

**LAPORAN KEMAJUAN
PENELITIAN DASAR**



**OPTIMALISASI FORMULA OBAT TETES TELINGA UNTUK
OTITIS MEDIA SUPPURATIF KHRONIS DARI VIRGIN
COCONUT OIL**

PENGUSUL:

Dr. Suryani, MSi (NIDN: 0027056501) ID SINTA 5973159

Dra. Tuty Taslim, Apt, M.Farm (NIDN : ID SINTA 6117122

Dr. Femi Earnestly, Ssi, MSi (NIDN : 1026127903) ID SINTA 5981225

UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA BARAT

2019

RINGKASAN

Penelitian ini bertujuan mengoptimalkan formula obat tetes telinga dari VCO (Virgin Coconut Oil) yang mengandung BAL (Bakteri Asam Laktat) dan mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri patogen dari Otitis Media Supuratif Kronis (bersifat sebagai antimikroba alami). Seperti diketahui penyakit ini adalah penyakit yang dapat menyebabkan pasien menderita Meningitis bila infeksi nya tidak tertangani, sehingga berlanjut menjadi abses otak dan menyebabkan kematian. Di negara berkembang seperti Indonesia hal ini merupakan penyebab kematian yang tinggi. Obat tetes yang ada selama ini mengandung antibiotik sintesis seperti Khloramfenikol yang dapat menyebabkan resistensi pada pasien. Bila dapat dibuat formula obat tetes telinga dari VCO, maka ada alternatif obat tetes telinga yang mengandung antimikroba alami, sehingga dapat mengurangi resistensi terhadap antibiotik. Secara keseluruhan penelitian ini terdiri dari **2 tahapan yaitu 1) pada tahun pertama, Uji daya hambat dari VCO yang mengandung bermacam-macam Bakteri Asam Laktat terhadap bakteri patogen penyebab OMSK di Laboratorium, dan standarisasi VCO yang digunakan** Pada tahap ini, yang dilakukan adalah Uji daya hambat VCO dengan menambahkan VCO pada bakteri patogen penyebab OMSK yang telah ditumbuhkan pada media Agar Blood atau media yang cocok lainnya. Sebagai pembandingnya digunakan Obat tetes telinga sintetik ditambahkan pada bakteri patogen penyebab OMSK yang sebelumnya ditumbuhkan pada media Agar Blood. Diharapkan akan terbentuk daerah “Halo” yang jernih yang menunjukkan aktivitas /kemampuan VCO dan obat tetes telinga sintesis atau obat paten yang beredar (Khloramfenikol) dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen OMSK. Standarisasi VCO yang digunakan adalah mengukur kadar asam laurat, kekentalan, pH, Berat Jenis, sifat optis aktif, %FFA, bilangan penyabunan dan angka Iod **2) pada tahun ke dua Optimalisasi Formula**, dengan membuat beberapa formula sediaan obat tetes telinga yang memperhatikan konsentrasi VCO dalam sediaan, serta dievaluasi sifat fisikokimia dan kompatibilitas bahan aktif dan excipien seperti : kejernihan, kelarutan, pH stabilita, stabilitas zat aktif, inkompatibilitas, dosis, bahan pembantu (cairan pembawa/pelarut yang cocok, viskositas, pengawet dan antioksidan), metode pembuatan, evaluasi dan penyimpanan, dan terakhir wadah/penyimpanan Target luaran pada penelitian ini adalah artikel pada jurnal internasional bereputasi scopus Q2 yaitu African Journal of Pharmacy and Pharmacology dengan ISSN 19960816. Dan didapatkan informasi tentang dasar untuk penerapan pembuatan obat tetes telinga dari VCO. Dengan penelitian ini dapat diusulkan satu HAKI baik HAKI hak cipta maupun HAKI Paten, serta dapat menghasilkan satu buku ajar dan satu prosiding internasional. Adapun TKT yang dapat dicapai adalah TKT 1, TKT 2 dan TKT 3. Sesuai dengan pengerjaan yang dilakukan yaitu menganalisa prinsip dasar, dan membuat formulasi.

Kata kunci : VCO, BAL, antimikroba alami, obat tetes telinga, OMSK.

PRAKATA

Alhamdulillah kita panjatkan puji syukur ke hadirat Allah yang Maha Kuasa, yang telah memberikan kekuatan dan kesehatan untuk dapat menyelesaikan Laporan Kemajuan dari penelitian yang berjudul **“OPTIMALISASI FORMULA OBAT TETES TELINGA UNTUK OTITIS MEDIA SUPPURATIF KHRONIS DARI VIRGIN COCONUT OIL** Salawat beriring salam Allahumma shalli ‘ala Muhammad kita ucapkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW, alhamdulillah dengan segala daya dan upaya diselesaikan juga sampai 70% pelaksanaan penelitian ini.

Penelitian dan laporan kemajuan ini tidak akan ada tanpa bantuan dari berbagai pihak, untuk itu, terimakasih yang sedalam dalamnya diucapkan pada :

1. DRPM Ristekdikti yang telah mendanai penelitian ini.
2. Ketua LPPM Universitas Muhammadiyah Sumatera Barat yang telah banyak membantu dan memfasilitasi penelitian ini mulai dari pengusulan Proposal, sampai pelaksanaan penelitian.
3. Kepala Laboratorium Veteriner Baso Bukittinggi tempat menganalisa sampel
4. Kepala Laboratorium Kopertis Wilayah X

Akhirnya tak ada gading yang tak retak, untuk kesempurnaan penelitian ini diharapkan saran dan kritik yang membangun. Dan semoga penelitian ini berguna untuk semua pihak.

Peneliti

Suryani

NIDN: 0027056501

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Pengesahan	
Ringkasan	
Prakata	
Daftar Isi	
Daftar Tabel	
Daftar Gambar	
Daftar Lampiran	
BAB 1. PENDAHULUAN	
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	
BAB 4. METODE PENELITIAN	
BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	
BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN (Bukti Luaran yang didapatkan)	
- Artikel Ilmiah (draft, status submission atau reprint)	
- HKI, Publikasi dan produk penelitian lainnya	



DAFTAR TABEL



DAFTAR GAMBAR



DAFTAR LAMPIRAN

LUARAN YANG DICAPAI

1. Artikel yang sudah diseminarkan pada Seminar Internasional ICICS kerjasama dengan IPB dan HKI (Himpunan Kimiawan Indonesia), pada 5 – 6 Agustus 2019. Dan akan diterbitkan pada Jurnal Internasional bereputasi Scopus Q3 Indonesian Journal Chemistry (IJC) , sudah pada tahap Review.
2. Draft artikel pada Jurnal Internasional bereputasi Scopus Q2 yaitu Rasayan Journal Chemistry
3. Draft Paten.



BAB I. PENDAHULUAN.

Penyakit telinga tengah yang sudah khronis disebut juga dengan Otitis Media Suppuratif Khronis (OMSK) ^{1, 2, 3}. Penyakit ini dapat diderita mulai dari anak-anak⁴ sampai dengan orang dewasa, laki-laki maupun perempuan. Apabila tidak dapat disembuhkan akan mengakibatkan peradangan pada selaput otak yang selanjutnya dapat mengakibatkan kematian ⁵ Penyakit ini kebanyakan diderita oleh masyarakat negara berkembang seperti Indonesia ⁶. Penyebab Otitis Media Suppuratif Khronis ini adalah bakteri patogen seperti *Pseudomonas aureginosa*, *Staphilococcus aerus*, dan *Klebsiella*,⁷ dan lainnya.

Virgin Coconut Oil (VCO) adalah minyak kelapa yang dibuat melalui beberapa cara yaitu fisika ⁸, kimia ⁹, enzimatis ¹⁰, dengan penambahan stater ¹¹ dan secara tradisional atau fermentasi santan tanpa penambahan stater, ^{12, 13}. Santan termasuk salah satu bahan yang mengandung protein dan karbohidrat yang tinggi, bila difermentasi terdapat Bakteri Asam Laktat (BAL) ¹⁴.

Pada lapisan minyak VCO terdapat Bakteri Asam Laktat (BAL) seperti *Lactobacillus plantarum* NM.178-5, yang mengandung bakteriosin ^{15,16, 17}. Bakteriosin adalah peptida yang menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan tidak berbahaya bagi bakteri non patogen¹⁸. Telah dianalisa antimikroba dan antijamur nya ternyata dapat menghambat pertumbuhan 5 bakteri patogen yang ada pada sekret penderita OMSK yang telah diteliti

sebelumnya (PDUPT Suryani 2016-2017) *Pseudomonas aureginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella*, dan *Staphylococcus aureus*. dari 126 sampel sekret penderita OMSK ¹⁹. Dari India ²⁰, dilaporkan bahwa bakteri yang ada di cairan telinga 80 sampel penderita Otitis Media Akut yang dianalisa, terdapat beberapa bakteri patogen yang hampir sama yaitu *Staphilococcus aureus*, *Pseudomonas sp*, *Escherichia coli*, dan *Klebsiella sp*. Ternyata bakteri patogen tersebut 18 % sudah mengalami resisten atau sudah tidak mempan lagi dengan antibiotik seperti Methicillin, masih sensitif dengan amikacin, chloramfenicol dan piperacillin. ^{21, 22, 3, 23, 20, 6}

Berdasarkan uraian diatas maka perlu dipelajari optimasi formula obat tetes telinga dari VCO (Virgin Coconut Oil) dan standarisasi VCO yang digunakan sebagai bahan dasar obat tetes telinga OMSK, karena VCO mengandung BAL (Bakteri Asam Laktat) dan mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri patogen dari Otitis Media Supuratif Kronis (bersifat sebagai antimikroba alami) maka dapat dibuat obat tetes telinga dari VCO, dan diharapkan sensitif terhadap bakteri patogen OMSK. Sehingga dapat menjawab persoalan obat tetes yang sudah mengalami resistensi.

Permasalahan yang akan akan diteliti :

1. Apakah dapat distandarisasi VCO yang digunakan sebagai bahan dasar obat tetes telinga OMSK?.
2. Apakah dapat dioptimalisasikan formula obat tetes telinga dari bahan dasar VCO (sensitif atau tidak terhadap bakteri patogen OMSK)?.
3. Apakah dapat dievaluasi sifat fisikokimia dan kompatibilitas bahan aktif dari obat tetes telinga yang dibuat

Tujuan Khusus:

1. Melakukan Standarisasi VCO yang digunakan
2. Optimalisasi formula obat tetes telinga berbahan dasar VCO
3. Menganalisa sifat fisiko kimia dan kompabilitas bahan aktif

Urgensi Penelitian : bila didapatkan formula obat tetes telinga untuk pasien OMSK berbahan dasar VCO (alami) yang optimal, maka dapat dibuat obat tetes telinganya, dan masalah resistensi dapat diatasi. Selanjutnya penderita OMSK dapat dicegah berlanjut ke peradangan selaput otak yang mematikan. Akhirnya dapat menurunkan angka kematian penduduk.

Adapun skema penelitian ini adalah Penelitian Dasar, karena mempelajari hal-hal dasar dari pembuatan obat tetes telinga.

BAB. II. TINJAUAN PUSTAKA

TINJAUAN PUSTAKA

Virgin Coconut Oil

Virgin Coconut Oil (VCO) adalah minyak kelapa yang salah satu cara pembuatannya dengan fermentasi santan, atau dengan kata lain tanpa menggunakan pemanasan sama sekali. Selain dengan fermentasi ada beberapa teknik lain untuk ekstraksi minyak kelapa, seperti dengan cara fisika, kimia, atau proses enzimatik yang menggunakan *inokulum mikroba* sebagai starter (Rini Handayani, 2009; Gopala Krisna, 2010; Satheesh Neela, 2012; Sri Rejeki 2013). Metode ekstraksi VCO yang lainnya adalah fermentasi santan tanpa penambahan mikroorganisma sebagai stater, dinamakan dengan fermentasi tradisional seperti yang dilaporkan oleh Divina D. Bawalan, 2006, Sri Kumalaningsih (2012), dan melanjutkannya dengan menghitung jumlah mikroba dalam proses fermentasi, belum mengidentifikasi mikrobanya. Suryani, (2014) sudah mengidentifikasi mikrobanya yang memperoleh 5 kelompok spesies yaitu *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus thermobacterium*, *Corineaebacterium bovis*, *Corineaebacterium xerosis*, dan *Microoccus luteus*. Urutan gen dari isolat sudah di daftarkan di DDBJ (Data DNA Bank Jepang) dengan nomor pendaftaran (*acession number*) AB890143. *Virgin Coconut Oil* (VCO) mengandung asam lemak rantai pendek (*Medium Chain Trigiserida* biasa disingkat dengan MCT) (Gopala Krisna, 2010; Arlee 2013). VCO mempunyai banyak kegunaan, diantaranya adalah membantu masalah kesehatan malnutrisi pada anak-anak, mengurangi berat badan, dan penyembuhan HIV karena VCO mempunyai fungsi antiviral. VCO juga berfungsi sebagai antijamur seperti antijamur dari spesies jamur *Candida* (E.V.Carandang, 2008). Khasiat lain untuk kesehatan adalah sebagai antibakteri yang bisa menghambat pertumbuhan mikroba

Staphilococcus (Manohar et.al 2013), bersifat sebagai antioksidan (Marina,2009) karena kandungan fenol yang tinggi dan dapat mengurangi efek dari osteoporosis (Abu Jazia 2012).

