melalui produksi asam (Mulyani *et al.*, 2023). Beberapa genus BAL seperti *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, dan *Streptococcus* kerap dimanfaatkan sebagai pengawet alami karena kemampuannya menghasilkan senyawa antimikroba (Kartikasari, 2018).

Zheng *et al.* (2020) mengusulkan klasifikasi baru yang mencakup 25 genus, antara lain *Lactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, dan *Secundilactobacillus*. BAL merupakan bakteri Gram positif anaerob fakultatif yang bersifat antagonis melalui produksi senyawa antimikroba dalam media pertumbuhannya. Sifat ini menjadikan BAL sebagai biopreservatif yang berpotensi mengurangi atau menggantikan penggunaan bahan kimia aditif pada produk pangan fermentasi tradisional (Arena *et al.*, 2016).

Karakteristik BAL dapat diamati secara morfologis melalui pengamatan makroskopis dan mikroskopis. Secara makroskopis, identifikasi dilakukan dengan mengamati bentuk koloni, elevasi, tepi koloni, struktur internal, pertumbuhan pada media miring, serta motilitas. Secara mikroskopis, pengamatan meliputi bentuk dan

susunan sel menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x (Usmiati, 2007).

BAL memiliki peran penting dalam fermentasi berbagai produk pangan seperti keju, yogurt, kefir, daging, dan sayuran. Dalam proses tersebut, BAL berfungsi meningkatkan cita rasa sekaligus mengawetkan produk dengan mengendalikan pertumbuhan bakteri patogen (Raj *et al.*, 2022). Produksi asam laktat dalam konsentrasi tinggi yang menyebabkan penurunan pH mampu menghambat mikroba pembusuk dan patogen, sehingga produk fermentasi menjadi lebih awet dan aman dikonsumsi. Selain asam laktat, BAL juga menghasilkan senyawa lain seperti hidrogen peroksida, diasetil, karbondioksida, reuterin, dan bakteriosin yang berperan sebagai antimikroba (Coelho *et al.*, 2022).

### C. Probiotik

Probiotik merupakan mikroorganisme hidup yang apabila diberikan dalam jumlah yang cukup mampu memberikan efek menguntungkan bagi ternak inangnya (Fijan, 2014). Probiotik juga didefinisikan sebagai penambahan mikroba hidup yang memberikan pengaruh positif terhadap komunitas mikroba pada lingkungan tempat hidupnya (Rombaut *et al.*, 2000). Pemberian probiotik diketahui memberikan berbagai manfaat, antara lain menekan kemampuan bakteri patogen dalam memproduksi toksin, merangsang pembentukan senyawa antimikroba, meningkatkan aktivitas enzim pencernaan, serta mengurangi dampak negatif senyawa antinutrisi dalam pakan (Humayun Kober *et al.*, 2022).

Dalam pemilihan mikroorganisme yang akan digunakan sebagai probiotik, terdapat beberapa persyaratan yang perlu dipenuhi, yaitu: 1) tidak bersifat patogen maupun merugikan inang, serta aman bagi konsumen (manusia maupun hewan), 2) tidak mengganggu keseimbangan ekosistem setempat, 3) mudah dipelihara dan diperbanyak, serta 4) mampu hidup, bertahan, dan berkembang biak di dalam saluran pencernaan (Feliatra, 2002).

Menurut Lopez (2000), mekanisme interaksi metabolik mikroba dalam saluran pencernaan meliputi: 1) kompetisi antara probiotik dan mikroba non-indigenous terhadap ketersediaan nutrisi yang terbatas, 2) produksi metabolit oleh

probiotik yang dapat menghambat multiplikasi mikroba non-indigenous, 3) penciptaan kondisi lingkungan yang mendukung pertumbuhan probiotik sehingga menekan populasi mikroba non-indigenous, serta 4) kompetisi dalam perlekatan pada mukosa usus. Sementara itu, Surono (2004) menjelaskan bahwa mekanisme kerja probiotik mencakup: 1) antagonisme langsung melalui produksi senyawa antimikroba, 2) kompetisi terhadap reseptor adhesi dan nutrisi, 3) kemampuan adhesi bakteri probiotik pada epitel usus, serta 4) stimulasi sistem imun inang.

#### D. Susu Kefir

Menurut Tomar *et al.* (2019), susu merupakan salah satu bahan pangan yang memiliki peranan penting dalam mendukung kesehatan masyarakat karena kandungan nutrisinya yang lengkap. Data Badan Pusat Statistik (2009) menunjukkan bahwa produksi susu sapi di Indonesia pada tahun 2019 mencapai 957,22 ribu ton dan mengalami peningkatan sebesar 4,19% pada tahun 2020 menjadi 997,35 ribu ton. Dalam periode 2019–2020, konsumsi susu dan produk olahannya juga meningkat sebesar 1,22%, yaitu dari 4.332,88 ribu ton pada tahun 2019 menjadi 4.406,94 ribu ton pada tahun 2020. Meskipun memiliki nilai gizi tinggi, susu termasuk bahan pangan yang mudah rusak apabila tidak ditangani dengan baik. Salah satu upaya pengolahan untuk memperpanjang daya simpan dan meningkatkan keamanan konsumsi adalah melalui proses fermentasi dengan penambahan bakteri asam laktat. Usmiati dan Abubakar (2009) menyatakan bahwa susu fermentasi memberikan manfaat kesehatan, antara lain lebih mudah dicerna dan diserap, membantu mengurangi gejala intoleransi laktosa, serta memiliki konsistensi yang relatif lebih kental dibandingkan susu segar. Berdasarkan metabolit yang dihasilkan, susu fermentasi dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu fermentasi asam laktat seperti yogurt, susu acidophilus, dan susu casei, serta fermentasi campuran asam laktat dan alkohol seperti kefir dan koumiss (Usmiati dan Abubakar, 2009).

Salah satu produk fermentasi susu yang banyak dikonsumsi adalah kefir. Kefir merupakan minuman probiotik yang bermanfaat bagi kesehatan sistem pencernaan. Produk ini lebih mudah dicerna dibandingkan susu segar karena

sebagian protein telah mengalami hidrolisis selama proses fermentasi sehingga tidak membebani sistem pencernaan. Kefir juga berperan dalam menyeimbangkan mikroflora usus dengan menghambat bakteri patogen melalui mekanisme adhesi pada dinding saluran pencernaan dan kompetisi nutrisi (Widyaningsih, 2011). Menurut Bayu *et al.* (2017), kefir diproduksi dengan menambahkan kefir grain secara langsung ke dalam susu, baik susu sapi, kerbau, maupun kambing, kemudian difermentasi. Albaarri *et al.* (2003) menjelaskan bahwa kefir grain tersusun atas berbagai mikroorganisme seperti *Streptococcus* sp., *Lactobacilli*, serta khamir non-patogen. Selain mengandung bakteri dan ragi, kefir juga mengandung vitamin, asam amino, dan mineral yang mendukung fungsi tubuh (Otes dan Cagindi, 2003). Liutkevičius dan Šarkinas (2004) melaporkan bahwa kandungan asam amino esensial dalam kefir secara berurutan dari yang tertinggi adalah lisin (376 mg/100 g), isoleusin (262 mg/100 g), fenilalanin (231 mg/100 g), valin (220 mg/100 g), treonin (183 mg/100 g), metionin (137 mg/100 g), dan triptofan (70 mg/100 g). Standar mutu kefir menurut CODEX (CODEX Stan 243-2003) dapat dilihat pada tabel 2. berikut.

Tabel 2. Kadar nutrisi kefir

| Informasi gizi | Nilai         | Referensi |                       |
|----------------|---------------|-----------|-----------------------|
| Susu kefir     | Total Asam    | 0,60%     |                       |
|                | Lemak         | <10%      |                       |
|                | Protein       | 2,7%      | (CODEX Stan 243-2003) |
|                | Jumlah BAL    | $10^7$    |                       |
|                | Jumlah Khamir | $10^4$    |                       |
|                | pH            | 4,6       |                       |

Kefir merupakan produk susu fermentasi yang dibuat menggunakan bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus lactis* dan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* yang dikombinasikan dengan ragi, sehingga menghasilkan asam dan sejumlah alkohol. Pada tahap akhir proses produksi, dilakukan pematangan dalam kemasan tertutup untuk memungkinkan terbentuknya karbonasi (Albaarri dan Murti, 2003). Kefir berasal dari wilayah Kaukasus bagian utara atau kawasan timur laut Mongolia dan pada awalnya diproduksi secara tradisional dalam skala rumah tangga.

Bahan baku yang umum digunakan adalah susu sapi maupun susu kambing. Produk ini banyak diproduksi di Rusia dan dalam jumlah terbatas di beberapa negara Eropa. Kefir umumnya mengandung alkohol sekitar 0,5–1,0% serta asam laktat sebesar 0,9–1,1% (Surono, 2004). Secara nilai gizi, kefir relatif setara dengan susu sebagai bahan bakunya, namun memiliki keunggulan tambahan karena asam yang terbentuk selama fermentasi dapat memperpanjang daya simpan, menghambat pertumbuhan mikroorganisme pembusuk dan patogen, serta meningkatkan keamanan produk (Fardiaz, 1992).

Susu kambing secara alami mengandung berbagai bakteri asam laktat (BAL) yang berpotensi dimanfaatkan sebagai kultur starter. Beberapa penelitian melaporkan bahwa spesies seperti *Lactobacillus plantarum*, *L. rhamnosus*, serta *L. casei* atau *L. paracasei* sering ditemukan dalam susu kambing (Haddar *et al.*, 2013). Selain itu, isolasi juga mengidentifikasi keberadaan *Lactococcus lactis* dan *Weissella cibaria* yang memiliki ketahanan terhadap kondisi asam lambung, mampu menghasilkan eksopolisakarida, serta menunjukkan aktivitas antimikroba (Magno *et al.*, 2019). Dalam pembuatan yogurt, kultur sederhana seperti *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* lazim digunakan secara ko-fermentasi untuk menghasilkan tekstur lembut dan cita rasa asam khas (Magno *et al.*, 2019). Apabila ditambahkan biji kefir (kefir grain) ke dalam yogurt atau susu fermentasi, proses fermentasi berkembang menjadi produksi kefir dengan komunitas mikroba yang lebih kompleks, terdiri atas lebih dari 50 spesies bakteri dan ragi, termasuk *Lactobacillus kefiranofaciens*, serta *Lactococcus*, *Leuconostoc*, dan berbagai ragi yang hidup dalam matriks simbiotik. Komunitas ini tidak hanya menghasilkan karakteristik berbuih dan rasa asam khas, tetapi juga memberikan aktivitas antimikroba terhadap mikroorganisme patogen (Magno *et al.*, 2019).

### **E. Bunga Telang**

Bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) yang dikenal dengan warna birunya yang khas diduga berasal dari kawasan Asia tropis, meskipun terdapat pendapat lain yang menyatakan bahwa tanaman ini berasal dari Amerika Selatan bagian tengah dan

kemudian menyebar ke wilayah tropis pada abad ke-19, termasuk ke Indonesia (Ulimaz *et al.*, 2020). Penyebarannya mencakup berbagai wilayah tropis seperti Asia, Australia, hingga Afrika. Bentuk bunganya yang menyerupai kupu-kupu menyebabkan tanaman ini dikenal dengan sebutan Butterfly pea dalam bahasa Inggris. Di Indonesia, bunga telang juga memiliki beragam nama lokal, seperti bunga kelentit, kembang teleng, atau menteleng di Pulau Jawa; bunga talang atau taman lereng di Sulawesi; serta bunga bisi atau seyamagulele di Maluku (Anto, 2021).

Bunga telang termasuk dalam familia Fabaceae, yang dicirikan oleh batang berukuran kecil dan pola pertumbuhan merambat ke arah kiri sehingga memerlukan penyangga. Daunnya berukuran kecil dan tersusun berpasangan sebanyak 2–4 pasang, sedangkan bunganya berwarna biru mencolok (Budiasih, 2017). Berikut ini adalah klasifikasi tanaman telang:

|             |                               |
|-------------|-------------------------------|
| Kingdom     | : Plantae                     |
| Divisi      | : Tracheophyta                |
| Infrodivisi | : Angiospermae                |
| Kelas       | : Magnoliopsida               |
| Ordo        | : Fabales                     |
| Familia     | : Fabacea                     |
| Genus       | : Clitoria                    |
| Spesies     | : <i>Clitoria ternatea</i> L. |



Gambar 2. Bunga telang (*Clitoria ternatea* L.)

(Sumber :

<https://katadata.co.id/iftitah/berita/614d3c23b219d/10-manfaat-bunga-telang-untuk-kesehatan-otak-hingga-jantung>)

Bunga telang merupakan tanaman herbal tropis yang kaya akan senyawa bioaktif seperti antosianin, flavonoid, fenol total, dan alkaloid. Kandungan antosianinnya berfungsi sebagai antioksidan kuat yang mampu menangkal radikal bebas serta berpotensi sebagai agen antimikroba alami. Ekstrak bunga telang telah banyak dimanfaatkan dalam pengembangan pangan fungsional, baik dalam bentuk teh, sirup, maupun sebagai fortifikan pada produk fermentasi untuk meningkatkan aktivitas antioksidan (Hanum *et al.*, 2021).

Chusak *et al.* (2018) melaporkan bahwa konsumsi minuman berbasis ekstrak bunga telang dapat meningkatkan kadar antioksidan dalam darah tanpa menimbulkan efek hipoglikemik, serta berpotensi membantu menurunkan kadar glukosa darah. Senyawa utama yang memberikan warna biru khas pada bunga telang adalah delphinidin glucoside (Zakaria *et al.*, 2018). Antosianin dari bunga telang tergolong stabil, namun sifat kestabilannya sangat dipengaruhi oleh pH. Perubahan pH akan memengaruhi intensitas dan spektrum warna, di mana pada pH netral berwarna biru dan pada pH lebih rendah berubah menjadi ungu (Chu *et al.*, 2016). Selain aktivitas antioksidan, ekstrak bunga telang juga memiliki sifat antimikroba (Dhanasekaran *et al.*, 2019). Senyawa antimikroba tersebut dilaporkan mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Shigella dysenteriae*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, serta *Escherichia coli* (Ezzudin dan Rabeta, 2018).

#### F. Identifikasi Molekuler 16S rRNA

Gen yang paling umum dimanfaatkan untuk identifikasi spesies mikroba adalah gen 16S ribosomal RNA (16S rRNA). Gen ini merupakan bagian dari kompleks protein yang membentuk subunit kecil 30S pada ribosom bakteri. Subunit tersebut dikodekan oleh gen 16S rRNA yang bersifat sangat konservatif dan esensial dalam proses perakitan ribosom pada seluruh bakteri. Meskipun konservatif, gen ini juga memiliki wilayah variabel yang berfungsi sebagai penanda spesifik bagi masing-masing spesies. Oleh karena itu, gen 16S rRNA dianggap sebagai fragmen, serta klasifikasi filogenetik bakteri (Johnson *et al.*, 2019).

16S rRNA merupakan komponen subunit kecil RNA ribosom bakteri, sedangkan gen yang mengkodekannya dikenal sebagai 16S ribosomal DNA (rDNA). Panjang gen 16S rRNA sekitar 1.540 nukleotida dan terdapat pada seluruh bakteri. Karena struktur dan fungsinya yang sangat terkonservasi, teknologi high-throughput sequencing (HTS) banyak digunakan dalam studi ekologi mikroba untuk mengidentifikasi fragmen gen ini (Tozzo *et al.*, 2020). Setelah proses sekuensing dilakukan, wilayah 16S dianalisis secara bioinformatika. Persentase kemiripan sekuens mencerminkan kedekatan hubungan filogenetik antar mikroorganisme, sedangkan jumlah kemunculan suatu sekuens menunjukkan kelimpahan relatif mikroorganisme tersebut dalam komunitas. Melalui pendekatan ini, dapat diperoleh informasi mengenai komposisi spesies dan tingkat keanekaragaman komunitas mikroba (Hassler *et al.*, 2022).

Penggunaan teknik sekuensing gen 16S rRNA untuk analisis filogenetik pertama kali dilaporkan pada tahun 1985. Gen ini memiliki sepuluh daerah yang sangat konservatif yang dimanfaatkan dalam perancangan primer, serta sembilan daerah hiper-variabel yang berperan dalam identifikasi karakteristik filogenetik mikroorganisme. Daerah konservatif mencerminkan hubungan evolusioner antarspesies bakteri dan menjadi dasar perancangan primer universal, sedangkan daerah hiper-variabel menggambarkan variasi antarspesies. Gen 16S rRNA bakteri memiliki sembilan wilayah hiper-variabel (V1–V9) dengan tingkat keragaman urutan yang tinggi pada berbagai bakteri. Secara spesifik, wilayah V1 efektif untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dari *Staphylococcus koagulase-negatif*, V2 dan V3 mampu mengidentifikasi bakteri hingga tingkat genus, V6 dapat membedakan sebagian besar spesies kecuali anggota famili Enterobacteriaceae, sementara wilayah V4, V5, V7, dan V8 memiliki efektivitas yang relatif rendah sebagai target probe spesifik genus atau spesies (Chakravorty *et al.*, 2007).

Primer universal yang dirancang dari daerah konservatif tersebut dapat digunakan untuk proses identifikasi dan klasifikasi bakteri. Kemampuan gen 16S rRNA dalam membedakan berbagai spesies menjadikannya komponen penting dalam kajian taksonomi dan evolusi bakteri. Oleh sebab itu, sekuensing gen 16S

rRNA telah menjadi penanda genetik yang paling luas digunakan dalam analisis dan pemprofilan komunitas bakteri (Song *et al.*, 2018).

### **G. *Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Elektroforesis***

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik biologi molekuler yang memungkinkan perbanyakan fragmen DNA secara *in vitro* menggunakan enzim DNA polimerase yang bersifat termostabil (Karim, 2019). Teknik ini pertama kali dikembangkan oleh Kary Mullis bersama timnya dan kemudian mengantarkannya meraih Penghargaan Nobel Kimia atas penemuan tersebut (Jäger and Weiher, 2020). Sejak saat itu, PCR berkembang pesat dan menjadi salah satu metode paling revolusioner dalam bidang biologi dan kedokteran. PCR memungkinkan analisis DNA dalam berbagai bidang, seperti genetika, forensik, mikrobiologi, serta diagnostik penyakit menular dan genetik (Alsharksi *et al.*, 2024). Keunggulan utama PCR dibandingkan teknik lain adalah sensitivitas dan spesifisitasnya yang tinggi, sehingga mampu mendeteksi DNA dalam jumlah sangat kecil secara cepat dan akurat (Bhat dan Al-Khayri, 2023).

Proses PCR terdiri atas serangkaian siklus suhu berulang, di mana setiap siklus meliputi tiga tahap utama. (i) Denaturasi, dilakukan pada suhu 94–96°C untuk memisahkan DNA heliks ganda menjadi dua untai tunggal. (ii) Annealing, berlangsung pada suhu 45–60°C, yaitu tahap penempelan primer oligonukleotida pada ujung 3' DNA cetakan. Primer merupakan oligonukleotida untai tunggal dengan urutan nukleotida yang dirancang komplementer terhadap sekuens target dan berfungsi menentukan fragmen DNA yang akan diamplifikasi. (iii) Elongasi, terjadi pada suhu 72°C, yaitu tahap pemanjangan primer oleh enzim DNA polimerase sehingga terbentuk untai DNA baru yang komplementer terhadap DNA cetakan (Radji, 2011). Setiap siklus PCR menggandakan jumlah molekul DNA target karena produk yang terbentuk akan menjadi cetakan pada siklus berikutnya (Syukur dan Purwati, 2013).

Komponen utama yang dibutuhkan dalam reaksi PCR meliputi DNA template sebagai molekul target yang akan dianalisis, primer sebagai batas amplifikasi, enzim

DNA polimerase untuk mensintesis DNA baru, larutan buffer yang mengandung  $MgCl_2$ , serta deoksinukleotida trifosfat (dNTPs) yang terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP sebagai bahan penyusun DNA (Syukur dan Purwati, 2013).

Keberhasilan reaksi PCR dapat dievaluasi menggunakan metode elektroforesis gel dengan pewarnaan etidium bromida, yang merupakan teknik paling umum digunakan. Hasil elektroforesis diamati menggunakan sinar ultraviolet (Christanto *et al.*, 2003). Elektroforesis gel DNA merupakan metode untuk memisahkan molekul DNA berdasarkan ukuran fragmennya (Firdausi, 2016). Namun, interpretasi hasil elektroforesis secara manual seringkali sulit, memakan waktu, dan berpotensi menimbulkan kesalahan (Intarapanich *et al.*, 2015). Hal ini disebabkan kompleksitas pergerakan molekul DNA dalam gel, di mana jarak migrasi dipengaruhi oleh muatan, bentuk, dan ukuran molekul (Kusumaningrum *et al.*, 2014).

Dalam praktiknya, gel agarosa merupakan media standar yang umum digunakan dalam elektroforesis DNA. Fragmen DNA yang telah bermigrasi dianalisis berdasarkan posisinya di dalam gel dan dibandingkan dengan DNA marker yang ukurannya telah diketahui (Zhang *et al.*, 2011). Melalui perbandingan tersebut, ukuran dan kecocokan fragmen DNA hasil amplifikasi dapat ditentukan secara akurat.

#### **H. Analisis Sekuensing dan Filogenetik**

Analisis sekuen merupakan teknik yang dinilai paling efektif untuk mengkaji keanekaragaman hayati suatu kelompok organisme. Perkembangan teknik ini semakin pesat setelah ditemukannya mesin DNA sequencer. Pada prinsipnya, polimorfisme diamati berdasarkan perbedaan urutan sekuen DNA dari fragmen tertentu dalam genom organisme. Kajian keragaman jenis dapat dilakukan melalui analisis sekuen gen 16S rRNA pada organisme prokariotik dan 18S rRNA pada organisme eukariotik. Perbandingan sekuen rRNA menjadi alat yang sangat baik untuk menduga hubungan filogeni dan evolusi antara kelompok Bacteria, Archaea, dan Eukariota (Suryanto, 2003).

Menurut Ahmad (2014), sekuensing DNA adalah metode yang digunakan untuk mengetahui urutan nukleotida atau basa dalam suatu fragmen DNA. DNA menyimpan informasi genetik dalam bentuk urutan nukleotida. Dengan mengetahui urutan tersebut, dapat diprediksi urutan asam amino dari protein yang dikodekannya. Sebaliknya, urutan asam amino protein tidak dapat sepenuhnya mengungkapkan urutan nukleotida gen penyandinya. Selain itu, proses sekuensing protein relatif lebih mahal dan kompleks dibandingkan sekuensing DNA, sehingga analisis berbasis DNA lebih luas digunakan dalam penelitian molekuler.

Karakterisasi secara molekuler mampu menggambarkan hubungan kekerabatan antarspesies secara lebih akurat dibandingkan metode identifikasi klasik yang didasarkan pada karakter fenotip. Identifikasi bakteri berbasis genotip, khususnya melalui analisis sekuensing gen 16S rRNA, memberikan hasil yang lebih presisi dalam menentukan identitas spesies. Analisis ini dilakukan dengan menyekuensing gen penyandi RNA ribosomal menggunakan primer spesifik, sehingga tipe dan variasi gen rRNA dapat ditentukan (Syukur *et al.*, 2011).

Filogenetik merupakan metode yang digunakan untuk menganalisis hubungan kekerabatan (phylogenetic relationship) antar makhluk hidup. Dalam filogenetika, organisme yang memiliki kesamaan karakter dianggap memiliki hubungan evolusioner yang dekat karena berasal dari nenek moyang yang sama dan membentuk kelompok monofiletik (Astarini *et al.*, 2021). Hubungan tersebut biasanya divisualisasikan dalam bentuk pohon filogeni, yaitu diagram bercabang yang menggambarkan pola evolusi dan silsilah organisme, baik hewan maupun tumbuhan (Lubis, 2014). Analisis filogenetik berbasis data molekuler seperti DNA atau protein mampu memberikan gambaran yang lebih objektif mengenai hubungan evolusi antarspesies (Dharmayanti, 2011).

## BAB III METODE PENELITIAN

### A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus hingga November 2025 di Laboratorium Teknologi Hasil Ternak Bagian Mikrobiologi / Bioteknologi, Fakultas Peternakan Universitas Andalas.

### B. Penelitian Tahap I

#### 1. Materi Penelitian

##### a. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoclave, cawan petri, oven listrik, desikator, neraca analitik, labu Kjeldhal, plastik kaca, kotak plastik, bunsen, labu ukur, labu destilasi, pipet tetes, erlenmeyer, alat tritasi, dan pH meter.

##### b. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah susu kambing etawa yang diperoleh dari Kota Padang, benzene, kertas lemak,  $H_2SO_4$  0.05 N, NaOH 30%, NaOH standar 0.1 N dan  $HClO_4$  52%

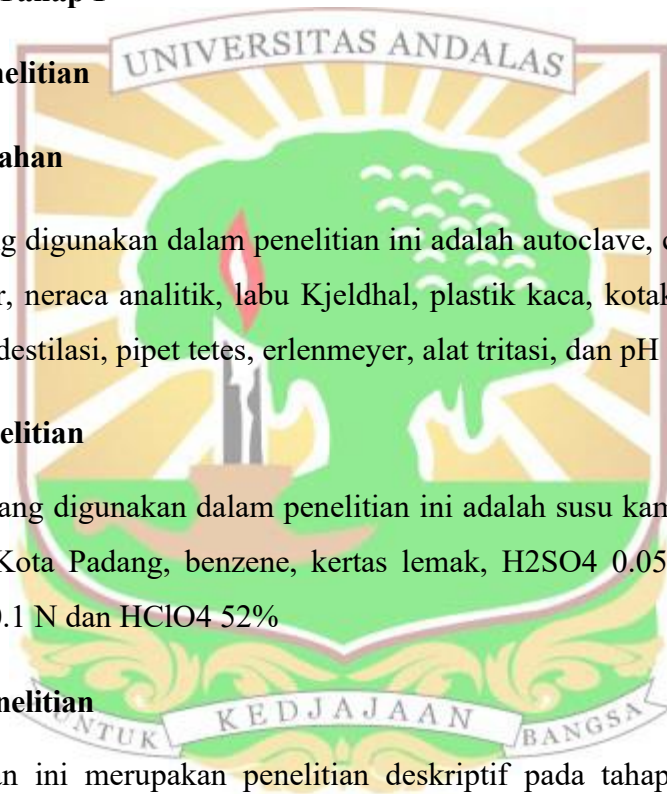
#### 2. Metode penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif pada tahap I yaitu analisis proksimat susu kambing etawa untuk mendapatkan kandungan gizi susu kambing etawa yang berpotensi sebagai pangan fungsional.

#### 3. Pelaksanaan Penelitian Tahap I

##### a. Pengambilan Sampel Susu Kambing Etawa

Sampel susu kambing etawa diambil dari 3 lokasi yang berbeda di Kota Padang yaitu Gunung Pangilun, Korong Gadang dan Padayo. Sampel susu kambing etawa



dimasukkan kedalam botol kaca dan dibawa ke Laboratorium Teknologi Hasil Ternak dengan *ice box*.

