

## 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.1/526/2025

Protokol penelitian versi 1 yang diusulkan oleh :  
*The research protocol proposed by*

Peneliti utama : Daniel Yudhan Kriswardana  
*Principal In Investigator*

Nama Institusi : Politeknik Kesehatan Kementerian  
Kesehatan Yogyakarta

*Name of the Institution*

Dengan judul:  
*Title*

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

*"Identification of Bifidobacterium Species as Probiotics from Klanceng 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 11 April 2025 sampai dengan tanggal 11 April 2026.

*This declaration of ethics applies during the period April 11, 2025 until April 11, 2026.*



April 11, 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

$$\text{Volume (mL)} = \frac{\text{Jumlah zat (mol)}}{\text{Konsentrasi (mol/L)}} \times 1000$$

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

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

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 $\mu\text{M}$  menjadi 50 $\mu\text{M}$

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

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

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

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 $\mu\text{L}$  harus mencakup konsentrasi akhir masing-masing primer sebesar 0,2  $\mu\text{M}$ . 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**

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

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

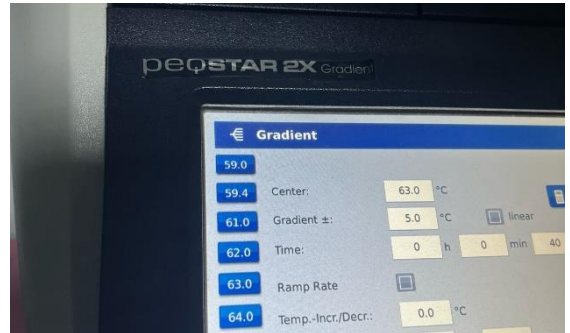
$$V_1 = 8\mu\text{L}$$

Maka, untuk membuat 100μL *Bifidobacterium multiplex primer mix* diperlukan masing-masing 4μL 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; 24μL primer Mplex Bifido R dan 8μL primer Mplex Bifido F. Air bebas nuklease ditambahkan sebanyak 36μL untuk mencapai volume akhir 100μL.

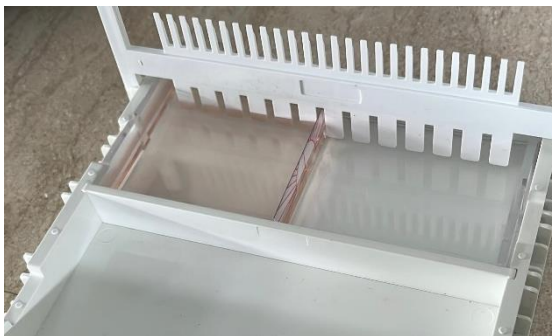
### Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian



Hasil Ekstraksi DNA



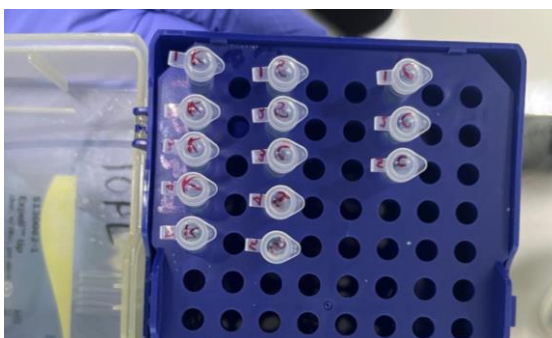
Fitur *Gradient* pada *Thermo cycler*



Pencetakan Gel Agarosa



Proses Elektroforesis



PCR Mixture



Proses PCR