Bakteri Asam Laktat

Bakteri Asam Laktat (BAL) adalah bakteri yang dihasilkan dari fermentasi baik hewan maupun tumbuhan yang kaya akan karbohidrat dan protein. Fermentasi ini menghasilkan komponen-komponen seperti asam asetat, asam laktat (utama), etanol, karbondioksida, dan asam formiat, H₂ O₂ dan peptida antimikroba (bakteriosin), Epo Poli Sakarida (EPS), dan Vitamin. Bakteri Asam Laktat adalah bakteri Gram positif (+), berbentuk batang, ataupun bulat, tidak membentuk spora, katalase –negatif, asam toleran dan organisme anearob fakultatif. BAL pada umumnya adalah bakteri yang aman dikonsumsi (*food grade microorganism*) dan merupakan bakteri yang ada dalam kelompok GRAS (Generally Recognized As Safe). Yang termasuk spesies BAL antara lain genus *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Enterococcus* dan *Leuconostoc* (Fernanda Mozzi, 2010, Luz adriana, 2010). BAL tumbuh pada proses fermentasi substrat yang banyak mengandung karbohidrat. Bakteri asam laktat (BAL) mencakup kelompok mikroorganisme yang heterogen, dimana BAL adalah Gram (+), tidak membentuk spora, katalase -negatif, asam- toleran, organisme anaerob fakultatif kecuali untuk beberapa spesies. Pada umumnya BAL adalah non patogen dan diakui sebagai bakteri yang berstatus safe yaitu aman untuk di konsumsi. Spesies BAL antara lain: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, dan *Leuconostoc* (Fernanda Mozzi, 2010).

Suryani (2014) melaporkan bahwa terdapat BAL pada VCO, dan VCO dapat menghambat aktifitas pertumbuhan mikroba 5 bakteri uji yaitu *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphilococcus aureus*, *Listeria monocitogenes* *Salmonella typhifosa* dan

kemampuan anti jamur terhadap 3 jamur pattogen yaitu *Candida sp*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp* disebabkan oleh adanya bakteriosin, karena bakteriosin adalah peptida yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri pattogen dan tidak berbahaya bagi bakteri non pattogen.

Otitis Media Suppurativ Kronis.

Otitis media supuratif kronik (OMSK) adalah peradangan kronis dari telinga tengah dan rongga mastoid, yang menimbulkan masalah kesehatan masyarakat yang besar, karena bila komplikasi akan menyebabkan radang otak sehingga menyebabkan kematian (Rajahmundry, 2012).

Penderita Otitis Media Suppurativ ini mulai dari anak-anak sampai dengan orang dewasa, Yaor, M.A (2006) melaporkan bahwa dari 73 penderita yang diteliti dengan rentang usia dari 9 sampai 84 tahun terdapat anak-anak dengan umur 9 sampai 15 tahun sebanyak 17 orang yaitu 24 %.

Rajahmundry (2012) melaporkan bahwa dari 150 penderita Otitis Media Suppurativ Kronis telah diambil cairan telinganya dan diisolasi bakteri pattogen nya , ternyata ada beberapa bakteri pattogen yang ditemukan seperti *Staphylococcus aureus* (36%), spesies *Proteus* (32%), *Pseudomonas aeruginosa* (24%), juga telah dianalisa kesensitifannya terhadap beberapa antibiotik dan ternyata ada yang telah resisten atau sudah tidak mempan lagi dengan antibiotik berikut: 89 % resisten terhadap ciprofloxacin, 76,5 % gentamisin, dan 59,3 % kloramfenikol

Studi Pendahuluan yang telah dilaksanakan

Suryani (2014) telah mengisolasi Bakteri Asam Laktat (BAL) yang ada pada lapisan minyak Virgin Coconut Oil (VCO) dan didapatkan sebanyak 187 isolat bakteri asam laktat (BAL) termasuk ke dalam 5 kelompok spesies yaitu *Lactobacillus plantarum* , *Lactobacillus thermobacterium*, *Corineaebacterium bovis*, *Corineaebacterium xerosis*, dan *Microccus luteus*. Urutan gen dari isolat sudah di daftarkan di DDBJ (Data DNA Bank Jepang) dengan nomor pendaftaran (*acession number*) AB890143,. Isolat BAL yang di dapat mempunyai kemampuan antimikroba/antibakteri terhadap 5 bakteri uji yaitu *Escherichia coli*, *Bacillus substilis*, *Staphilococcus aureus*, *Listeria monocitogenes*

Salmonella typhiphosa dan kemampuan anti jamur terhadap 3 jamur pattogen yaitu *Candida sp*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp* Dari isolat BAL itu dapat diisolasi bakteriosin nya dengan karakteristik berikut: dapat menghambat pertumbuhan bakteri pattogen dalam range pH yang panjang yaitu dari pH 2 – pH 9 mempunyai aktifitas pada temperatur -20⁰ C , 4⁰ C sampai 121⁰ C dan dari hasil SDS – PAGE, berat molekulnya diperkirakan 3,5 kD.

Rajahmuhdy (2012) telah mengisolasi bakteri pattogen yang terdapat pada cairan telinga 150 penderita Otitis Media dan memperoleh 192 isolat bakteri yang terdiri dari *Staphylococcus aureus* (36%), *spesies Proteus* (32%), *Pseudomonas aeruginosa* (24%) dan telah menguji kesensitifan beberapa antibiotik ternyata 89% resisten terhadap ciprofloxacin, gentamisin (76,5%) dan kloramfenikol (59,3%).

Manohar (2013) melaporkan VCO berguna dalam bidang kesehatan sebagai antibakteri yang bisa menghambat pertumbuhan mikroba *Staphilococcus*.

Suryani tahun 2016 telah mengisolasi bakteri patogen OMSK dan didapatkan *Pseudomonas aureginosa*, *Klebsiella*, *Proteus*, *S aureus* dan *S epidermidis*. Suryani (2017) telah melakukan analisa antimikroba dari bakteri asam laktat yang ada pada lapisan minyak VCO terhadap bakteri patogen OMSK dan hasilnya dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen tersebut.

BAB.III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

TUJUAN PENELITIAN

Tujuan Khusus:

1. Melakukan Standarisasi VCO yang digunakan
2. Optimalisasi formula obat tetes telinga berbahan dasar VCO
3. Menganalisa sifat fisiko kimia dan kompabilitas bahan aktif

MANFAAT PENELITIAN

bila didapatkan formula obat tetes telinga untuk pasien OMSK berbahan dasar VCO (alami) yang optimal, maka dapat dibuat obat tetes telinga nya, dan masalah resistensi dapat diatasi. Selanjutnya penderita OMSK dapat dicegah berlanjut ke peradangan selaput otak yang mematikan. Akhirnya dapat menurunkan angka kematian penduduk.

BAB IV. METODE

METODE.

Tempat:

1. Laboratorium Kopertis X dan
2. Labor dasar Universitas Muhammadiyah Sumatera Barat

Sampel:

VCO

Biakan bakteri patogen OMSK:

Biakan murni *Pseudomonas aeruginosa*

Biakan murni *S.aureus*

Biakan murni *S.epidermidis*

Biakan murni *Klebsiella*

Biakan murni *Proteus*

Alat:

Tabung reaksi besar 200 buah

Tabung reaksi kecil 200 buah

Petri sedang 200 buah

Petri besar 200 buah

Pipet tetes 50 buah

Tusuk gigi 10 kotak

Kapas 1 bal

Erlenmeyer 250 ml 25 buah

Erlenmeyer 500 ml 5 buah

Erlenmeyer 1000 ml % buah

Lampu spiritus

Botol semprot

Beker gelas 500 ml

Beker glass 1000 ml

Zat:

Aquades 500 liter

Media agar darah

Media Saboroud

Media MRS

Media MRSA

Media NA

H₂O₂

HCl, H₂SO₄, HNO₃



Metodologi:

Penelitian terdiri dari 2 Tahapan dimana tahap I dikerjakan pada tahun I dan tahap 2 dikerjakan pada tahun II .

Pada tahun I yang akan dikerjakan adalah :

1. Uji daya hambat VCO yang mengandung bermacam-macam bakteri asam laktat terhadap bakteri patogen penyebab OMSK di Laboratorium Kopertis X, dengan memvariasikan jumlah VCO yang ditambahkan dan juga memvariasikan bakteri patogen yang digunakan:

Untuk itu dapat dibuatkan tabel data yang akan diukur atau analisa seperti berikut:

No	Jumlah VCO yang ditambahkan (ml)	Bakteri patogen OMSK	Daya hambat mm daerah Halo
1.	2.	<i>Pseudomonas aureginosa</i>	
2.	4		
3.	6		
4.	8		
5.	10		
6.	12		
7.	dst		
	Jumlah obat tetes sintetis 1		
	2		
	4		
	6		
	8		
	Jumlah obat tetes sintetis 2		
	2		
	4		
	6		
	Jumlah obat sintetis 3		
	2		
	4		
	6		
	8		

2. Standarisasi VCO yang digunakan untuk bahan dasar obat tetes telinga yaitu: Pengukuran mengukur kadar asam laurat,kekentalan, pH, Berat Jenis, sifat optis aktif, %FFA, bilangan penyabunan dan angka Iod serta jumlah bakteri asam laktat yang ada pada lapisan minyak VCO

Dan Pada Tahun ke 2 Yang akan dikerjakan adalah:

1. Optimalisasi formula dengan membuat beberapa formula sediaan obat tetes telinga dengan memvariasikan konsentrasi VCO dalam sediaan.
2. Dievaluasi sifat fisikokimia dan
3. Dievaluasi kompatibilitas bahan aktif
4. Dievaluasi eksipien seperti : kejernihan, kelarutan, pH stabilita, stabilitas zat aktif, inkompatibilitas, dosis, bahan pembantu {(cairan pembawa/pelarut cocok, iskositas, pengawet dan antioksidan) metode pembuatan, evaluasi dan penyimpanan, terakhir wadah/penyimpanan

Adapun pembagian tugas diantara Tim Pengusul Penelitian adalah sebagai berikut:

Pada tahun I yang akan dikerjakan adalah:

1. Uji daya hambat VCO yang mengandung bermacam-macam bakteri asam laktat terhadap bakteri patogen penyebab OMSK di Laboratorium Kopertis X, dengan memvariasikan jumlah VCO yang ditambahkan dan juga memvariasikan bakteri patogen yang digunakan:

Yang bertanggung jawab adalah Dr. Suryani, Msi bersama dengan Dra. Tuty Taslim, Msi, Apt.

2. **Standarisasi vco yang digunakan seperti :**

1. Pengukuran mengukur kadar asam laurat,
2. kekentalan,
3. pH,
4. Berat Jenis,
5. sifat optis aktif
6. , %FFA,
7. bilangan penyabunan dan
8. angka Iod
9. jumlah bakteri asam laktat yang ada pada lapisan minyak VCO

Yang bertanggung jawab adalah Dr. Suryani, Msi Bidang Ilmu Kimia /Biokimia) dengan Dr. Femi Earnestly (Bidang ilmu Kimia)

Pada Tahun ke II yang akan dikerjakan adalah :

5. Optimalisasi formula dengan membuat beberapa formula sediaan obat tetes telinga dengan memvariasikan konsentrasi VCO dalam sediaan.

Yang bertanggungjawab adalah Dr. Suryani, Msi dengan Dra. Tuty aslim, Msi, Apt.

6. Dievaluasi sifat fisikokimia dan
7. Dievaluasi kompatibilitas bahan aktif
8. Dievaluasi eksipien seperti :
 - kejernihan,
 - kelarutan,
 - pH stabilita,
 - stabilitas zat aktif,
 - inkompatibilitas,

Yang bertanggungjawab adalah Dr.Suryani,Msi dan Dr. Femi earnesly

Pengerjaan selanjutnya adalah :

- dosis,
- bahan pembantu
 - ❖ (cairan pembawa/pelarut yang cocok,
 - ❖ viskositas, pengawet dan antioksidan) ,
 - ❖ metode pembuatan,
 - ❖ evaluasi
 - ❖ dan penyimpanan,
 - ❖ terakhir wadah/penyimpanan

Yang bertanggungjawab adalah

Yang bertanggungjawab adalah Dr. Suryani, Msi dengan Dra. Tuty aslim, Msi, Apt.