## **b. Analisis Proksimat Susu Kambing Etawa**

### **1) Kadar Air**

Penentuan kadar air dilakukan dengan metode gravimetri menggunakan oven. Cawan porselen terlebih dahulu dibersihkan, kemudian dikeringkan dalam oven listrik pada suhu 105–110°C selama 1 jam. Setelah itu, cawan didinginkan di dalam desikator selama 1 jam. Cawan yang telah dingin kemudian ditimbang menggunakan neraca analitik dan dicatat sebagai berat awal (X gram). Sebanyak 1 gram sampel dimasukkan ke dalam cawan porselen tersebut, lalu ditimbang kembali dan dicatat sebagai (Y gram). Selanjutnya, cawan yang berisi sampel dikeringkan dalam oven listrik pada suhu 110°C selama 5 jam. Setelah proses pengeringan, cawan dipindahkan ke dalam desikator dan didiamkan selama 30 menit hingga mencapai suhu ruang. Setelah dingin, cawan beserta sampel ditimbang kembali menggunakan neraca analitik. Proses penimbangan dilakukan berulang hingga diperoleh berat yang konstan, yang kemudian dicatat sebagai (Z gram) (Badan Standarisasi Nasional, 2006a). Kadar air dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{x + y - z}{y} \times 100\%$$

Keterangan:

x = Berat cawan kosong

y = Berat sampel awal

z = Berat cawan dan sampel (setelah pengeringan)

### **2) Kadar Lemak**

Penentuan kadar lemak dilakukan dengan metode ekstraksi Soxhlet. Sebanyak 1 gram sampel dibungkus menggunakan kertas lemak, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105–110°C selama 12 jam hingga mencapai berat

konstan dan dicatat sebagai (c gram). Sampel yang masih dalam keadaan panas kemudian ditimbang satu per satu dan dicatat sebagai (b gram). Selanjutnya, sampel diekstraksi menggunakan pelarut benzena dalam alat Soxhlet selama 16 jam hingga pelarut yang tersirkulasi tampak jernih, menandakan proses ekstraksi lemak telah berlangsung optimal. Setelah proses ekstraksi selesai, sampel diangin-anginkan hingga kering agar sisa benzena menguap. Berikutnya, sampel kembali dikeringkan dalam oven listrik pada suhu 105–110°C selama 4 jam. Setelah itu, bungkus sampel ditimbang kembali dan dicatat sebagai (a gram) (Badan Standarisasi Nasional, 2006b). Kadar Lemak dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Kadar Lemak} = \frac{b - a}{c} \times 100\%$$

Keterangan:

a = berat sampel setelah diekstraksi (gram)

b = berat sampel sebelum diekstraksi (gram)

c = berat sampel (gram)

### 3) Kadar Protein

Pengukuran kadar protein dilakukan sesuai metode Kjeldhal. Metode Kjeldhal didasarkan pada pengukuran kadar nitrogen total yang ada di dalam sampel. Penetapan kadar protein dengan metode Kjeldhal dibagi menjadi tiga tahapan, yaitu tahap penghancuran/destruksi, destilasi dan titrasi.

#### a) Destruksi

Sampel kering yang ingin diketahui kadar proteinnya, ditimbang sebanyak 1 gram ke dalam labu Kjeldhal. Lalu ditambahkan 1 gram selenium dan 25 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat lalu dipanaskan dalam lemari asam dengan api kecil sehingga terjadi destruksi. Pemanasan terus dilakukan hingga larutan berwarna kuning jernih kemudian didinginkan.

#### b) Destilasi

Sejumlah kecil aquades secara perlahan ditambahkan ke dalam labu ukur 250 ml melewati dinding. Ke dalam labu ukur dimasukkan isi labu Kjeldhal lalu dibilas

sebanyak 3-4 kali dengan sedikit aquades dan ditambahkan aquades hingga tanda batas labu ukur. Kemudian dipipet sebanyak 25 ml larutan dalam labu ukur tersebut dan dimasukkan ke dalam labu destilasi. Ditambahkan ke dalam labu destilasi 25 ml NaOH 30% yang telah dicampur dengan aquades sebanyak 150 ml. Larutan dipanaskan (2/3 tersuling) hingga semua N dari cairan yang ada dalam labu tertangkap oleh H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05 N sebanyak 25 ml yang terlebih dahulu dicampur dengan 3 tetes larutan indikator metil merah dalam erlenmeyer.

#### c) Titrasi

Pada tahap ini labu erlenmeyer yang berisi hasil sulingan dititrasi dengan NaOH standar 0.1 N (sampel) hingga berubah warna. Selanjutnya dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 25 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05 N lalu ditambah indikator metil merah 5 tetes kemudian dititer dengan NaOH sehingga terjadi perubahan warna dari merah muda menjadi kuning (blanko) (Badan Standarisasi Nasional, 2006c). Selisih jumlah blanko dan sampel merupakan jumlah ekuivalen nitrogen. Kadar protein dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Kadar Protein} = \frac{(Y-Z) \times N \text{ NaOH} \times C \times 0.014 \times 6.38}{X} \times 100\%$$

Keterangan:

X = berat sampel (gram)

Y = volume pentiter blanko (ml)

Z = volume pentiter sampel (ml)

C = pengenceran

0.014 = konstanta

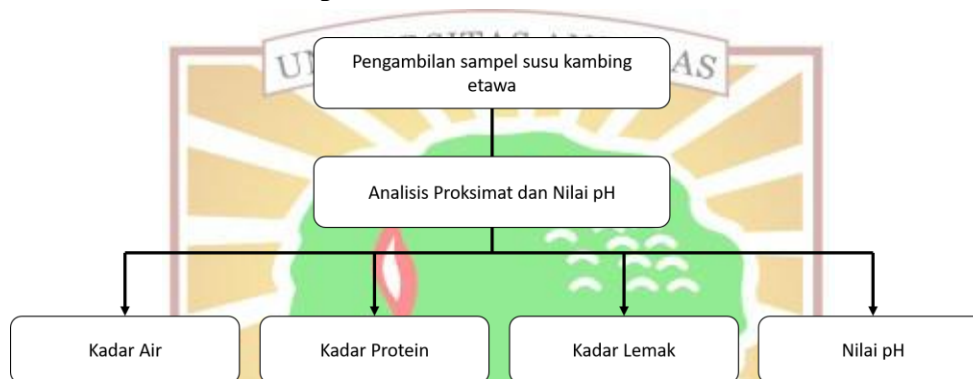
6.38 = faktor konversi dari total nitrogen ke dalam protein

#### 4) Nilai pH

Penentuan nilai pH dilakukan menggunakan pH meter dengan tahapan sebagai berikut. Sebanyak 10 mL sampel diambil dan dihomogenkan bersama 20 mL akuades menggunakan mortar selama kurang lebih 1 menit hingga tercampur merata. Campuran tersebut kemudian dituangkan ke dalam gelas beker berkapasitas 10 mL

untuk selanjutnya dilakukan pengukuran pH. Sebelum digunakan, pH meter terlebih dahulu dikalibrasi dengan larutan buffer pH 7 untuk memastikan ketepatan dan sensitivitas alat. Setelah proses kalibrasi selesai, elektroda pH meter dicelupkan ke dalam sampel, kemudian nilai pH dibaca setelah jarum atau angka pada layar menunjukkan posisi yang stabil. Nilai yang terbaca pada kondisi konstan tersebut dicatat sebagai hasil pengukuran pH sampel (Richana, 2011).

#### 4. Skema Penelitian Tahap 1



Gambar 3. Skema Penelitian Tahap 1

### C. Penelitian Tahap II

#### 1. Materi Penelitian

##### a. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *autoclave*, *hot plate*, bunsen, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, tabung *ependorf*, erlenmeyer, inkubator, vortex, timbangan analitik, gelas ukur, hockeystick, jarum ose, kaca benda (preparat), mikroskop, *Lamina Air Flow* (Captair™ bio by erlab (Biocap) France), *quebecolony counter*, tip pipet mikro, anaerob jar, pipet mikro, sentrifuge, PCR (Bio-Rad my cycler™ thermal cycler, USA), cetakan agarose, elektroforesis (Power Pac Basic™, USA), incubatorshaker (Rocker NB104).

## **b. Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah susu kambing etawa yang diperoleh dari Kota Padang. Bahan-bahan yang digunakan untuk identifikasi bakteri asam laktat adalah *de Mann Rogosa Sharpe (MRS) Broth* (Merck), *de Mann Rogosa Sharpe (MRS) Agar* (Merck), *Mueller Hinton Agar (MHA)*, Pepton Water, aquades steril, alkohol, spritus, krista violet, iodine, safranin, 1x *Tris Ethylene Diamine TetraAcid* (Tris EDTA), *lysozyme*, etanol 70%, RNase, primer, dNTP, Taq Polymerase, 10 x Buffer, *Gel Agarose*, 1xTBE Tris-Boric-EDTA, TAE (*Tris Acid EDTA*), *RedSafe*, ddH<sub>2</sub>O, Promega Kit Protocol.

## **2. Metode Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif pada tahap II, yaitu identifikasi bakteri asam laktat dari *susu kambing etawa* untuk mendapatkan isolat bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai kandidat probiotik.

## **3. Pelaksanaan Penelitian Tahap II**

### **a. Perhitungan Total Koloni Bakteri Asam Laktat Susu Kambing Etawa**

#### **1) Persiapan dan Pembuatan Media**

Pembuatan media MRS Broth diawali dengan menimbang 52,2 gram bubuk MRS Broth menggunakan neraca analitik, kemudian melarutkannya dalam 1000 mL akuades. Larutan tersebut dihomogenkan menggunakan magnetic stirrer di atas hot plate pada suhu 100°C hingga seluruh komponen larut sempurna. Setelah homogen, media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit untuk memastikan kondisi steril sebelum digunakan. Sementara itu, pembuatan media MRS Agar dilakukan dengan menimbang 68,2 gram bubuk MRS Agar menggunakan neraca analitik, lalu dilarutkan dalam 1000 mL akuades. Larutan kemudian dihomogenkan menggunakan magnetic stirrer di atas hot plate pada suhu 100°C hingga tercampur merata. Setelah proses homogenisasi, media disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi selesai, media didinginkan hingga mencapai suhu sekitar 55°C agar tidak terjadi kondensasi berlebih saat penuangan. Selanjutnya, media dituangkan ke dalam cawan petri masing-masing sebanyak 8 mL, lalu dibiarkan pada suhu ruang hingga memadat dan siap digunakan untuk proses inokulasi (Purwati *et al.*, 2025).

## 2) Menghitung Total Koloni Bakteri Asam Laktat Susu Kambing Etawa

Sebanyak 1 mL sampel susu kambing Etawa diinokulasikan ke dalam 9 mL media MRS Broth, kemudian dihomogenkan menggunakan vortex hingga tercampur merata. Dari suspensi tersebut, sebanyak 0,1 mL dipindahkan ke dalam tabung mikro (Eppendorf) yang berisi 0,9 mL media MRS Broth untuk memperoleh pengenceran  $10^{-1}$ . Proses pengenceran selanjutnya dilakukan secara bertingkat (serial dilution) hingga mencapai tingkat pengenceran  $10^{-10}$ . Pada pengenceran terakhir, sebanyak 0,1 mL suspensi diambil dan diinokulasikan ke permukaan media MRS Agar menggunakan metode spread plate. Suspensi kemudian diratakan secara aseptik dengan bantuan hockey stick steril agar tersebar merata di seluruh permukaan media. Cawan petri selanjutnya dimasukkan ke dalam anaerobic jar untuk menciptakan kondisi anaerob, kemudian diinkubasi pada suhu 37–40°C selama 24 jam guna mendukung pertumbuhan bakteri asam laktat (Purwati *et al.*, 2025). Hitung Total koloni yang tumbuh dengan menggunakan rumus CFU/mL:

$$\frac{\text{CFU}}{\text{Gram}} = \text{Jumlah Koloni} \times \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}} \times \frac{1}{\text{Berat Sampel}} \times 10$$

### b. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Susu Kambing

#### 1) Isolasi Bakteri Asam Laktat

Sebelum digunakan, seluruh peralatan seperti cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, ujung mikropipet, dan hockey stick terlebih dahulu disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 15 psi. Media enrichment disiapkan dengan melarutkan 7,6 gram MRS Broth (Merck) ke

dalam 144 mL akuades, kemudian dipanaskan dan dihomogenkan menggunakan hot plate stirrer pada suhu 100°C hingga larut sempurna. Setelah itu, media disterilisasi dalam autoklaf dengan kondisi yang sama. Pembuatan media MRS Agar (Merck) dilakukan dengan melarutkan 4,1 gram bubuk dalam 60 mL akuades, lalu dipanaskan dan diaduk merata menggunakan hot plate stirrer pada suhu 100°C. Media kemudian disterilkan menggunakan autoklaf. Setelah suhu media turun hingga  $\pm 55^{\circ}\text{C}$ , media dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak kurang lebih 15 mL dan dibiarkan memadat.

Sebanyak 1 mL susu kambing Etawa dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 mL MRS Broth, kemudian dihomogenkan menggunakan vortex untuk memperoleh pengenceran  $10^{-1}$ . Suspensi diinkubasi secara anaerob selama 24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya, 1 mL dari suspensi tersebut dipindahkan ke tabung lain berisi 9 mL MRS Broth dan divortex hingga homogen untuk menghasilkan pengenceran  $10^{-2}$ . Proses pengenceran bertingkat dilanjutkan hingga mencapai  $10^{-8}$ . Dari pengenceran  $10^{-8}$ , sebanyak 100  $\mu\text{L}$  sampel ditanam pada media MRS Agar menggunakan metode spread plate. Suspensi diratakan dengan hockey stick yang telah disterilkan menggunakan api bunsen dan didinginkan. Cawan petri dimasukkan ke dalam anaerob jar dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C serta diberi kode identifikasi. Setelah inkubasi, koloni tunggal dengan ciri khas bakteri asam laktat dipindahkan ke media MRS Agar untuk pemurnian menggunakan metode streaking, kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37°C (Purwati *et al.*, 2005).

## 2) Morfologi Bakteri Asam Laktat

Identifikasi makroskopis dilakukan dengan mengamati pertumbuhan isolat pada media kultur. Pengamatan ini dilakukan secara langsung tanpa menggunakan alat bantu, dengan memperhatikan karakteristik koloni yang terbentuk, meliputi bentuk, permukaan, tepi, serta warna koloni (Kurnia *et al.*, 2020).

### 3) Pewarnaan Gram

Isolat bakteri diambil menggunakan jarum ose steril, kemudian dioleskan secara merata pada permukaan kaca preparat. Preparat selanjutnya difiksasi dengan pemanasan ringan di atas nyala bunsen atau menggunakan alat pengering hingga kering. Setelah proses fiksasi, preparat ditetesi larutan kristal violet sebagai pewarna utama dan didiamkan selama 30 detik, kemudian dibilas dengan akuades. Selanjutnya, preparat ditetesi larutan iodin sebagai mordant dan dibiarkan selama 30 detik, lalu dibilas kembali menggunakan akuades dan difiksasi. Tahap berikutnya adalah proses dekolorisasi dengan merendam preparat dalam larutan etanol selama kurang lebih 20 detik, kemudian dibilas dengan akuades dan difiksasi ulang. Pewarnaan dilanjutkan dengan penambahan safranin sebagai pewarna kontras (counterstain) dan didiamkan selama 1 menit. Preparat kemudian dibilas kembali menggunakan alkohol 96%. Setelah seluruh proses pewarnaan selesai, preparat difiksasi, ditetesi minyak imersi, dan diamati di bawah mikroskop menggunakan lensa objektif perbesaran  $100\times$  dengan total perbesaran  $1000\times$  (Asfiya *et al.*, 2024).

### 4) Uji Katalase

Isolat bakteri diambil menggunakan jarum ose steril, kemudian dioleskan pada permukaan kaca objek. Setelah itu, beberapa tetes larutan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) ditambahkan ke atas preparat dan didiamkan selama kurang lebih satu menit. Pengamatan dilakukan terhadap adanya reaksi berupa pembentukan gelembung gas yang menandakan aktivitas enzim katalase. Jika terbentuk gelembung, isolat dinyatakan bersifat katalase positif (aerob). Sebaliknya, apabila tidak muncul gelembung, isolat tersebut dikategorikan sebagai katalase negatif (anaerob) (Susanti *et al.*, 2017).

### 5) Uji Tipe Fermentasi

Satu koloni isolat bakteri ditumbuhkan dalam media *De Man, Rogosa, dan Sharpe* (MRS) Broth yang ditempatkan dalam tabung reaksi. Sebuah tabung Durham dimasukkan ke dalam tabung reaksi dalam posisi terbalik untuk mendeteksi produksi

gas selama proses fermentasi. Kultur kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Setelah inkubasi, dilakukan observasi terhadap keberadaan gelembung gas dalam tabung Durham. Kehadiran gelembung menunjukkan aktivitas fermentasi heterofermentatif, sedangkan ketiadaan gelembung mengindikasikan fermentasi bersifat homofermentatif (Suryani *et al.*, 2010).

#### **6) Uji Ketahanan Terhadap Asam Lambung**

Uji ketahanan terhadap kondisi asam lambung dilakukan untuk menyeleksi isolat bakteri asam laktat (BAL) yang memiliki toleransi tinggi terhadap lingkungan asam, khususnya pada pH 3. Sebanyak 0,1 mL suspensi bakteri yang telah dikultur dalam media MRS Broth diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang masing-masing berisi 9 mL MRS Broth steril. Suspensi tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit. Setelah proses inkubasi, pH medium diturunkan hingga mencapai pH 3 dengan menambahkan larutan HCl secara aseptik. Perlakuan ini bertujuan untuk mensimulasikan kondisi asam lambung. Selanjutnya, suspensi bakteri dikultur pada media MRS Agar dan diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37°C. Viabilitas bakteri setelah perlakuan asam dievaluasi berdasarkan kemampuan pertumbuhan koloni pada media, yang menunjukkan tingkat ketahanan isolat terhadap kondisi asam (Sunaryanto dan Marwoto, 2013).

#### **7) Uji Ketahanan Terhadap Garam Empedu**

Media MRS Broth yang telah ditambahkan garam empedu (oxgall) dengan konsentrasi 0,3% dan 0,5% masing-masing diinokulasikan dengan 1 mL kultur bakteri uji, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 jam. Perlakuan ini bertujuan untuk menguji kemampuan isolat dalam bertahan terhadap kondisi yang menyerupai lingkungan saluran pencernaan. Setelah masa inkubasi, dilakukan tahap pengayaan (enrichment) dengan mengambil 100 µL kultur, lalu dimasukkan ke dalam tabung mikro (Eppendorf) yang berisi 900 µL MRS Broth steril. Suspensi tersebut kemudian ditanam pada media MRS Agar dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 24 jam. Jumlah koloni bakteri yang tumbuh dihitung menggunakan

metode hitungan cawan (plate count method). Viabilitas sel dinyatakan sebagai persentase perbandingan antara jumlah sel hidup setelah perlakuan dengan jumlah sel sebelum perlakuan. Semakin tinggi persentase viabilitas yang diperoleh, semakin besar kemampuan bakteri dalam bertahan terhadap paparan garam empedu (Sunaryanto dan Marwoto, 2013).

## 8) Uji Aktivitas Antimikroba

Uji aktivitas antimikroba bakteri asam laktat (BAL) dilakukan menggunakan metode difusi sumur agar (well diffusion method) terhadap bakteri uji, yaitu *Escherichia coli* O157 dan *Staphylococcus aureus*. Isolat BAL terlebih dahulu diremajakan (enrichment) sebanyak tiga kali dalam media MRS Broth dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam kondisi anaerob. Proses enrichment yang sama juga dilakukan pada bakteri patogen dengan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur BAL kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh dinetralkan hingga pH 6,5, kemudian disaring menggunakan membran filter berpori 0,22 µm untuk mendapatkan supernatan bebas sel. Sebanyak 0,2% kultur bakteri patogen diinokulasikan ke dalam 20 mL Nutrient Agar (NA) yang telah didinginkan hingga suhu 50°C, lalu dituangkan dan dibiarkan memadat. Setelah media mengeras, dibuat sumur berdiameter 4 mm menggunakan cork borer. Ke dalam setiap sumur dimasukkan 50 µL supernatan bebas sel, kemudian didiamkan selama 1 jam pada suhu ruang agar terjadi difusi. Cakram antibiotik Clindamycin (10 µg) digunakan sebagai kontrol positif. Selanjutnya, cawan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam kondisi aerob. Diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar sumur dan cakram antibiotik diukur menggunakan jangka sorong. Zona bening yang terbentuk menunjukkan adanya senyawa antimikroba dalam supernatan yang berpotensi menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Melia *et al.*, 2015).

### **c. Identifikasi Molekular Bakteri Asam Laktat dengan Gen 16S rRNA**

#### **1) Ekstraksi Genom Bakteri Gram Positif dengan KIT Promega (USA)**

Sebanyak 1000  $\mu\text{L}$  suspensi isolat BAL dari koloni murni dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf, kemudian disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 14.000 rpm. Setelah sentrifugasi, supernatan dibuang dan pelet sel dipertahankan. Ke dalam pelet tersebut ditambahkan 480  $\mu\text{L}$  EDTA 50 mM dan 120  $\mu\text{L}$  lysozyme, kemudian diinkubasi dalam water bath pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 60 menit. Selanjutnya, suspensi kembali disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 2 menit, supernatan dibuang, dan pelet diambil. Pelet kemudian ditambahkan 600  $\mu\text{L}$  nuclei lysis solution dan dihomogenkan menggunakan mikropipet. Campuran diinkubasi pada suhu  $80^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit, lalu didiamkan pada suhu ruang.

Tahap berikutnya, ditambahkan 3  $\mu\text{L}$  RNase solution, dihomogenkan, dan diinkubasi dalam water bath pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 60 menit. Setelah itu, sebanyak 200  $\mu\text{L}$  protein precipitation solution ditambahkan, kemudian divortex dan diinkubasi dalam es selama 5 menit, dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 3 menit pada 14.000 rpm. Supernatan dipindahkan ke tabung Eppendorf baru, sedangkan pelet dibuang. Ke dalam supernatan ditambahkan 600  $\mu\text{L}$  isopropanol, dihomogenkan, lalu disentrifugasi selama 2 menit pada 14.000 rpm. Supernatan dibuang dan pelet DNA yang terbentuk dicuci dengan 600  $\mu\text{L}$  etanol 70%, kemudian disentrifugasi kembali selama 2 menit pada 14.000 rpm. Setelah supernatan dibuang, tabung dikeringanginkan selama 15 menit. Terakhir, pelet DNA direhidrasi dengan menambahkan 10–100  $\mu\text{L}$  rehydration solution dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu  $65^{\circ}\text{C}$  (Promega Protocol, 2010).

#### **2) Amplifikasi Gen 16S rRNA dengan PCR**

DNA genom hasil isolasi dari koloni bakteri murni selanjutnya diamplifikasi menggunakan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR). Proses amplifikasi dilakukan dengan alat Thermocycler Mupid-Exu menggunakan primer forward 16S-27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') dan primer reverse 16S-1492R (5'-

GTT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') yang menargetkan gen 16S rRNA. Campuran reaksi PCR terdiri atas primer forward 16S-27F, primer reverse 16S-1492R, Master Mix, DNA template, dan dH<sub>2</sub>O hingga mencapai volume yang ditentukan. Seluruh komponen dicampurkan secara homogen, kemudian dimasukkan ke dalam tabung PCR dan ditempatkan pada mesin thermocycler. Program amplifikasi dijalankan sebanyak 40 siklus untuk memperoleh produk DNA yang teramplifikasi secara optimal (Promega Protocol, 2010). Komposisi campuran untuk amplifikasi dan kondisi PCR dapat di lihat pada Tabel 3 dan Tabel 4.

Tabel 3. Kocktail PCR

| Komposisi          | Volume (µl)  |
|--------------------|--------------|
| Master Mix         | 12,5 µl      |
| Primer F           | 1 µl         |
| Primer R           | 1 µl         |
| DNA (Template)     | 1 µl         |
| ddH <sub>2</sub> O | 9,5 µl       |
| <b>Total</b>       | <b>25 µl</b> |

Sumber: Promega Protocol (2010)

Tabel 4. Program PCR

| Rangkaian proses | Suhu  | Waktu            |
|------------------|-------|------------------|
| Pre denaturasi   | 95 °C | 2 menit          |
| Denaturasi       | 92 °C | 45 detik         |
| Annealing        | 56 °C | 45 detik         |
| Extention        | 72 °C | 1 menit 40 detik |
| Final extension  | 72 °C | 10 menit         |
| Pendinginan      | 4 °C  | ~                |

Sumber: Promega Protocol (2010)

### 3) Elektroforesis Hasil Ekstraksi Genom

Alat elektroforesis dipasang dari kutub negatif ke kutub positif kemudian agar diletakkan di dalam elektroforesis. Larutan TBE dimasukkan sampai agar terbenam. *Loadingdye* diambil sebanyak 2 µl dan 3 µl genom hasil ekstraksi keatas kertas parafilm kemudian dihomogenkan dan diinjeksikan ke dalam sumur agar. Diinjeksikan marker sebanyak 2 µl di samping injeksi larutan genom sebagai

penanda. Alat elektroforesis dinyalakan dengan tegangan 100 V selama 40 menit dan visualisasi hasil dapat dilakukan menggunakan sinar Ultraviolet (Modifikasi Mustopa, 2009).

#### **4) Analisis Data**

##### **a) Sekuensing**

Data hasil sekuensing dianalisis menggunakan perangkat lunak DNASTAR. Proses sequence alignment dilakukan dengan membandingkan sekuens target (query) dengan sekuens yang tersedia dalam basis data GenBank melalui pencarian menggunakan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) yang diakses melalui situs resmi NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Analisis ini bertujuan untuk mengidentifikasi kemiripan dan homologi sekuens guna menentukan spesies atau strain yang paling mendekati (Depson, 2012).

##### **b) BLAST dan Analisis Filogenetik**

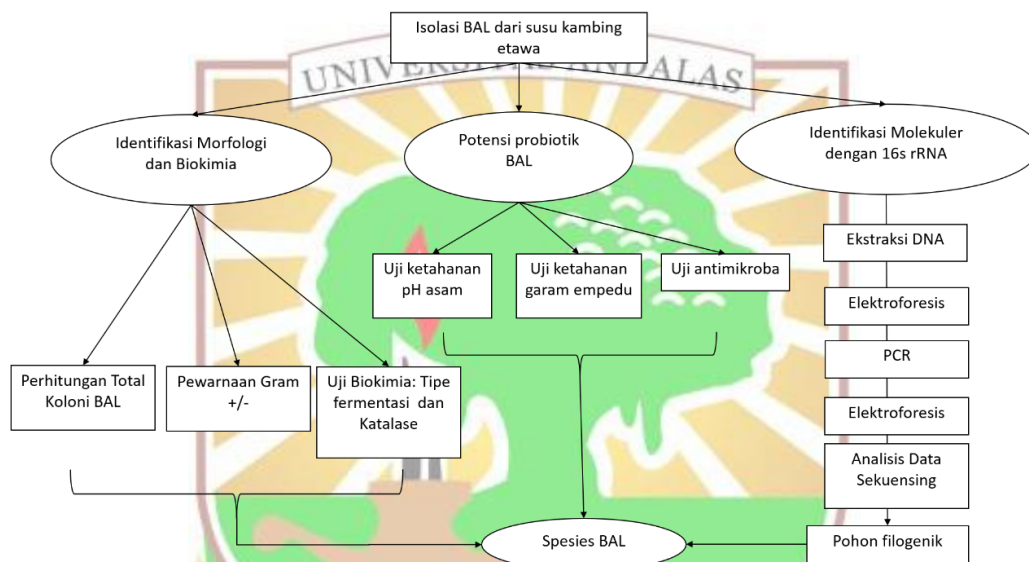
Data hasil sekuensing yang diperoleh selanjutnya dirakit (contig assembly) menggunakan perangkat lunak BioEdit, kemudian disimpan dalam format FASTA. Analisis identifikasi dilakukan menggunakan program BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) yang tersedia pada laman <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/cgi>. Jenis BLAST yang digunakan adalah nucleotide BLAST, dengan memasukkan sekuens DNA pada kolom entry sequence. Basis data yang dipilih adalah kategori other, dengan organisme target bacteria. Algoritma pencarian yang digunakan adalah megablast, yang menghasilkan daftar sekuens DNA bakteri yang memiliki kekerabatan terdekat dengan sekuens query.

Sekuens hasil pencocokan kemudian dikonversi kembali ke format FASTA dan dilakukan penjajaran sekuens (multiple sequence alignment) menggunakan perangkat lunak MEGA versi 7.0. Hasil alignment tersebut diedit ulang dengan menggunakan BioEdit untuk memastikan kualitas penjajaran.

Analisis filogenetik dilakukan dengan bantuan program MEGA versi IX.

