

LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Keterangan Layak Etik



Kementerian Kesehatan

Poltekkes Yogyakarta

Komite Etik Penelitian Kesehatan

Jalan Tata Bumi No. 3, Banyuraden, Gamping,
Sleman, D.I. Yogyakarta 55293

(0274) 617601

<https://poltekkesjogja.ac.id>

KETERANGAN LAYAK ETIK
DESCRIPTION OF ETHICAL EXEMPTION
"ETHICAL EXEMPTION"

No.DP.04.03/e-KEPK.1/467/2025

Protokol penelitian versi 1 yang diusulkan oleh :

The research protocol proposed by

Peneliti utama : Aurellia Anindya Putri
Principal In Investigator

Nama Institusi : Poltekkes Kesehatan Kementerian
Kesehatan Yogyakarta
Name of the Institution

Dengan judul:

Title

"Identifikasi Spesies Bifidobacterium sebagai Probiotik dari Madu dalam Isolat Bakteri Hasil Skrining Menggunakan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR)"

"Identification of Bifidobacterium Species as Probiotics from Honey in Bacterial Isolates Resulting from Screening Using Polymerase Chain Reaction (PCR) Method"

Dinyatakan layak etik sesuai 7 (tujuh) Standar WHO 2011, yaitu 1) Nilai Sosial, 2) Nilai Ilmiah, 3) Pemerataan Beban dan Manfaat, 4) Risiko, 5) Bujukan/Eksploitasi, 6) Kerahasiaan dan Privacy, dan 7) Persetujuan Setelah Penjelasan, yang merujuk pada Pedoman CIOMS 2016. Hal ini seperti yang ditunjukkan oleh terpenuhinya indikator setiap standar.

Declared to be ethically appropriate in accordance to 7 (seven) WHO 2011 Standards, 1) Social Values, 2) Scientific Values, 3) Equitable Assessment and Benefits, 4) Risks, 5) Persuasion/Exploitation, 6) Confidentiality and Privacy, and 7) Informed Consent, referring to the 2016 CIOMS Guidelines. This is as indicated by the fulfillment of the indicators of each standard.

Pernyataan Laik Etik ini berlaku selama kurun waktu tanggal 20 Maret 2025 sampai dengan tanggal 20 Maret 2026.

This declaration of ethics applies during the period March 20, 2025 until March 20, 2026.



March 20, 2025
Chairperson,



Dr. drg. Wiworo Haryani, M.Kes.

Lampiran 2. Perhitungan Pembuatan Reagen

1. Pembuatan SDS 10%

$$\text{Massa zat (g)} = \frac{\text{persen}}{100} \times \text{volume larutan (mL)}$$

$$\text{Massa zat (g)} = \frac{10}{100} \times 50 \text{ mL}$$

$$\text{Massa zat (g)} = 5 \text{ gram}$$

2. Pengenceran buffer TE 100x menjadi 1x

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$100 \times V_1 = 1 \times 50 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL}$$

3. Pembuatan NaOH 10%

$$\text{Massa zat (g)} = \frac{\text{persen}}{100} \times \text{volume larutan (mL)}$$

$$\text{Massa zat (g)} = \frac{10}{100} \times 50 \text{ mL}$$

$$\text{Massa zat (g)} = 5 \text{ gram}$$

4. Pembuatan Tris HCl 50 mM

$$\text{Massa (g)} = \text{Molaritas (M)} \times \text{Mr} \times \text{Volume (L)}$$

$$\text{Massa (g)} = 0,05\text{M} \times 157,6 \times 0,5\text{L}$$

$$\text{Massa (g)} = 3,94 \text{ gram}$$

5. Pembuatan NaCl 5M

$$\text{Massa (g)} = \text{Molaritas (M)} \times \text{Mr} \times \text{Volume (L)}$$

$$\text{Massa (g)} = 5\text{M} \times 58,44 \times 0,05\text{L}$$

$$\text{Massa (g)} = 14,61 \text{ gram}$$

6. Pembuatan EDTA 0,5 M

$$\text{Massa (g)} = \text{Molaritas (M)} \times \text{Mr} \times \text{Volume (L)}$$

$$\text{Massa (g)} = 0,5\text{M} \times 372,24 \times 0,005\text{L}$$

$$\text{Massa (g)} = 0,9306 \text{ gram}$$

7. Pengenceran buffer TBE 10x menjadi 1x

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$10 \times V_1 = 1 \times 500 \text{ mL}$$