Tabel Pembagian Tugas menurut Bidang Ilmu Tim Pengusul

No.	Kegiatan	Penanggungjawab/ bidang
1.	Pada tahun I 1. Uji daya hambat VCO yang mengandung bermacam-macam bakteri asam laktat terhadap bakteri patogen penyebab OMSK di Laboratorium Kopertis X, dengan memvariasikan jumlah VCO yang ditambahkan dan juga memvariasikan bakteri patogen yang digunakan:	Bidang Kimia dan Farmasi Dr. Suryani,Msi bersama dengan Dra.Tuty Taslim, Msi, Apt. (dibantu 4 orang mahasiswa penelitian)
	2.Standarisasi vco yang digunakan seperti : Pengukuran mengukur kadar asam laurat,	Bidang Kimia Dr.Suryani,Msi dan

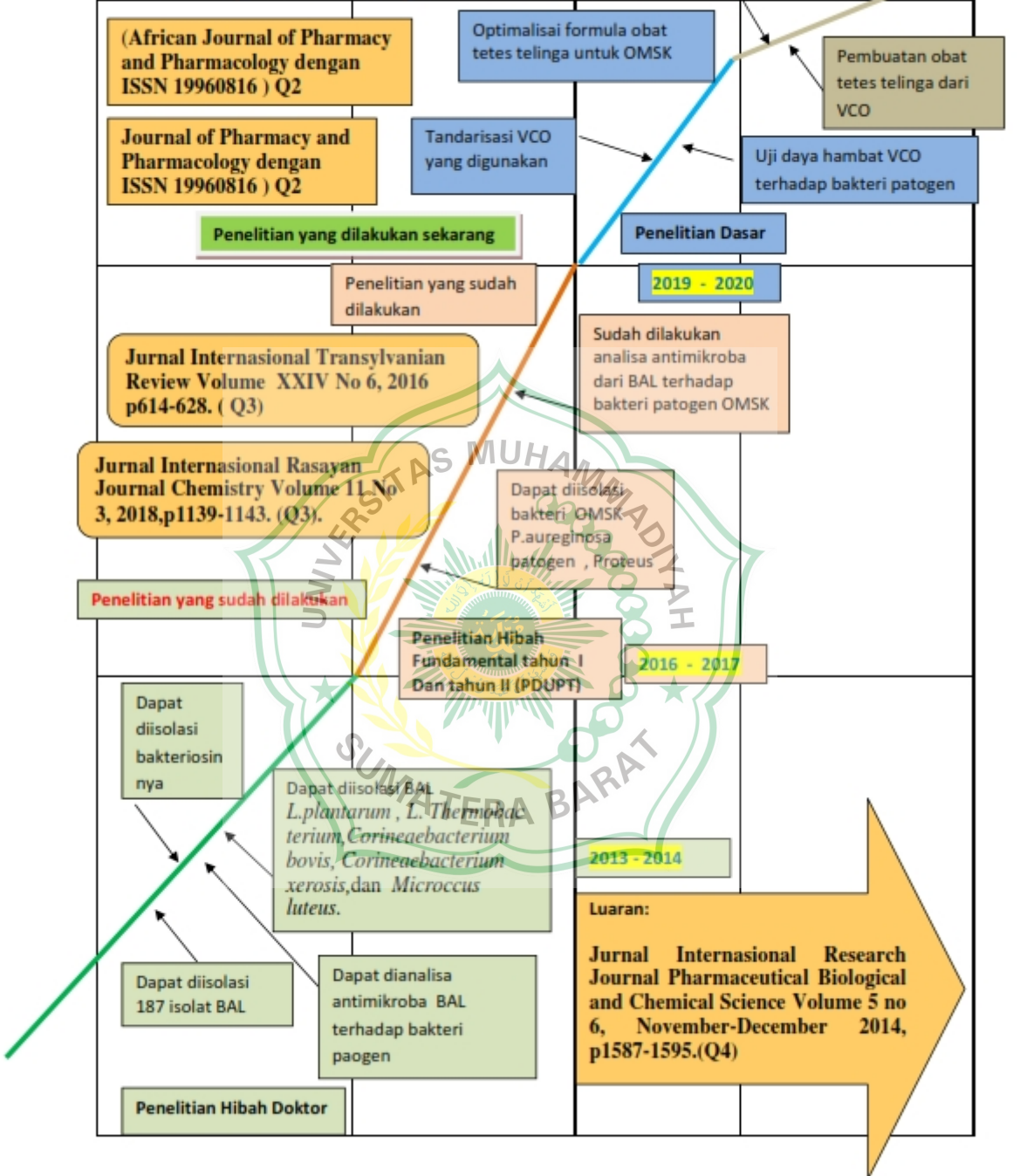
	kekentalan, pH, Berat Jenis, sifat optis aktif , %FFA, bilangan penyabunan dan angka Iod jumlah bakteri asam laktat yang ada pada lapisan minyak VCO	Dr. Femi earnesly (dibantu 4 orang mahasiswa penelitian)
2.	Pada Tahun ke II 1. Optimalisasi formula dengan membuat beberapa formula sediaan obat tetes telinga dengan memvariasikan konsentrasi VCO dalam sediaan.	Bidang Farmasi dan Kimia Dr. Suryani, Msi dengan Dra. Tuty aslim, Msi, Apt. (dibantu 4 orang mahasiswa penelitian)
	2. Dievaluasi sifat fisikokimia dan 3. Dievaluasi kompatibilitas bahan aktif 4. Dievaluasi eksipien seperti : <ul style="list-style-type: none"> • kejernihan, • kelarutan, • pH stabilita, • stabilitas zat aktif, • inkompatibilitas, 	Bidang Kimia Dr.Suryani,Msi dan Dr. Femi earnesly (dibantu 4 orang mahasiswa penelitian)
	Pengerjaan selanjutnya adalah : <ul style="list-style-type: none"> • dosis, • bahan pembantu <ul style="list-style-type: none"> ❖ (cairan pembawa/pelarut yang cocok, ❖ viskositas, pengawet dan antioksidan) , ❖ metode pembuatan, ❖ evaluasi ❖ dan penyimpanan, ❖ terakhir wadah/penyimpanan 	Bidang Kimia Dr.Suryani,Msi dan Dra. Tuty Taslim, Msi, Apt.(dibantu 4 orang mahasiswa penelitian)

METODE PENELITIAN

obat tetes telinga dari VCO merupakan antimikroba alami

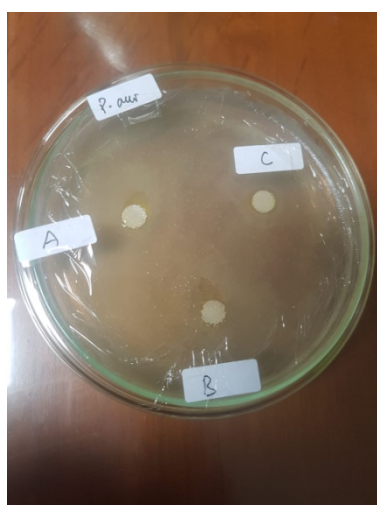
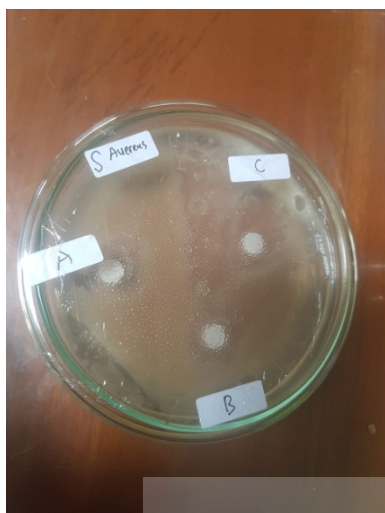
Pengujian obat tetes terhadap manusia

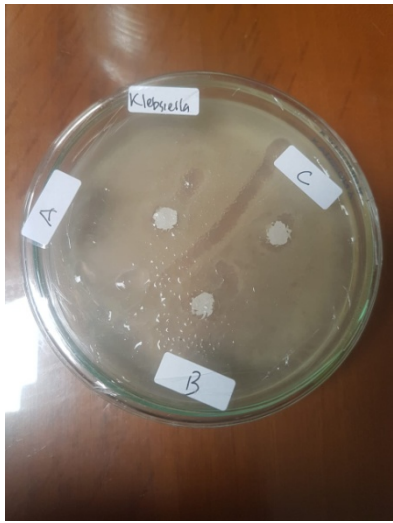
Penelitian Terapan
2021 - 2022



BAB V. HASIL

I. Uji Daya Hambat VCO dengan langsung menjadikan VCO sebagai sampel





DATA ANALISA VCO (VIRGIN COCONUT OIL)

1. ANALISA BILANGAN ASAM

NO	KODE SAMPEL	BERAT SAMPEL	VOLUME TITRASI	% ANGKA ASAM	RATA-RATA BERAT SAMPEL
1	A1	20,499	3,5	0,9713	20,44235
2	A2	20,3857	3,4	0,9488	
3	B1	20,3053	3,8	1,0696	20,34375
4	B2	20,3822	3,6	1,0047	
5	C1	20,5112	3,7	1,0262	20,4255
6	C2	20,3398	3,6	1,0068	

2. ANALISA ANGKA YODIUM

NO	KODE SAMPEL	BERAT SAMPEL	VOLUME TITRASI	% ANGKA YODIUM	RATA-RATA BERAT SAMPEL
1	A1	0,5865	34,2	5,1063	0,6
2	A2	0,6135	33,95	5,4121	
3	B1	0,5864	34	5,5512	0,58565
4	B2	0,5849	34	5,5655	
5	C1	0,5812	34,1	5,3769	0,5887
6	C2	0,5962	34,05	5,3508	

3. ANALISA BILANGAN PENYABUNAN

NO	KODE SAMPEL	BERAT SAMPEL	VOLUME TITRASI	% ANGKA PENYABUNAN	RATA-RATA BERAT SAMPEL
1	A1	5,0242	75,4	333,8621	5,0226
2	A2	5,021	75,5	333,516	
3	B1	5,0191	70,4	362,1446	5,0277
4	B2	5,0363	70,5	360,3509	
5	C1	5,0225	78,3	317,779	5,0267
6	C2	5,0309	78,2	317,806	

4. ANALISA ANGKA ASAM LEMAK BEBAS

NO	KODE SAMPEL	BERAT SAMPEL	VOLUME TITRASI	% ASAM LEMAK BEBAS	RATA-RATA BERAT SAMPEL
1	A1	28,2289	3,2	0,2322	28,2759
2	A2	28,3229	3,1	0,2242	
3	B1	28,2335	4,1	0,2974	28,22205
4	B2	28,2106	4,1	0,2976	
5	C1	28,005	3	0,2127	28,11285
6	C2	28,2207	2,7	0,1959	

5. ANALISA pH

NO	KODE SAMPEL	pH	RATA-RATA pH
1	A1	6,67	6,665
2	A2	6,66	
3	B1	6,45	6,455
4	B2	6,46	
5	C1	6,51	6,505
6	C2	6,5	



DATA HASIL PENELITIAN

1. Bobot Jenis vco

Perc ke	Bobot VCO A	Bobot Air	BJ	BJ VCO A
1.	22,6279	24,6269	0,9188	0,9192
2.	22,6966	24,6951	0,9191	
3.	23,2072	25,2361	0,9196	

Perc ke	Bobot VCO B	Bobot Air	BJ	BJ VCO B
1.	22,7943	24,7981	0,9192	0,9189
2.	23,2228	25,2766	0,9187	
3.	22,6895	24,6936	0,9188	

Perc ke	Bobot VCO C	Bobot Air	BJ	BJ VCO C
1.	22,6591	24,6947	0,9190	0,9187
2.	22,7893	24,8020	0,9188	
3.	23,1973	25,2577	0,9184	

Perc ke	Bobot Erlamycetin	Bobot Air	BJ	BJ Erlamycetin
1.	25,5940	24,6819	1,0370	1,0371
2.	25,5996	24,6851	1,0370	
3.	25,5975	24,6798	1,0372	

Perc ke	Bobot Vital	Bobot Air	BJ	BJ Vital
1.	22,1123	25,2694	0,8751	0,8750
2.	22,0997	25,2672	0,8746	
3.	22,1189	25,2686	0,8754	

Perc ke	Bobot Reco	Bobot Air	BJ	BJ Reco
1.	25,7546	24,8073	1,0382	1,0385
2.	25,7620	24,7947	1,0387	
3.	25,7592	24,8025	1,0386	

DATA HASIL PENELITIAN

1. **Bobot Jenis vco**

Perc ke	Bobot VCO A	Bobot Air	BJ	BJ VCO A
1.	22,6279	24,6269	0,9188	0,9192
2.	22,6966	24,6951	0,9191	
3.	23,2072	25,2361	0,9196	

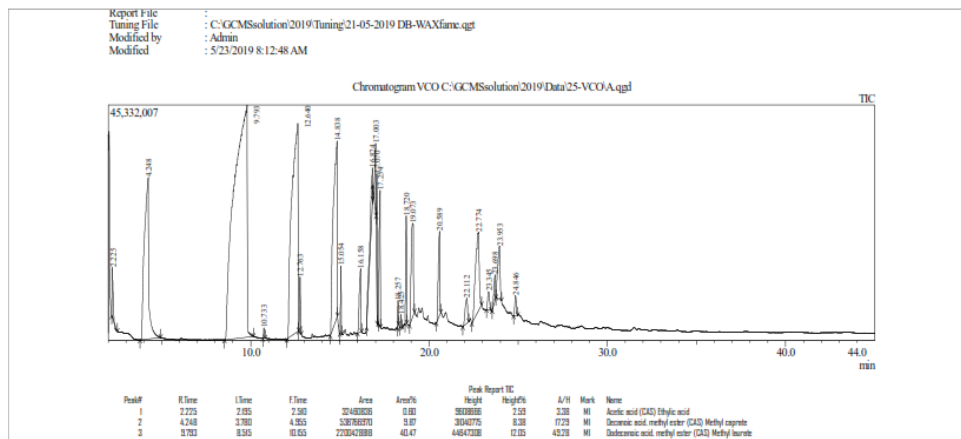
Perc ke	Bobot VCO B	Bobot Air	BJ	BJ VCO B
1.	22,7943	24,7981	0,9192	0,9189
2.	23,2228	25,2766	0,9187	
3.	22,6895	24,6936	0,9188	

Perc ke	Bobot VCO C	Bobot Air	BJ	BJ VCO C
1.	22,6591	24,6947	0,9190	0,9187
2.	22,7893	24,8020	0,9188	
3.	23,1973	25,2577	0,9184	

Perc ke	Bobot Erlamycetin	Bobot Air	BJ	BJ Erlamycetin
1.	25,5940	24,6819	1,0370	1,0371
2.	25,5996	24,6851	1,0370	
3.	25,5975	24,6798	1,0372	

Perc ke	Bobot Vital	Bobot Air	BJ	BJ Vital
1.	22,1123	25,2694	0,8751	0,8750
2.	22,0997	25,2672	0,8746	
3.	22,1189	25,2686	0,8754	

Perc ke	Bobot Reco	Bobot Air	BJ	BJ Reco
1.	25,7546	24,8073	1,0382	1,0385
2.	25,7620	24,7947	1,0387	
3.	25,7592	24,8025	1,0386	



GC-MS dari VCO

LUARAN YANG DICAPAI

4. Artikel yang sudah diseminarkan pada Seminar Internasional ICICS kerjasama dengan IPB dan HKI (Himpunan Kimiawan Indonesia), pada 5 – 6 Agustus 2019. Dan akan diterbitkan pada Jurnal Internasional bereputasi Scopus Q3 Indonesian Journal Chemistry (IJC), sudah pada tahap Review.
5. Draft artikel pada Jurnal Internasional bereputasi Scopus Q2 yaitu Rasayan Journal Chemistry
6. Draft Paten.