Untuk mengevaluasi reliabilitas cabang pohon filogenetik, dilakukan uji bootstrap sebanyak 1000 kali. Analisis dilakukan menggunakan metode maximum parsimony dan distance tree (Neighbor Joining), sedangkan untuk metode maximum likelihood, digunakan 200 kali bootstrap. Pohon filogenetik hasil analisis divisualisasikan menggunakan perangkat lunak MEGA IX (Mustofa, 2009) .

#### 4. Skema Penelitian Tahap II



Gambar 4. Skema Penelitian Tahap II

#### D. Penelitian Tahap III

##### 1. Materi Penelitian

###### a. Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan pada tahap ketiga penelitian ini meliputi: autoklaf, hot plate, lampu Bunsen, cawan petri, tabung reaksi beserta raknya, tabung mikro (Eppendorf), labu Erlenmeyer, inkubator, vortex mixer, timbangan analitik, gelas ukur, serta Laminar Air Flow (Captair™ Bio by Erlab – Biocap, France). Selain itu, digunakan juga Quebec Colony Counter, ujung pipet mikro (tip), pipet mikro, anaerob jar, sentrifuge, spektrofotometer, ice cream maker, water bath, oven, cawan

porcelain, desikator, perangkat alat Soxhlet, perangkat alat destilasi, lemari asam, pipet gondok, pH meter, alat titrasi, serta laktodensimeter.

### **b. Bahan Penelitian**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: grain kefir, isolat bakteri asam laktat dari susu kambing etawa yang diperoleh dari peternakan kambing etawa di Gunung Pangilun, Korong Gadang dan Padayo dan susu segar. Selain itu, digunakan juga ekstrak bunga telang. Media kultur yang digunakan mencakup de Man, Rogosa, dan Sharpe (MRS) Broth (Merck), MRS Agar (Merck), dan Potato Count Agar (PCA). Bahan tambahan lainnya meliputi Peptone Water, aquades steril, alkohol, spirtus, asam sulfat ( $H_2SO_4$ ), selenium, larutan NaOH, indikator metil merah, n-heksana, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), metanol, dan indikator fenolftalein (pp).

## **2. Metode Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian tahap II, yaitu aplikasi BAL sebagai starter kefir dan penambahan ekstrak bunga telang dengan metode eksperimen yang dirancang dengan Rancangan Acak Kelompok (RAK) pola faktorial 3 x 3 dengan 3 ulangan, perlakuan tersebut adalah:

Faktor A adalah konsentrasi penambahan starter kefir, terdiri dari:

- A1: Penambahan konsentrasi starter kefir *Lactobacillus plantarum* strain CAU10666 2%
- A2: Penambahan konsentrasi starter kefir *Lactobacillus plantarum* strain CAU10666 4%
- A3: Penambahan konsentrasi starter kefir *Lactobacillus plantarum* strain CAU10666 6%

Faktor B adalah penambahan ekstrak bunga telang, terdiri dari:

- B1: Tanpa penambahan ekstrak bunga telang
- B2: Penambahan ekstrak bunga telang 10%
- B3: Penambahan ekstrak bunga telang 20%

Model matematika rancangan percobaan yang digunakan mengacu pada Steel dan Torrie (1996) sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta_{ij}) + K_k + \sum_{ijk}$$

dimana:

$Y_{ijk}$  : Nilai pengamatan pada satuan percobaan yang mendapat perlakuan faktor A taraf ke-I faktor B taraf ke-j dan ulangan ke-k.

$\mu$  : Nilai tengah umum

$\alpha_i$  : Pengaruh faktor A taraf ke-i

$\beta_j$  : Pengaruh faktor B taraf ke-j

$\alpha\beta_{ij}$  : Pengaruh interaksi faktor A taraf ke-I, faktor B taraf ke-j

$K_k$  : Pengaruh kelompok ke-k

I : Faktor A (1,2,3) konsentrasi penambahan starter kefir

J : Faktor B (1,2,3) penambahan ekstrak bunga telang

$\sum_{ijk}$  : Pengaruh galat pada satuan percobaan yang mendapat perlakuan A taraf ke-I, faktor B taraf ke-j dan ulangan ke-k

### 3. Pelaksanaan Penelitian Tahap III

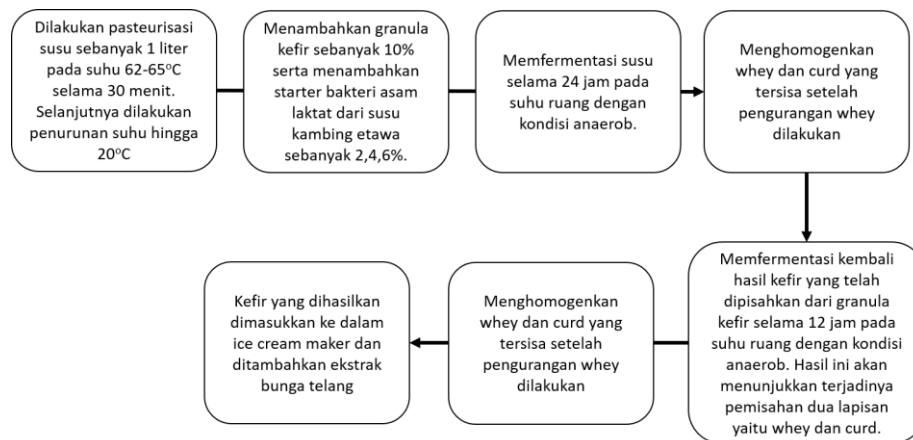
#### a. Pembuatan Starter Kefir

Sebanyak 200 mL susu kambing terlebih dahulu dipasteurisasi pada suhu 65°C selama 30 menit, kemudian didinginkan hingga mencapai suhu 43°C sebelum proses inokulasi dilakukan. Isolat bakteri asam laktat yang berasal dari susu kambing Etawa dan telah diremajakan selama 24 jam dalam media MRS Broth pada suhu 37°C diambil sebanyak 1 mL. Kultur tersebut kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 2 menit pada suhu 27°C untuk memisahkan sel bakteri dan memperoleh pelet. Pelet sel hasil sentrifugasi selanjutnya diinokulasikan ke dalam susu kambing yang telah dipasteurisasi. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 12 jam untuk memungkinkan terjadinya proses fermentasi (Purwati, 2018).

## b. Pembuatan Kefir

Sebanyak 1 liter susu kambing dipasteurisasi pada suhu 62–65°C selama 30 menit, kemudian didinginkan hingga mencapai suhu 20°C. Setelah proses pendinginan, ditambahkan granula kefir sebanyak 10% serta starter bakteri asam laktat (BAL) yang berasal dari susu kambing Etawa dengan variasi konsentrasi 2%, 4%, dan 6%. Pemilihan konsentrasi tersebut mengacu pada penelitian Ramadhanti (2021) yang melaporkan bahwa konsentrasi tersebut menghasilkan kualitas kefir terbaik. Fermentasi tahap pertama dilakukan selama 24 jam pada suhu ruang dalam kondisi anaerob. Setelah fermentasi selesai, granula kefir dipisahkan dari produk melalui proses penyaringan. Kefir yang telah terpisah dari granula kemudian difermentasi kembali selama 12 jam pada suhu ruang dalam kondisi anaerob sebagai fermentasi tahap kedua. Proses fermentasi bertingkat ini menghasilkan dua lapisan, yaitu lapisan cair (whey) dan lapisan padat (curd). Sebagian whey dipisahkan, kemudian sisa whey dan curd dihomogenkan hingga tercampur merata. Campuran tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam alat ice cream maker untuk memperoleh tekstur yang lebih halus (Ferawati *et al.*, 2019).

Pada tahap akhir, ditambahkan ekstrak bunga telang dengan konsentrasi 10% dan 20%. Pemilihan konsentrasi ini juga mengacu pada penelitian Ramadhanti (2021), yang menunjukkan bahwa konsentrasi tersebut memberikan hasil terbaik terhadap kualitas kefir dengan penambahan bahan alami. Tahapan pembuatan kefir dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Tahapan pembuatan kefir

### c. Pemeriksaan Proximat Kefir

#### 1) Uji Kadar Air

Penentuan kadar air dilakukan menggunakan metode gravimetri dengan bantuan oven. Cawan porselen terlebih dahulu dibersihkan, kemudian dikeringkan dalam oven listrik pada suhu 105–110°C selama 1 jam untuk menghilangkan sisa kelembapan. Setelah itu, cawan didinginkan di dalam desikator selama 1 jam agar mencapai suhu ruang dan terhindar dari penyerapan uap air dari lingkungan. Cawan yang telah dingin kemudian ditimbang menggunakan neraca analitik dan dicatat sebagai berat awal (X gram). Sebanyak 1 gram sampel dimasukkan ke dalam cawan porselen tersebut, lalu ditimbang kembali dan dicatat sebagai (Y gram). Selanjutnya, cawan yang berisi sampel dikeringkan dalam oven pada suhu 110°C selama 5 jam. Setelah proses pengeringan, cawan dipindahkan ke dalam desikator dan didiamkan selama 30 menit hingga dingin. Cawan beserta sampel kemudian ditimbang kembali menggunakan neraca analitik (Badan Standarisasi Nasional, 2006a). Proses pengeringan dan penimbangan diulang hingga diperoleh berat yang konstan, yang dicatat sebagai (Z gram):

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{x + y - z}{y} \times 100\%$$

Keterangan:

x = Berat cawan kosong

y = Berat sampel awal

z = Berat cawan dan sampel (setelah pengeringan)

## 2) Uji Kadar Lemak

Penentuan kadar lemak dilakukan menggunakan metode ekstraksi Soxhlet. Sebanyak 1 gram sampel dibungkus dengan kertas lemak, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105–110°C selama 12 jam hingga mencapai berat konstan dan dicatat sebagai (c gram). Setelah proses pengeringan, sampel ditimbang dalam keadaan panas secara satu per satu dan dicatat sebagai (b gram). Selanjutnya, sampel diekstraksi menggunakan pelarut benzena dalam alat Soxhlet selama 16 jam hingga pelarut yang tersirkulasi tampak jernih, yang menandakan bahwa proses ekstraksi lemak telah berlangsung optimal. Setelah ekstraksi selesai, sampel diangin-anginkan hingga kering untuk menguapkan sisa benzena. Tahap berikutnya, sampel kembali dikeringkan dalam oven listrik pada suhu 105–110°C selama 4 jam. Setelah itu, bungkusan sampel ditimbang kembali dan dicatat sebagai (a gram) untuk perhitungan kadar lemak (Badan Standardisasi Nasional, 2006b). Kadar Lemak dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Kadar Lemak} = \frac{b - a}{c} \times 100\%$$

Keterangan:

a = berat sampel setelah diekstraksi (gram)

b = berat sampel sebelum diekstraksi (gram)

c = berat sampel (gram)

## 3) Uji Kadar Protein

Pengukuran kadar protein dilakukan sesuai metode Kjeldhal. Metode Kjeldhal didasarkan pada pengukuran kadar nitrogen total yang ada di dalam sampel. Penetapan kadar protein dengan metode Kjeldhal dibagi menjadi tiga tahapan, yaitu tahap penghancuran/destruksi, destilasi dan titrasi.

a) Destruksi

Sampel kering yang ingin diketahui kadar proteinnya, ditimbang sebanyak 1 gram ke dalam labu Kjeldhal. Lalu ditambahkan 1 gram selenium dan 25 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat lalu dipanaskan dalam lemari asam dengan api kecil sehingga terjadi destruksi. Pemanasan terus dilakukan hingga larutan berwarna kuning jernih kemudian didinginkan.

b) Destilasi

Sejumlah kecil aquades secara perlahan ditambahkan ke dalam labu ukur 250 ml melewati dinding. Ke dalam labu ukur dimasukkan isi labu Kjeldhal lalu dibilas sebanyak 3-4 kali dengan sedikit aquades dan ditambahkan aquades hingga tanda batas labu ukur. Kemudian dipipet sebanyak 25 ml larutan dalam labu ukur tersebut dan dimasukkan ke dalam labu destilasi. Ditambahkan ke dalam labu destilasi 25 ml NaOH 30% yang telah dicampur dengan aquades sebanyak 150 ml. Larutan dipanaskan (2/3 tersuling) hingga semua N dari cairan yang ada dalam labu tertangkap oleh H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05 N sebanyak 25 ml yang terlebih dahulu dicampur dengan 3 tetes larutan indikator metil merah dalam erlenmeyer.

c) Titrasi

Pada tahap ini labu erlenmeyer yang berisi hasil sulingan dititrasi dengan NaOH standar 0.1 N (sampel) hingga berubah warna. Selanjutnya dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 25 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05 N lalu ditambah indikator metil merah 5 tetes kemudian dititer dengan NaOH sehingga terjadi perubahan warna dari merah muda menjadi kuning (blanko) (Badan Standarisasi Nasional, 2006c). Selisih jumlah blanko dan sampel merupakan jumlah ekuivalen nitrogen. Kadar protein dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Kadar Protein} = \frac{(Y-Z) \times N \text{ NaOH} \times C \times 0.014 \times 6.38}{X} \times 100\%$$

Keterangan:

- X = berat sampel (gram)  
 Y = volume pentiter blanko (ml)  
 Z = volume pentiter sampel (ml)

C = pengenceran

0.014 = konstanta

6.38 = faktor konversi dari total nitrogen ke dalam protein

#### 4) Nilai pH

Penentuan nilai pH dilakukan menggunakan pH meter dengan prosedur sebagai berikut. Sebanyak 10 mL sampel diambil, kemudian dihomogenkan bersama 20 mL akuades menggunakan mortar selama kurang lebih 1 menit hingga tercampur merata. Setelah homogen, campuran tersebut dituangkan ke dalam gelas beker berkapasitas 10 mL untuk dilakukan pengukuran. Sebelum digunakan, pH meter terlebih dahulu dikalibrasi menggunakan larutan buffer pH 7 untuk memastikan ketepatan pengukuran dan sensitivitas alat. Setelah proses kalibrasi selesai, elektroda pH meter dicelupkan ke dalam sampel. Nilai pH ditentukan berdasarkan angka yang terbaca setelah jarum atau tampilan skala menunjukkan posisi yang stabil (konstan) (Richana, 2011).

#### d. Total Koloni Bakteri Asam Laktat Kefir

Sebanyak 1 mL sampel susu kambing Etawa dimasukkan ke dalam 9 mL media MRS Broth, kemudian dihomogenkan menggunakan vortex hingga tercampur merata. Dari suspensi tersebut, diambil 0,1 mL dan dipindahkan ke dalam tabung mikro (Eppendorf) yang berisi 0,9 mL MRS Broth untuk memperoleh pengenceran  $10^{-1}$ . Proses pengenceran dilakukan secara bertingkat (serial dilution) dengan metode yang sama hingga mencapai tingkat pengenceran  $10^{-10}$ . Dari pengenceran terakhir, sebanyak 0,1 mL suspensi diinokulasikan ke permukaan media MRS Agar menggunakan metode spread plate. Suspensi kemudian diratakan secara aseptik menggunakan hockey stick steril agar tersebar merata di seluruh permukaan media. Cawan petri selanjutnya dimasukkan ke dalam anaerobic jar untuk menciptakan kondisi anaerob, lalu diinkubasi pada suhu  $37-40^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam untuk mendukung pertumbuhan bakteri asam laktat (Purwati *et al.*, 2005). Hitung Total koloni yang tumbuh dengan menggunakan rumus CFU/mL:

$$\frac{\text{CFU}}{\text{Gram}} = \text{Jumlah Koloni} \times \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}} \times \frac{1}{\text{Berat Sampel}} \times 10$$

#### e. Uji Total Asam Tetitiasi

Penentuan Total Asam Tertitiasi (TAT) dilakukan mengacu pada metode AOAC (2005). Sebanyak 10 mL sampel dipipet dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan beberapa tetes indikator fenolftalein (PP). Larutan dikocok hingga homogen sebelum dilakukan proses titrasi. Selanjutnya, sampel dititrasi menggunakan larutan NaOH 0,1 N hingga terjadi perubahan warna menjadi merah muda pucat yang stabil sebagai titik ekuivalen. Volume NaOH 0,1 N yang digunakan selama titrasi dicatat untuk perhitungan. Nilai Total Asam Tertitiasi kemudian dihitung menggunakan rumus yang sesuai berdasarkan volume titran yang terpakai.:

$$\text{Derajat Keasaman (\%)} = \frac{\text{Hasil Volume Titrasi} \times 0,009}{W}$$

Keterangan:

0,009 : BM asam laktat/1000 (dihitung sebagai asam laktat)

W : Berat Sampel (ml)

#### f. Pemeriksaan Antioksidan (Metode DPPH)

Metode DPPH digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan karena prosedurnya sederhana, cepat, sensitif, serta hanya membutuhkan jumlah sampel yang relatif sedikit. Sebanyak 4 mL larutan uji diambil, kemudian ditambahkan 1 mL larutan pereaksi 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 0,2 mM, lalu campuran dikocok hingga homogen. Larutan tersebut selanjutnya didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit agar reaksi antara senyawa antioksidan dan radikal DPPH berlangsung sempurna. Setelah masa inkubasi, absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer. Sebagai blanko digunakan metanol. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan spektrofotometer Shimadzu seri UV-1800 untuk menentukan besarnya aktivitas penangkapan radikal bebas oleh

sampel (Huang *et al.*, 2005). Aktivitas antioksidan dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}}\right) \times 100\%$$

Dalam metode DPPH, aktivitas antioksidan dinyatakan dalam nilai IC50 (Inhibition Concentration), yaitu konsentrasi ekstrak yang diperlukan untuk menghambat aktivitas oksidasi. IC50 menunjukkan konsentrasi sampel (ppm) yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC50, maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Secara spesifik, suatu senyawa dikategorikan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC50 kurang dari 50 ppm, kuat jika berada pada rentang 50–100 ppm, sedang jika berada pada rentang 100–150 ppm, dan lemah jika berada pada rentang 151–200 ppm (Cahyani 2017).

#### **g. Uji Organoleptik Kefir**

Uji organoleptik dalam penelitian ini menggunakan metode hedonik yang bertujuan untuk mengetahui tingkat penerimaan atau kesukaan panelis terhadap produk yang dihasilkan. Penilaian dilakukan oleh 50 panelis yang berasal dari Rumah Sakit Semen Padang Hospital, dengan mengevaluasi beberapa atribut sensori seperti rasa, aroma, tekstur, dan warna. Masing-masing atribut dinilai menggunakan skala hedonik lima tingkat, yaitu: (1) sangat tidak suka, (2) tidak suka, (3) agak suka, (4) suka, dan (5) sangat suka. Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara statistik dengan metode nonparametrik menggunakan uji Friedman untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan tingkat kesukaan antar perlakuan yang diuji:

$$X^2_r = \frac{12}{r \cdot t(t+1)} \times \sum R^2 - 3 \cdot r \cdot t(t+1)$$

Keterangan:

$X^2_r$  : Kriteria uji Friedman

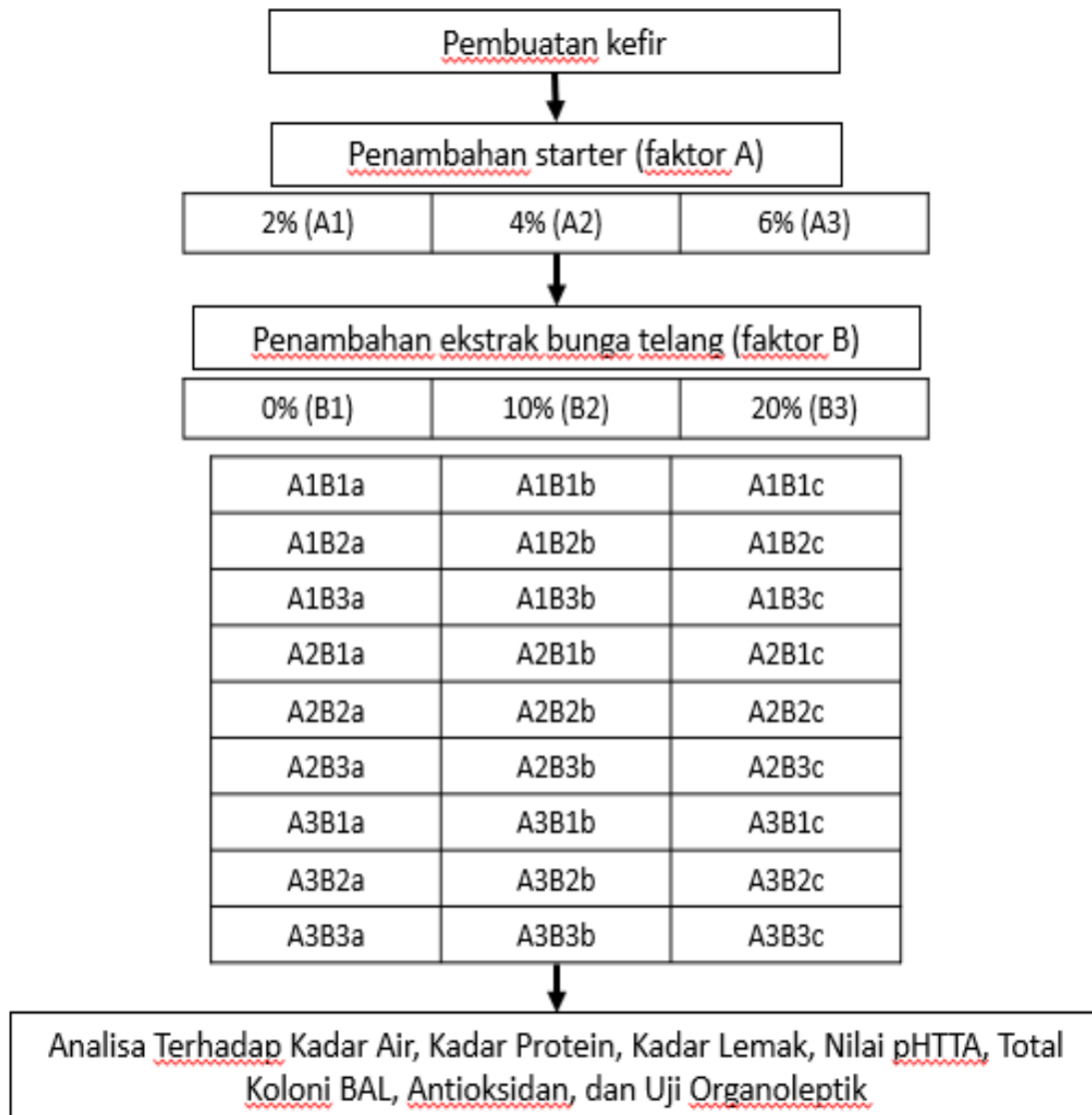
r : jumlah ulangan

t : jumlah perlakuan

$R^2$  : total ranking dari setiap kelompok perlakuan

Apabila hasilnya berbeda nyata  $X^2_{hitung} > X^2_{tabel}$  maka dilanjutkan dengan uji lanjut Uji Wilcoxon (Rahayu, 2001) .

#### 4. Skema Penelitian Tahap III



Gambar 6. Skema Penelitian Tahap III

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Tahap I

#### 1. Nilai Proksimat dan pH Susu Kambing Etawa

Berdasarkan hasil nilai proksimat dan pH susu kambing etawa didapatkan hasil dalam tabel berikut.

Tabel 5. Rerata hasil analisis proksimat dan pH susu kambing etawa

| No | Sampel                  | Kadar Air (%) | Kadar Protein (%) | Kadar Lemak (%) | Nilai pH  |
|----|-------------------------|---------------|-------------------|-----------------|-----------|
| 1  | KG                      | 88,93±0,98    | 4,17±0,01         | 5,00±0,35       | 7,00±0,07 |
| 2  | PD                      | 86,11±0,09    | 3,64±0,09         | 4,30±0,35       | 6,70±0,07 |
| 3  | EL                      | 88,71±0,14    | 3,97±0,02         | 4,00±0,14       | 6,96±0,02 |
| 4  | SNI 01-3141-2011 (2011) | >88,30        | >2,80             | >3,00           | 6,30-6,80 |

Berdasarkan Tabel 5, kadar air susu kambing Etawa pada penelitian ini berkisar antara 86,11–88,93%. Nilai tersebut telah memenuhi standar kadar air susu kambing menurut Departemen Kesehatan Republik Indonesia (2008), yaitu sebesar 88,30%. Kadar air susu sangat dipengaruhi oleh kandungan laktosa yang dihasilkan, yakni sekitar 4,01–4,16% (Arief *et al.*, 2018). Hal ini berkaitan dengan sifat isotonis susu yang harus dipertahankan agar seimbang dengan tekanan osmotik darah ternak. Produksi laktosa yang cukup diperlukan untuk menjaga keseimbangan tersebut. Kekurangan laktosa dapat menurunkan sekresi air ke dalam susu sehingga volume susu menjadi lebih rendah. Air dalam susu disekresikan melalui sel-sel epitel ambing melalui proses filtrasi yang dipengaruhi oleh tekanan osmotik susu (Suhendra *et al.*, 2015).

Kadar protein susu kambing Etawa dalam penelitian ini berkisar antara 3,64–4,17%, dengan nilai tertinggi pada susu kambing KG sebesar 4,17%. Hasil tersebut telah memenuhi standar kadar protein susu kambing menurut SNI 01-3141-2011

(2011), yaitu minimal 2,80%. Protein merupakan komponen utama bahan kering tanpa lemak (solid non fat) dalam susu. Kadar protein susu dipengaruhi oleh jenis dan kualitas pakan yang diberikan kepada ternak (Zurriyati *et al.*, 2011). Pemberian pakan konsentrat meningkatkan ketersediaan protein mikroba rumen yang mendukung sintesis protein susu. Semakin tinggi kandungan protein dalam pakan, terutama dari konsentrat, semakin besar pula jumlah protein yang dapat disekresikan ke dalam susu (Zaidemarmo *et al.*, 2016). Protein susu terbentuk melalui metabolisme pakan di dalam rumen menjadi asam amino, yang kemudian diserap di usus halus, dialirkan melalui darah, dan dimanfaatkan oleh sel sekretori ambing untuk pembentukan protein susu (Utari *et al.*, 2012). Kandungan protein yang tinggi mencerminkan kualitas nutrisi yang baik dan berpengaruh terhadap nilai ekonomi susu.

Kadar lemak susu kambing Etawa pada penelitian ini berkisar antara 4,00–5,00%, dengan nilai tertinggi pada susu kambing KG sebesar 5,00%. Nilai ini telah memenuhi standar kadar lemak susu kambing menurut SNI 01-3141-2011 (2011), yaitu minimal 3,00%. Lemak merupakan komponen nutrisi yang mudah mengalami perubahan dan sangat dipengaruhi oleh asupan serat dalam pakan (Ensminger, 2001). Secara kimiawi, lemak dan minyak tergolong dalam kelompok lipida yang sebagian besar berupa trigliserida (Amalia, 2012).

Kadar lemak susu dipengaruhi oleh jenis pakan, terutama hijauan dan konsentrat. Hijauan sebagai sumber serat berperan penting dalam pembentukan lemak susu karena meningkatkan produksi asetat di dalam rumen. Asetat merupakan salah satu volatile fatty acids (VFA) hasil fermentasi rumen yang berfungsi sebagai prekursor sintesis asam lemak susu (Zain, 2013). Selain asetat, fermentasi hijauan juga menghasilkan propionat dan butirrat. Asetat yang diserap ke dalam darah kemudian dimanfaatkan oleh sel sekretori ambing untuk sintesis lemak susu. Susu kambing Peranakan Etawa (PE) dilaporkan memiliki kadar lemak lebih tinggi dibandingkan dengan susu kambing bangsa lain seperti Saanen dan Alpine (Amigo & Fontecha, 2011). Lemak, bersama protein, merupakan komponen utama yang menentukan nilai ekonomi dan harga jual susu (Zurriyati *et al.*, 2011).