$$V_1 = 50 \text{ mL}$$

8. Pembuatan gel agarosa 1%

$$\text{Massa zat (g)} = \frac{\text{persen}}{100} \times \text{volume larutan (mL)}$$

$$\text{Massa zat (g)} = \frac{1}{100} \times 36 \text{ mL}$$

$$\text{Massa zat (g)} = 0,36 \text{ gram}$$

9. Pembuatan gel agarosa 1,5%

$$\text{Massa zat (g)} = \frac{\text{persen}}{100} \times \text{volume larutan (mL)}$$

$$\text{Massa zat (g)} = \frac{1,5}{100} \times 36 \text{ mL}$$

$$\text{Massa zat (g)} = 0,54 \text{ gram}$$

10. Pelarutan primer *Bifidobacterium*

$$\text{Volume (L)} = \frac{\text{Jumlah zat (mol)}}{\text{Konsentrasi (mol/L)}}$$

$$\text{Volume (}\mu\text{L)} = \frac{\text{Jumlah zat (nmol)} \times 10^{-9}}{\text{Konsentrasi (}\mu\text{M)} \times 10^{-6}} \times 10^6$$

$$\text{Volume (}\mu\text{L)} = \frac{\text{Jumlah zat (nmol)}}{\text{Konsentrasi (}\mu\text{M)}} \times 1000$$

a. Primer Breve F

$$\text{Volume (}\mu\text{L)} = \frac{31,1 \text{ nmol}}{100 \mu\text{M}} \times 1000$$

$$\text{Volume (}\mu\text{L)} = 311$$

b. Primer Lactis R

$$\text{Volume (}\mu\text{L)} = \frac{41,1 \text{ nmol}}{100 \mu\text{M}} \times 1000$$

$$\text{Volume (}\mu\text{L)} = 411$$

c. Primer Mplex B. adolescentis F

$$\text{Volume (}\mu\text{L)} = \frac{31,2 \text{ nmol}}{100 \mu\text{M}} \times 1000$$

$$\text{Volume (}\mu\text{L)} = 312$$

d. Primer Pseudolongum F

$$\text{Volume (}\mu\text{L)} = \frac{36,9 \text{ nmol}}{100 \mu\text{M}} \times 1000$$

$$\text{Volume (}\mu\text{L)} = 369$$

e. Primer Animalis B. Lactis F

$$\text{Volume } (\mu\text{L}) = \frac{31,8 \text{ nmol}}{100 \mu\text{M}} \times 1000$$

$$\text{Volume } (\mu\text{L}) = 318$$

f. Primer Infantis B. Long

$$\text{Volume } (\mu\text{L}) = \frac{36,9 \text{ nmol}}{100 \mu\text{M}} \times 1000$$

$$\text{Volume } (\mu\text{L}) = 369$$

g. Primer Longum F

$$\text{Volume } (\mu\text{L}) = \frac{31,9 \text{ nmol}}{100 \mu\text{M}} \times 1000$$

$$\text{Volume } (\mu\text{L}) = 319$$

h. Primer Mplex B. Bifidum F

$$\text{Volume } (\mu\text{L}) = \frac{28,8 \text{ nmol}}{100 \mu\text{M}} \times 1000$$

$$\text{Volume } (\mu\text{L}) = 288$$

i. Primer Mplex Bifido F

$$\text{Volume } (\mu\text{L}) = \frac{32,2 \text{ nmol}}{100 \mu\text{M}} \times 1000$$

$$\text{Volume } (\mu\text{L}) = 322$$

j. Primer Mplex Bifido R

$$\text{Volume } (\mu\text{L}) = \frac{28,8 \text{ nmol}}{100 \mu\text{M}} \times 1000$$

$$\text{Volume } (\mu\text{L}) = 288$$

11. Pengenceran primer *Bifidobacterium* 100 μM menjadi 50 μM

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$100\mu\text{M} \times V_1 = 50\mu\text{M} \times 100\mu\text{L}$$

$$V_1 = 50\mu\text{L}$$

12. Pembuatan *Bifidobacterium multiplex primer mix*

Bifidobacterium multiplex primer mix terdiri dari 10 primer dengan perbandingan konsentrasi masing-masing primer spesies: Mplex Bifido R: Mplex Bifido F adalah 1:6:2. PCR *mixture* 20 μL harus mencakup konsentrasi akhir masing-masing primer sebesar 0,2 μM . Perlu diketahui konsentrasi masing-masing primer dalam PCR *mixture*.