LAMPIRAN.

1. ISOLATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA (LAB) IN COCONUT MILK FERMENTATION

Suryani Suryani ^{*1}, Femi Earnestly ², Abdi Dharma³, Sariani ⁴, Fauzan⁵.

^{1,2}. Department of Chemistry, Muhammadiyah University of West Sumatera

(Jalan Pasir Kandang No 4, Pasia Nan Tigo, Koto Tangah, Padang, Indonesia)

³Department of Chemistry, University of Andalas

(UNAND Limau Manis, Padang, Indonesia)

⁴Department of English, Politeknik Negeri Padang, Indonesia

⁵Department of Biology, Muhammadiyah University of West Sumatera

(Jalan Pasir Kandang No 4, Pasia Nan Tigo, Koto Tangah, Padang, Indonesia)

* Corresponding author, tel/: 081275180200, email: suryanimdiah@yahoo.com

ABSTRACT

Lactic Acid Bacteria (LAB) contains of bacteriocin which is peptide that has the capacity to isolate the growth of pathogenic bacteria, where in contrast is harmless for other good bacteria. LAB is found in material fermentation containing high carbohydrate and protein like coconut milk which is undergone the process becoming Virgin Coconut Oil (VCO). In the fermentation process, there were three layers formed; oil, blondo, and water (waste). The LAB isolation on coconut milk fermentation used MRSA + 0,5% CaCO₃ as the selective media. with the dilution from 10⁻¹ to 10⁻⁷. Here, each sample was taken from each layer formed in the milk fermentation process. The identification was carried out in two ways, first was morphology identification, and the second one was molecular identification applying the PCR method. There were 97 isolates obtained from oil layer, 23 isolates from Blondo layer, and 14 isolates from water layer. After being identified well based on both morphology, and molecular on the oil layer, there were six LAB found, which were *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Micrococcus luteus*, *Corineaebacterium bovis*, *Lactobacillus thermobacterium* dan *Corineaebacterium xerocis*. Three types of LAB within the blondo were identified as *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus thermobacterium*.

Keywords: Isolation, molecular identification, Virgin Coconut Oil (VC), Lactic Acid Bacteria (LAB), PCR

ABSTRAK

Bakteri Asam Laktat (BAL) mengandung bakteriosin yaitu peptida yang mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri patogen, tetapi tidak berbahaya bagi bakteri baik. Bakteri asam laktat terdapat pada fermentasi bahan yang mengandung karbohidrat dan protein tinggi seperti santan diproses menjadi Virgin Coconut Oil. Pada proses fermentasi santan menjadi Virgin Coconut Oil (VCO) terbentuk tiga lapisan yaitu lapisan Minyak, lapisan Blondo dan lapisan Air (kotoran). Isolasi Bakteri Asam Laktat dari fermentasi santan menggunakan media selektif MRSA + 0,5% CaCO₃ dan media MRSA saja dengan pengenceran 10⁻¹ sampai 10⁻⁷. Dimana sampel diambil dari setiap lapisan hasil proses fermentasi santan menjadi VCO. Identifikasi dilakukan dengan dua cara yaitu identifikasi morfologi dan identifikasi molekular dengan menggunakan metoda PCR. Dari lapisan Minyak didapat 97 isolat, lapisan blondo 23 isolat dan lapisan Air 14 isolat. Setelah diidentifikasi baik secara morfologi maupun molekular ternyata pada lapisan minyak terdapat 6 jenis Bakteri Asam Laktat (BAL) yaitu *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Micrococcus luteus*, *Corineabacterium bovis*, *Lactobacillus thermobacterium* dan *Corineabacterium xerocis*. Pada blondo didapatkan 3 jenis Bakteri Asam Laktat (BAL) yaitu *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* dan *Lactobacillus thermobacterium*.

Kata kunci: isolasi, identifikasi molekular, Virgin Coconut Oil(VCO), Bakteri Asam Laktat (BAL), PCR

INTRODUCTION

Lactid acid bacteria (LAB) are bacteria isolated from materials which are rich mainly in carbohydrates and containing high protein ¹ and are able to ferment those material in order to produce lactid acid. These bacteria are beneficial as source of probiotic ^{2,3,4} and contain of bacteriocin ^{5,6} which is peptides that can destroy the wall of patogen bacteria cell and kill those bacteria, which is in contrast to good bacteria.

Bacteriocin has huge potential as food preservative ^{7, 8} besides its ability as antimicrobial ^{9, 10} which in this work proves that the bacteriocin existing in lactid acid

Lactobacillus spp can inhibit the growth of *chloramfenikol*, *Ampisilin* and *Tetrasiklin* antibiotics. In general, LAB isolation is in line with the observation of its antibacteria ^{10, 11, 12}.

The ability of LAB containing bacteriocin which function as either antimicrobial or antibiotics is equally important with the ability of natural antibiotics which are isolated from the plants like *Trichomanes chinense* ¹³, and is able to inhibit *Staphilococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherichia coli*. Other antibiotics derived from Marine Actinomycetes microbe which is *Sterptomyces* sp A11 has been determined as well ¹⁴. Apparently, this compound can also inhibit *Bacillus substillis*, *E.coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*.

Several of LAB have been isolated from various sources like in Turkey ¹¹ obtaining 45 LAB isolates which are isolated from "Boza" sample, and consisted of *Lactococcus lactis* subsp, *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus brevi*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Enterococcus faeciu*, *Lactobacillus graminis*, *Pediococcus species* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. The LAB of Medicinal herbs originated from Pirandai have also been isolated ¹⁵, and *Lactobacillus acidophillus* and *Lactococcus raffinolactis* were obtained. Traditional fermented food originated from West Sichuan Area like yoghurt is also containing LAB ¹⁶ namely *Lactobacillus* and *Lactococcus*, which is further identified applying PCR, and turned out as *Lactobacillus fermentum* and *Lactococcus lactis*. Fermented food from other areas like "Teff" contains LAB ¹² such as *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paracasei* and *Enterococcus faccium*. Besides that Dairy fermented food is also included into those which contain lactic acid bacteria *Lactobacillus* spp ¹⁰. According to what have been mentioned above, the lactic acid bacteria isolation have been performed from various material ² i.e., cheese, kefir grains, milk, beverage, source of poultry, cow rumen fluids, human feces, chicken feed, beef, dadih, pineapple waste, and etc.

Nevertheless, there is none performed in identifying the lactic acid bacteria of the coconut milk fermentation process forming Virgin Coconut Oil (VCO), but some experts had already isolate the bacteriocin from virgin coconut oil ¹⁷ The fermented coconut milk producing VCO has many advantages such as losing weight, reducing cholesterol level, and inhibiting the growth of pathogenic bacteria, or functioning as both antibacteria and antivirus ^{18, 19, 20}.

EXPERIMENTAL SECTION

This research was conducted at several laboratories, i.e., LLDIKTI Region X Laboratory, Baso Veterinary Laboratory, Biomedical Laboratory, Medical Faculty of Andalas University. and Chemistry Laboratory of Muhammadiyah University of West Sumatra.

Materials

The materials used in this research were as follows: Coconut milk which was processed into Virgin Coconut Oil, oil layer (VCO), Blondo layer and water layer obtained from the process of making VCO through coconut milk fermentation. Whereas the media taken for isolating Lactic Acid Bacteria were Mannosa Rogosa Sharpe Broth / MRSB (Merck), CaCO₃ (technical), Agarosa (Merck). In addition, sterile saline solution, MRSA and MRSA + 0.5% CaCO₃ were used as the ingredients to identify morphologically, and to perform biochemical tests such as Complex Iodine, Safranin, Alcohol, Aquades and so on. Whilst the materials used for molecular identification were primary, 500µl Tris EDTA (TE), ammonium acetate, SDS-Polyacrylamide (SDS-PAGE) gel material 18-20%, comassife blue for. Ase RNA 3 µl, 70% ethanol, lysozyme, obtained ddH₂O 27 µl, phenol, SDS (Sodium Dodesil Sulfate), chloroform, Proteinase K (10 mg / µl), isoamil alcohol 25: 24: 1, and protein marker with the size of 10,000-40,000. Typically, DNA α, Tris HCl pH 8, isopropanol to fractionate DNA, ethidium bromide, agaros gel, 3M acetate, agarose, TBE buffer (Tris-Boric-EDTA) were taken.

Instrumentation

Here in this research, the equipment used in order to isolate and to conduct morphology identification as well as to perform biochemical tests of Lactic Acid Bacteria besides those commonly used glass tools were Autocklaf, Laminar Flow and Microscopes. In another hand, for molecular identification Electrophoresis was also used other than PCR.

Procedure

Isolation of Lactic Acid Bacteria

In order to get isolates, LAB was isolated from three existing layers containing coconut milk fermentation process to become Virgin Coconut Oil, namely oil layer, blondo layer and water layer. Isolation was carried out using 2 media, they were MRSA media and MRSA + media

0.5% CaCO₃. By applying a dilution method up to 10⁻⁷, the isolation process was performed for several times using the pour plate and streak plate method, so that a number of isolates could be obtained which was followed by the identification process morphologically along with biochemical tests.

Morphological identification

Then the obtained isolates were proceeded by performing identification morphologically where isolates were planted in MRSA media, and incubated at 37 °C. Observed on the shape of the colony, some were convex, whereas some others were flat or concave. Examined also the color of the colonies, where there were white in color, yellow, yellowish or clear and so on. The arrangement of cells were also significant to be taken into account whether the shape of the cell was round or hollow.

Molecular identification.

Molecular identification was initiated with the genomic isolation stage of lactic acid bacterial DNA isolates obtained from morphological identification and biochemical tests, then 16S rRNA gene amplification PCR 16S rDNA amplification per reaction of 30 µL using 27F primer (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') position 8-27 on the E. Coli chromosome and primer 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGA CTT -3') in positions of 1510-1492 on the E. coli chromosome (Nikolova et al. 2009), followed by analyzing it in the Electrophoresis Gel and was ended by performing its sequencing data analysis.

RESULT AND DISCUSSION

Isolation of Lactic Acid Bacteria

The colony of Lactic Acid Bacteria isolation using the MRSA media in the absence of adding 0,5% CaCO₃ was able to be measured at the dilution of 10⁻⁵ up to 10⁻⁷. At 10⁻¹ up to 10⁻⁴ dilution, the colonies were grown so dense therefore they were unmeasurable. The grown bacteria were yellowish, convex, and rather shiny. However, as highlighted by Delfaedah and Sumaryati Syukur (2013); Hoque (2010), Heravi (2011), Syukur and Husmaini (2014) that those grown colonies were identical among each other, and there were no certainty that these were LAB colonies. To confirm that these were LAB colonies, Husmaini and Endang

Purwati (2012) suggested to proceed using KIT AOI CHL 50. The LAB colonies which were grown in MRSA media can be seen in Figure 1 below:

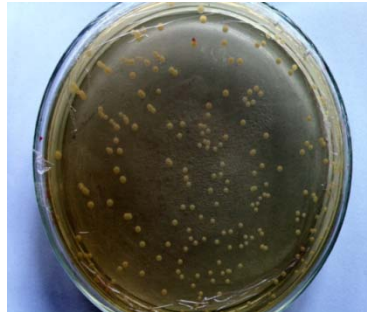


Figure 1. LAB isolates colony grown in MRS media

LAB isolation process using MRSA media + 0,5% CaCO₃, would form the “Halo” area, where one colony was found in its center, and was confirmed as LAB bacteria colony. CaCO₃ would be reacted with the acid produced by LAB, neutralized it, and made the area free from bacteria and in clear condition. The isolates grown in the center of “Halo” area were picked using ose, and then scratch them to MRSA media for morphology identification. LAB colony grown in MRSA media + 0,5% CaCO₃ can be seen in Figure 2. below:

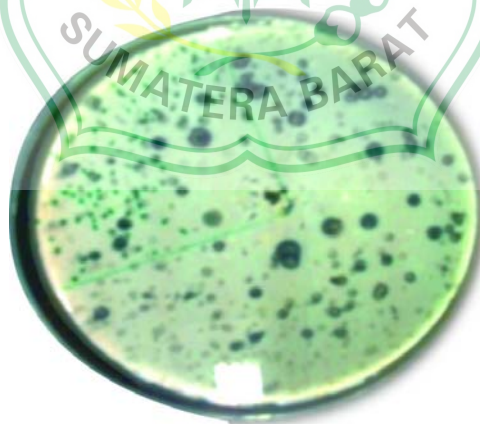


Figure 2. LAB isolate colony grown in MRSA media + 0,5% CaCO₃

The use of MRSA media + 0,5% CaCO₃ in isolating LAB was in accordance as highlighted by Rukmini Putri (2012); where she fermented Lactid Acid Bacteria obtained from fermentation of *Growol*, Indonesia traditional cuisine, by using MRSA media added with 1,5

% CaCO₃ . Whereas, Nguyen (2010), isolated LAB using MRSA media 1 % CaCO₃ as well on the Vietnamese traditional food namely *Nem chua*, and Sarkono (2010) isolated the LAB derived from abalone using MRSA media + 0,5 % CaCO₃, the indicated colony was the growth of LAB bacteria marked by the clear zone in its surrounding.