Nilai pH susu kambing Etawa dalam penelitian ini berkisar antara 6,70–7,00, dengan nilai tertinggi sebesar 7,00 pada susu kambing KG. Nilai tersebut masih berada dalam kisaran standar pH susu segar menurut SNI 3141.1:2011 (2011), yaitu 6,3–6,8. Nilai pH merupakan indikator penting dalam menentukan kualitas dan tingkat kerusakan susu. Variasi pH dipengaruhi oleh komponen alami susu segar seperti CO<sub>2</sub>, fosfat, sitrat, dan protein yang berfungsi sebagai sistem penyangga (buffer), sehingga mampu menahan perubahan keasaman (Zain, 2013). Apabila terjadi aktivitas mikroorganisme, pH susu akan menurun menjadi lebih asam, yaitu di bawah kisaran normal 6,5–6,7 (Swadayana *et al.*, 2012). Sebaliknya, nilai pH di atas 6,7 dapat mengindikasikan kemungkinan terjadinya mastitis pada ternak (Legowo *et al.*, 2009).

## B. Tahap II

### 1. Total Koloni Bakteri Asam Laktat Susu Kambing Etawa

Berdasarkan hasil penelitian, total koloni bakteri asam laktat (BAL) pada susu kambing Etawa yang berasal dari tiga lokasi di Kota Padang menunjukkan nilai yang berbeda-beda. Total BAL tertinggi ditemukan pada sampel KG sebesar  $48,33 \times 10^8$  CFU/ml, diikuti oleh sampel EL sebesar  $45,66 \times 10^8$  CFU/ml, sedangkan nilai terendah terdapat pada sampel PD sebesar  $30,66 \times 10^8$  CFU/ml (Tabel 6). Perbedaan jumlah BAL antar lokasi diduga dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, manajemen pemeliharaan, sanitasi pemerahan, serta kualitas pakan yang diberikan pada ternak kambing.

Tabel 6. Rerata total koloni BAL

| No | Sampel | Total Koloni BAL ( $\times 10^8$ CFU/g) |
|----|--------|---|
| 1  | KG     | 48,33±2,51                              |
| 2  | PD     | 30,66±5,03                              |
| 3  | EL     | 45,66±4,04                              |

Penghitungan total koloni bakteri asam laktat dilakukan untuk mengetahui jumlah BAL yang secara alami terdapat pada susu kambing Etawa dari ketiga lokasi

tersebut. Keberadaan BAL dalam susu kambing segar menunjukkan bahwa susu kambing dapat menjadi sumber bakteri asam laktat alami. BAL yang terdapat pada susu kambing berpotensi memberikan manfaat bagi kesehatan, khususnya dalam menjaga keseimbangan mikroflora saluran pencernaan, apabila dikonsumsi dalam jumlah yang mencukupi dan dalam kondisi hidup.

Isolat bakteri asam laktat pada penelitian ini ditumbuhkan pada media MRS (de Man, Rogosa, and Sharpe) Agar, yang merupakan media selektif untuk pertumbuhan BAL, sehingga koloni yang terbentuk dapat dihitung sebagai total BAL. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah BAL pada seluruh sampel berada pada kisaran  $10^8$  CFU/ml, yang berarti telah melampaui batas minimal jumlah BAL hidup yang direkomendasikan oleh FAO/WHO (2002), yaitu sebesar  $\geq 10^6$  CFU/ml, untuk pangan yang berpotensi sebagai sumber bakteri probiotik.

Secara fisiologis, bakteri asam laktat berperan dalam metabolisme karbohidrat dengan mengonversinya menjadi energi dan asam laktat melalui jalur fermentasi homofermentatif maupun heterofermentatif. Pada jalur homofermentatif, produk utama yang dihasilkan adalah asam laktat, sedangkan pada jalur heterofermentatif dihasilkan asam laktat, etanol, dan karbondioksida. Selain itu, aktivitas metabolik BAL juga berpotensi menghasilkan senyawa asam organik lain yang berkontribusi terhadap sifat fungsional pangan (Hatti-Kaul *et al.*, 2018).

Total BAL yang diperoleh pada penelitian ini tergolong lebih tinggi dibandingkan dengan hasil penelitian Melia *et al.* (2018), yang melaporkan total BAL pada susu kambing sebesar  $57,25 \times 10^7$  CFU/ml. Perbedaan ini diduga disebabkan oleh variasi kondisi lingkungan, metode pemerahan, kebersihan alat, serta perbedaan metode analisis mikrobiologi yang digunakan dalam masing-masing penelitian.

## 2. Isolasi dan Identifikasi Morfologi Bakteri Asam Laktat Susu Kambing Etawa

### a. Isolasi Bakteri Asam Laktat

Susu kambing etawa yang telah diambil dari tiga lokasi berbeda dilihat single koloni yang tumbuh. Setelah BAL diisolasi, ditemukan isolat BAL kandidat potensial dengan ciri-ciri berbentuk bulat, licin dan berwarna krem. Setelah itu, dilanjutkan dengan pengamatan makroskopis. Pengamatan makroskopis adalah pengamatan langsung secara visual terhadap bentuk koloni bakteri, warna, ukuran dan permukaan bakteri. Hasil pengamatan BAL secara makroskopis dapat dilihat pada tabel 7 dibawah ini.

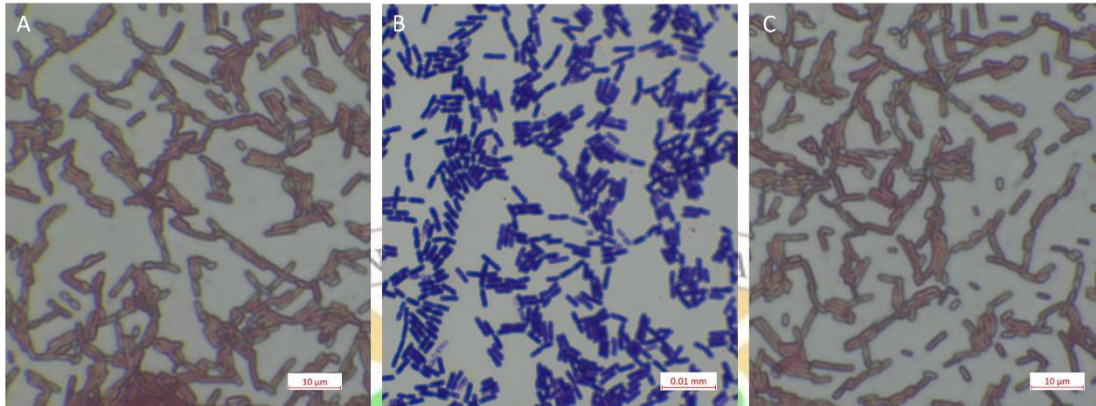
Tabel 7. Hasil Pengamatan isolat BAL Susu Kambing Etawa

| No | Isolat | Warna      | Bentuk Koloni | Ukuran | Pinggir     | Permukaan      |
|----|--------|------------|---------------|--------|-------------|----------------|
| 1  | KG     | Putih-krem | Bulat         | 3,5 mm | Rata, Halus | Licin, cembung |
| 2  | PD     | Putih-krem | Bulat         | 2,5 mm | Rata, Halus | Licin, cembung |
| 3  | EL     | Putih-krem | Bulat         | 2 mm   | Rata, Halus | Licin, cembung |

Berdasarkan hasil pengamatan makroskopis, koloni bakteri asam laktat (BAL) yang tumbuh menunjukkan karakteristik berbentuk bulat, berwarna putih hingga putih kekuningan, dengan tepian koloni rata serta permukaan licin dan cembung. Karakteristik tersebut sesuai dengan pernyataan Putri dan Kusdiyantini (2018) yang menyebutkan bahwa koloni BAL umumnya berbentuk bulat, berwarna putih hingga krem, dan memiliki permukaan halus. Selain itu, Purwati *et al.* (2005) melaporkan bahwa isolasi bakteri asam laktat pada media MRS Agar menghasilkan koloni berwarna putih kekuningan. Hasil penelitian ini juga sejalan dengan temuan Sulmiyati *et al.* (2022), yang melaporkan bahwa isolat BAL dari susu kambing memiliki ciri koloni berbentuk bulat, berwarna putih, dengan tepian rata dan permukaan cembung. Secara keseluruhan, kesesuaian karakteristik makroskopis koloni yang diperoleh dengan berbagai laporan sebelumnya menunjukkan bahwa isolat yang tumbuh memiliki ciri khas bakteri asam laktat.

## b. Pewarnaan Gram

Hasil pewarnaan gram BAL yang diisolasi dari susu kambing asal Kota Padang didapatkan bentuk morfologi bakteri yaitu berbentuk batang (bacil) seperti yang terlihat pada gambar 7.



Gambar 7. Pewarnaan gram isolat BAL asal Susu Kambing dengan pembesaran 10 µm kali, A= KG , B = PD, C= EL

Berdasarkan hasil pewarnaan Gram, isolat PD menunjukkan sifat Gram positif, sedangkan isolat KG dan EL tergolong Gram negatif. Hasil ini mengindikasikan bahwa isolat PD termasuk dalam kelompok bakteri asam laktat (BAL), karena memiliki karakteristik Gram positif dengan bentuk sel batang (basil). Hal tersebut sesuai dengan pendapat Nasution *et al.* (2017) yang menyatakan bahwa BAL merupakan bakteri Gram positif yang mampu mempertahankan warna ungu kristal violet pada tahap akhir pewarnaan Gram karena tidak mengalami proses dekolorisasi.

Bakteri Gram positif ditunjukkan oleh sel berwarna ungu pada hasil pewarnaan Gram. Warna tersebut disebabkan oleh struktur dinding sel yang tersusun atas lapisan peptidoglikan tebal, sehingga mampu mempertahankan zat warna utama kristal violet meskipun telah dibilas dengan alkohol. Dinding sel bakteri Gram positif juga berperan penting dalam melindungi sel dari gangguan fisik maupun biologis, walaupun secara struktur relatif lebih sederhana dibandingkan dengan bakteri Gram negatif (Huda, 2020).

Keberadaan isolat Gram negatif pada penelitian ini diduga disebabkan oleh kemungkinan kontaminasi susu kambing oleh bakteri non-BAL, termasuk bakteri patogen. Hal ini sejalan dengan Zega dan Hasruddin (2018) yang menyatakan bahwa sebagian besar bakteri Gram negatif bersifat patogen. Secara struktural, bakteri Gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tipis, sekitar 10% dari keseluruhan dinding sel, sehingga tidak mampu mempertahankan kompleks kristal violet saat proses pembilasan dengan alkohol. Akibatnya, sel akan menyerap zat warna safranin dan tampak berwarna merah muda hingga kemerahan pada pengamatan mikroskopis (Thairu *et al.*, 2016).

Dengan demikian, perbedaan hasil pewarnaan Gram pada isolat PD, KG, dan EL menunjukkan adanya variasi karakter dinding sel bakteri yang mengindikasikan perbedaan kelompok bakteri, serta kemungkinan adanya kontaminasi oleh bakteri non-bakteri asam laktat dalam sampel susu kambing yang diteliti.

### 3. Uji Biokimia Bakteri Asam Laktat Susu Kambing Etawa

Hasil uji biokimia BAL isolat susu kambing etawa didapatkan hasil dalam tabel berikut.

Tabel 8. Hasil uji biokimia BAL asal susu kambing etawa

| No | Isolat | Katalase | Tipe Fermentasi   |
|----|--------|----------|-------------------|
| 1  | PD     | -        | Heterofermentatif |
| 2  | EF     | -        | Heterofermentatif |
| 3  | KG     | -        | Heterofermentatif |

Berdasarkan hasil pengamatan, isolat PD menunjukkan hasil katalase negatif. Hasil ini sesuai dengan karakteristik bakteri asam laktat (BAL) yang umumnya bersifat mikroaerofilik hingga anaerob fakultatif dan tidak memiliki enzim katalase. Menurut Irma *et al.* (2022), terbentuknya gelembung udara pada uji katalase menandakan adanya aktivitas enzim katalase yang mampu menguraikan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Sebaliknya, tidak terbentuknya gelembung menunjukkan bahwa bakteri tidak memiliki enzim katalase.

Suhaeni dan Akhmad (2016) menyatakan bahwa BAL tergolong bakteri katalase negatif karena tidak menghasilkan enzim katalase yang berfungsi memecah

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Anastiwani (2014) menjelaskan bahwa selama proses respirasi, bakteri dapat menghasilkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sebagai produk samping metabolisme. Pada bakteri katalase positif, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> akan diuraikan oleh enzim katalase menjadi air (H<sub>2</sub>O) dan oksigen (O<sub>2</sub>), yang ditandai dengan terbentuknya gelembung gas. Sebaliknya, pada bakteri katalase negatif, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tidak diuraikan sehingga tidak terbentuk gelembung oksigen, sebagaimana yang diamati pada isolat PD dalam penelitian ini.

Berdasarkan hasil pengujian fermentasi, isolat PD tergolong bakteri asam laktat dengan tipe fermentasi heterofermentatif. Pada tipe ini, selain menghasilkan asam laktat sebagai produk utama, bakteri juga menghasilkan senyawa lain seperti asam asetat, etanol, dan karbon dioksida (CO<sub>2</sub>). Widodo (2019) menyatakan bahwa BAL dibedakan menjadi dua kelompok berdasarkan jalur fermentasinya, yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. BAL homofermentatif menghasilkan asam laktat sebagai satu-satunya produk akhir fermentasi karbohidrat, sedangkan BAL heterofermentatif menghasilkan asam laktat disertai produk samping lain seperti asam asetat, etanol, dan CO<sub>2</sub>.

Secara biokimia, metabolisme heterofermentatif diawali dengan oksidasi glukosa melalui jalur pentosa fosfat, dimulai dari pembentukan 6-fosfoglukonat yang kemudian mengalami dekarboksilasi menjadi pentosa-5-fosfat. Senyawa ini dipecah oleh enzim fosfoketolase menjadi gliseraldehid-3-fosfat (GAP) dan asetil fosfat. Gliseraldehid-3-fosfat selanjutnya dimetabolisme melalui jalur glikolisis untuk menghasilkan asam laktat. Sementara itu, asetil fosfat dapat direduksi menjadi etanol melalui pembentukan asetil-KoA dan asetaldehid apabila tidak tersedia akseptor elektron tambahan. Proses ini juga menghasilkan produk samping berupa karbon dioksida (CO<sub>2</sub>) dan etanol (Setyaningsih, 2010). Dengan demikian, hasil uji katalase negatif dan pola fermentasi heterofermentatif pada isolat PD semakin menguatkan bahwa isolat tersebut termasuk dalam kelompok bakteri asam laktat.

#### **4. Uji Potensi Probiotik Bakteri Asam Laktat Susu Kambing Etawa**

Hasil uji ketahanan pH asam dan garam empedu BAL isolat susu kambing etawa didapatkan hasil dalam tabel berikut.

Tabel 9. Rerata viabilitas ketahanan pH asam dan garam empedu BAL

| No | Sampel | Viabilitas (%) |              |
|----|--------|----------------|--------------|
|    |        | pH Asam        | Garam Empedu |
| 1  | PD     | 32,50±17,67    | 80,60±26,21  |
| 2  | EF     | 18,95±11,45    | 74,28±14,14  |
| 3  | KG     | 6,62±1,03      | 77,03±28,13  |

Hasil pengujian viabilitas menunjukkan bahwa isolat PD memiliki ketahanan terhadap kondisi pH asam sebesar 32,50% (Tabel 9). Ketahanan terhadap pH asam merupakan salah satu kriteria penting bagi bakteri asam laktat (BAL) yang berpotensi sebagai probiotik, karena bakteri tersebut harus mampu bertahan pada kondisi pH lambung yang sangat asam, yaitu sekitar pH 2–3 akibat sekresi asam lambung. Hal ini sejalan dengan Wijayanto (2009) yang menyatakan bahwa kandidat probiotik ideal harus mampu bertahan pada pH lambung sekitar 2,5.

Tingkat viabilitas isolat PD pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian Sari *et al.* (2018), yang melaporkan bahwa isolat *Lactobacillus* K.12.1 memiliki viabilitas sebesar 96,74% pada kondisi pH asam. Perbedaan tersebut diduga dipengaruhi oleh variasi spesies bakteri, karakter fisiologis masing-masing isolat, serta perbedaan metode dan kondisi pengujian.

Menurut Sivram dan Vishwanath (2012), beberapa BAL mampu menginduksi mekanisme acid tolerance response sebagai bentuk adaptasi terhadap paparan asam ringan, sehingga meningkatkan ketahanannya terhadap lingkungan dengan pH rendah. Viabilitas bakteri juga dipengaruhi oleh pH optimum enzim yang dimilikinya; semakin rendah pH optimum enzim tersebut, semakin baik kemampuan bakteri untuk bertahan pada kondisi asam. Sebaliknya, paparan asam ekstrem dapat menyebabkan kerusakan membran sel dan kebocoran komponen intraseluler seperti magnesium (Mg), kalium (K), dan lipid, yang pada akhirnya berujung pada kematian sel (Susanti *et al.*, 2007).

Bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai probiotik harus mampu bertahan terhadap berbagai kondisi ekstrem sepanjang saluran pencernaan, mulai dari rongga mulut hingga usus, serta mampu berkolonisasi pada permukaan usus (Harnentis *et al.*,

2020). Keasaman lambung berfungsi sebagai mekanisme seleksi awal mikroba sebelum memasuki usus, namun pH yang terlalu rendah tetap dapat menghambat atau membunuh bakteri probiotik. Ketahanan terhadap kondisi asam juga berkaitan dengan struktur dinding sel bakteri Gram positif yang didominasi lapisan peptidoglikan tebal (sekitar 90%) serta asam teikoat, yang berperan menjaga stabilitas struktur sel. Peptidoglikan tersusun atas N-asetilmuramat dan N-asetilglukosamin serta asam amino seperti D-alanin, asam D-glutamat, L-alanin, dan asam diaminopimelat (ADP), yang berkontribusi terhadap ketahanan sel terhadap tekanan lingkungan, termasuk kondisi asam (Sakpetch *et al.*, 2022).

Selain uji ketahanan terhadap asam, hasil pengujian menunjukkan bahwa isolat PD memiliki viabilitas terhadap garam empedu sebesar 80,60%. Nilai ini menunjukkan kemampuan yang cukup baik dalam bertahan terhadap paparan garam empedu. Mulyani *et al.* (2023) menyatakan bahwa isolat BAL berpotensi sebagai probiotik apabila menunjukkan penurunan viabilitas yang relatif kecil setelah perlakuan garam empedu. Meskipun demikian, nilai tersebut masih lebih rendah dibandingkan dengan laporan Sari *et al.* (2018) yang menyebutkan bahwa isolat *Lactobacillus* K.11.3 memiliki viabilitas terhadap garam empedu sebesar 98,31%.

Kemampuan isolat PD untuk bertahan terhadap garam empedu menunjukkan potensi sebagai kandidat probiotik, karena mampu bertahan pada kondisi garam empedu di usus halus dan selanjutnya berkolonisasi di usus besar (Prima *et al.*, 2024). Menurut Mulaw *et al.* (2019), BAL dapat bertahan pada lingkungan yang mengandung garam empedu karena memiliki enzim bile salt hydrolase (BSH). Garam empedu, yang komponen utamanya berupa asam empedu, dapat merusak membran sel bakteri. Untuk mengatasi kondisi tersebut, bakteri menghasilkan enzim BSH yang berfungsi mendekongjugasi asam empedu menjadi asam empedu bebas.

Asam empedu bebas kemudian berperan dalam berbagai proses metabolisme, termasuk pengaturan penyerapan lemak dan metabolisme kolesterol, serta membantu menjaga homeostasis membran sel bakteri. Mekanisme adaptasi ini juga dapat memicu perubahan komposisi lemak membran dan produksi eksopolisakarida (EPS). EPS berfungsi sebagai agen pelindung sel bakteri terhadap tekanan lingkungan,

termasuk paparan garam empedu dengan konsentrasi 0,15–0,3% dan kondisi pH rendah pada kisaran 2–3 (Prima *et al.*, 2024).

Secara keseluruhan, meskipun ketahanan isolat PD terhadap pH asam masih tergolong sedang, kemampuannya bertahan terhadap garam empedu menunjukkan potensi yang cukup baik sebagai kandidat probiotik.

## 5. Uji Aktivitas Antimikroba

Hasil uji aktivitas antimikroba BAL isolat susu kambing etawa didapatkan hasil dalam tabel berikut.

Tabel 10. Rerata diameter zona bening uji aktivitas antimikroba (mm)

| No | Sumber Hambatan | Zona Bening (mm)    |                              |
|----|-----------------|---------------------|------------------------------|
|    |                 | <i>E. coli</i> 0157 | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 1  | PD              | 15,94±2,06          | 11,95±2,17                   |
| 2  | T (Klindamisin) | 15,55±0,79          | 31,06±3,08                   |

Hasil uji aktivitas antimikroba menunjukkan bahwa isolat PD mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji *Escherichia coli* O157 dan *Staphylococcus aureus*, ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekeliling koloni. Isolat PD menghasilkan zona hambat sebesar 15,94 mm terhadap *E. coli* O157 dan 11,95 mm terhadap *S. aureus*, menandakan aktivitas antimikroba terhadap kedua bakteri uji. Zona hambat terhadap *E. coli* O157 lebih besar dibandingkan kontrol positif (klindamisin), sementara terhadap *S. aureus* lebih kecil dibanding kontrol.

Pembentukan zona hambat ini disebabkan oleh kemampuan bakteri asam laktat (BAL) menghasilkan senyawa antimikroba seperti asam laktat, hidrogen peroksida, dan bakteriosin. Senyawa tersebut menurunkan pH lingkungan dan merusak struktur sel bakteri patogen, sehingga menghambat pertumbuhannya. Diameter zona hambat pada penelitian ini lebih besar dibandingkan hasil Suphandi *et al.* (2022), yang melaporkan isolat BAL dari susu sapi menghasilkan zona hambat terhadap *E. coli* sebesar 9,70 mm dan *S. aureus* 10,30 mm.

Ukuran zona hambat mencerminkan tingkat kemampuan BAL dalam

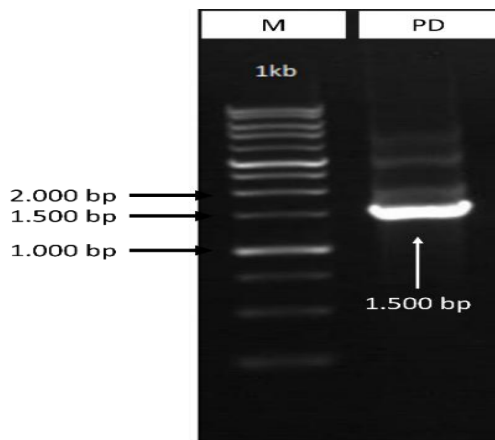
menghambat bakteri patogen. Menurut Riadi *et al.* (2017), aktivitas antimikroba dikategorikan kuat jika diameter zona hambat melebihi 10 mm, sehingga isolat PD termasuk memiliki aktivitas antimikroba kuat terhadap kedua bakteri uji. Perbedaan daya hambat terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif dipengaruhi oleh struktur dinding sel masing-masing. Bakteri Gram positif umumnya menunjukkan zona hambat lebih besar karena dinding selnya tersusun sekitar 95% peptidoglikan, sedangkan bakteri Gram negatif memiliki dinding sel lebih kompleks dengan lipid, protein, dan lipopolisakarida, serta peptidoglikan hanya 5–10% (Nurhayati *et al.*, 2020).

Asam organik yang dihasilkan BAL dapat menurunkan pH medium hingga 4–5 (Afaroh & Suryani, 2023), menyebabkan denaturasi protein penyusun dinding sel patogen, terbentuknya pori-pori, dan kerusakan struktur peptidoglikan. Kerusakan ini menghambat pertumbuhan atau bahkan menyebabkan kematian sel bakteri patogen (Setiani *et al.*, 2021).

## **6. Identifikasi Molekuler Bakteri Asam Laktat dengan 16s rRNA**

### **a. Hasil Amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR**

Hasil pengamatan elektroforesis menunjukkan bahwa PCR berhasil mengamplifikasi gen 16S rRNA dari isolat bakteri asam laktat (BAL) yang berasal dari susu kambing Etawa di Kota Padang. Keberhasilan amplifikasi ditandai dengan munculnya pita DNA hasil PCR berukuran sekitar 1400 bp, sesuai dengan ukuran target gen 16S rRNA. Fragmen ini diperoleh dengan menggunakan primer forward 16S-27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan primer reverse 16S-1492R (5'-GTTTACCTTGTTACGACTT-3'). Pola pita DNA hasil elektroforesis isolat BAL dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Hasil elektroforesis PCR isolat BAL dari susu kambing etawa (M = Marker, PD = Isolat PD)

Berdasarkan Gambar 8, terlihat bahwa sampel PD menghasilkan pita DNA berukuran sekitar 1.500 bp, yang menandakan bahwa amplifikasi gen 16S rRNA telah berhasil. Ukuran fragmen ini sejalan dengan panjang gen 16S rRNA yang umumnya sekitar  $\pm 1.400$  bp. Menurut Nikunj Kumar dan Dhruvi (2012), gen 16S rRNA memiliki panjang basa yang cukup untuk analisis bioinformatika karena mampu mengamplifikasi daerah konservatif dan variabel pada semua kelompok bakteri, sehingga banyak digunakan dalam identifikasi dan karakterisasi bakteri.

Analisis gen 16S rRNA dapat menjadi metode alternatif ketika identifikasi bakteri secara fisiologis mengalami kendala. Jika uji fisiologis dan biokimia tidak mampu memberikan hasil spesifik atau jelas, analisis gen 16S rRNA menawarkan akurasi yang lebih tinggi dalam menentukan identitas bakteri (Janda dan Abbott, 2007). Pangastuti (2006) menambahkan bahwa gen 16S rRNA memiliki beberapa keunggulan yang membuatnya sangat efektif untuk identifikasi bakteri. Pertama, gen ini bersifat ubikuitas karena fungsinya relatif sama pada seluruh organisme. Kedua, urutan basa gen ini berubah seiring jarak evolusi, sehingga dapat dijadikan penanda evolusi. Ketiga, daerah konservatif pada gen 16S rRNA berguna untuk menyusun pohon filogenetik universal. Keempat, keberadaan daerah hipervariabel memungkinkan identifikasi bakteri hingga tingkat genus atau spesies dengan presisi lebih tinggi.

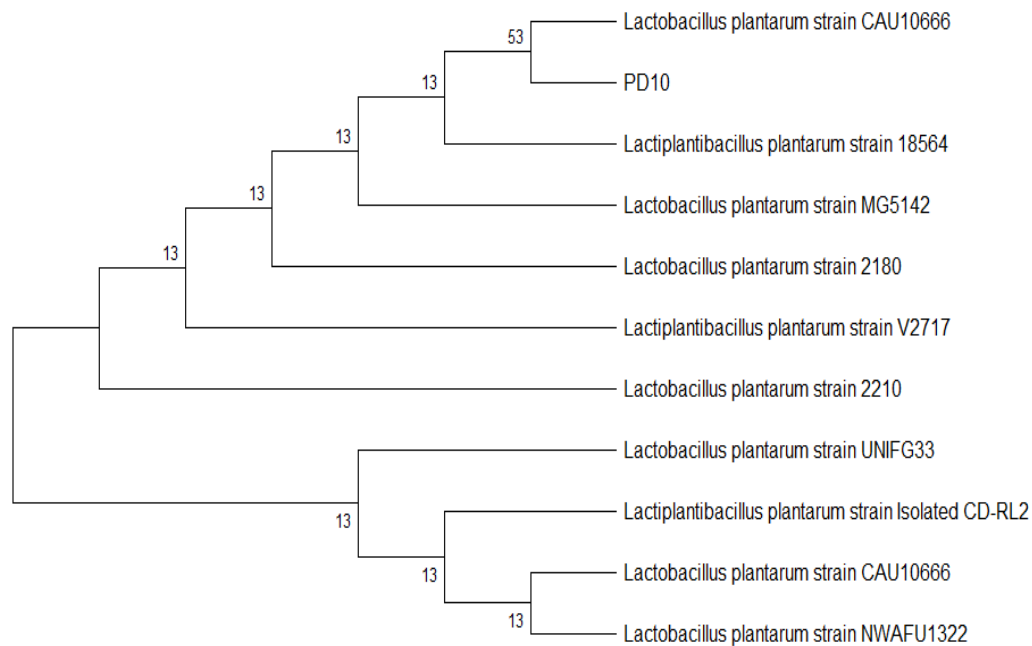
Dengan demikian, hasil amplifikasi gen 16S rRNA pada isolat PD mendukung penggunaan metode molekuler ini sebagai alat yang handal untuk identifikasi dan karakterisasi bakteri asam laktat dari susu kambing Etawa.