Konsentrasi primer dalam PCR *mixture*

Konsentrasi setiap primer spesies : Mplex Bifido R : Mplex Bifido F = 1 : 6 : 2

Konsentrasi setiap primer spesies : Mplex Bifido R : Mplex Bifido F = 0,2µM : 1,2µM : 0,4 µM

Volume *Bifidobacterium multiplex primer mix* yang ditambahkan ke dalam PCR *mixture* adalah 2µL. Maka, untuk mencapai konsentrasi tersebut dalam total volume 20µL, konsentrasi awal masing-masing primer dalam primer mix dihitung dengan rumus pengenceran:

Konsentrasi primer spesies (Breve F, Lactis R, Mplex B. adolescentis F, Pseudolongum F, Animalis B. lactis F, Infantis B long, Longum F, Mplex B bifidum F)

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$C_1 \times 2\mu\text{L} = 0,2\mu\text{M} \times 20\mu\text{L}$$

$$C_1 = 2\mu\text{M}$$

Konsentrasi primer Mplex Bifido R

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$C_1 \times 2\mu\text{L} = 1,2\mu\text{M} \times 20\mu\text{L}$$

$$C_1 = 12\mu\text{M}$$

Konsentrasi primer Mplex Bifido F

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$C_1 \times 2\mu\text{L} = 0,4\mu\text{M} \times 20\mu\text{L}$$

$$C_1 = 4\mu\text{M}$$

Berdasarkan perhitungan, dibutuhkan primer masing-masing spesies dengan konsentrasi 2µM, primer Mplex Bifido R 12µM dan primer Mplex Bifido F 4µM. *Bifidobacterium multiplex primer mix* akan dibuat sebanyak 100µL dari konsentrasi awal masing-masing primer 50µM. Berikut perhitungan volume primer 50µM yang dibutuhkan:

Volume masing-masing primer spesies

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$50\mu\text{M} \times V_1 = 2\mu\text{M} \times 100\mu\text{L}$$

$$V_1 = 4\mu\text{L}$$

Konsentrasi primer Mplex Bifido R

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$50\mu\text{M} \times V_1 = 12\mu\text{M} \times 100\mu\text{L}$$

$$V_1 = 24\mu\text{L}$$

Konsentrasi primer Mplex Bifido F

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$50\mu\text{M} \times V_1 = 4\mu\text{M} \times 100\mu\text{L}$$

$$V_1 = 8\mu\text{L}$$

Maka, untuk membuat 100 μL *Bifidobacterium multiplex primer mix* diperlukan masing-masing 4 μL untuk primer Breve F, Lactis R, Mplex B. adolescentis F, Pseudolongum F, Animalis B. lactis F, Infantis B long, Longum F, Mplex B bifidum F; 24 μL primer Mplex Bifido R dan 8 μL primer Mplex Bifido F. Air bebas nuklease ditambahkan sebanyak 36 μL untuk mencapai volume akhir 100 μL .

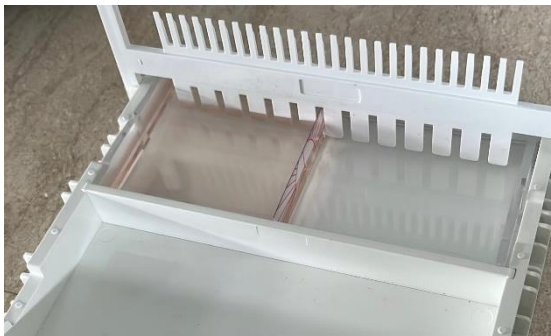
Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian



Hasil Ekstraksi DNA



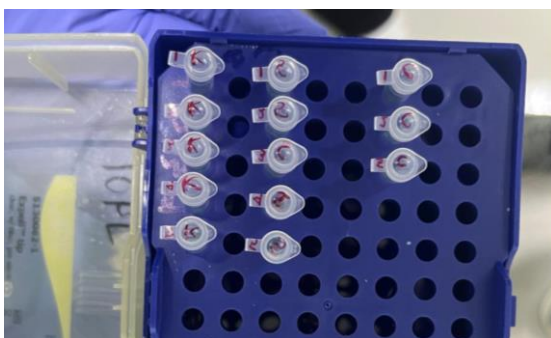
Penimbangan reagen



Pencetakan Gel Agarosa



Proses Elektroforesis



PCR Mixture



Proses PCR