The LAB isolate colony after being measured is shown in Table 1 below:

Table 1. LAB isolates amount of isolated result

No.	Layer	Isolate Amount
1.	Oil	97
2.	Blondo	23
3.	Water	14

Morphology Identification

There were 134 LAB isolates of the isolation result using the MRSA media + CaCO₃ would experience further analysis process on morphology identification. It resulted variation in shape of colony like convex, flat, and concave, variation in color like white, yellow, yellowish, and clear, and variation in smell like odour and odourless. This morphology identification result of LAB isolates was confirmed by biochemical test's results such as gram staining, motility test, and others, and combined with physiology test as shown in Table 2 below:

Table 2. Result of Morphology Identification on LAB Isolates

No.	Layer	Type of LAB
1.	Oil Layer	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Corineaebacterium bovis</i> <i>Corineaebacterium xerosis</i>

		<i>Lactobacillus thermobacterium</i>
2.	Blondo Layer	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Lactobacillus thermobacterium</i>
3.	Water Layer	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Corineaebacterium bovis</i> <i>Corineaebacterium xerosis</i>

Molecular Identification

From 134 LAB isolates obtained, some were performed further identification molecularly using PCR, in order to determine their LAB types, and to find out the sequence of its LAB DNA. The molecular identification was initially conducted onto four isolates. Its analysis result using the PCR composition and profil was pointed out in the Figure 3 below:

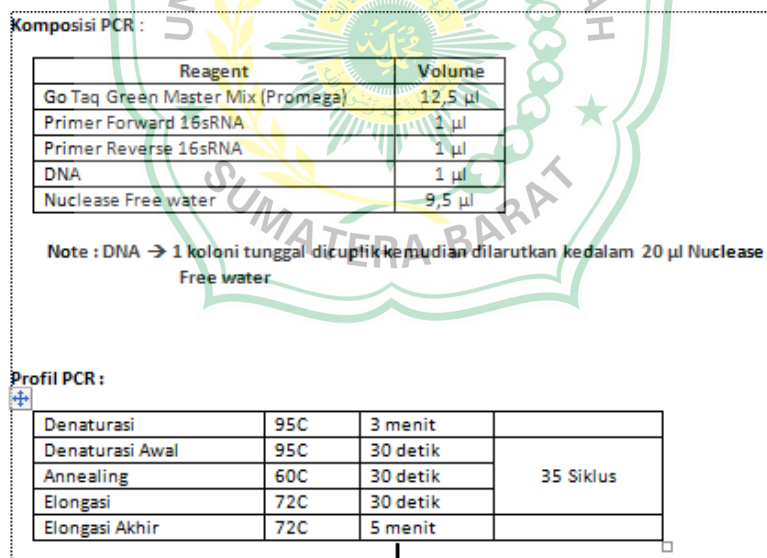


Figure 3. PCR Composition and Profile

Produced electropherogram as shown in Figure 4 below:

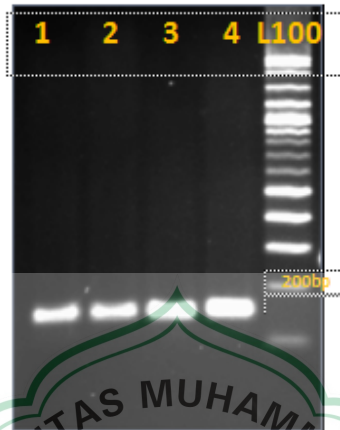


Figure 4. Electropherogram on PCR Result using 16s RNA Primer

Its sequencing is highlighted in the Figure 5 below:

1. Bac1

Forward :

GACGTCCCATGAGAGTTTGTACAGCCGAAGCCGGTGCCTAACCTTTTGGGGAGAGCCCC
CTAAAGCGTGAGACATGAGAGGGGGGAGATCTCATAAAGGTGTCCGTA AAA

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bifidobacterium monqoliense strain DA-344 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	69.4	69.4	60%	4e-09	86%	KJ128213.1
Bifidobacterium monqoliense gene for 16S rRNA, partial sequence, strain YIT 10738	69.4	69.4	60%	4e-09	86%	AB433857.1
Bifidobacterium monqoliense strain YIT 10443 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	69.4	69.4	60%	4e-09	86%	NR_041888.1
Bifidobacterium sp. LMG 28769 partial 16S rRNA gene, strain LMG 28769	63.9	63.9	60%	2e-07	84%	LN849254.1
Uncultured actinobacterium clone Bf170_118 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	63.9	63.9	46%	2e-07	89%	KM650575.1
Tessaracoccus sp. MME-017 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	63.9	63.9	46%	2e-07	89%	KP410681.1
Uncultured bacterium clone 6-12W5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	63.9	63.9	60%	2e-07	84%	KC179058.1
Uncultured Bifidobacterium sp. partial 16S rRNA gene, clone Ania_1	63.9	63.9	60%	2e-07	84%	HE804184.1
Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone FD04A01	63.9	63.9	46%	2e-07	89%	FM873458.1
Tessaracoccus bendigoensis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	63.9	63.9	46%	2e-07	89%	DQ539501.1
Uncultured bacterium clone DE02747805 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	62.1	62.1	45%	7e-07	88%	GQ853800.1
Uncultured bacterium clone DE02749D01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	62.1	62.1	45%	7e-07	88%	GQ853768.1
Uncultured bacterium clone DE02742C07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	62.1	62.1	45%	7e-07	88%	GQ853767.1
Uncultured bacterium clone DE02747A07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	62.1	62.1	45%	7e-07	88%	GQ853766.1

Figure 5. Result of Isolate No 1 Sequencing

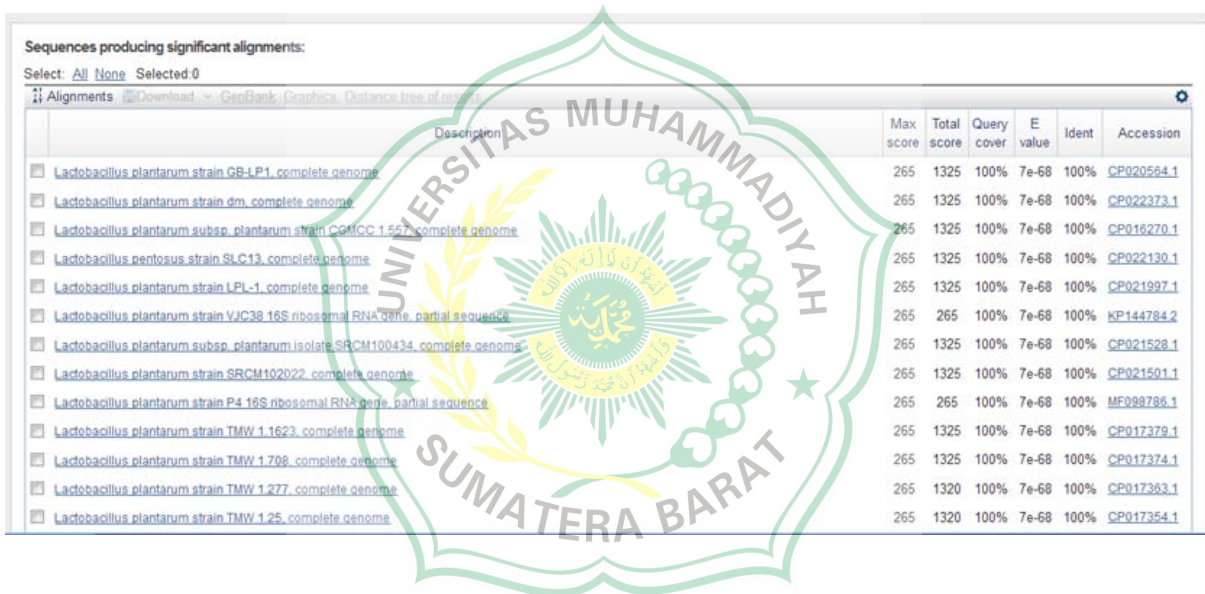
In the figure shown above, the sequencing result on LAB No 1 isolate is not detected.

The following is Figure 6. The isolate No 2 sequencing result.

2. Bac2

Consensus :

```
CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCCTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACC  
CAAAGTCGGTGGGGTAAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGG  
TGAAGTCGTAACAAGGTAGCC
```



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Lactobacillus plantarum strain GB-LP1, complete genome	265	1325	100%	7e-68	100%	CP020564.1
Lactobacillus plantarum strain dm, complete genome	265	1325	100%	7e-68	100%	CP022373.1
Lactobacillus plantarum subsp. plantarum strain CGMCC 1.567, complete genome	265	1325	100%	7e-68	100%	CP016270.1
Lactobacillus pentosus strain SL-C13, complete genome	265	1325	100%	7e-68	100%	CP022130.1
Lactobacillus plantarum strain LPI-1, complete genome	265	1325	100%	7e-68	100%	CP021997.1
Lactobacillus plantarum strain VJC38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	265	265	100%	7e-68	100%	KP144784.2
Lactobacillus plantarum subsp. plantarum isolate SRCM100434, complete genome	265	1325	100%	7e-68	100%	CP021528.1
Lactobacillus plantarum strain SRCM102022, complete genome	265	1325	100%	7e-68	100%	CP021501.1
Lactobacillus plantarum strain P4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	265	265	100%	7e-68	100%	MF098786.1
Lactobacillus plantarum strain TMW 1.1623, complete genome	265	1325	100%	7e-68	100%	CP017379.1
Lactobacillus plantarum strain TMW 1.708, complete genome	265	1325	100%	7e-68	100%	CP017374.1
Lactobacillus plantarum strain TMW 1.277, complete genome	265	1320	100%	7e-68	100%	CP017363.1
Lactobacillus plantarum strain TMW 1.25, complete genome	265	1320	100%	7e-68	100%	CP017354.1

Sequencing result on Isolate No 2

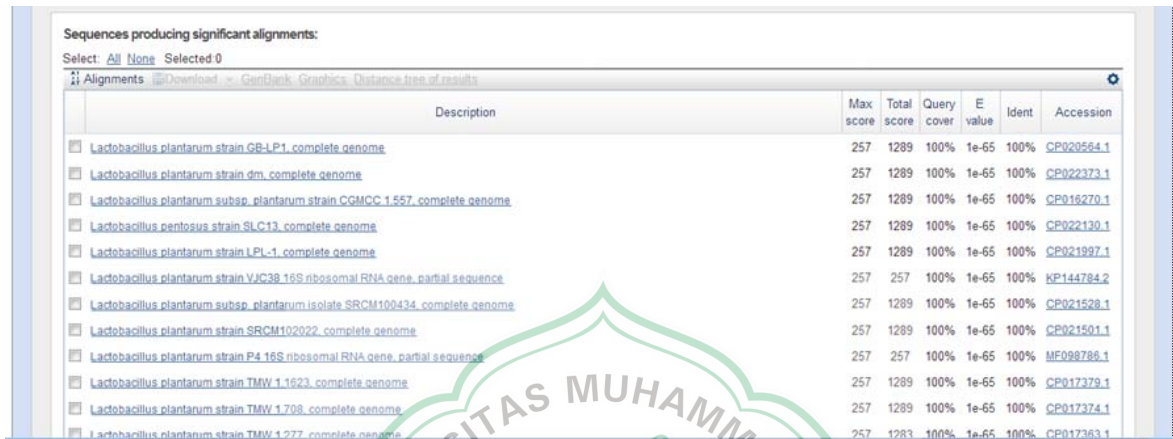
Presented in Figure 6 that the isolate is *Lactobacillus plantarum*

The following is Figure 7. containing the sequencing result of LAB No 3,

3. Bac3

Consensus :

```
GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAA  
GTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAA  
GTCGTAACAAGGTAGCC
```



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain GB-LP1, complete genome	257	1289	100%	1e-65	100%	CP020564.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain dm, complete genome	257	1289	100%	1e-65	100%	CP022373.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum subsp. plantarum strain CGMCC 1.557, complete genome	257	1289	100%	1e-65	100%	CP016270.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus pentosus strain SLC13, complete genome	257	1289	100%	1e-65	100%	CP022130.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain LPI-1, complete genome	257	1289	100%	1e-65	100%	CP021997.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain VJC38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	257	257	100%	1e-65	100%	KP144784.2
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum subsp. plantarum isolate SRCM100434, complete genome	257	1289	100%	1e-65	100%	CP021528.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain SRCM102022, complete genome	257	1289	100%	1e-65	100%	CP021501.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain P4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	257	257	100%	1e-65	100%	MF098788.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain TMW 1.1623, complete genome	257	1289	100%	1e-65	100%	CP017379.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain TMW 1.708, complete genome	257	1289	100%	1e-65	100%	CP017374.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain TMW 1.277, complete genome	257	1283	100%	1e-65	100%	CP017363.1

Figure 7. The isolate sequencing result on LAB No 3

Presented in Figure 7, it can be seen that LAB isolate of sample No 3 is *Lactobacillus plantarum*

The sequencing result of isolate sample No 4 is pointed out in Figure 8 below,

4. Bac4

Consensus :

```
CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACC  
CGAAGCCGGTGGCGTAACCTTTTAGGGAGCGAGCCGTCTAAGGTGGGACAAATGATTAG  
GGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAA
```


Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacterium strain A2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	276	276	100%	3e-71	100%	KX268350.1
Lactobacillus paracasei strain HD1.7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	276	276	100%	3e-71	100%	EU249147.1
Lactobacillus rhamnosus strain L156.4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	274	274	99%	1e-70	100%	KX644947.1
Lactobacillus casei strain LC5, complete genome	274	1372	99%	1e-70	100%	CP017065.1
Lactobacillus rhamnosus strain 4B15, complete genome	274	1372	99%	1e-70	100%	CP021426.1
Lactobacillus paracasei strain IIA, complete genome	274	1372	99%	1e-70	100%	CP014985.1
Lactobacillus rhamnosus strain Pen, complete genome	274	1372	99%	1e-70	100%	CP020464.1
Lactobacillus rhamnosus strain WQ2, complete genome	274	274	99%	1e-70	100%	CP020015.1
Lactobacillus rhamnosus strain BFE5264, complete genome	274	1372	99%	1e-70	100%	CP014201.1
Lactobacillus casei strain K1C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S	274	274	99%	1e-70	100%	KJ954559.1
Lactobacillus rhamnosus strain LRR, complete genome	274	1372	99%	1e-70	100%	CP016823.1
Lactobacillus rhamnosus gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain NGRI 0110	274	274	99%	1e-70	100%	LC177236.1
Lactobacillus paracasei strain FS3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	274	274	99%	1e-70	100%	KJ315064.1
Lactobacillus rhamnosus strain ASCC 290, complete genome	274	274	99%	1e-70	100%	CP014645.1