#### b. Analisis Sekuen Gen 16s rRNA isolat dari Susu Kambing Etawa

Hasil sekuensing dibandingkan dengan data GeneBank menggunakan program BLAST yang dilakukan online pada website NCBI. Data sekuensing, hasil analisis BLAST pada Pohon filogenetik yang berhasil didapat dari isolat BAL susu kambing etawa sampel PD dapat dilihat pada tabel 11 dan gambar 9 di bawah ini.

Tabel 11. Analisis BLAST similarity index isolat BAL susu kambing etawa

| No | Mikroorganisme  | Query cover (%) | Accession Number | Per. Ident |
|----|---|-----------------|------------------|------------|
| 1  | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain CAU10666        | 100%            | MF097966.1       | 100%       |
| 2  | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain 18564           | 100%            | MW866834.1       | 99.93%     |
| 3  | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain 11513           | 100%            | M2080571.1       | 99.93%     |
| 4  | <i>Lactobacillus plantarum</i> strain 2180                  | 100%            | MT604680.1       | 99.93%     |
| 5  | <i>Lactobacillus plantarum</i> strain V2717                 | 100%            | PP961477.1       | 99.93%     |
| 6  | <i>Lactobacillus plantarum</i> strain MG5142                | 100%            | MN368575.1       | 99.93%     |
| 7  | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain Isolated CD-RL2 | 100%            | MW418176.1       | 99.93%     |
| 8  | <i>Lactobacillus plantarum</i> strain UNIFG33               | 100%            | KP899078.1       | 99.93%     |
| 9  | <i>Lactobacillus plantarum</i> strain 2210                  | 100%            | MT604708.1       | 99.93%     |
| 10 | <i>Lactobacillus plantarum</i> strain NWAFU1322             | 100%            | MG462237.1       | 99.93%     |



Gambar 9. Pohon Filogenik isolat BAL dari susu kambing etawa berdasarkan 16S rRNA dengan analisis *Neighbor Joining* (NJ)

Berdasarkan hasil analisis pohon filogenetik, isolat PD memiliki jarak genetika terdekat dengan *Lactobacillus plantarum* strain CAU10666, yang menunjukkan bahwa isolat bakteri asam laktat (BAL) dari sampel PD dapat diidentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum* strain CAU10666. Analisis filogenetik juga menunjukkan bahwa isolat BAL dari susu kambing Etawa memiliki kesamaan sekuens 100% dengan *L. plantarum*. Menurut Cai *et al.* (2003), tingkat kesamaan sekuens  $\geq 97\%$  menandakan bahwa isolat berada dalam spesies yang sama, sedangkan nilai di bawah 97% mengindikasikan perbedaan taksonomi.

*Lactobacillus plantarum* adalah BAL yang mampu mengubah glukosa menjadi asam laktat. Bakteri ini termasuk filum Firmicutes, ordo Lactobacillales, famili Lactobacillaceae, dan genus *Lactobacillus*. Morfologinya berupa batang Gram positif dengan ukuran sekitar  $0,9\text{--}1,2\ \mu\text{m} \times 1,0\text{--}8,0\ \mu\text{m}$ , dapat ditemukan sebagai sel tunggal atau berpasangan membentuk rantai pendek (Hidayatulloh *et al.*, 2019). *L. plantarum* banyak ditemukan pada susu, daging, sayuran fermentasi, dan saluran pencernaan manusia. Bersifat anaerob fakultatif, bakteri ini dapat tumbuh baik

dengan atau tanpa oksigen. Menurut Suroño (2004), *L. plantarum* dapat berkembang pada produk non-susu. Dalam fermentasi, bakteri ini meningkatkan nilai nutrisi dan sifat fungsional bahan pangan, terutama pada fermentasi berbasis biji-bijian (Junaidi dan Wikandari, 2020).

Penerapan *L. plantarum* dalam industri pangan luas. Bakteri ini digunakan sebagai kultur tambahan pada keju, berkontribusi pada degradasi sitrat menjadi aspartat, diasetil, dan asetoin yang memengaruhi cita rasa (Kieronczyk *et al.*, 2004). Selain itu, *L. plantarum* terlibat dalam fermentasi pangan tradisional, seperti asinan kubis, zaitun hijau, dan mentimun (Vaughn *et al.*, 1953), serta dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen dalam produk daging pada suhu rendah sehingga memperpanjang umur simpan (Todorov, 2007).

Berbagai strain *L. plantarum* memiliki karakteristik dan fungsi berbeda. Strain WCFS1 menghasilkan senyawa antimikroba dan memiliki potensi probiotik untuk kesehatan manusia (van den Nieuwboer *et al.*, 2016). Strain ATCC 14917 mampu memfermentasi berbagai karbohidrat kompleks dan menghasilkan asam laktat serta senyawa aroma untuk industri pangan (Mantzourani *et al.*, 2018). Strain 299V adalah probiotik komersial yang terbukti bermanfaat bagi saluran pencernaan dan meningkatkan sistem kekebalan tubuh (Kaźmierczak-Siedlecka *et al.*, 2020).

### C. Tahap III

#### 1. Nilai pH Kefir

Hasil analisis menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan penambahan konsentrasi starter bakteri asam laktat dan konsentrasi ekstrak bunga telang memberikan pengaruh yang signifikan terhadap nilai pH kefir ( $P < 0,05$ ). Tabel 13 menyajikan hasil uji lanjut menggunakan Duncan's Multiple Range Test (DMRT) pada taraf signifikansi 5% terhadap masing-masing faktor perlakuan.

Tabel 12. Rataan nilai pH kefir dengan konsentrasi ekstrak bunga telang dan konsentrasi starter BAL

| Konsentrasi starter BAL (Faktor A) | Konsentrasi ekstrak bunga telang (Faktor B) |                              |                              | Rataan                       |
|------------------------------------|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                                    | B1  | B2                           | B3                           |                              |
| A1                                 | 4,42±0,25                                   | 4,29±0,01                    | 4,16±0,15                    | <b>4,29±0,11<sup>b</sup></b> |
| A2                                 | 4,22±0,25                                   | 4,09±0,01                    | 3,99±0,01                    | <b>4,10±0,10<sup>b</sup></b> |
| A3                                 | 3,94±0,15                                   | 3,87±0,01                    | 3,42±0,63                    | <b>3,74±0,39<sup>a</sup></b> |
| <b>Rataan</b>                      | <b>4,19±0,21<sup>b</sup></b>                | <b>4,08±0,18<sup>b</sup></b> | <b>3,86±0,46<sup>a</sup></b> |                              |

Keterangan : Angka-angka pada baris yang sama diikuti oleh huruf kecil yang sama dan angka-angka pada kolom yang sama diikuti oleh huruf besar yang sama berbeda tidak nyata taraf 5%

Tabel 12 memperlihatkan bahwa rata-rata nilai pH kefir pada perlakuan konsentrasi starter BAL 2%, 4%, dan 6% berkisar antara 3,74–4,29. Perlakuan penambahan konsentrasi starter BAL (Faktor A) memberikan pengaruh yang nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap nilai pH kefir. Nilai pH tertinggi diperoleh pada konsentrasi starter BAL 2% (A1) dengan rata-rata pH 4,29, sedangkan nilai pH terendah diperoleh pada konsentrasi starter BAL 6% (A3) dengan rata-rata pH 3,74. Hasil uji DMRT menunjukkan bahwa perlakuan A1 tidak berbeda nyata dengan A2, namun berbeda nyata dengan A3. Perlakuan penambahan konsentrasi ekstrak bunga telang (Faktor B) juga memberikan pengaruh yang nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap nilai pH kefir. Nilai pH tertinggi diperoleh pada perlakuan tanpa penambahan ekstrak bunga telang (B1) dengan rata-rata pH 4,19, sedangkan nilai pH terendah diperoleh pada penambahan ekstrak bunga telang 20% (B3) dengan rata-rata pH 3,86. Hasil uji DMRT menunjukkan bahwa perlakuan B1 tidak berbeda nyata dengan B2, namun berbeda nyata dengan B3.

Nilai pH terendah diperoleh pada kombinasi A3B3 (3,42), yang menunjukkan tingkat keasaman tertinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Penurunan pH seiring dengan peningkatan konsentrasi starter BAL disebabkan oleh meningkatnya aktivitas metabolik bakteri asam laktat dalam mengonversi laktosa menjadi asam laktat selama fermentasi. Semakin tinggi jumlah starter yang digunakan, semakin besar akumulasi asam organik yang terbentuk, sehingga pH produk semakin rendah. Selain itu, penambahan ekstrak bunga telang kemungkinan turut mempengaruhi

keseimbangan keasaman sistem. Hasil ini sejalan dengan penelitian Lengkey *et al.* (2013) yang melaporkan bahwa peningkatan persentase starter kefir menyebabkan penurunan nilai pH secara signifikan

Hasil penelitian ini sejalan dengan Pertiwi *et al.* (2023) yang melaporkan bahwa nilai pH kefir berada pada kisaran 4,31–4,40 dan cenderung menurun selama proses fermentasi. Meskipun nilai pH pada penelitian ini relatif lebih rendah, kecenderungan penurunan pH yang terjadi menunjukkan pola fermentasi yang serupa, dengan perbedaan intensitas pembentukan asam.

Penurunan nilai pH akibat penambahan ekstrak bunga telang diduga berkaitan dengan kandungan senyawa polifenol dan pigmen antosianin yang dapat berinteraksi dengan komponen protein susu serta memengaruhi keseimbangan asam-basa dalam sistem fermentasi. Gymnastiar *et al.* (2024) melaporkan bahwa interaksi antara protein susu dan senyawa fenolik dapat memodulasi pelepasan asam selama fermentasi dan memengaruhi nilai pH akhir produk.

## 2. Kadar Air Kefir

Hasil analisis menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan penambahan konsentrasi starter bakteri asam laktat dan konsentrasi ekstrak bunga telang tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar air kefir ( $P > 0,05$ ). Tabel 13 menyajikan hasil uji lanjut menggunakan Duncan's Multiple Range Test (DMRT) pada taraf signifikansi 5% terhadap masing-masing faktor perlakuan.

Tabel 13. Rataan kadar air kefir dengan konsentrasi ekstrak bunga telang dan konsentrasi starter BAL

| Konsentrasi starter BAL (Faktor A) | Konsentrasi ekstrak bunga telang (Faktor B) |                   |                    | Rataan             |
|------------------------------------|---|-------------------|--------------------|--------------------|
|                                    | B1 (%)                                      | B2 (%)            | B3 (%)             |                    |
| A1 (%)                             | 84,92±0,13                                  | 84,88±0,26        | 60,81±43,93        | <b>76,87±25,05</b> |
| A2 (%)                             | 86,27±0,03                                  | 85,18±0,32        | 86,88±0,72         | <b>86,11±0,76</b>  |
| A3 (%)                             | 84,45±0,10                                  | 88,48±0,08        | 86,76±0,15         | <b>86,56±1,75</b>  |
| <b>Rataan</b>                      | <b>85,22±0,82</b>                           | <b>86,18±1,73</b> | <b>78,15±25,52</b> |                    |

Tabel 12 memperlihatkan rata-rata kadar air kefir dengan pemberian konsentrasi starter BAL (Faktor A) 2%, 4%, dan 6% berkisar antara 76,87–86,56.

Perlakuan penambahan konsentrasi BAL (Faktor A) tidak memberikan pengaruh yang nyata ( $P>0,05$ ) terhadap kadar air kefir. Kadar air tertinggi ditemukan pada konsentrasi BAL 6% (A3) dengan rata-rata nilai 86,56 dan terendah pada pemberian konsentrasi starter BAL 2% (A1) dengan rata-rata nilai 76,87. Perlakuan penambahan konsentrasi ekstrak bunga telang (Faktor B) juga tidak memberikan pengaruh yang nyata ( $P>0,05$ ) terhadap kadar air kefir. Kadar air tertinggi ditemukan pada konsentrasi ekstrak bunga telang 10% (B2) dengan rata-rata nilai 86,18 dan terendah pada konsentrasi ekstrak bunga telang 20% (B3) dengan rata-rata nilai 78,15. Secara kombinasi perlakuan, nilai kadar air tertinggi diperoleh pada A3B2 (88,48%).

Tidak berbedanya kadar air antar perlakuan menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi starter BAL maupun ekstrak bunga telang dalam rentang yang digunakan belum mampu memengaruhi distribusi air dalam matriks kefir secara signifikan. Kadar air pada produk fermentasi umumnya lebih dipengaruhi oleh komposisi awal bahan baku dan kondisi proses seperti pemanasan, pengadukan, serta metode penyaringan dibandingkan oleh variasi konsentrasi starter atau penambahan bahan fungsional dalam jumlah terbatas.

Istianah *et al.* (2019) menyatakan bahwa kadar air merupakan persentase kandungan air dalam suatu bahan pangan yang dinyatakan berdasarkan bobot basah atau bobot kering, dan relatif stabil apabila tidak terjadi perubahan signifikan pada struktur fisik bahan. Dengan demikian, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan ekstrak bunga telang dan variasi konsentrasi starter BAL tidak menyebabkan perubahan kadar air kefir yang berarti. Tidak berbedanya kadar air antar perlakuan menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi starter BAL maupun ekstrak bunga telang dalam rentang yang digunakan belum mampu memengaruhi distribusi air dalam matriks kefir secara signifikan. Kadar air pada produk fermentasi umumnya lebih dipengaruhi oleh komposisi awal bahan baku dan kondisi proses seperti pemanasan, pengadukan, serta metode penyaringan dibandingkan oleh variasi konsentrasi starter atau penambahan bahan fungsional dalam jumlah terbatas.

### 3. Kadar Protein Kefir

Hasil analisis menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan penambahan konsentrasi starter bakteri asam laktat dan konsentrasi ekstrak bunga telang tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar protein kefir ( $P>0,05$ ). Tabel 14 menyajikan hasil uji lanjut menggunakan Duncan's Multiple Range Test (DMRT) pada taraf signifikansi 5% terhadap masing-masing faktor perlakuan.

Tabel 14. Rataan kadar protein kefir dengan konsentrasi ekstrak bunga telang dan konsentrasi starter BAL

| Konsentrasi starter BAL (Faktor A) | Konsentrasi ekstrak bunga telang (Faktor B) |                   |                   | Rataan            |
|------------------------------------|---|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                    | B1 (%)                                      | B2 (%)            | B3 (%)            |                   |
| A1 (%)                             | 42,37±5,53                                  | 45,38±5,69        | 36,45±6,41        | <b>41,40±6,45</b> |
| A2 (%)                             | 36,75±3,95                                  | 42,18±4,25        | 35,31±4,38        | <b>38,08±4,80</b> |
| A3 (%)                             | 36,09±1,03                                  | 35,05±2,13        | 43,48±1,02        | <b>38,20±4,18</b> |
| <b>Rataan</b>                      | <b>38,40±4,55</b>                           | <b>40,87±5,89</b> | <b>38,41±5,49</b> |                   |

Tabel 14 memperlihatkan rata-rata kadar protein kefir dengan pemberian konsentrasi starter BAL (Faktor A) 2%, 4%, dan 6% berkisar antara 38,08–41,40. Perlakuan penambahan konsentrasi starter BAL (Faktor A) tidak memberikan pengaruh yang nyata ( $P>0,05$ ) terhadap kadar protein kefir. Kadar protein tertinggi ditemukan pada konsentrasi starter BAL 2% (A1) dengan rata-rata nilai 41,40 dan terendah pada pemberian konsentrasi starter BAL 4% (A2) dengan rata-rata nilai 38,20. Perlakuan penambahan konsentrasi ekstrak bunga telang (Faktor B) juga tidak memberikan pengaruh yang nyata ( $P>0,05$ ) terhadap kadar protein kefir. Kadar protein tertinggi ditemukan pada konsentrasi ekstrak bunga telang 10% (B2) dengan rata-rata nilai 40,87 dan terendah pada tanpa pemberian ekstrak bunga telang (B1) dengan rata-rata nilai 38,41. Secara kombinasi perlakuan, kadar protein tertinggi diperoleh pada A1B2 (45,38%).

Kadar protein kefir yang dihasilkan pada penelitian ini jauh lebih tinggi dibandingkan dengan persyaratan mutu kefir menurut SNI 2981 (2009) dan CODEX-STAN 243 (2003), yaitu kadar protein minimal sebesar 2,7%. Hal ini menunjukkan bahwa produk kefir yang dihasilkan telah memenuhi standar mutu nasional dan

memiliki kandungan protein yang memadai sebagai produk pangan fermentasi.

Hasil penelitian ini sejalan dengan Pertiwi *et al.* (2023) yang melaporkan bahwa kadar protein kefir berada pada kisaran 3,27–3,48% dan tidak berbeda nyata akibat penambahan ekstrak bunga telang maupun lama penyimpanan. Meskipun kisaran kadar protein pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan penelitian tersebut, kedua hasil menunjukkan kecenderungan yang sama, yaitu perlakuan fermentasi dan penambahan ekstrak bunga telang tidak memberikan pengaruh signifikan terhadap kadar protein total kefir.

Tidak berbedanya kadar protein antar perlakuan menunjukkan bahwa variasi konsentrasi starter BAL dan penambahan ekstrak bunga telang dalam penelitian ini belum cukup kuat untuk memengaruhi kandungan protein total kefir secara signifikan. Selama proses fermentasi, bakteri asam laktat menghasilkan enzim protease yang berperan dalam menghidrolisis protein susu menjadi peptida dan asam amino, namun proses ini umumnya lebih memengaruhi komposisi fraksi protein dibandingkan dengan jumlah protein total yang terukur.

Zakaria (2009) menjelaskan bahwa semakin banyak jumlah bakteri aktif dalam susu fermentasi, maka aktivitas enzim protease semakin meningkat dan mempercepat penguraian protein sebagai sumber energi bagi pertumbuhan bakteri. Namun demikian, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas proteolitik tersebut belum menyebabkan perubahan kadar protein total yang signifikan, kemungkinan karena produk hasil hidrolisis masih terhitung sebagai bagian dari protein pada metode analisis yang digunakan.

#### **4. Kadar Lemak Kefir**

Hasil analisis menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan penambahan konsentrasi starter bakteri asam laktat dan konsentrasi ekstrak bunga telang memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar lemak kefir ( $P < 0,05$ ). Tabel 15 menyajikan hasil uji lanjut menggunakan Duncan's Multiple Range Test (DMRT) pada taraf signifikansi 5% terhadap masing-masing faktor perlakuan.

Tabel 15. Rataan kadar lemak kefir dengan konsentrasi ekstrak bunga telang dan konsentrasi starter BAL

| Konsentrasi starter BAL<br>(Faktor A) | Konsentrasi ekstrak bunga telang<br>(Faktor B) |                               |                               | Rataan                        |
|---------------------------------------|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                                       | B1(%)  | B2 (%)                        | B3 (%)                        |                               |
| A1 (%)                                | 42,85±0,66                                     | 33,74±1,78                    | 39,03±0,86                    | <b>38,54±4,09<sup>c</sup></b> |
| A2 (%)                                | 32,74±0,68                                     | 34,37±0,55                    | 35,40±0,82                    | <b>34,18±1,30<sup>b</sup></b> |
| A3 (%)                                | 40,35±0,36                                     | 22,60±1,42                    | 33,79±1,09                    | <b>32,25±7,82<sup>a</sup></b> |
| <b>Rataan</b>                         | <b>38,64±4,58<sup>c</sup></b>                  | <b>30,24±5,85<sup>a</sup></b> | <b>36,08±2,45<sup>b</sup></b> |                               |

Keterangan : Angka-angka pada baris yang sama diikuti oleh huruf kecil yang sama dan angka-angka pada kolom yang sama diikuti oleh huruf besar yang sama berbeda tidak nyata taraf 5%

Tabel 15 memperlihatkan bahwa rata-rata kadar lemak kefir pada perlakuan konsentrasi starter BAL 2%, 4%, dan 6% berkisar antara 32,25–38,54%. Perlakuan penambahan konsentrasi starter BAL (Faktor A) memberikan pengaruh yang nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap kadar lemak kefir. Kadar lemak tertinggi diperoleh pada konsentrasi starter BAL 2% (A1) dengan rata-rata 38,54%, sedangkan kadar lemak terendah diperoleh pada konsentrasi starter BAL 6% (A3) dengan rata-rata 32,25%. Hasil uji DMRT menunjukkan bahwa perlakuan A1 berbeda nyata dengan A2 dan A3. Perlakuan penambahan konsentrasi ekstrak bunga telang (Faktor B) juga memberikan pengaruh yang nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap kadar lemak kefir. Kadar lemak tertinggi diperoleh pada perlakuan tanpa penambahan ekstrak bunga telang (B1) dengan rata-rata 38,64%, sedangkan kadar lemak terendah diperoleh pada penambahan ekstrak bunga telang 10% (B2) dengan rata-rata 30,24%. Hasil uji DMRT menunjukkan bahwa perlakuan B1 berbeda nyata dengan B2 dan B3. Secara kombinasi perlakuan, kadar lemak tertinggi diperoleh pada A1B1 (42,85%).

Penurunan kadar lemak kefir seiring dengan meningkatnya konsentrasi starter BAL berkaitan dengan meningkatnya aktivitas mikroba selama proses fermentasi dan penyimpanan. Bakteri asam laktat dalam starter kefir mampu menghasilkan enzim lipase yang berperan dalam menghidrolisis lemak menjadi asam lemak bebas dan gliserol. Semakin tinggi jumlah bakteri yang tumbuh, semakin besar aktivitas lipolitik yang terjadi, sehingga kadar lemak total kefir cenderung menurun. Selain itu, penurunan kadar lemak selama penyimpanan juga terjadi karena bakteri asam

laktat penghasil lipase pada starter kefir melepaskan enzim lipase yang terus aktif selama masa penyimpanan (Setyawardani *et al.*, 2017).

Meskipun mengalami penurunan, kadar lemak kefir pada seluruh perlakuan dalam penelitian ini masih memenuhi persyaratan mutu produk fermentasi susu menurut SNI 2981 (2009), yaitu kadar lemak minimal sebesar 3%. Hal ini menunjukkan bahwa produk kefir yang dihasilkan tetap berada dalam kategori layak mutu dan sesuai dengan standar nasional yang berlaku.

Pola penurunan kadar lemak ini sejalan dengan hasil penelitian Pertiwi *et al.* (2023), yang melaporkan bahwa kadar lemak kefir berada pada kisaran 0,96–2,15% dan cenderung menurun selama fermentasi dan penyimpanan. Meskipun satuan dan bahan baku yang digunakan berbeda, kedua penelitian menunjukkan kecenderungan yang sama, yaitu semakin intensif aktivitas fermentasi, semakin rendah kadar lemak produk kefir.

Sawitri (2005) melaporkan bahwa peningkatan populasi bakteri asam laktat selama fermentasi susu dapat meningkatkan aktivitas enzim lipase, yang selanjutnya mempercepat proses hidrolisis lemak. Penurunan kadar lemak akibat penambahan ekstrak bunga telang pada penelitian ini juga diduga berkaitan dengan interaksi senyawa fenolik terhadap metabolisme mikroba, yang dapat memodulasi aktivitas enzimatik selama fermentasi. Dengan demikian, perbedaan pengaruh ekstrak bunga telang terhadap kadar lemak antara penelitian ini dan jurnal acuan menunjukkan bahwa respons metabolik mikroba sangat dipengaruhi oleh konsentrasi ekstrak, formulasi starter, dan kondisi fermentasi yang digunakan.

## 5. Nilai Total Asam Tertitrasi Kefir

Hasil analisis menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan penambahan konsentrasi starter bakteri asam laktat dan konsentrasi ekstrak bunga telang memberikan pengaruh yang signifikan terhadap nilai total asam tertitrasi (TAT) kefir ( $P < 0,05$ ). Tabel 16 menyajikan hasil uji lanjut menggunakan Duncan's Multiple Range Test (DMRT) pada taraf signifikansi 5% terhadap masing-masing faktor perlakuan.

Tabel 16. Rataan nilai TAT kefir dengan konsentrasi ekstrak bunga telang dan konsentrasi starter BAL

| Konsentrasi starter BAL (Faktor A) | Konsentrasi ekstrak bunga telang (Faktor B) |                              |                              | Rataan                       |
|------------------------------------|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                                    | B1 (%)                                      | B2 (%)                       | B3 (%)                       |                              |
| A1 (%)                             | 1,09±0,01                                   | 1,27±0,01                    | 1,21±0,01                    | <b>1,19±0,79<sup>a</sup></b> |
| A2 (%)                             | 1,80±0,18                                   | 1,25±0,10                    | 1,25±0,10                    | <b>1,44±0,27<sup>b</sup></b> |
| A3 (%)                             | 1,21±0,18                                   | 1,31±0,20                    | 1,72±0,10                    | <b>1,41±0,25<sup>b</sup></b> |
| <b>Rataan</b>                      | <b>1,37±0,32<sup>b</sup></b>                | <b>1,28±0,10<sup>a</sup></b> | <b>1,39±0,24<sup>b</sup></b> |                              |

Keterangan : Angka-angka pada baris yang sama diikuti oleh huruf kecil yang sama dan angka-angka pada kolom yang sama diikuti oleh huruf besar yang sama berbeda tidak nyata taraf 5%

Tabel 16 menunjukkan bahwa rata-rata nilai TTA kefir pada perlakuan konsentrasi starter BAL 2%, 4%, dan 6% berada pada kisaran 1,19–1,44. Perlakuan penambahan konsentrasi starter BAL (Faktor A) memberikan pengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap nilai TTA kefir. Nilai TTA tertinggi diperoleh pada konsentrasi starter BAL 4% (A2) dengan rata-rata 1,44, sedangkan nilai TTA terendah diperoleh pada konsentrasi starter BAL 2% (A1) dengan rata-rata 1,19. Hasil uji DMRT menunjukkan bahwa perlakuan A2 berbeda nyata dengan A1, namun tidak berbeda nyata dengan A3. Perlakuan penambahan konsentrasi ekstrak bunga telang (Faktor B) juga memberikan pengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap nilai TTA kefir. Nilai TTA tertinggi diperoleh pada penambahan ekstrak bunga telang 20% (B3) dengan rata-rata 1,39, sedangkan nilai TTA terendah diperoleh pada penambahan ekstrak bunga telang 10% (B2) dengan rata-rata 1,28. Hasil uji DMRT menunjukkan bahwa perlakuan B3 berbeda nyata dengan B1, namun tidak berbeda nyata dengan B2. Nilai TTA tertinggi diperoleh pada kombinasi A2B1 (1,80%).

Nilai TTA kefir yang dihasilkan pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan dengan standar yang ditetapkan dalam CODEX-STAN 243 (2003), yaitu syarat minimal nilai TTA pada kefir sebesar 0,6%. Hal ini menunjukkan bahwa proses fermentasi pada seluruh perlakuan telah berlangsung secara optimal dengan terbentuknya asam organik dalam jumlah yang mencukupi. Hasil penelitian ini sejalan dengan Pertiwi *et al.* (2023) yang melaporkan bahwa penambahan bunga

telang sebesar 6% mampu meningkatkan nilai TTA hingga mencapai 0,72%. Kesamaan kecenderungan tersebut menunjukkan bahwa penambahan bunga telang berpotensi berkontribusi terhadap peningkatan pembentukan asam pada produk fermentasi.

Peningkatan nilai TTA seiring dengan bertambahnya konsentrasi starter BAL berkaitan dengan meningkatnya produksi asam organik, terutama asam laktat, selama proses fermentasi. Semakin tinggi aktivitas metabolik bakteri asam laktat, semakin besar akumulasi asam yang terbentuk, sehingga nilai TTA meningkat. Pola ini sejalan dengan penurunan nilai pH kefir yang umumnya diamati pada perlakuan dengan konsentrasi starter yang lebih tinggi, sebagaimana dilaporkan pada berbagai produk fermentasi berbasis BAL. Selain itu, total asam tertitrasi (TAT) juga dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain jenis susu, jenis dan jumlah starter, suhu penyimpanan, serta lama penyimpanan (Triana *et al.*, 2022).

Penambahan ekstrak bunga telang juga berperan dalam memengaruhi nilai TTA melalui kandungan senyawa polifenol dan pigmen antosianin yang berpotensi berinteraksi dengan mikroorganisme fermentasi. Nur'Aini *et al.* (2024) menyatakan bahwa senyawa fenolik dapat memodulasi metabolisme mikroba, sehingga memengaruhi pembentukan asam selama fermentasi. Interaksi tersebut dapat mempercepat atau menghambat akumulasi asam, bergantung pada konsentrasi ekstrak yang digunakan serta kondisi lingkungan fermentasi.

## 6. Total BAL Kefir

Hasil analisis menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan penambahan konsentrasi starter bakteri asam laktat dan konsentrasi ekstrak bunga telang memberikan pengaruh yang signifikan terhadap total BAL kefir ( $P < 0,05$ ). Tabel 17 menyajikan hasil uji lanjut menggunakan Duncan's Multiple Range Test (DMRT) pada taraf signifikansi 5% terhadap masing-masing faktor perlakuan.

Tabel 17. Rataan total BAL kefir ( $10^7$  CFU/ml) dengan konsentrasi ekstrak bunga telang dan konsentrasi starter BAL

| Konsentrasi starter BAL<br>(Faktor A) | Konsentrasi ekstrak bunga telang<br>(Faktor B) |                                |                                | Rataan                         |
|---------------------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|                                       | B1   | B2                             | B3                             |                                |
| A1                                    | 45,00±11,00                                    | 65,67±25,71                    | 151,67±21,22                   | <b>87,44±52,04<sup>b</sup></b> |
| A2                                    | 27,33±3,51                                     | 31,67±3,05                     | 86,33±14,57                    | <b>48,44±29,48<sup>a</sup></b> |
| A3                                    | 34,00±2,64                                     | 27,00±2,64                     | 48,00±22,64                    | <b>36,33±14,74<sup>a</sup></b> |
| <b>Rataan</b>                         | <b>35,44±9,73<sup>a</sup></b>                  | <b>41,44±22,43<sup>a</sup></b> | <b>95,33±48,52<sup>b</sup></b> |                                |

Keterangan : Angka-angka pada baris yang sama diikuti oleh huruf kecil yang sama dan angka-angka pada kolom yang sama diikuti oleh huruf besar yang sama berbeda tidak nyata taraf 5%

Tabel 17 menunjukkan bahwa rata-rata total BAL kefir pada perlakuan konsentrasi starter BAL 2%, 4%, dan 6% berada pada kisaran 36,33–87,44. Perlakuan penambahan konsentrasi starter BAL (Faktor A) memberikan pengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap total BAL kefir. Total BAL tertinggi diperoleh pada konsentrasi starter BAL 2% (A1) dengan rata-rata 87,44, sedangkan total BAL terendah diperoleh pada konsentrasi starter BAL 6% (A3) dengan rata-rata 36,33. Hasil uji DMRT menunjukkan bahwa perlakuan A1 berbeda nyata dengan A2 dan A3. Perlakuan penambahan konsentrasi ekstrak bunga telang (Faktor B) juga berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap total BAL kefir. Total BAL tertinggi diperoleh pada penambahan ekstrak bunga telang 20% (B3) dengan rata-rata 95,33, sedangkan total BAL terendah diperoleh pada perlakuan tanpa penambahan ekstrak bunga telang (B1) dengan rata-rata 35,44. Hasil uji DMRT menunjukkan bahwa perlakuan B3 berbeda nyata dengan B1 dan B2. Total BAL tertinggi diperoleh pada kombinasi A1B3 ( $151,67 \times 10^7$  CFU/ml).

Total BAL kefir yang dihasilkan pada penelitian ini telah memenuhi dan melampaui standar yang ditetapkan dalam CODEX-STAN 243-2003, yaitu syarat minimal total BAL pada kefir sebesar  $>10^7$ . Hal ini menunjukkan bahwa kefir yang dihasilkan memiliki kualitas mikrobiologis yang baik serta memenuhi persyaratan sebagai produk fermentasi berbasis bakteri asam laktat. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Martharini dan Indratiningsih (2017), yang melaporkan bahwa penambahan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 sebesar 3% mampu meningkatkan total BAL sekaligus menurunkan nilai pH produk fermentasi. Kondisi

tersebut menunjukkan bahwa penggunaan konsentrasi starter yang optimal berperan penting dalam mendukung pertumbuhan BAL selama fermentasi. Selain itu, Mathur *et al.* (2020) menyatakan bahwa jumlah BAL yang tinggi berkaitan dengan peningkatan potensi probiotik dan stabilitas produk fermentasi.

Peningkatan total BAL pada konsentrasi starter yang lebih rendah menunjukkan bahwa jumlah starter awal yang terlalu tinggi tidak selalu menghasilkan populasi BAL akhir yang lebih besar. Konsentrasi starter yang tinggi dapat mempercepat penurunan pH serta meningkatkan persaingan terhadap substrat, sehingga menyebabkan stres mikroba dan menghambat pertumbuhan BAL. Fenomena ini umum terjadi pada sistem fermentasi tertutup, di mana kepadatan mikroba yang berlebihan dapat menurunkan efisiensi pertumbuhan sel.

Penambahan ekstrak bunga telang diduga turut berperan dalam meningkatkan total BAL melalui kandungan senyawa fenolik dan komponen bioaktif lainnya yang dapat bertindak sebagai faktor selektif bagi pertumbuhan bakteri asam laktat. Namun demikian, Oliveira *et al.* (2025) menekankan bahwa perubahan keseimbangan mikroba sebagai respons terhadap senyawa fenolik dapat memengaruhi spektrum metabolit yang dihasilkan, yang pada akhirnya berdampak pada cita rasa, tekstur, serta potensi manfaat kesehatan produk kefir.

## **7. Aktivitas Antioksidan**

Hasil analisis menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan penambahan konsentrasi starter bakteri asam laktat dan konsentrasi ekstrak bunga telang memberikan pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas antioksidan kefir ( $P < 0,05$ ). Tabel 18 menyajikan hasil uji lanjut menggunakan Duncan's Multiple Range Test (DMRT) pada taraf signifikansi 5% terhadap masing-masing faktor perlakuan.

Tabel 18. Rataan aktivitas antioksidan kefir dengan konsentrasi ekstrak bunga telang dan konsentrasi starter BAL

| Konsentrasi starter BAL<br>(Faktor A) | Konsentrasi ekstrak bunga telang<br>(Faktor B) |                    |                    | Rataan                         |
|---------------------------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------------------|
|                                       | B1   | B2                 | B3                 |                                |
| A1                                    | 44,58±17,87                                    | 47,77±14,86        | 32,54±25,85        | <b>41,63±18,72<sup>a</sup></b> |
| A2                                    | 59,49±1,59                                     | 29,82±2,72         | 44,42±25,11        | <b>44,58±18,03<sup>a</sup></b> |
| A3                                    | 68,82±2,20                                     | 64,11±3,93         | 69,22±1,22         | <b>67,38±3,39<sup>b</sup></b>  |
| <b>Rataan</b>                         | <b>57,63±13,92</b>                             | <b>47,24±16,77</b> | <b>48,72±24,24</b> |                                |

Keterangan : Angka-angka pada baris yang sama diikuti oleh huruf kecil yang sama dan angka-angka pada kolom yang sama diikuti oleh huruf besar yang sama berbeda tidak nyata taraf 5%

Tabel 18 memperlihatkan rata-rata aktivitas antioksidan kefir dengan pemberian konsentrasi starter BAL (Faktor A) 2%, 4%, dan 6% berkisar antara 41,63–67,38. Perlakuan penambahan konsentrasi starter BAL (Faktor A) memberikan pengaruh yang nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap aktivitas antioksidan kefir. Aktivitas antioksidan tertinggi diperoleh pada konsentrasi starter BAL 6% (A3) dengan rata-rata 67,38, sedangkan aktivitas antioksidan terendah diperoleh pada konsentrasi starter BAL 2% (A1) dengan rata-rata 41,63. Hasil uji jarak berganda Duncan menunjukkan bahwa perlakuan A1 tidak berbeda nyata dengan A2, namun berbeda nyata dengan A3.

Perlakuan penambahan konsentrasi ekstrak bunga telang (Faktor B) tidak memberikan pengaruh yang nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap aktivitas antioksidan kefir. Aktivitas antioksidan tertinggi diperoleh pada perlakuan tanpa penambahan ekstrak bunga telang (B1) dengan rata-rata 57,63, sedangkan aktivitas antioksidan terendah diperoleh pada penambahan ekstrak bunga telang 10% (B2) dengan rata-rata 47,24. Aktivitas antioksidan tertinggi diperoleh pada kombinasi A3B3 (69,22).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa peningkatan aktivitas antioksidan lebih dipengaruhi oleh konsentrasi starter BAL dibandingkan oleh penambahan ekstrak bunga telang. Peningkatan konsentrasi starter BAL diduga meningkatkan aktivitas enzimatik selama fermentasi, sehingga menghasilkan peptida bioaktif dan senyawa metabolit lain yang memiliki kemampuan menangkap radikal bebas. Temuan ini sejalan dengan Pertiwi *et al.* (2023) yang melaporkan bahwa aktivitas antioksidan kefir meningkat seiring dengan proses fermentasi, namun tidak selalu meningkat secara signifikan akibat penambahan ekstrak bunga telang. Pertiwi *et al.* (2023)

melaporkan aktivitas antioksidan kefir berkisar antara 7,88–55,57% penghambatan DPPH, dengan kecenderungan peningkatan pada awal fermentasi dan penurunan selama penyimpanan.

Tidak signifikannya pengaruh penambahan ekstrak bunga telang terhadap aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi bahan kaya senyawa fenolik tidak selalu berbanding lurus dengan peningkatan aktivitas antioksidan terukur. Liang *et al.* (2023) melaporkan bahwa stabilitas dan efektivitas senyawa fenolik sangat dipengaruhi oleh kondisi matriks pangan, seperti pH dan interaksi dengan protein. Campos *et al.* (2017) juga menjelaskan bahwa pada konsentrasi tertentu, antosianin cenderung lebih stabil dan terdispersi dengan baik, sedangkan pada konsentrasi yang lebih tinggi senyawa fenolik dapat mengalami degradasi, polimerisasi, atau presipitasi, sehingga menurunkan aktivitas antioksidan yang terukur dengan metode DPPH.

Selain itu, lingkungan fermentasi kefir yang bersifat asam dan berpotensi oksidatif dapat mempercepat degradasi antosianin, terutama ketika konsentrasinya melebihi kapasitas perlindungan matriks protein dan lemak kefir. Kondisi ini menjelaskan mengapa penambahan ekstrak bunga telang pada konsentrasi yang lebih tinggi tidak selalu menghasilkan peningkatan aktivitas antioksidan secara signifikan.

## 8. Nilai Organoleptik

### a. Rasa

Hasil analisis keragaman menggunakan uji Friedman menunjukkan adanya pengaruh yang nyata ( $P < 0,05$ ) antara konsentrasi starter bakteri asam laktat (Faktor A) dan konsentrasi ekstrak bunga telang (Faktor B) terhadap nilai organoleptik rasa frozen kefir. Rataan penilaian kesukaan panelis terhadap rasa frozen kefir disajikan pada Tabel 19.

Tabel 19. Rataan nilai organoleptik rasa kefir dengan konsentrasi ekstrak bunga telang dan konsentrasi starter BAL

| Konsentrasi starter BAL<br>(Faktor A) | Konsentrasi ekstrak bunga telang<br>(Faktor B) |                        |                        | Rataan           |
|---------------------------------------|--|------------------------|------------------------|------------------|
|                                       | B1   | B2                     | B3                     |                  |
| A1                                    | 1,96±0,75 <sup>f</sup>                         | 2,66±0,84 <sup>e</sup> | 3,66±0,62 <sup>c</sup> | <b>2,76±0,85</b> |
| A2                                    | 2,60±0,49 <sup>e</sup>                         | 3,08±0,89 <sup>d</sup> | 4,08±0,69 <sup>b</sup> | <b>3,25±0,75</b> |
| A3                                    | 4,12±0,68 <sup>b</sup>                         | 4,24±0,68 <sup>b</sup> | 4,52±0,50 <sup>a</sup> | <b>4,29±0,20</b> |
| <b>Rataan</b>                         | <b>2,89±1,10</b>                               | <b>3,24±0,81</b>       | <b>4,02±0,43</b>       |                  |

Keterangan : Angka-angka pada baris yang sama diikuti oleh huruf kecil yang sama dan angka-angka pada kolom yang sama diikuti oleh huruf besar yang sama berbeda tidak nyata taraf 5%

Tabel 19 menunjukkan bahwa rata-rata nilai organoleptik rasa kefir pada Faktor A berada pada kisaran 2,76–4,29, sedangkan rata-rata pada Faktor B berada pada kisaran 2,89–4,02. Hasil tersebut menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi starter BAL maupun ekstrak bunga telang cenderung meningkatkan tingkat kesukaan panelis terhadap rasa frozen kefir. Nilai organoleptik rasa tertinggi diperoleh pada kombinasi perlakuan A3B3 dengan nilai 4,52, sedangkan nilai terendah diperoleh pada kombinasi perlakuan A1B1 dengan nilai 1,96. Pola ini mengindikasikan bahwa kombinasi konsentrasi starter BAL yang lebih tinggi dan penambahan ekstrak bunga telang yang lebih tinggi memberikan kontribusi positif terhadap penerimaan rasa frozen kefir oleh panelis.

Secara umum, nilai kesukaan rasa frozen kefir berada pada rentang 2,76–4,29, yang termasuk dalam kategori “agak suka” hingga “suka”. Peningkatan nilai kesukaan rasa ini berkaitan dengan aktivitas metabolisme bakteri asam laktat selama proses fermentasi yang menghasilkan asam laktat serta berbagai senyawa metabolit lain, sehingga membentuk cita rasa asam yang khas dan lebih seimbang serta dapat diterima oleh panelis (Pratama *et al.*, 2021).

Hasil penelitian ini sejalan dengan Pertiwi *et al.* (2023) yang melaporkan bahwa atribut rasa kefir dengan penambahan ekstrak bunga telang masih dapat diterima oleh panelis dan tidak menunjukkan penurunan tingkat kesukaan secara signifikan. Pertiwi *et al.* (2023) menyatakan bahwa karakter rasa asam khas kefir tetap dominan meskipun ditambahkan ekstrak bunga telang, sehingga produk masih berada dalam rentang penerimaan sensoris yang baik.

Penambahan ekstrak bunga telang juga berperan dalam memodifikasi karakter rasa frozen kefir. Menurut Hartono (2013), ekstrak bunga telang mengandung pigmen antosianin dan senyawa fenolik yang dapat berinteraksi dengan komponen produk fermentasi sehingga memengaruhi cita rasa minuman. Turang *et al.* (2023) menambahkan bahwa rasa khas kefir umumnya disebabkan oleh kandungan asam laktat yang lebih tinggi dibandingkan produk susu fermentasi tanpa penambahan bahan fungsional, sehingga kombinasi proses fermentasi dan penambahan ekstrak bunga telang menghasilkan profil rasa yang lebih kompleks dan cenderung lebih disukai oleh panelis.

### b. Aroma

Hasil analisis keragaman menggunakan uji Friedman menunjukkan adanya pengaruh yang nyata ( $P < 0,05$ ) antara konsentrasi starter bakteri asam laktat (BAL) (Faktor A) dan konsentrasi ekstrak bunga telang (Faktor B) terhadap nilai organoleptik aroma kefir. Rataan penilaian kesukaan panelis terhadap aroma kefir disajikan pada Tabel 20.

Tabel 20. Rataan nilai organoleptik aroma Kefir dengan konsentrasi ekstrak bunga telang dan konsentrasi starter BAL

| Konsentrasi starter BAL (Faktor A) | Konsentrasi ekstrak bunga telang (Faktor B) |                         |                        | Rataan           |
|------------------------------------|---|-------------------------|------------------------|------------------|
|                                    | B1  | B2                      | B3                     |                  |
| A1                                 | 2,94±0,89 <sup>d</sup>                      | 3,04±0,87 <sup>d</sup>  | 3,62±1,02 <sup>c</sup> | <b>3,20±0,36</b> |
| A2                                 | 3,24±0,91 <sup>cd</sup>                     | 3,32±0,86 <sup>cd</sup> | 3,72±0,99 <sup>b</sup> | <b>3,42±0,25</b> |
| A3                                 | 3,52±0,81 <sup>bc</sup>                     | 3,96±0,72 <sup>ab</sup> | 4,16±0,73 <sup>a</sup> | <b>3,88±0,32</b> |
| <b>Rataan</b>                      | <b>3,23±0,29</b>                            | <b>3,44±0,47</b>        | <b>3,83±0,28</b>       |                  |

Keterangan : Angka-angka pada baris yang sama diikuti oleh huruf kecil yang sama dan angka-angka pada kolom yang sama diikuti oleh huruf besar yang sama berbeda tidak nyata taraf 5%

Tabel 20 menunjukkan bahwa rata-rata nilai organoleptik aroma kefir pada Faktor A berada pada kisaran 3,20–3,88, sedangkan rata-rata pada Faktor B berada pada kisaran 3,23–3,83. Nilai organoleptik aroma tertinggi diperoleh pada kombinasi perlakuan A3B3 dengan nilai 4,16, sedangkan nilai terendah diperoleh pada kombinasi perlakuan A1B1 dengan nilai 2,94. Hasil ini menunjukkan bahwa

peningkatan konsentrasi starter BAL dan penambahan ekstrak bunga telang cenderung meningkatkan tingkat kesukaan panelis terhadap aroma frozen kefir.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Pertiwi *et al.* (2023) yang melaporkan bahwa peningkatan aktivitas fermentasi kefir dengan penggunaan starter bakteri asam laktat mampu meningkatkan penerimaan panelis terhadap aroma produk. Pertiwi *et al.* (2023) menyatakan bahwa aroma kefir yang lebih disukai berkaitan dengan terbentuknya senyawa volatil hasil metabolisme mikroba, seperti asam organik dan senyawa pembentuk flavor lainnya selama proses fermentasi.

Secara umum, nilai kesukaan aroma frozen kefir pada penelitian ini berada pada kategori “agak suka”, yang menunjukkan bahwa aroma yang dihasilkan masih dapat diterima dengan baik oleh panelis. Mandang *et al.* (2016) menyatakan bahwa starter berperan penting dalam pembentukan aroma kefir melalui produksi senyawa volatil seperti etanol, asam organik, dan komponen pembentuk flavor lainnya. Senyawa-senyawa tersebut memberikan karakter aroma khas pada produk fermentasi susu.

Pengaruh penambahan ekstrak bunga telang terhadap aroma frozen kefir relatif lebih kecil dibandingkan dengan pengaruh konsentrasi starter BAL. Hal ini sejalan dengan laporan Pertiwi *et al.* (2023) yang menyebutkan bahwa bunga telang tidak memberikan kontribusi aroma yang dominan, karena perannya lebih sebagai sumber pigmen antosianin dibandingkan senyawa volatil. Hartatie (2011) juga menegaskan bahwa aroma produk fermentasi lebih dipengaruhi oleh mikroorganisme dan proses fermentasi dibandingkan oleh bahan tambahan yang tidak memiliki aroma khas kuat.

### **c. Warna**

Hasil analisis keragaman menggunakan uji Friedman menunjukkan adanya pengaruh yang nyata ( $P < 0,05$ ) antara konsentrasi starter bakteri asam laktat (BAL) (Faktor A) dan konsentrasi ekstrak bunga telang (Faktor B) terhadap nilai organoleptik warna kefir. Rataan penilaian kesukaan panelis terhadap warna kefir disajikan pada Tabel 21.

Tabel 21. Rataan nilai organoleptik warna kefir dengan konsentrasi ekstrak bunga telang dan konsentrasi starter BAL

| Konsentrasi starter BAL (Faktor A) | Konsentrasi ekstrak bunga telang (Faktor B) |                        |                        | Rataan           |
|------------------------------------|---|------------------------|------------------------|------------------|
|                                    | B1  | B2                     | B3                     |                  |
| A1                                 | 1,82±0,84 <sup>f</sup>                      | 2,90±0,70 <sup>d</sup> | 3,68±0,91 <sup>c</sup> | <b>2,80±0,93</b> |
| A2                                 | 2,14±0,78 <sup>f</sup>                      | 3,06±0,93 <sup>d</sup> | 4,00±0,75 <sup>b</sup> | <b>3,06±0,93</b> |
| A3                                 | 2,64±0,94 <sup>c</sup>                      | 3,04±0,83 <sup>d</sup> | 4,52±0,57 <sup>a</sup> | <b>3,40±0,99</b> |
| <b>Rataan</b>                      | <b>2,20±0,41</b>                            | <b>3,00±0,08</b>       | <b>4,06±0,42</b>       |                  |

Keterangan : Angka-angka pada baris yang sama diikuti oleh huruf kecil yang sama dan angka-angka pada kolom yang sama diikuti oleh huruf besar yang sama berbeda tidak nyata taraf 5%

Tabel 21 menunjukkan bahwa rata-rata nilai organoleptik warna kefir pada Faktor A berada pada kisaran 2,80–3,40, sedangkan rata-rata pada Faktor B berada pada kisaran 2,20–4,06. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan ekstrak bunga telang memberikan pengaruh yang lebih dominan terhadap tingkat kesukaan panelis terhadap warna dibandingkan dengan variasi konsentrasi starter BAL. Nilai organoleptik warna tertinggi diperoleh pada kombinasi perlakuan A3B3 dengan nilai 4,52, sedangkan nilai terendah diperoleh pada kombinasi perlakuan A1B1 dengan nilai 1,82.

Pola peningkatan nilai kesukaan warna yang tajam seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak bunga telang menunjukkan bahwa atribut warna merupakan parameter sensori yang paling responsif terhadap penambahan bunga telang. Hasil ini sejalan dengan Pertiwi *et al.* (2023) yang melaporkan bahwa penambahan ekstrak bunga telang pada produk kefir secara nyata meningkatkan intensitas warna dan tingkat penerimaan panelis. Pertiwi *et al.* (2023) menyebutkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak bunga telang menyebabkan perubahan warna kefir dari biru keabuan menjadi biru tua hingga keunguan, yang dinilai lebih menarik secara visual oleh panelis.

Secara umum, nilai kesukaan warna frozen kefir pada penelitian ini berada pada kategori “agak suka” hingga “suka”, yang menunjukkan bahwa warna yang dihasilkan masih dapat diterima dengan baik. Angriani (2019) menjelaskan bahwa

antosianin pada bunga telang mampu menghasilkan berbagai variasi warna, mulai dari merah, ungu, hingga biru, bergantung pada konsentrasi pigmen dan kondisi lingkungan seperti pH.

#### d. Tekstur

Hasil analisis keragaman menggunakan uji Friedman menunjukkan adanya pengaruh yang nyata ( $P < 0,05$ ) antara konsentrasi starter bakteri asam laktat (BAL) (Faktor A) dan konsentrasi ekstrak bunga telang (Faktor B) terhadap nilai organoleptik tekstur kefir. Rataan penilaian kesukaan panelis terhadap tekstur kefir disajikan pada Tabel 22.

Tabel 22. Rataan nilai organoleptik tekstur kefir dengan konsentrasi ekstrak bunga telang dan konsentrasi starter BAL

| Konsentrasi starter BAL (Faktor A) | Konsentrasi ekstrak bunga telang (Faktor B) |                        |                        | Rataan           |
|------------------------------------|---|------------------------|------------------------|------------------|
|                                    | B1  | B2                     | B3                     |                  |
| A1                                 | 2,06±0,68 <sup>f</sup>                      | 2,52±0,61 <sup>e</sup> | 2,72±0,49 <sup>d</sup> | <b>2,42±0,33</b> |
| A2                                 | 2,94±0,58 <sup>c</sup>                      | 3,16±0,76 <sup>c</sup> | 3,94±0,65 <sup>b</sup> | <b>3,34±0,52</b> |
| A3                                 | 4,08±0,85 <sup>ab</sup>                     | 4,14±0,72 <sup>a</sup> | 4,30±0,70 <sup>a</sup> | <b>4,17±0,11</b> |
| <b>Rataan</b>                      | <b>3,02±1,01</b>                            | <b>3,27±0,81</b>       | <b>3,65±0,82</b>       |                  |

Keterangan : Angka-angka pada baris yang sama diikuti oleh huruf kecil yang sama dan angka-angka pada kolom yang sama diikuti oleh huruf besar yang sama berbeda tidak nyata taraf 5%

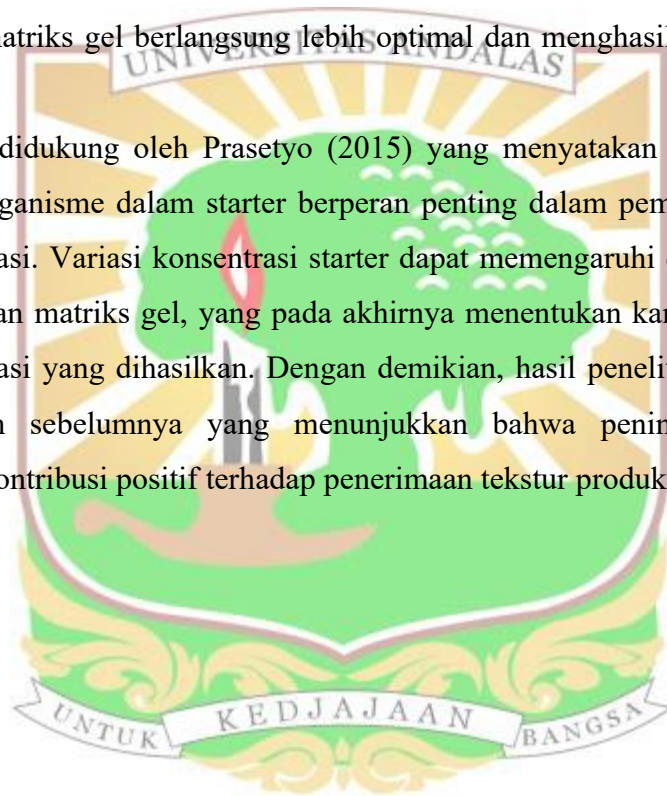
Nilai organoleptik tekstur frozen kefir tertinggi diperoleh pada kombinasi perlakuan A3B3 dengan nilai 4,30, sedangkan nilai terendah diperoleh pada kombinasi perlakuan A1B1 dengan nilai 2,06. Pola ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi starter BAL, terutama ketika dikombinasikan dengan penambahan ekstrak bunga telang, mampu menghasilkan tekstur frozen kefir yang lebih disukai oleh panelis.

Secara umum, nilai kesukaan tekstur frozen kefir berada pada rentang 2,42–4,17, yang termasuk dalam kategori “agak suka” hingga “suka”. Hasil ini sejalan dengan Pertiwi *et al.* (2023) yang melaporkan bahwa peningkatan konsentrasi starter dan penambahan ekstrak bunga telang pada kefir dapat meningkatkan kekentalan dan kekenyalan produk, sehingga memberikan sensasi tekstur yang lebih halus dan

kompak. Tekstur yang lebih baik tersebut berkaitan dengan meningkatnya aktivitas fermentasi yang memengaruhi struktur matriks protein dan polisakarida selama proses fermentasi.

Peningkatan kesukaan terhadap tekstur pada penelitian ini diduga berkaitan dengan aktivitas mikroorganisme selama fermentasi, yang berperan dalam pembentukan struktur gel dan kekentalan produk. Semakin tinggi konsentrasi starter BAL, semakin besar aktivitas metabolik yang terjadi, sehingga degradasi protein dan pembentukan matriks gel berlangsung lebih optimal dan menghasilkan tekstur yang lebih stabil.