Figure 8. The isolate sequencing result on LAB No 4

It is identified within Figure 8 that the isolate of sample No 2 and 3 are *Lactobacillus plantarum*. The samples no 4 is *Lactobacillus paracasei*. Then, molecular identification was performed with the second four isolates by conducting the analysis of these four isolates consecutively. For the bacteria DNA of PCR amplification result on 16S ribosomal sequencing zone is highlighted in the following Figure 9.,

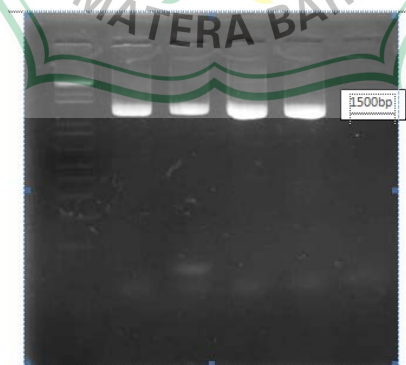


Figure 9. Electrophoresis result on 4 isolates; M0. A5 , M16.16.2 and M16.4

Picture Description:

- The sample of PCR product is in the size of 1500bp, (-) control negative

- Ladder DNA 1kb plus 100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1000, 1650, 2000, 3000, 4000 bp.
- Fasta format was obtained from the result of sample sequencing analysis using Bioedit program. The fasta format of the sample is as follow:

```

>CONTIQ_M16.4_1440bp_Lactobacillus plantarum_100%
GCTCAGGACGAACTGCGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTCTT
GCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAACTGCCAGAAAGCGGGGATA
ACACCTGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGACCCGATGGTCCGAGCTTGAAGATGCCTTCGGCTAT
CACTTTTGGATGGTCCCGCGCGTATTAGTAGATGGTGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGAG
CTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGAGCAGTAGGGAATCTTC
CACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTA
AAGAAGAACATATCTGAGAGTAACCTTTCAGGTATTGACGGTATTAAACCAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGGATTTATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGTTTTTTA
AGTCTGATGTGAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAGTGATCGGAACTGGGAACTTGAAGTGCAGAAAGGAGCA
GTGAACTCCATGTGTAGCGTGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCACAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCT
GTAACCTGACGCTGAGGCTGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATACCGTAAACGAT
GAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCTGGGAGTACGG
CCGCAAGGCTGAACTCAAAGGAATTTGACGGGGCCCGCACAAACGGTGGAGCATGGTGTAAATTCGAAGCTAC
GCGAAGAACCTTACCAGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGCTTCCCTTCGGGACATGGATACA
GGTGGTGCATGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTATC
AGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAAGTGGGATGACGTCAAA
TCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTA
AGCTAATCTCTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT
CGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGAAC
ACCCAAAGTC

```

```

>CONTIQ_A5_1430bp_Lactobacillus plantarum_100%
ACGCTGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTCTTGCATCATGATTT
ACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAACTGCCAGAAAGCGGGGATAACACCTGAAAA
CAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGACCCGATGGTCCGAGCTTGAAGATGGCTTGGCTATCACTTTGGATG
GTCCCGCGCGTATTAGTAGATGGTGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTA
ATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACG
AAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAACAAT
ATCTGAGAGTAACCTGTTGAGGTATTGACGGTATTAAACCAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGACGCCGCGT
AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGGATTTATGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGTTTTTTAAGTCTGATGTA
AAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAAGTGCATCGGAACTGGGAACTTGAAGTGCAGAAAGAGGACAGTGGAACTCCAT
GTGTAGCGGTGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCACAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGTCTGTAACCTGACGCT
GAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTG
TTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCTGGGAGTACGCGCCGCAAGGCTG
AACTCAAAGGAATTAACGGGGGCCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGTACGCGAAGAACCTT
ACCAGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGCTTCCCTTCGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGG
TTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTATCAGTTGCCAGCATT
AAGTTGGCACTCTGGTGAAGTGGGTTGACAAACCGGAGGAAAGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTC
TATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAAGCTAATCTCTTA
AAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA
TGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGAACCCCAAAGTCG

```

```

>CONTIQ_M16.16.2_1422bp_Lactobacillus plantarum_99%
TGGTTCTAAAAGGTTACCCACCGACTTTGGGTGTTACAAACTCTCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC
AAGGCCCGGGAAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTG
AGCCTACAATCCGAACAGAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTGCAACTCGTTGTACCATCCAT
GTAGCAGTGTGTAGCCAGGTGATAAGGGGCATGATGATTGACGTCATCCCACTTCTCCGGTTTGTACCCGG
CAGTCTCACCAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACA
TCTCAGCAGCAGAGCTGACGACAACCATGACCACTGATCCATGTCGCCGAAGGGAACGTCTAATCTCTAGATT
GCATAGTATGTCAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCTAGCTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGGG
CCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCAGCCGTAATCCCAAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGA
AGGGCGGAAACCCCTCAACACTTAGCATTATCGTTTACGGTATGGACTACCAGGATCTAATCCTGTTTGCTACC
ATACTTTCGAGCCTCAGCGTCAAGTACAGACCAGACAGCCGCTTCGCCACTGTTGTTCTCCATATATCTACGCAT
TCACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCGATGCACTTCTTCGGTTGAGCG
GAAGGCTTTCATCAGACTTAAAAACCGCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGAACAACGCTTGCACCT
ACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGTTAAATACCGTCAATACCTGAACAGTTACTC
CAGATATGTTCTTTAAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAACCCCTTCTCACTCAGCGGCGTGTGCTCCATCAGACT
TTTCCGTCATTGTGAAGATTCCCTACTGCTGCTCCGCTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT
ACCTCTCAGGTGCGCTAGTATCATTGCCATGTGAGCCGTTACCCACCATCTAGCTAATACGCGCGGACCAT
CCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAGCTCGACCATGCGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTT
CCAGGTGTTATCCCCGCTTCTGGCAGGTTTCCACGTTACTCACCAGTTCCGCACTCACTCAAATGTAATCAT
GATGCAAGCACAATCAATACCAGAGTTCGTT

```

```

>CONTIQ_MO_797bp_Lactobacillus plantarum_100%
AACACTTAGCATTTCATCGTTTACGGTATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTACCCATACTTTCGAGCCTCA
GCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCTTCGCCACTGTTGTTCTCCATATATCTACGCATTTCCACCGCTACACATGG
AGTTCCACTGTCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCGATGCACTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATCA
GACTTAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGAACAACGCTTCCACCTACGTATTACCGCGGCT
GCTGGCAGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAAATACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATATGTTCTTCTT
TAAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAACCCCTTCTCACTCAGCGGCGTTCCTCCATCAGACTTTCGTCCTATTGTGGA
GATTCCCTACTGCTGCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCGATTACCTCTCAGGTGCGG
TACGTATCATTGCCATGTTGAGCCGTTACCCACCATCTAGCTAATACGCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCCG
AAGCCATCTTCAAGCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCG
CTTCTGGGCAGGTTTCCGACGTGTTACTCACCAGTTCCGCACTCACTCAAATGTAATCATGATGCAAGCACAATCA
ATACCAGAGTTCGTTTCA

```

The sequence molecular identification result of the second sample on DNA 4 is shown in Table 2. as follow:

Table 2. Result of LAB molecular identification

No.	Isolate Code	LAB Type
1.	IsolatMO	<i>Lactobacillus plantarum</i>
2.	IsolatM16.16.2,	<i>Lactobacillus plantarum</i>
3.	IsolatA5	<i>Lactobacillus plantarum</i>
4.	Isolat16.4,	<i>Lactobacillus plantarum</i>

Phylogenetics Analysis

In the following four samples, phylogenetics analysis was carried out using the **bootstrap method** as seen in Figure 10 below:

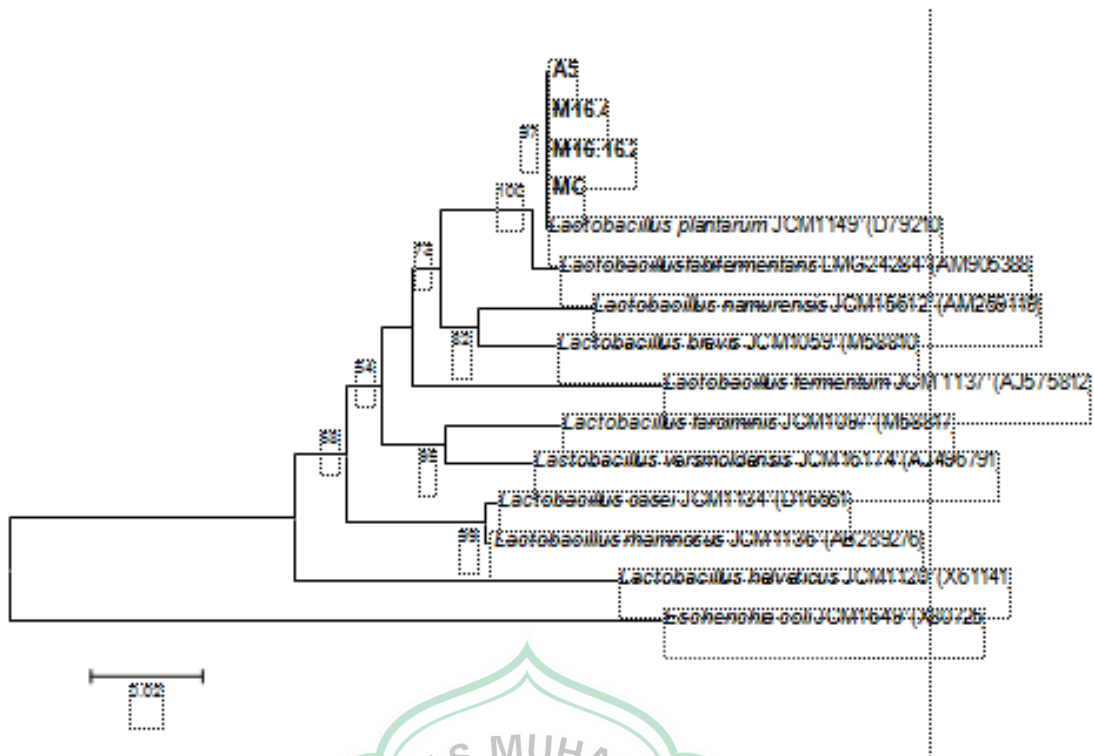


Figure 10. Phylogenetic tree obtained from Neighbor Joining analysis with 1000 repetition

CONCLUSION

Regarding to the research conducted and the results obtained, it can be concluded that:

The molecularly identified Lactic Acid Bacteria using PCR is broken down into three types, namely *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus plantarum* strain JCM1149T, and *Lactobacillus paracasei*. There are six Lactic Acid bacteria that can be identified morphologically, namely *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus thermobacterium*, *Micrococcus luteus*, *Corineobacterium bovis* dan *Corineobacterium xerocis*. A total of 134 isolates of BAL (Lactic Acid Bacteria) can be isolated from the fermentation process of coconut milk consisting of 97 isolates deriving from the oil layer, 23 isolates deriving from Blondo and 14 isolates deriving from the water layer.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research consumed huge amount of work, and dedication. It would not have been possible without having support of many individuals and organizations. Therefore we would like to extend our sincere gratitude to all of them.

1. First of all we are thankful to Directorate of Research and Community Service of the Ministry of Research and Technology for providing its Basic Research Grant, year 2019, with the Research Contract No:.....
2. We are also grateful to Prof. Rahmiana Zein for her provision of expertise, and insightful ideas to carry on this research.
3. We would like to express our sincere thanks towards the Head of Biochemistry at Andalas University.
4. Nevertheless, we express our gratitude toward Head of Laboratory of Region X Private Higher Education Coordination (Kopertis).

References

1. Fernanda Mozzi, Raul R. Raya, G. M. V. *Biotechnology of Lactid Acid Bacteria Novel Aplication*. (2010).
2. Arshad, F.-A., Mehmood, R., Hussain, S., Annus Khan, M. & Khan, M. S. Lactobacilli as Probiotics and their Isolation from Different Sources. *Br. J. Res.* **05**, 1–11 (2018).
3. Nami, Y., Haghshenas, B. & Khosroushahi, A. Y. Molecular identification and probiotic potential characterization of lactic acid bacteria isolated from human vaginal microbiota. *Adv. Pharm. Bull.* **8**, 683–695 (2018).
4. Ashrethalatha, A. Artthy, U. Poonkodi, T and Narayanan, R. . Identification and molecular characterization of Lactic Acid Bacteria (LAB) species from the medicinal plant *Cissus quadrangularis* (Pirandai). *Int. Food Res. J.* **23**, 2695–2701 (2016).
5. Afshan Naz, S. & Rasool, S. A. Isolation, production and characterization of bacteriocins produced by strains from indigenous environments. *Pakistan J. Bot.* **45**, 261–267 (2013).