Hal ini didukung oleh Prasetyo (2015) yang menyatakan bahwa jenis dan jumlah mikroorganisme dalam starter berperan penting dalam pembentukan tekstur produk fermentasi. Variasi konsentrasi starter dapat memengaruhi degradasi protein dan pembentukan matriks gel, yang pada akhirnya menentukan karakteristik tekstur produk fermentasi yang dihasilkan. Dengan demikian, hasil penelitian ini konsisten dengan temuan sebelumnya yang menunjukkan bahwa peningkatan aktivitas fermentasi berkontribusi positif terhadap penerimaan tekstur produk kefir.



## BAB V

### PENUTUP

#### A. Kesimpulan

1. Bakteri asam laktat berhasil diisolasi dari susu kambing etawa asal Kota Padang, Sumatra Barat yang diuji dan berpotensi sebagai probiotik dengan ditemukannya *Lactobacillus plantarum* sebagai mikroorganisme pembuatan starter kefir
2. Hasil menunjukkan pengaruh yang nyata ( $P < 0.05$ ) pada masing-masing faktor beserta nilai terbaik dimana pemberian konsentrasi starter berpengaruh terhadap nilai pH (4,29), kadar lemak (38,54%), TTA (1,44) total koloni BAL ( $87,44 \times 10^8$ ) dan aktivitas antioksidan (67,38%). Namun, menunjukkan pengaruh yang tidak nyata ( $P > 0.05$ ) terhadap kadar air (86,56%) dan kadar protein (41,40%). Kemudian pada nilai organoleptik menunjukkan disukai panelis dengan skor terhadap rasa (3,34), aroma (3,50), warna (3,08), dan tekstur (3,31).

#### B. Saran

Pembuatan frozen kefir menggunakan starter bakteri asam laktat dari *Lactobacillus plantarum* sebaiknya dengan penambahan starter 6% dan ekstrak bunga telang 10%. Kemudian disarankan untuk penelitian selanjutnya dapat melakukan pengamatan terhadap lama penyimpanan kefir.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adawiyah, S.R., Hafsan, H., Nur, F. And Mustami, M.K. (2015) ‘Ketahanan Bakteri Asam Laktat Asal Dangke Terhadap Garam Empedu sebagai Kandidat Probiotik’, In Seminar Nasional Mikrobiologi Kesehatan Dan Lingkungan, Makassar, Indonesia.
- Afaroh, F.R. And Suryani, L. (2023) ‘Optimization of pH to Bacteriocin Production By Lactic Acid Bacteria Growol Isolate Against Salmonella Typhi’, Proceedings Of Universitas Muhammadiyah Yogyakarta Graduate Conference, 3(2), Pp. 139–145.  
<https://doi.org/10.18196/Umygrace.V3I2.601>
- Ağagündüz, D., Yılmaz, B., Şahin, T.O., Güneşliol, B.E., Ayten, S., Russo, P., Spano, G., Rocha, J.M., Bartkiene, E. and Özogul, F. (2021) ‘Dairy Lactic Acid Bacteria and Their Potential Function in Dietetics: The Food–Gut–Health Axis’, *Foods*, 10(12), pp. 1–33.
- Ahmad, A. (2014) *Bioteknologi Dasar*. Makassar: Fakultas MIPA, Universitas Hasanuddin.
- Albaarri, A.N. And Murti, T.W. (2003) ‘Analisa pH, Keasaman dan Kadar Laktosa Pada Yakult, Yoghurt, Kefir’, in Simposium Nasional Hasil-Hasil Penelitian di Unika Soegijapranata, Semarang, 22 Maret 2003.
- Alsharksi, A.N., Sirekbasan, S., Gürkök-Tan, T. And Mustapha, A. (2024) ‘From Tradition to Innovation: Diverse Molecular Techniques in The Fight Against Infectious Diseases’, *Diagnostics*, 14(24), P. 2876.
- Al-Snafi, A.E. (2016) ‘Medicinal Plants with Antimicrobial Activities (Part 2): Plant-Based Review’, *Scholars Academic Journal Of Pharmacy*, 5(6), Pp. 208–239.  
<https://doi.org/10.21276/Sajp.2016.5.6.2>
- Amalia, L. (2012) *Makanan Tetap untuk Balita*. Depok: Kawan Pustaka.
- Amigo, L. and Fotencha, J. (2011) ‘Goat milk’, in Fuquay, J.W., Fox, P.F. and McSweeney, P.L.H. (eds.) *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2nd edn. London: Elsevier Ltd., pp. 484–493.

- Anastiawan (2014) *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Probiotik yang Berasal Dari Usus Itik Pedaging (Anas domesticus)*. Skripsi. Universitas Hasanuddin.
- Angriani, L. (2019) 'Potensi Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria Ternatea*) Sebagai Pewarna Alami Lokal pada Industri Pangan', *Canrea Journal*, 2(1), Pp. 32–37
- Anto, A. (2021) 'Mengenal Bunga Telang, Si Biru dengan Beragam Manfaat'. Available at: <http://kalteng.litbang.pertanian.go.id/ind/index.php/publikasi-mainmenu-47-47/artikel/1402mengenal-bunga-telang-si-biru-dengan-beragam-manfaat> (Accessed: 17 July 2025).
- AOAC (2005) *Official Methods of Analysis*. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Arena, M.P., Silvain, A., Normanno, G., Grieco, F., Drider, D., Spano, G. And Fiocco, D. (2016) 'Use of *Lactobacillus Plantarum* Strains As Bio-Control Strategy Against Food-Borne Pathogenic Microorganisms', *Frontiers In Microbiology*, 7, Pp. 464–474.
- Arief, E., Somen, S., Roza, E., Pazla, R. And Rizqan (2018) 'Production and Quality of Etawa Raw Milk Using Palm Oil Industry Waste and Paitan Plants As An Early Feed', *Pakistan Journal Of Nutrition*, 17(8), Pp. 399–404.
- Arora, R., Bhojak, N. And Joshi, R. (2013) 'Comparative Aspects of Goat and Cow Milk', *International Journal Of Engineering Science Invention*, 2(1), Pp. 7–10.R
- Arum, H.P. And Purwidiani, N. (2014) 'Pengaruh Jumlah Ekstrak Jahe dan Susu Skim Terhadap Sifat Organoleptik Yoghurt Susu Kambing Etawa', *E-Journal Boga*, 3(3), Pp. 116–124.
- Asfiya, N.A., Novalina, D. And Astuti, T.D. (2024) 'Potensi dan Uji Stabilitas Ekstrak *Lawsonia Inermis* sebagai Cat Penutup pada Gram Staining Dengan Variasi Suhu', *Borneo Journal of Medical Laboratory Technology*, 6(2), Pp. 540–546. <https://doi.org/10.33084/Bjmlt.V6I2.6736>.
- Astarini, I., Ardiana, S., Putra, I.N., Pertiwi, P., Sembiring, A., Yusmalinda, A. And Al Malik, D. (2021) 'Genetic Diversity And Phylogenetics of Longtail Tuna (*Thunnus Tonggol*) Landed in Pabean Fish Market, Surabaya', *Musamus Fisheries And Marine Journal*, 3(2), Pp. 107–115. <https://doi.org/10.35724/Mfmj.V3I2.3375>

- Astawan, M. (2011) *Pangan Fungsional untuk Kesehatan yang Optimal*. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian IPB.
- Badan Standardisasi Nasional (2006a) *SNI 2354.2:2015 Mutu dan Cara Uji Kadar Air pada Produk Perikanan*. Jakarta: BSN.
- Badan Standardisasi Nasional (2006b) *SNI 2354.3:2017 Mutu dan Cara Uji Kadar Lemak pada Produk Perikanan*. Jakarta: BSN.
- Badan Standardisasi Nasional (2006c) *SNI 01-234.2.2006 Mutu dan Cara Uji Kadar Protein pada Produk Perikanan*. Jakarta: BSN.
- Badan Standardisasi Nasional (2009) *SNI 2981:2009 Yogurt*. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
- Barus, P. (2005) 'Studi Penentuan Kandungan Karbohidrat, Protein dan Mineral dalam Air Rebusan Beras sebagai Minuman Pengganti Susu', *Jurnal Sains Kimia (Suplemen)*, 9(3), pp. 15–16.
- Bayu, K.M., Rizqiati, H. and Nurwantoro (2017) 'Analisis Total Padatan Terlarut, Keasaman, Kadar Lemak, dan Tingkat Viskositas pada Kefir Optima dengan Lama Fermentasi Yang Berbeda', *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 1(2), pp. 33–38.
- Bhat, T.A. and Al-Khayri, J.M. (2023) *Genetic Engineering: Volume 1: Principles, Mechanism, and Expression*. Boca Raton: CRC Press.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan (2005) *Peraturan Kepala BPOM Republik Indonesia Nomor HK.00.05.1.52.0685 Tahun 2005 tentang Ketentuan Pokok Pengawasan Pangan Fungsional*. Jakarta: BPOM. (Accessed: 16 July 2023).
- Budiasih, K.S. (2017) 'Kajian Potensi Farmakologis Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.)', in *Prosiding Seminar Nasional Kimia UNY: Sinergi Penelitian dan Pembelajaran untuk Mendukung Pengembangan Literasi Kimia pada Era Global*, FMIPA UNY, 14 Oktober 2017.
- Cahyani, A.I. (2017) Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Kulit Batang Kayu Jawa (*Lannea coromandelica*) dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil). Skripsi. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah,

Jakarta.

- Cai, H., Archambault, M. and Prescott, J.F. (2003) '16S Ribosomal RNA Sequence-Based Identification of Veterinary Clinical Bacteria', *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 15, pp. 465–469.
- Campos, D.C.D.S., Neves, L.T.B.C., Flach, A., Costa, L.A.M.A. and Sousa, B.O.D. (2017) 'Post-Acidification and Evaluation of Anthocyanin Stability and Antioxidant Activity in Fermented Milk and Yogurt (*Euterpe oleracea* Mart.)', *Revista Brasileira de Fruticultura*, 39, e-871.
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N. and Alland, D. (2007) 'A detailed Analysis of 16S Ribosomal RNA Gene Segments for the Diagnosis of Pathogenic Bacteria', *Journal of Microbiological Methods*, 69, pp. 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005>
- Christanto, A., Soekardono, S., Primadewi, N., Surono, A. and Widada, J. (2003) Uji Molekuler (Polymerase Chain Reaction) pada Otitis Media Supuratif Kronik Benigna Aktif. Yogyakarta: Departemen THT-KL Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada/RS Dr. Sardjito.
- Chu, B.S.(2016) 'Effect of Sucrose on Thermal and pH Stability of *Clitoria ternatea* Extract', *International Journal of Food Processing Technology*, 3(1), pp. 11–17. <https://doi.org/10.15379/2408-9826.2016.03.01.02>
- Chusak, C., Thilavech, T., Henry, C.J. and Adisakwattana, S. (2018) 'Acute Effect of *Clitoria Ternatea* Flower Beverage on Glycemic Response and Antioxidant Capacity in Healthy Subjects: A Randomized Crossover Trial', *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(6), pp. 1–18.
- Codex Alimentarius Commission (2003) Milk and Milk Products (CODEX STAN 243-2003). Rome: World Health Organization (WHO) and Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Coelho, M.C., Malcata, F.X. and Silva, C.C.G. (2022) 'Lactic Acid Bacteria in Raw-Milk Cheeses: from Starter Cultures to Probiotic Functions', *Foods*, 11(15). <https://doi.org/10.3390/foods11152276>
- Cotter, P.D. and Hill, C. (2003) 'Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH', *Microbiology and Molecular Biology*

Reviews, 67, pp. 429–453.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia (2005) Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 23 Tahun 2005 Tentang Kesehatan. Jakarta: Depkes RI.

Depson, R. (2012) *Identifikasi Molekuler dan Pengaruh Pemberian Potensial Probiotik Bakteri Asam Laktat (BAL) Asal Dadiah terhadap Kolesterol Daging Itik Bayang Sumber Daya Genetik Sumatera Barat*. Tesis. Universitas Andalas, Padang.

Dhanasekaran, S., *et al.* (2019) ‘Efficacy of Crude Extracts of *Clitoria ternatea* for Antibacterial Activity Against Gram-Negative Bacterium (*Proteus Mirabilis*)’, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, p. 101328. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101328>

Erlita, Y. (2017) ‘Kandungan dan Manfaat Susu Kambing’, *Portal Resmi Provinsi Sumatera Barat*. Available At: (Accessed: 20 July 2025).

Ensminger, M.E. (2001) *Sheep and Goat Science*. 6th edn. Danville, Illinois: Interstate Publishers Inc.

Fardiaz, S. (1992) *Fisiologi Fermentasi*. Bogor: Pusat Antar Universitas, Lembaga Sumber Daya Informasi, Institut Pertanian Bogor.

Feliatra (2002) *Implementasi dan Pengembangan Bioteknologi kelautan dalam upaya optimalisasi pemanfaatan laut Indonesia*. Makalah Pengukuhan Guru Besar. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Riau, Pekanbaru, 5 November 2002.

Ferawati, Purwati, Juliyarsi, Suharto, Harun and Amelia (2019) *Paten pembuatan kefir dengan fermentasi bertingkat*. No. S00202006383.

Fijan, S. (2014) ‘Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature’, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(5), pp. 4745–4767.

Finanda, A., Mukarlina and Rahmawati (2021) ‘Isolasi dan karakterisasi genus bakteri asam laktat dari fermentasi daging buah pisang kepok (*Musa paradisiaca* L.)’, *Jurnal Protobiont*, 10(2), pp. 37–41. <https://doi.org/10.26418/protobiont.v10i2.53897>

- Firdausi, N. (2016) 'Implementasi elektroforesis DNA (*deoxyribonucleic acid*) menggunakan image processing dengan logika fuzzy', [jenis publikasi tidak dicantumkan].
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Health Organization (WHO) (2002) *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food: Report of a Joint FAO/WHO Working Group*. London (ON): FAO/WHO.
- Gymnastiar, M.G., Wulandari, E. and Pratama, A. (2024) 'Pengaruh penambahan ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) terhadap pH, kadar alkohol, dan antioksidan kefir susu kambing', *Madani Jurnal Ilmiah Multidisiplin*, 2(7), pp. 688–694.
- Haddar, A., *et al.* (2013) 'Characterization of *Lactobacillus* from Algerian goat's milk', *PLoS ONE*.
- Hanum, Z., *et al.* (2021) 'Kefir susu kambing dengan penambahan ekstrak etanol kembang telang (*Clitoria ternatea*)', *Jurnal Veteriner*, 22(3), pp. 406–413.
- Harnentis, H., Marlida, Y., Nur, Y.S., Wizna, W., Santi, M.A., Septiani, N., Adzitey, F. and Huda, N. (2020) 'Novel probiotic lactic acid bacteria isolated from indigenous fermented foods from West Sumatera, Indonesia', *Veterinary World*, 13(9), pp. 1922–1928.
- Hartatie, E.S. (2011) 'Kajian formulasi dan metode pembuatan terhadap kualitas es krim', *GAMMA*, 7(1), pp. 20–26.
- Hartono, M.A., Purwijantiningsih, L.M.E. and Pranata, S. (2013) 'Pemanfaatan ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) sebagai pewarna alami es lilin', *Jurnal Biologi*, pp. 1–15.
- Hassler, H.B., Probert, B., Moore, C., Lawson, E., Jackson, R.W., Russell, B.T. (2022) 'Phylogenies of the 16S rRNA gene and its hypervariable regions lack concordance with core genome phylogenies', *Microbiome*, 10, p. 104. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01295-y>
- Hatti-Kaul, R., Chen, L., Dishisha, T. and El Enshasy, H. (2018) 'Lactic acid

bacteria: From starter cultures to producers of chemicals’, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 365(20), pp. 1–20.

Hidayatullah, A., Jajang, G. and Harlia, E. (2019) ‘Potensi senyawa metabolit yang dihasilkan *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 sebagai bahan biopreservasi dan antibakteri pada bahan pangan asal hewan’, *Jurnal Ilmu Ternak dan Produksi (JITP)*, 7(2).

Huang, Y.C., Chang, Y.H. and Shao, Y.Y. (2005) ‘Effect of genotype and treatment on the antioxidant activity of sweet potato in Taiwan’, *Food Chemistry*, 98, pp. 29–38.

Huda, U.R. (2020) *Isolasi dan identifikasi dengan gen 16S rRNA bakteri endofit dari daun pepaya (*Carica papaya* L.) serta uji aktivitas antibakterinya*. Skripsi. Universitas Perintis Indonesia.

Humayun Kober, A.K.M., Rajoka, M.S.R., Mehwish, H.M., Villena, J. and Kitazawa, H. (2022) ‘Immunomodulation potential of probiotics: A novel strategy for improving livestock health, immunity, and productivity’, *Microorganisms*, 10(2), pp. 1–20.

Indriyati, A.S. (2010) *Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat (BAL) dari susu formula balita yang berpotensi menghasilkan substansi antimikroba*. Skripsi. UIN Sunan Kalijaga, Yogyakarta. Available at: <http://repositori.uinalauddin.ac.id/2097/1/winarsih%20andani.pdf> (Accessed: 15 July 2025).

Intarapanich, A., Kaewkamnerd, S., Shaw, P.J., Ukosakit, K., Tragoonrung, S. and Tongshima, S. (2015) ‘Automatic DNA diagnosis for 1D gel electrophoresis images using bioimage processing technique’, *BMC Genomics*.

Irma, A., Lukman, J.B. and Nurfadillah, A. (2022) ‘Karakterisasi mikrobiota mulut penghasil senyawa antimikroba: Laboratory research’, *Journal of Vocational Health Science*, 1(1), pp. 34–39.

Istianah, N., Fitriadinda, H. and Murtini, E.S. (2019) *Perancangan pabrik untuk industri pangan*. Malang: Universitas Brawijaya Press.

Jäger, R. and Weiher, H. (2020) ‘Polymerase chain reaction’, in *An Introduction to Molecular Biotechnology: Fundamentals, Methods and Applications*.

- Janda, J.M. and Abbott, S.L. (2007) '16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils and pitfalls', *Journal of Clinical Microbiology*, 45, pp. 2761–2764.
- Johnson, J.S., Spakowicz, D.J., Hong, B.Y., Petersen, L.M., Demkowicz, P. and Chen, L., (2019) 'Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis', *Nature Communications*, 10, p. 5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Junaidi, A. and Wikandari, P.R. (2020) 'Pengaruh lama fermentasi ekstrak ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas*) dengan *Lactobacillus plantarum* B1765 terhadap mutu minuman fermentasi', *Unesa Journal of Chemistry*, 9(1), pp. 78–82. <https://doi.org/10.26740/ujc.v9n1.p78-82>
- Karim, K. (2019) 'Polymerase chain reaction (PCR): Principle and applications', in Nagpal, M.L., Boldura, O.-M., Balta, C. and Enany, S. (eds.) *Synthetic Biology – New Interdisciplinary Science*. London: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86491>
- Kartikasari, R. (2018) *Eksplorasi bakteri asam laktat dari saluran pencernaan kerang pisau (Solen spp.) yang berpotensi sebagai probiotik di Pesisir Selatan Kabupaten Bangkalan, Madura*. Skripsi. Universitas Brawijaya. Available at: <https://journal.unnes.ac.id/nju/index.php/biosaintifika/article/view/3956> (Accessed: 17 July 2025).
- Kaushal, J., Mehandia, S., Singh, G., Raina, A. and Arya, S.K. (2018) 'Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, pp. 192–199.
- Kaźmierczak-Siedlecka, K., Daca, A., Folwarski, M., Witkowski, J.M., Bryl, E. and Makarewicz, W. (2020) 'The role of *Lactobacillus plantarum* 299v in supporting treatment of selected diseases', *Central European Journal of Immunology*, 45(4), pp. 488–493. <https://doi.org/10.5114/ceji.2020.101515>
- Kieronczyk, A., Skeie, S., Langsrud, T., Le Bars, D. and Yvon, M. (2004) 'The nature of aroma compounds produced in a cheese model by glutamate dehydrogenase-positive *Lactobacillus* INF15D depends on its relative aminotransferase activities towards different amino acids', *International Dairy Journal*, 14(3), pp. 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.07.001>

- Kurnia, M., Amir, H. and Handayani, D. (2020) 'Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat dari makanan tradisional suku Rejang di Provinsi Bengkulu: "Lemea"', *Alotrop*, 4(1), pp. 25–32. <https://doi.org/10.33369/atp.v4i1.13705>
- Kusumaningrum, H., Budi, W., Azam, M. and Bawono, A. (2014) 'Design of electrophoresis device for optimization of DNA visualization and DNA concentration using software', *Jurnal Pendidikan Fisika Indonesia*.
- Kusumawati, N., Bettysri, L.J., Siswa, S., Ratihdewanti and Hariadi (2008) 'Seleksi bakteri asam laktat indigenous sebagai galur probiotik dengan kemampuan menurunkan kolesterol', *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, 2(1), pp. 120–128.
- Lakshan, S.A.T., *et al.* (2019) 'A commercial potential blue pea (*Clitoria ternatea* L.) flower extract incorporated beverage having functional properties', *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2916914>
- Legowo, A.M., Kusrahayu and Mulyani, S. (2009) *Ilmu dan Teknologi Susu*. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro.
- Lengkey, H.A.W., Siwi, J.A. and Balia, R.L. (2013) 'The effect of various starter dosages on kefir quality', *Lucrări Științifice Seria Zootehnie*, 59.
- Liang, Z., Huang, Y., Zhang, P. and Fang, Z. (2023) 'Impact of fermentation on the structure and antioxidant activity of selective phenolic compounds', *Food Bioscience*, 56, p. 103147.
- Liutkevičius, A. and Šarkinas, A. (2004) 'Studies on the growth conditions and composition of kefir grains as a food and forage biomass', *Veterinarija ir Zootechnika*, 25, pp. 64–70.
- Lubis, K. (2014) 'Cara pembuatan pohon filogeni', *Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat*, 20(75), pp. 66–69.
- Magno, S., *et al* (2019) 'Safety and probiotic functionality of isolated goat milk lactic acid bacteria', *Annals of Microbiology*.
- Mantzourani, I., Kazakos, S., Terpou, A., Alexopoulos, A., Bezirtzoglou, E., Bekatorou, A. and Plessas, S. (2018) 'Potential of the probiotic

*Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 strain to produce functional fermented pomegranate juice', *Foods*, 8(1), p. 4.  
<https://doi.org/10.3390/foods8010004>

Malaka, R. and Laga, A. (2005) 'Isolasi dan identifikasi *Lactobacillus bulgaricus* strain ropy dari yogurt komersial', *Jurnal Sains dan Teknologi*, 5(1), pp. 50–58.

Mandang, O.F., Dien, H. and Yelnetty, A. (2016) 'Aplikasi penambahan konsentrasi susu skim terhadap kefir susu kedelai (*Glycine max*)', *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*, 4(1), pp. 9–17.

Marpaung, A.M. (2020) 'Tinjauan manfaat bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) bagi kesehatan manusia', *Journal of Functional Food and Nutraceutical*, 1(2), pp. 1–23. <https://doi.org/10.33555/jffn.v1i2.30>

Marpaung, A.M., Lee, M. and Kartawiria, I.S. (2020) 'The development of butterfly pea (*Clitoria ternatea*) flower powder drink by co-crystallization', *Indonesian Food Science and Technology Journal*, 3(2), pp. 34–37.  
<https://doi.org/10.22437/ifstj.v3i2.10185>

Martharini, D. and Indratiningsih, I. (2017) 'Mikrobiologis dan kimiawi kefir susu kambing dengan penambahan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 dan tepung kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca*)', *Agritech*, 37(1).

Mathur, H., Beresford, T.P. and Cotter, P.D. (2020) 'Health benefits of lactic acid bacteria (LAB) fermentates', *Nutrients*, 12(6), p. 1679.

Melia, S., Yuherman, Ferawati, Jaswandi, Purwanto, H. and Purwati, E. (2018) 'Kualitas nutrisi dan kandungan mikrobiologi pada susu kerbau, sapi dan kambing dari Sumatera Barat', *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 23(3), pp. 150–157. <https://doi.org/10.14334/jitv.v23i3.1594>

Melia, S., Novia, D. and Juliyarsi, I. (2015) 'Antioxidant and antimicrobial activities of gambir (*Uncaria gambir* Roxb.) extracts and their application in rendang', *Pakistan Journal of Nutrition*, 14(12), pp. 938–941.

Moeljanto (2002) *Khasiat dan manfaat susu kambing*. Depok: Agromedia Pustaka.

Morales, G., Sierra, P., Mancilla, A., Paredes, A., Loyola, L.A., Gallardo, O. (2003) 'Secondary metabolites from four medicinal plants from Northern Chile:

Antimicrobial activity and biotoxicity against *Artemia salina*', *Journal of the Chilean Chemical Society*, 48(2).

- Muhammad, E.R. and Rabeta, M.S. (2018) 'A potential of telang tree (*Clitoria ternatea*) in human health', *Food Research*, 2(5), pp. 415–420. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.2\(5\).073](https://doi.org/10.26656/fr.2017.2(5).073)
- Mulaw, G., Tessema, S., Muleta, D. and Tesfaye, A. (2019) 'In vitro evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from some traditionally fermented Ethiopian food products', *International Journal of Microbiology*, 2019, p. 7179514.
- Mulyani, R., Adi, P. and Yang, J.J. (2023) 'Produk fermentasi tradisional Indonesia berbahan dasar pangan hewani (daging dan ikan): A review', *Journal of Applied Agriculture, Health, and Technology*, 1(2), pp. 34–48. <https://doi.org/10.20961/jaht.v1i2.473>
- Mustopa, A. (2009) *Koleksi protokol laboratorium virologi molekuler*. Bogor: Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.
- Nadia, L.S., Sutakwa, A. and Suharman, S. (2020) 'Pengaruh penambahan ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea*) terhadap pertumbuhan bakteri asam laktat pada pembuatan yogurt telang', *Journal of Food and Culinary*, 3(1), p. 10.
- Nasution, A.P.A., Erina, E., Darmawi, D., Darniati, D., Ismail, I. and Thasmi, C.N. (2017) 'Total bakteri asam laktat (BAL) pada caecum puyuh (*Coturnix japonica*)', *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Veteriner*, 1(4), pp. 774–779. <https://doi.org/10.21157/jim%20vet.v1i4.5470>
- Nikunj Kumar, B.D. and Dhruvil (2012) *Molecular identification of bacteria using 16S rDNA sequencing*. Gujarat: Gujarat University.
- Nur'Aini, K., Prabaningtyas, S., Febrisiantosa, A. and Trinugraha, A.C. (2024) 'Evaluation of butterfly pea powder addition to cow's milk kefir on antibacterial activity against foodborne bacteria', *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1377(1), 012047.
- Nurhayati, L.S., Yahdiyani, N. and Hidayatulloh, A. (2020) 'Perbandingan pengujian aktivitas antibakteri starter yogurt dengan metode difusi sumuran dan metode difusi cakram', *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*, 1(2), pp. 41–46.

- Nuryady, M., Istiqomah, T., Faizah, R., Ubaidillah, S., Mahmudi, Z. and Sutoyo (2013) 'Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat asal yoghurt', *UNEJ Jurnal*, 1, pp. 1–11.
- Oliveira, I., Santos-Buelga, C., Aquino, Y., Barros, L. and Heleno, S.A. (2025) 'New frontiers in the exploration of phenolic compounds and other bioactives as natural preservatives', *Food Bioscience*, p. 106571.
- Otes, S. and Cagindi, O. (2003) 'Kefir: A probiotic dairy composition, nutritional and therapeutic aspects', *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(2), pp. 54–59.
- Padmawati, I.G.A., Pratiwi, I.D.P.K. and Wiadnyani, A.A.I.S. (2022) 'Pengaruh penambahan ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* Linn) terhadap karakteristik marshmallow', *Itepa: Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*, 11(1), pp. 43–54.
- Pangastuti, A. (2006) 'Definisi spesies prokaryota berdasarkan urutan basa gen penyandi 16S rRNA dan gen penyandi protein', *Biodiversitas*, 7(3), pp. 292–296.
- Paz, N.F., De Oliveira, E.G., De Kairuz, M.S.N. and Ramón, A.N. (2014) 'Characterization of goat milk and potentially symbiotic non-fat yogurt', *Food Science and Technology*, 34(3), pp. 629–635.
- Pertiwi, A.F., Taufik, E. and Arief, I.I. (2023) 'Karakteristik kefir susu sapi dengan penambahan ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea*)', *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 28(1), pp. 34–45.
- Pertiwi, F.A., Taufik, E. and Arief, I.I. (2022) 'Karakteristik kefir susu sapi dengan penambahan ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea*)', *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 28(1), pp. 34–45. <https://doi.org/10.18343/jipi.28.1.34>
- Pratama, Y.I., Ardigurnita, F. and Wulansari, P.D. (2021) 'Kefir dengan kombinasi susu sapi dan tepung mocaf terhadap pH, kadar air, total padatan, dan sifat fisik', *Jurnal Sains Peternakan Nusantara*, 1(1), pp. 21–28. <https://doi.org/10.53863/jspn.v1i01.203>
- Prescott, L.M. (2002) *Laboratory exercises in microbiology*. 5th edn. McGraw-Hill.
- Prima, H.S., Susalam, M.K., Fajri, F., Maulana, F. and Yansen, F. (2024) 'Potensi

bakteri asam laktat *Lactobacillus fermentum* diisolasi dari ikan bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singkarak terhadap performa produksi dan penurunan kolesterol puyuh petelur', *Jurnal Peternakan Borneo*, 3(2), pp. 8–21.

Promega Corporation (2010) *DNA analysis protocols*. Available at: <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/>

Purwati, E., Syukur, S. and Hidayat, Z. (2005) 'Lactobacillus sp. isolasi dari Bivicophitomega sebagai probiotik', in *Proceedings Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia*. Jakarta.

Putri, A.L. and Kusdiyantini, E. (2018) 'Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat dari pangan fermentasi berbasis ikan (Inasua) yang diperjualbelikan di Maluku-Indonesia', *Jurnal Biologi Tropika*, 1(2), pp. 6–12. <https://doi.org/10.14710/jbt.1.2.6-12>

Rahayu, W.P. (2001) *Penuntun praktikum penilaian organoleptik*. Bogor: Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.

Raj, T., Chandrasekhar, K., Kumar, A.N. and Kim, S.-H. (2022) 'Recent biotechnological trends in lactic acid bacterial fermentation for food processing industries', *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2(1), pp. 14–40. <https://doi.org/10.1007/s43393-021-00044-w>

Ramadhanti, N., Melia, S., Helliward, J. and Purwati, E. (2021) 'Characteristics of lactic acid bacteria isolated from palm sugar from West Sumatra, Indonesia and their potential as a probiotic', *Biodiversitas*, 22(5), pp. 2610–2616.

Riadi, S., Situmeang, S.M. and Musthari, M. (2017) 'Isolasi dan uji aktivitas antimikroba bakteri asam laktat (BAL) dari yoghurt dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella Typhi*', *Jurnal Biosains*, 3(3), pp. 144–151.

Richana, N. (2011) *Bioetanol: Bahan baku, teknologi, produksi dan pengendalian mutu*. Bandung: Penerbit Nuansa.

Romadhon, Subagiyo and Margino, S. (2012) 'Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat dari usus udang penghasil bakteriosin sebagai agen antibakteria pada produk-produk hasil perikanan', *Jurnal Saintek Perikanan*, 8(1), pp. 59–64.

- Sakpetch, P., Benchama, O., Masniyom, P., Salaipeth, L. and Kanjan, P. (2022) 'Physicochemical characteristics and flavor profiles of fermented fish sauce (budu) during fermentation in commercial manufacturing plant', *Journal of Food Science and Technology*, pp. 1–10.
- Salundik, Suryadi, Mansjoer, S.S., Soepandi, D. and Ridwan, W. (2011) 'Analisis kualitas fisik dan kimia susu sapi perah dengan pakan klobot jagung dari limbah organik pasar', *Agrista*, 15(3).
- Sari, F.M., Rossi, E. and Efendi, R. (2018) 'Viability of lactic acid bacteria (LAB) isolated from ari skin of soybean on bile salt (oxgall) and chloride acid (HCl)', *Jurnal Online Mahasiswa (JOM) Universitas Riau*, 5(2).
- Sari, N.I., Leksono, T. and Yuliana, C.H. (2023) 'Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat pada bekasam ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dengan penambahan dadih', *Agrointek*, 17(4), pp. 854–865.
- Sawitri, M.E. (2005) *Pengaruh konsentrasi kefir grains terhadap kualitas kefir*. Laporan penelitian. Universitas Brawijaya.
- Setiani, B.E., Bintoro, V.P. and Fauzi, R.N. (2021) 'Pengaruh penambahan sari jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) sebagai bahan penggumpal alami terhadap karakteristik fisik dan kimia tahu kacang hijau (*Vigna radiata*)', *Jurnal Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian*, 16(1), pp. 18–34.
- Setiawan, T. and Tanius, A. (2005) *Beternak kambing perah peranakan Ettawa*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Setianingsih, S. (2010) *Kajian senyawa antimikroba bakteri asam laktat homofermentatif isolat ASI*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor.
- Setyawardani, T., Sumarmono, J., Rahardjo, A.H.D., Sulistyowati, M. and Widayaka, K. (2017) 'Kualitas kimia, fisik dan sensori kefir susu kambing yang disimpan pada suhu dan lama penyimpanan berbeda', *Buletin Peternakan*, 41(3), pp. 298–306. <https://doi.org/10.21059/buletinpeternak.v41i3.18266>
- Shahrizal, N.A.B. (2019) *Potensi ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea*) sebagai antioksidan dan inhibitor tirosinase*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor.

- Sivram, P.L. and Vishwanath, P.P. (2012) 'Assessment of probiotic potential of *Lactobacillus* sp. isolated from cheese and preparation of probiotic ice cream', *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 3(4).
- Song, G.Q., Cao, Y., Li, H., Ma, K., Zhao, X.Y., Zou, K.N. (2018) 'Progress in the 16S rRNA gene sequencing in forensic science', *Fa Yi Xue Za Zhi*, 34, pp. 542–548. <https://doi.org/10.12116/j.issn.1004-5619.2018.05.021>
- Standar Nasional Indonesia (2011) *SNI 01-3141-2011 Susu segar*. Dewan Standardisasi Indonesia.
- Suhaeni and Syakur, A. (2016) 'Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat dangke asal Kabupaten Enrekang Sulawesi Selatan', *Biogenesis*, 4(2), pp. 79–83.
- Suhendra, D., Anggiati, G.T., Sarah, S., Nasrullah, A.F., Thimoty, A. and Utama, D.W.C. (2015) 'Tampilan kualitas susu sapi perah akibat imbalanced konsentrasi dan hijauan yang berbeda', *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 25(1), pp. 42–46.
- Sukarini (2006) 'Produksi dan kualitas air susu kambing peranakan Ettawa yang diberi tambahan urea molases blok dan/atau dedak padi pada awal laktasi', *Journal of Animal Production*, 8(3), pp. 196–205.
- Sulistiyani, N. and Dwinta, E. (2023) 'Pengaruh konsentrasi biji kefir dan waktu fermentasi terhadap aktivitas antibakteri kefir susu sapi dan kefir susu kacang tanah pada bakteri *Shigella dysenteriae*', in *Prosiding Seminar Nasional Farmasi Universitas Ahmad Dahlan*, 1.
- Sulmiyati, Said, N.S., Fahrodi, D.U., Malaka, R. and Maruddin, F. (2018) 'Characteristics of lactic acid bacteria isolated from Indonesian commercial kefir grain', *Malaysian Journal of Microbiology*, 14(7), pp. 632–639.
- Sunaryanto, R. and Marwoto, B. (2013) 'Isolasi, identifikasi dan karakterisasi bakteri asam laktat dari dadih susu kerbau', *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*, 14(3), pp. 228–233.
- Suphandi, M., Sugata, M. and Tan, T.J. (2023) 'Aktivitas antimikroba bakteri asam laktat yang diisolasi dari susu sapi di Indonesia', *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*, 8(2), pp. 111–119. <https://doi.org/10.24002/biota.v8i2.6554>
- Supriatna, U., Setyawardani, T. and Sumarmono, J. (2022) 'Pengaruh penambahan bubuk bunga telang terhadap total bakteri asam laktat, asam laktat, dan pH

- kefir susu kambing', *ANGON: Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan*, 4(2), pp. 182–191.
- Surono, I.S. (2004) *Probiotik, susu fermentasi dan kesehatan*. Jakarta: Yayasan Pengusaha Makanan dan Minuman Seluruh Indonesia.
- Suryani, I., Santoso, A. and Juffrie, M. (2010) 'Penambahan agar-agar dan pengaruhnya terhadap kestabilan dan daya terima susu tempe pada mahasiswa Politeknik Kesehatan Jurusan Gizi Yogyakarta', *Jurnal Gizi Klinik Indonesia*, 7(2), pp. 85–91.
- Suryati, N., Bahar, E. and Ilmiawati, I. (2018) 'Uji efektivitas antibakteri ekstrak *Aloe vera* terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* secara in vitro', *Jurnal Kesehatan Andalas*, 6(3), pp. 518–522. <https://doi.org/10.25077/jka.v6i3.732>
- Susanti, I., Kusumaningtyas, R.W. and Ilaningtyas, F. (2007) 'Uji sifat probiotik bakteri asam laktat sebagai kandidat bahan pangan fungsional', *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 18, pp. 89–95.
- Susanti, Awari, Periadnadi and Nurmiati (2017) 'Isolasi dan karakterisasi bakteri alami pencernaan ikan patin siam (*Pangasius hypophthalmus*) sebagai kandidat probiotik', *Jurnal Metamorfosa*, 4(2), pp. 247–255.
- Sutama, I.K. (2007) *Petunjuk teknis beternak kambing perah*. Yogyakarta: Kanisius.
- Swadayana, A., Sambodho, P. and Budiarti, C. (2012) 'Total bakteri dan pH susu akibat lama waktu dipping puting kambing peranakan Ettawa laktasi', *Animal Agricultural Journal*, 1(1), pp. 12–21.
- Syukur, S. and Purwati, E. (2013) *Bioteknologi probiotik untuk kesehatan masyarakat*. Padang: Penerbit Dani.
- Syukur, S., Utami, L.S., Purwati, E., Urnemi and Jamsari (2011) 'Screening and in vitro antimicrobial and protease activities from West Sumatera, Indonesia', in *Prosiding Seminar Internasional HKI*. Pekanbaru.
- Thairu, Y., Nasir, I.A. and Usman, Y. (2016) 'Laboratory perspective of Gram staining and its significance in investigations of infectious diseases', *Sub-Saharan African Journal of Medicine*, 1(4), pp. 168–174.
- Todorov, S. (2009) 'Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum*: Production, genetic organization and mode of action', *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, pp.

209–221. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000200001>

- Tomar, O., Akarca, G., Çağlar, A., Beykaya, M. and Gök, V. (2019) ‘The effects of kefir grain and starter culture on kefir produced from cow and buffalo milk during storage periods’, *Food Science and Technology*, 40(6), pp. 1–7. <https://doi.org/10.1590/fst.39418>
- Tozzo, P., D’Angiolella, G., Brun, P., Castagliuolo, I., Gino, S. and Caenazzo, L. (2020) ‘Skin microbiome analysis for forensic human identification: What do we know so far?’, *Microorganisms*, 8, p. 873. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060873>
- Triana, A.N., Setyawandani, T. and Sumarmono, J. (2022) ‘Pengaruh jenis susu pada pH, total asam dan warna kefir tradisional’, *Journal of Animal Science and Technology*, 4(1), pp. 15–25.
- Turang, M.W., Yelnetty, A. and Ma’ruf, W. (2023) ‘Penggunaan bunga telang kering (*Clitoria ternatea* L.) terhadap nilai pH dan sensoris kefir’, *Zootec*, 43(1), pp. 102–109.
- Ulimaz, T.A., Ustari, D., Aziza, V., Suganda, T., Concibido, V., Levita, J. and Karuniawan, A. (2020) ‘Keragaman genetik bunga telang (*Clitoria ternatea*) asal Indonesia berdasarkan karakter bunga dan komponen hasil pada dua lahan berbeda’, *Jurnal Agrobiogen*, 16(2), pp. 1–16. <http://dx.doi.org/10.21082/jbio.v16n1.2020.p1-6>
- Ummah, A.K., Sumarmono, J. and Rahardjo, A.H.D. (2022) ‘Pengaruh penambahan bubuk bunga telang (*Clitoria ternatea* Linn) terhadap total bakteri asam laktat, kadar asam laktat dan pH whey kefir susu kambing’, *Bulletin of Applied Animal Research*, 4(2), pp. 65–72. <https://doi.org/10.36423/baar.v4i2.1022>
- Usmiati, S. (2007) ‘Kefir susu fermentasi dengan rasa menyegarkan’, *Warta Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian*.
- Usmiati, S. and Abubakar (2009) *Teknologi pengolahan susu*. Bogor: Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian.
- Utari, F.D., Prasetyono, B.W.H.E. and Muktiani, A. (2012) ‘Kualitas susu kambing

perah peranakan Ettawa yang diberi suplementasi protein terproteksi dalam wafer pakan komplit berbasis limbah agroindustri', *Animal Agricultural Journal*, 1(1), pp. 426–447.

van den Nieuwboer, M., van Hemert, S., Claassen, E. and de Vos, W.M. (2016) '*Lactobacillus plantarum* WCFS1 and its host interaction: A dozen years after the genome', *Microbial Biotechnology*, 9(4), pp. 452–465. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12368>

Vaughn, R.H., Won, W.D., Spencer, F.B., Pappagianis, D., Foda, I.O. and Krumperman (1953) '*Lactobacillus plantarum*, the cause of yeast spots on olives', *Applied Microbiology*, 2, pp. 82–85.

Wanniatie, V., Qisthon, A., Husni, A. and Olsen, E. (2021) 'Kualitas mikrobiologis susu kambing dengan metode pasteurisasi high temperature short time (HTST) pada penyimpanan berbeda', *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan*, 9(1), pp. 30–35. <https://doi.org/10.29244/jipthp.9.1.30-35>

Website Resmi Pemerintah Kota Pariaman (2012) *Pariwisata–kuliner susu kambing etawa*. Available at: <http://www.pariamankota.go.id>

Widiyaningsih, E.N. (2011) 'Peran probiotik untuk kesehatan', *Jurnal Kesehatan*, 4(1), pp. 14–20.

Widodo (2019) *Bakteri asam laktat strain lokal*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

Widyastuti, Y. and Sofarianawati, E. (1999) 'Karakter bakteri asam laktat *Enterococcus* sp. yang diisolasi dari saluran pencernaan ternak', *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, 4(2), pp. 50–53.

Wijayanto, U. (2009) *Analisis in vitro toleransi isolat bakteri asam laktat asal daging sapi terhadap pH lambung, pH usus dan garam empedu sebagai kandidat probiotik*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor.

Yuliana, Y., Baidar, A. and Faridah, A. (2013) *Model perbaikan status gizi balita dan penganekaragaman pangan masyarakat melalui standarisasi dan peningkatan kualitas gizi makanan tradisional Minang di Provinsi Sumatera Barat*. Padang: Universitas Negeri Padang.

- Yuniarti, M., Lindawati, S.A. and Putra, I.G.A.A. (2021) 'Aktivitas antimikroba kefir susu sapi yang diinkubasi pada tempurung kelapa hijau muda terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*', *Jurnal Ilmiah Teknologi Pertanian Agrotechno*, 6(2).
- Zaidemarmo, N., Husni, A. and Sulastri (2016) 'Kualitas kimia susu kambing peranakan Ettawa pada berbagai periode laktasi di Desa Sungai Langka Kecamatan Gedong Tataan Kabupaten Pesawaran', *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*, 4(4), pp. 307–312.
- Zain, W.N.H. (2013) 'Kualitas susu kambing segar di peternakan Umban Sari dan Alam Raya Pekanbaru', *Jurnal Peternakan*, 10(1), pp. 24–30.
- Zakaria, Y. (2009) 'Pengaruh jenis susu dan persentase starter yang berbeda terhadap kualitas kefir', *Jurnal Agripet*, 9(1).
- Zakaria, N.N.A., *et al.* (2018) 'In vitro protective effects of an aqueous extract of *Clitoria ternatea* L. flower against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and UV-induced mtDNA damage in human keratinocytes', *Phytotherapy Research*, 32(6), pp. 1064–1072. <https://doi.org/10.1002/ptr.6045>
- Zakaria, Y., Helmy, M.Y. and Safara, Y. (2011) 'Analisa kualitas susu kambing peranakan Etawah yang disterilkan pada suhu dan waktu yang berbeda', *Agripet*, 11(1), pp. 29–31.
- Zega, M.F. and Hasruddin (2018) 'Uji coliform dan *Escherichia coli* pada depot air minum isi ulang di Kecamatan Medan Deli', *Jurnal Biosains*, 4(1), pp. 10–16.
- Zhang, J.H., Wang, F. and Wang, T.Y. (2011) 'A simple and effective super buffer for DNA agarose electrophoresis', *Gene*.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C., Harris, H., Mattarelli, P. (2020) 'A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, pp. 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zingare, M.L., *et al.* (2013) '*Clitoria ternatea* (Aparajita): A review of the antioxidant, antidiabetic and hepatoprotective potentials', *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3(1), pp. 203–213.

Zurriyati, Y., Noor, R.R. and Maheswari, R.R.A. (2011) 'Analisis molekuler genotipe kappa kasein ( $\kappa$ -kasein) dan komposisi susu kambing Peranakan Etawah, Saanen dan persilangannya', *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 16(1), pp. 61–70.



## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Hasil Sekuensing dan BLAST Isolat PD

PD10 Assembly - Notepad

File Edit Format View Help

>PD10

```
TCTGGTATTGATTGGTGCCTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACGGTGAGTAACACGTGG
GAAACCTGCCAGAAGCGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCA
TGGTCCGAGTTTAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGCGTATTAGCTAGATGGTG
GGTAACGGCTACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAA
CGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAA
CTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGA
AAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAC
TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGT
AACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAAC
GATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGG
GGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
TAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTGACATAC TATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTT
CCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTC
CCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACCTCGGTGAGACTGCCGGTGA
CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC
AATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGAT
TGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGGCGCGGTGAATA
CGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCC
```

Job Title PD10

RID [STBSURDY016](#) Search expires on 02-12 23:32 pm [Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database core\_nt [See details](#)

Query ID lcl|Query\_4312747

Description PD10

Molecule type dna

Query Length 1356

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

**Filter Results**

Organism only top 20 will appear  exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity  to  E value  to  Query Coverage  to

[Filter](#) [Reset](#)

**Descriptions**

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

**Sequences producing significant alignments** Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected

| Description   | Scientific Name                       | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession                  |
|---|---------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|----------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lactobacillus plantarum strain CAU10886 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>  | <a href="#">Lactiplantibacillu...</a> | 2505      | 2505        | 100%        | 0.0     | 100.00%    | 1356     | <a href="#">MF097096.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lactiplantibacillus cerosus strain 19331 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a> | <a href="#">Lactiplantibacillu...</a> | 2499      | 2499        | 100%        | 0.0     | 99.93%     | 1441     | <a href="#">MW674177.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lactobacillus plantarum strain CO4-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>     | <a href="#">Lactiplantibacillu...</a> | 2499      | 2499        | 100%        | 0.0     | 99.93%     | 1402     | <a href="#">MG846885.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lactobacillus plantarum strain 6413 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>      | <a href="#">Lactiplantibacillu...</a> | 2499      | 2499        | 100%        | 0.0     | 99.93%     | 1468     | <a href="#">MT515854.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lactiplantibacillus plantarum strain F2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>  | <a href="#">Lactiplantibacillu...</a> | 2499      | 2499        | 100%        | 0.0     | 99.93%     | 1472     | <a href="#">OQ099575.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lactobacillus plantarum strain 3750 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>      | <a href="#">Lactiplantibacillu...</a> | 2499      | 2499        | 100%        | 0.0     | 99.93%     | 1460     | <a href="#">MT538604.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lactobacillus plantarum strain 2210 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>      | <a href="#">Lactiplantibacillu...</a> | 2499      | 2499        | 100%        | 0.0     | 99.93%     | 1476     | <a href="#">MT804708.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lactobacillus sp. A2 partial 16S rRNA gene, isolate A2</a>                            | <a href="#">Lactobacillus sp...</a>   | 2499      | 2499        | 100%        | 0.0     | 99.93%     | 1399     | <a href="#">LN995804.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lactobacillus plantarum strain 8195 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>      | <a href="#">Lactiplantibacillu...</a> | 2499      | 2499        | 100%        | 0.0     | 99.93%     | 1477     | <a href="#">MT538941.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lactobacillus plantarum strain NWAFL1296 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a> | <a href="#">Lactiplantibacillu...</a> | 2499      | 2499        | 100%        | 0.0     | 99.93%     | 1411     | <a href="#">MG482205.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lactiplantibacillus plantarum strain O24 chromosome, complete genome</a>              | <a href="#">Lactiplantibacillu...</a> | 2499      | 12644       | 100%        | 0.0     | 99.93%     | 3126794  | <a href="#">CP157747.1</a> |

## Lampiran 2. Nilai pH

### Descriptive Statistics

Dependent Variable: Nilai pH

| Konsentrasi Starter | Konsentrasi Bunga Telang | Mean   | Std. Deviation | N  |
|---------------------|--------------------------|--------|----------------|----|
| 2%                  | 0%                       | 4.4233 | .02517         | 3  |
|                     | 10%                      | 4.2900 | .01000         | 3  |
|                     | 20%                      | 4.1633 | .01528         | 3  |
|                     | Total                    | 4.2922 | .11366         | 9  |
| 4%                  | 0%                       | 4.2233 | .02517         | 3  |
|                     | 10%                      | 4.0900 | .01000         | 3  |
|                     | 20%                      | 3.9900 | .01000         | 3  |
|                     | Total                    | 4.1011 | .10240         | 9  |
| 6%                  | 0%                       | 3.9367 | .01528         | 3  |
|                     | 10%                      | 3.8700 | .01000         | 3  |
|                     | 20%                      | 3.4233 | .63516         | 3  |
|                     | Total                    | 3.7433 | .39922         | 9  |
| Total               | 0%                       | 4.1944 | .21273         | 9  |
|                     | 10%                      | 4.0833 | .18214         | 9  |
|                     | 20%                      | 3.8589 | .46183         | 9  |
|                     | Total                    | 4.0456 | .33164         | 27 |

### Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a,b</sup>

|          | Levene Statistic                     | df1    | df2 | Sig.  |      |
|----------|--------------------------------------|--------|-----|-------|------|
| Nilai pH | Based on Mean                        | 15.110 | 8   | 18    | .000 |
|          | Based on Median                      | .999   | 8   | 18    | .470 |
|          | Based on Median and with adjusted df | .999   | 8   | 2.008 | .590 |
|          | Based on trimmed mean                | 12.000 | 8   | 18    | .000 |

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.<sup>a,b</sup>

a. Dependent variable: Nilai pH

b. Design: Intercept + Starter + Bunga\_Telang + Starter \* Bunga\_Telang

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Nilai pH

| Source                 | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F        | Sig. |
|------------------------|-------------------------|----|-------------|----------|------|
| Corrected Model        | 2.049 <sup>a</sup>      | 8  | .256        | 5.682    | .001 |
| Intercept              | 441.896                 | 1  | 441.896     | 9806.191 | .000 |
| Starter                | 1.397                   | 2  | .699        | 15.505   | .000 |
| Bunga_Telang           | .526                    | 2  | .263        | 5.836    | .011 |
| Starter * Bunga_Telang | .125                    | 4  | .031        | .694     | .606 |
| Error                  | .811                    | 18 | .045        |          |      |
| Total                  | 444.756                 | 27 |             |          |      |
| Corrected Total        | 2.860                   | 26 |             |          |      |

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Nilai pH

| Source                 | Noncent. Parameter | Observed Power <sup>b</sup> |
|------------------------|--------------------|-----------------------------|
| Corrected Model        | 45.459             | .989                        |
| Intercept              | 9806.191           | 1.000                       |
| Starter                | 31.010             | .997                        |
| Bunga_Telang           | 11.672             | .808                        |
| Starter * Bunga_Telang | 2.777              | .183                        |
| Error                  |                    |                             |
| Total                  |                    |                             |
| Corrected Total        |                    |                             |

a. R Squared = ,716 (Adjusted R Squared = ,590)

b. Computed using alpha = ,05

**Post Hoc Tests****Konsentrasi Starter****Homogeneous Subsets**

**Nilai pH**

Duncan<sup>a,b</sup>

| Konsentrasi Starter | N | Subset |        |
|---------------------|---|--------|--------|
|                     |   | 1      | 2      |
| 6%                  | 9 | 3.7433 |        |
| 4%                  | 9 |        | 4.1011 |
| 2%                  | 9 |        | 4.2922 |
| Sig.                |   | 1.000  | .072   |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,045.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000.

b. Alpha = ,05.

**Konsentrasi Bunga Telang****Homogeneous Subsets**

**Nilai pH**

Duncan<sup>a,b</sup>

| Konsentrasi Bunga Telang | N | Subset |        |
|--------------------------|---|--------|--------|
|                          |   | 1      | 2      |
| 20%                      | 9 | 3.8589 |        |
| 10%                      | 9 |        | 4.0833 |
| 0%                       | 9 |        | 4.1944 |
| Sig.                     |   | 1.000  | .281   |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

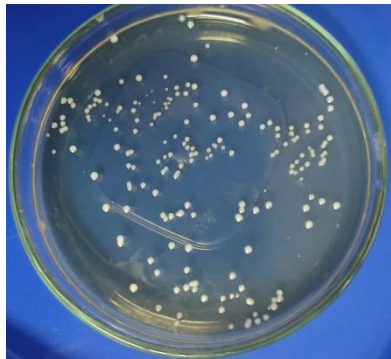
Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,045.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000.

b. Alpha = ,05.

### Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian



Total BAL



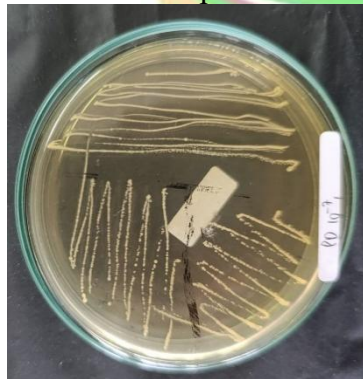
Destilasi



Ketahanan pH Asam



Ketahanan Garam Empedu



Single Koloni



Destruksi



Nilai pH



Kefir



POTENSI PROBIOTIK DARI SUSU KAMBING ETAWA UNTUK KEFIR DENGAN PENAMBAHAN EKSTRAK BUNGA TELANG (*Clitoria ternatea* L.) UNTUK MENINGKATKAN KESEHATAN MASYARAKAT

ORIGINALITY REPORT

|                  |                  |              |                |
|------------------|------------------|--------------|----------------|
| <b>21</b> %      | <b>19</b> %      | <b>11</b> %  | <b>7</b> %     |
| SIMILARITY INDEX | INTERNET SOURCES | PUBLICATIONS | STUDENT PAPERS |

PRIMARY SOURCES

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| <b>1</b> | <b>repo.unand.ac.id</b><br>Internet Source   | <b>2</b> % |
| <b>2</b> | <b>Submitted to Universitas Andalas</b><br>Student Paper   | <b>2</b> % |
| <b>3</b> | <b>Nur Prihatiningsih, Heru Adi Djatmiko, Puji Lestari. "AKTIVITAS SIDEROFOR BACILLUS SUBTILIS SEBAGAI PEMACU PERTUMBUHAN DAN PENGENDALI PATOGEN TANAMAN TERUNG", JURNAL HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN TROPIKA, 2017</b><br>Publication | <b>1</b> % |
| <b>4</b> | <b>Submitted to Fakultas Peternakan</b><br>Student Paper   | <b>1</b> % |
| <b>5</b> | <b>repository.ub.ac.id</b><br>Internet Source  | <b>1</b> % |
| <b>6</b> | <b>digilib.unila.ac.id</b><br>Internet Source  | <b>1</b> % |