6. Fangio, M. F. & Fritz, R. Potential use of a bacteriocin-like substance in meat and vegetable food biopreservation. *Int. Food Res. J.* **21**, 677–683 (2014).
7. Sankar, N. R., Priyanka, V. D. & Reddy, P. S. Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* Isolated from Cow Milk. **3**, 133–137 (2012).
8. Fawzya, Y. N., Setiap, P., Laktat, B. A. & Bal, P. BAHAN PENGAWET NISIN : APLIKASINYA PADA PRODUK PERIKANAN. **5**, 79–85 (2010).
9. Margino, S. PENGHASIL BAKTERIOSIN SEBAGAI AGEN ANTIBAKTERIA PADA PRODUK-PRODUK HASIL PERIKANAN. *J. Saintek Perikan.* **8**, (2012).
10. Alrubaye, H. H., Fakhry, S. S., Jebur, Z. a & Farhan, F. Biochemical and Molecular Characterization of *Lactobacillus* spp. Isolated from Dairy Products. *JSM Microbiol.* **6**, 1048 (2018).
11. Kivanç, M., Yilmaz, M. & Çakir, E. Isolation and identification of lactic acid bacteria from boza, and their microbial activity against several reporter strains. *Turkish J. Biol.* **35**, 313–324 (2011).
12. Tilahun, B. *et al.* Isolation and Molecular Identification of Lactic Acid Bacteria Using 16s rRNA Genes from Fermented Teff (*Eragrostis tef* (Zucc .)) Dough. **2018**, (2018).
13. Syafni, N., Putra, D. P. & Arbain, D. 3 , 4-DIHYDROXYBENZOIC ACID AND 3 , 4-DIHYDROXYBENZALDEHYDE FROM THE FERN *Trichomanes chinense* L . ; ISOLATION , ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT PROPERTIES. *Indones. J. Chem.* **12**, 273–278 (2012).
14. Sunaryanto, R., Marwoto, B. & Irawadi, T. T. ANTIBIOTIC COMPOUND FROM MARINE ACTINOMYCETES (*Streptomyces* sp A11) : *Indones. J. Chem.* **10**, 226–232 (2010).
15. Nadu, T. Identification and molecular characterization of Lactic Acid Bacteria (LAB) species from the medicinal plant *Cissus quadrangularis* (Pirandai). **23**, 2695–2701 (2016).
16. Ren, L. & Suo, H. Molecular Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from the Traditional Fermented Yak Yogurt in Western Sichuan Region. *A Comput. Sci. Res. (ACSR)dvances* **76**, 1248–1256 (2017).
17. Suryani, S. Isolation and Characterization of Bacteriocins Bacteria *Lactobacillus Plantarum* Strain NM 187-5 from Fermentation Process which contained on Coconut Milk. *Transylvanian Rev.* **XXIV**, (2016).
18. Abujazia, M. A., Muhammad, N., Shuid, A. N. & Soelaiman, I. N. The Effects of Virgin Coconut Oil on Bone Oxidative Status in Ovariectomised Rat. **2012**, (2012).
19. Carandang, E. V. Health Benefits of virgin coconut oil. *Indian Coconut J.* 8–12 (2008). doi:10.1177/0146167201277003

20. G, G. K. a, Raj, G., Bhatnagar, A. S., K, P. K. P. & Chandrashekar, P. Coconut Oil : Chemistry , Production and Its Applications - A Review. *Indian Coconut J.* 15–27 (2010).

ICICS Bogor 6-7 Agustus 2019

ISOLATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA (LAB) IN COCONUT MILK FERMENTATION

Suryani Suryani ^{*1}, Femi Earnestly ², Abdi Dharma³, Sariani ⁴, Fauzan⁵.

^{1,2} Department of Chemistry, Muhammadiyah University of West Sumatera (Jalan Pasir Kandang No 4, Pasia Nan Tigo, Koto Tangah, Padang, Indonesia)

³Department of Chemistry, University of Andalas (LIMAND Limau Manis, Padang, Indonesia)

⁴Department of English, Politeknik Negeri Padang, Indonesia

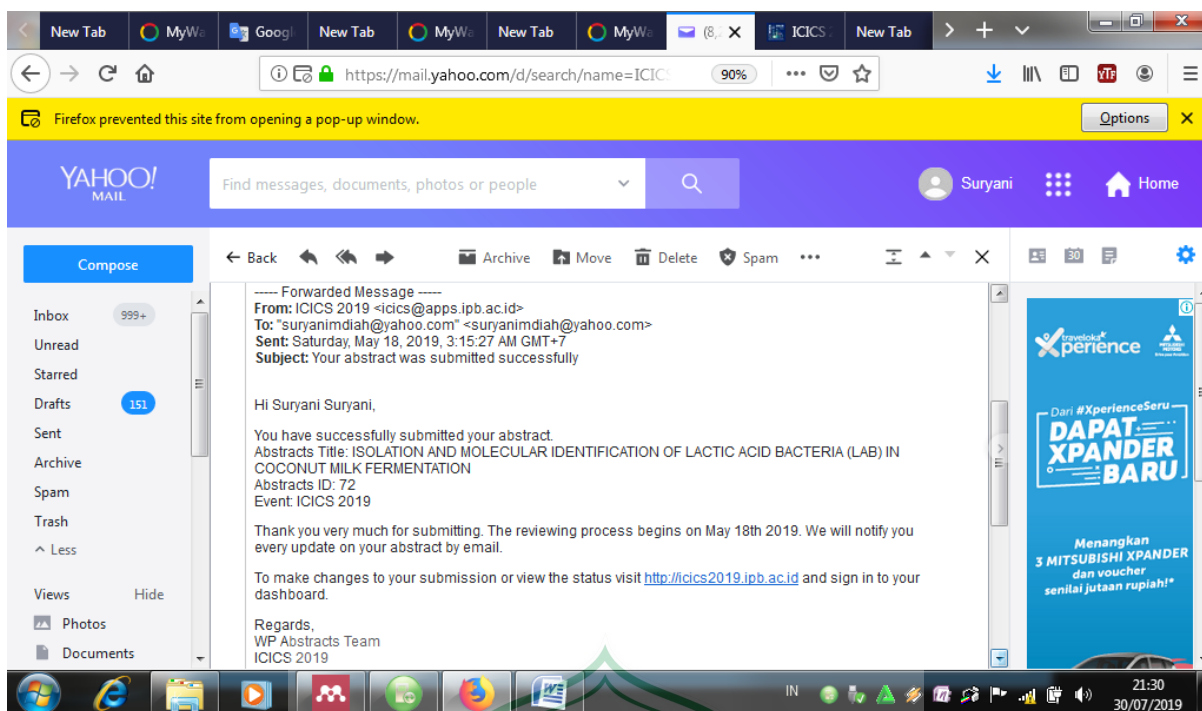
⁵Department of Biology, Muhammadiyah University of West Sumatera (Jalan Pasir Kandang No 4, Pasia Nan Tigo, Koto Tangah, Padang, Indonesia)

ICICS Bogor 6-7 Agustus 2019

INTRODUCTION

- **Lactid acid bacteria (LAB)**

bacteria isolated from materials which are rich mainly in carbohydrates and containing high protein and are able to ferment those material in order to produce lactid acid.



2, Draft artikel untu Rasayan Journal Chemistry

STANDARISASI VIRGIN COCONUT OIL UNTUK DIJADIKAN SEBAGAI OBAT TETES TELINGA PENDERITA OTITIS MEDIA SUPPURATIF KHRONIS

TITLE OF THE MANUSCRIPT MUST BE CENTRALLY ALIGNED, TIMES NEW ROMAN, FONT SIZE 16, BOLD

**Suryani Suryani^{1,*}, Femi Earnesly², Tuti Yusuf³, Abdi Darma⁴.
A. B. Sharma¹, C.D. Verma², E.F. Gupta^{3,*} and G.H. Singh⁴**
(Author's Names must be centrally aligned, Times New Roman, Font Size 14, Bold and Corresponding Author's name must be identified by the Asterisk)

¹Department of XYZ, College/University Name, Place-Pin Code, (State) Country

¹Departemen of Chemistry, University Muhammadiyah of West Sumatera, Padang

²Department of XYZ, College/University Name, Place-Pin Code, (State) Country

¹Departemen of Chemistry, University Muhammadiyah of West Sumatera, Padang

³Department of XYZ, College/University Name, Place-Pin Code, (State) Country

Departemen of Pharmacy, AKFAR (Akademi Farmasi) Prayoga, Padang

⁴Department of XYZ, College/University Name, Place-Pin Code, (State) Country

(Affiliations of the authors must be given centrally aligned, Time New Roman, Font Size 12, Normal)

*E-mail : e-mail id of Corresponding Author please mention here
suryanimdiah@yahoo.com

Mobile No.: of Corresponding Author Please mention here
081275180200

Address for Postal Correspondance: Please mention here
Muhammadiyah University of West Sumatera, Jalan Pasir Kandang, 25171, Padang
(All these information must be centrally aligned, Times New Roman, Font Size 12, Normal)

ABSTRACT

Write the Abstract of the paper in Times New Roman, Font Size 12, and Normal. The Abstract should not more than 250 Words. Please do not use any abbreviation and compound numbers in the abstract.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan kondisi optimum dari Virgin Coconut Oil (VCO) yang dijadikan sebagai bahan dasar pembuatan obat tetes telinga pasien penderita Otitis Media Suppuratif Khronis (OMSK). Selama ini obat tetes telinga yang digunakan adalah obat tetes yang mengandung antibiotik buatan seperti *Khloramfenikol*, *Methicilin* dan lainnya. Obat tetes yang mengandung khloramfenikol dapat menyebabkan resistensi terhadap pasien. Obat tetes telinga dari bahan dasar VCO adalah alternatif baru obat tetes telinga untuk pasien OMSK, ang mengandung antimikroba alami. Kondisi optimum itu ditentukan dengan dua cara, yaitu 1) dengan melakukan standarisai dari VCO yang terdiridari campuran bermacam-macam bakteri asam laktat, yaitu (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*), dan 2) analisa antimikroba dari VCO langsung sebagai sampel terhadap bakteri patogen penyebab ab Otitis Media Suppuratif Kronis dengan metoda kertas cakram. VCO yang digunakan sebagai sampel ada 3 jenis, dimana perbedaannya dari bahan yang digunakan untuk mengekstraksi santan kelapanya. Sampel 1) adalah VCO yang diekstraksi dengan air biasa saja , sampel 2) adalah VCO yang diekstraksi santannya dengan campuran air biasa dan sampel 3) adalah VCO yang santannya diekstraksi menggunakan air kelapa seluruhnya. Standarisasi VCO menghasilkan pH = 6,5, Viskositas....., kadar air,BJ....Untuk analisa antimikroba terhadap bakteri yang ada pada cairan telinga

penderita OMSK adalah berdasarkan urutan yang paling besar diameternya adalah *Pseudomonas aureginosa* (mm) , *Staphylococcus aureus* (mm) , *Klebsiella* (mm) , *Proteus* (mm) dan *Staphylococcus epidremidis*. Penelitian ini menunjukkan bahwa Virgin Coconut oil sudah memenuhi standar untuk dijadikan sebagai obat tetes telinga alternatif baru untuk pasien penderita OMSK.

Keywords: Virgin Coconut Oil (VCO), Bakteri Asam Laktat (BAL), Otitis Media Suppuratif Khronis (OMSK), Standarisasi

STANDARDIZATION OF COCONUT OIL VIRGINS TO BE HAPPENED AS EARLY DRUG DRUGS WITH CHRONICAL SUPPURATIVE MEDIA PATIENTS

ABSTRACT

The purpose of this study is to determine the optimum conditions of Virgin Coconut Oil (VCO) which is used as a basic ingredient in making ear drops for patients with Chronic Suppurative Otitis Media (CSOM). So far, ear drops used are drops containing artificial antibiotics such as chloramphenicol, methicillin and others. Drops containing chloramphenicol can cause resistance to patients. Ear drops from basic ingredients VCO is a new alternative for ear drops for CSOM patients, which contain natural antimicrobials. The optimum conditions were determined in two ways, namely 1) by standardizing the VCO consisting of a mixture of various lactic acid bacteria, namely (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*), and 2) antimicrobial analysis of direct VCO as a sample of pathogenic bacterial diseases Chronic Suppurative Otitis Media with disc paper method. There are 3 types of VCO used as samples, where the difference is from the material used to extract coconut coconut. Sample 1) is the VCO extracted with plain water, sample 2) is the VCO extracted by coconut milk with a mixture of ordinary water and sample 3) is the VCO whose coconut milk is extracted using coconut water entirely. VCO standardization produces pH = 6.5, Viscosity, moisture content, BJ For antimicrobial analysis of bacteria in the ear fluid of CSOM patients is based on the largest order of inhibition diameter it is *Pseudomonas aureginosa* (mm), *Staphylococcus aureus* (mm), *Klebsiella* (mm), *Proteus* (mm) and *Staphylococcus epidremidis*. This research shows that Virgin Coconut Oil has met the standard to be used as a new alternative ear drops for patients with CSOM.

Keywords: Virgin Coconut Oil (VCO), Lactic Acid Bacteria (BAL), Chronic Suppurative Otitis Media (CSOM), Standardization

INTRODUCTION

Introduction of the paper is nicely written in Times new Roman, Font Size 12, Normal in a good and grammatically checked English. References must be superscripted like.^{1,4,13} Remember, mention the full form of abbreviations when they appear for the first time in the text.

Penyakit telinga tengah yang sudah khronis disebut juga dengan Otitis Media Suppuratif Khronis (OMSK) ^{1, 2, 3}. Penyakit ini dapat diderita mulai dari anak-anak⁴

sampai dengan orang dewasa, laki-laki maupun perempuan. Apabila tidak dapat disembuhkan akan mengakibatkan peradangan pada selaput otak yang selanjutnya dapat mengakibatkan kematian⁵ Penyakit ini kebanyakan diderita oleh masyarakat negara berkembang seperti Indonesia, India dan Pakistan⁶. Penyebab Otitis Media Suppuratif Kronis ini adalah bakteri patogen seperti *Pseudomonas aureginosa*, *Staphilococcus aerus*, dan *Klebsiella*,⁷ dan lainnya.

Pada lapisan minyak VCO terdapat Bakteri Asam Laktat (BAL) seperti *Lactobacillus plantarum* NM.178-5, yang mengandung bakteriosin^{15,16, 17}. Bakteriosin adalah peptida yang menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan tidak berbahaya bagi bakteri non patogen¹⁸. Telah dianalisa antimikroba dan antijamur nya ternyata dapat menghambat pertumbuhan 5 bakteri patogen yang ada pada sekret penderita OMSK yang telah diteliti sebelumnya (PDUPT Suryani 2016-2017) *Pseudomonas aureginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella*, dan *Staphylococcus aureus*. dari 126 sampel sekret penderita OMSK¹⁹. Dari India²⁰, dilaporkan bahwa bakteri yang ada di cairan telinga 80 sampel penderita Otitis Media Akut yang dianalisa, terdapat beberapa bakteri patogen yang hampir sama yaitu *Staphilococcus aureus*, *Pseudomonas sp*, *Escherichia coli*, dan *Klebsiella sp*. Ternyata bakteri patogen tersebut 18 % sudah mengalami resisten atau sudah tidak mempan lagi dengan antibiotik seperti Methicillin, masih sensitif dengan amikacin, chloramfenicol dan piperacillin.^{21, 22, 3, 23, 20, 6}

Berdasarkan uraian diatas maka perlu dipelajari optimasi formula obat tetes telinga dari VCO (Virgin Coconut Oil) dan standarisasi VCO yang digunakan sebagai bahan dasar obat tetes telinga OMSK, karena VCO mengandung BAL (Bakteri Asam Laktat) dan mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri patogen dari Otitis Media Supuratif Kronis (bersifat sebagai antimikroba alami) maka dapat dibuat obat tetes telinga dari VCO, dan diharapkan sensitif terhadap bakteri patogen OMSK. Sehingga dapat menjawab persoalan obat tetes yang sudah mengalami resistensi.

EXPERIMENTAL

Material and Methods

General procedure

Detection Method

Analytical Discussion (If Any)

RESULTS AND DISCUSSION

In this section (written in Times new Roman, Font Size 12, Normal) you'll present your actual results and discussion, supported by schemes, figures, graphs, tables, reactions and equations. These items should be numbered clearly. Schemes and Figures must be drawn with help of **ChemDraw** or other similar software.

CONCLUSION

ACKNOWLEDGEMENT

REFERENCES

Please see the examples of all types of References-

Journal's Reference:

H. Matsumoto, S. Hara, N. Nagata and K. Ikeda, *Heterocyclic*, **41**, 47 (1995)

Book Reference:

M. Bodanszky and A. Bodanszky, *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, New York, p.78,91(1984).

Book Chapter's Reference:

G.R. Mettam, L.B. Adams, 1999, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones and R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Proceedings or Abstracts

T. B. Rajawat, K.S. Saini, R.P. Sharma, G.K. Rawat and A. Chopra, In *Proceedings of International Conference for Systematic Water Treatment and Planning*, Kathmandu, Nepal, pp. 330-335 (2008).

Reports

State Standard of the People's Republic of China, *Surface Water environmental Quality Standards*, GB, 3838-2002 (2022)

Thesis

R.K.Saini, Ph. D. Thesis, Department of Chemistry, University of Rajasthan, Jaipur, Rajasthan, India (2000).

J

Patents

T.K. Singhal , US Patent XXXXXXXXX (2008).

Web site

<http://www.food.gov.uk/safereating/chemsafe/additivesbranch/Enumberlist>

3. Draft Paten.

Deskripsi

PENGGUNAAN ISOLAT BAKTERI ASAM LAKTAT DARI LAPISAN MINYAK VCO

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berhubungan dengan penggunaan isolat bakteri asam laktat sebagai antibakteri patogen pada sekret pasien penderita Otitis Media Suppuratif Khronis (OMSK). Lebih khusus lagi bakteri *Lactobacillus paracasei* yang diisolasi dari lapisan minyak VCO (Virgin Coconut Oil).

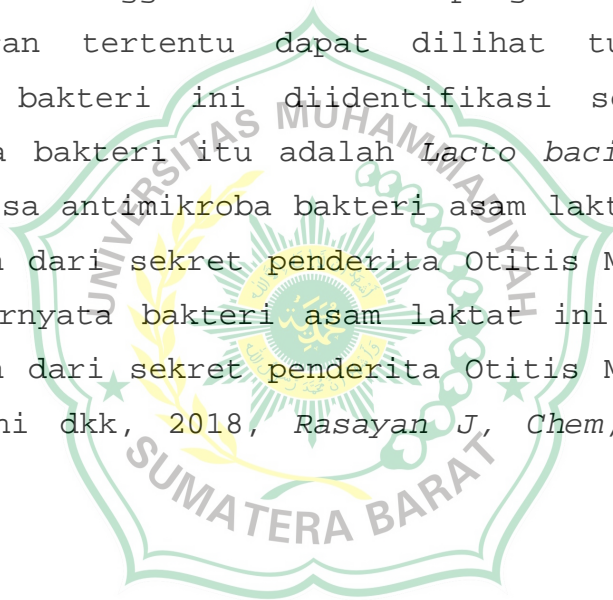
Latar Belakang Invensi

Invensi ini telah dikenal dan digunakan untuk probiotik, dan aman dikonsumsi karena bakteri asam laktat adalah bakteri yang ada pada fermentasi zat atau sesuatu yang mengandung karbohidrat dan protein tinggi (Yurong Gao, dkk, 2012 *Eur Food Res Technol* 234:45-51); (Toshio Watanabe, 2009, *Am J Phisiol Gastrointest Liver Phisiol*, Vol 297).

Bakteri asam laktat menghasilkan bakteriosin yang dapat membunuh bakteri patogen tapi tidak berbahaya bagi bakteri non patogen (Suryani dkk, 2016, *Transylvania Review*, Vol XXIV, No 6 ; Fernanda Mozi dkk, 2010, BlackWell Publishing, Singapura; Suryani dkk, 2017, *Jurnal Katalisator*, Vol 2 no 2); (N, Navi Sankar dkk, 2012, *International Journal Microbiology Research* Vol 3 no 2, p133-137).

Virgin Coconut Oil (VCO) dibuat dengan memfermentasi santan yang kaya karbohidrat dan protein, karena santan adalah emulsi antara protein, karbohidrat, minyak dan air. Proses fermentasinya tanpa pemanasan sama sekali dan tanpa penambahan kultur bakteri, dengan cara memeras santan menggunakan perbandingan kelapa parut dan air (air kelapa dan air biasa) adalah 1:2 sehingga santan

hasil perasan tersebut merupakan media yang cocok untuk tumbuhnya bakteri asam laktat. Apabila pemerasannya menggunakan air kelapa, maka akan lebih optimal menghasilkan VCO, karena pada air kelapa sudah terdapat bakteri asam laktat. Santan hasil perasan ini difermentasi dengan cara mendinginkannya pada suhu ruangan 27^o- 30^oC, dalam wadah plastik dan disimpan pada tempat yang tidak terkena cahaya matahari langsung selama 8- 12jam. Akan terbetuk lapisan minyak pada bagian atas (Virgin Coconut Oil/ VCO), bagian tengah adalah blondo, setelah itu air, dan paling bawah adalah kotoran. Lapisan minyak ini diambil serta diisolasi bakteri asam laktatnya dengan menggunakan metoda pengenceran sampai 10⁻⁷. Pada pengenceran tertentu dapat dilihat tumbuhnya koloni bakteri. Koloni bakteri ini diidentifikasi sehingga didapat informasi bahwa bakteri itu adalah *Lacto bacillus paracasei*. Dilakukan analisa antimikroba bakteri asam laktat ini terhadap bakteri patogen dari sekret penderita Otitis Media Suppuratif Khronis dan ternyata bakteri asam laktat ini dapat membunuh bakteri patogen dari sekret penderita Otitis Media Suppuratif Khronis (Suryani dkk, 2018, *Rasayan J, Chem, Vol 11 No 3, p1139-1143*).



Penelusuran terhadap paten-paten

Penemuan sebelumnya dokumen **paten US20100016430A1** mengungkapkan tentang minyak kelapa yang termodifikasi mempunyai sifat antimikrobia, khususnya komposisi antimikroba minyak kelapa termodifikasi yang mengandung asam lemak bebas rantai menengah yang memiliki 8-12 atom karbon, seperti asam kaprilat, asam kaprat, asam laurat dan monogliserida yang sesuai yang menghambat pertumbuhan bakteri gram positif *Staphilococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Sterptococcus pyogene* dan bakteri gram negatif *Vibrio chlorae*, *Eschericia coli* dan *Candida albicans*.

Sedangkan invensi yang diusulkan ini mengungkapkan tentang penggunaan bakteri asam laktat sebagai antimikroba bakteri patogen pada sekret pasien penderita Otitis Media Suppuratif Khronis (OMSK) yaitu *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphilococcus aureus*, *Sthphilococcus epidermidis*, *Klebsiella* dan *Proteus*. Lebih khusus lagi bakteri *Lactobacillus paracasei* yang diisolasi dari lapisan minyak VCO (Virgin Coconut Oil) .

Invensi lainnya sebagaimana diungkapkan pada dokumen **paten Korea, KR101811587B1** tentang metode pembuatan VCO dengan cara fermentasi menggunakan kultur *Bacillus substilis* dalam campuran air kelapa dan air serta santan. Sedangkan invensi yang diusulkan ini pembuatan VCO nya dengan metode fermentasi tanpa penambahan kultur bakteri. Hanya menggunakan bakteri yang ada dalam air kelapa dan bakteri yang ada di udara.

Invensi lainnya yaitu **CN104082423B** yang mengungkapkan metode pembuatan VCO melalui pendinginan dan sentrifugasi. Sementara pembuatan VCO yang diisolasi asam laktatnya di invensi ini adalah dengan fermentasi pada suhu kamar yaitu 28°C - 30°C.

Dokumen **paten US20160015625A1** mengungkapkan penggunaan VCO (Virgin Coconut Oil) sebagai pelembab alis yang dioleskan pada alis dan bulu mata, untuk meningkatkan kualitas estetika mata dan alis mata.

Sementara invensi ini mengungkapkan penggunaan isolat bakteri asam laktat, khususnya *Lactobacillus paracasei* sebagai antibakteri dari *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella* dan *Proteus* (bakteri patogen yang ada pada sekret penderita Otitis Media Suppuratif).

Invensi lainnya adalah **paten JP6262393B1** yang mengungkapkan proses pembuatan VCO itu dengan cara kering, yaitu dengan mengeringkan kelapa melalui pemanasan dan tekanan 2-7kPA.

Sementara invensi yang diusulkan ini proses pembuatan VCO nya dengan temperatur kamar 27-30°C.

Invensi **paten WO2016171541A1** mengungkap proses pembuatan VCO proses kering melalui kopra yaitu daging kelapa yang dikeringkan.

Sementara invensi yang diusulkan ini proses pembuatannya adalah secara basah yaitu daging kelapa yang diparut dan diperas atau diekstraksi jadi santan.

Uraian singkat invensi

Invensi yang diusulkan ini pada prinsipnya adalah pemanfaatan bakteri *Lactobacillus paracasei* yang diisolasi dari lapisan minyak VCO (Virgin Coconut Oil) sebagai anti bakteri dari patogen pada sekret pasien penderita Otitis Media Suppuratif Kronis (OMSK). Bakteri asam laktat ini diisolasi menggunakan media selektif yaitu MRSA ditambah CaCO₃ 0,3 %. Isolat bakteri ini diidentifikasi secara morfologi dan identifikasi molekular. Adapun bakteri patogen pada sekret penderita Otitis Media Suppuratif Kronis diisolasi dengan menggunakan media selektif juga yaitu agar darah atau Blood Agar. Ada lima jenis bakteri patogen hasil isolasi yaitu *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella* dan *Proteus*. Dari analisa antimikroba, ternyata *Lactobacillus paracasei* mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen yang ada pada sekret penderita OMSK.

Uraian Singkat Gambar

Gambar 1 : adalah contoh hasil analisa antimikroba bakteri asam laktat *Lactobacillus paracasei* terhadap bakteri patogen dari sekret penderita Otitis Media Suppuratif Khronis .

Gambar 2 : tabel hasil pengukuran diamete zona bening sebagai Daya Hambat (mm) isolat *Lactobacillus paracasei* Terhadap Bakteri Uji (patogen OMSK

Uraian Lengkap Invensi

Invensi ini bertujuan untuk mengungkapkan penemuan terhadap penggunaan isolat bakteri asam laktat yaitu *Lactobacillus paracasei* yang diisolasi dari lapisan minyak Virgin Coconut Oil (VCO) sebagai antimikroba dari bakteri patogen yang ada pada sekret penderita Otitis Media Suppuratif Khronis yaitu bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphilococcus aureus*, *Stphilococcus epidermidis*, *Klebsiella* dan *Proteus*.

Metoda isolasi bakteri asam asam laktat dengan pengenceran lapisan minyak Virgin Coconut Oil sampai 10^{-7} , menggunakan media selektif MRSA + CaCO_3 0,3%. Akan ada koloni bakteri yang terletak ditengah-tengah daerah bening yang dinamakan daerah "Halo". Terjadinya daerah halo karena bakteri asam laktat tumbuh dengan menghasilkan asam yang bereaksi dengan CaCO_3 , sehingga dapat dipastikan koloni bakteri yang

tumbuh adalah bakteri asam laktat. Koloni ini diidentifikasi secara morfologis dengan mengamati bentuk koloni, warna koloni, permukaan koloni dan dilakukan uji-uji biokimia serta identifikasi secara molekular dengan PCR. Sehingga dapat ditentukan jenis bakteri asam laktanya. Ada 6 jenis bakteri asam laktat nya yaitu *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus thermobacterium*, *Corineabacterium bovis*, *Corineabacterium xerosis*, *Microoccus luteus*

Mengacu pada Gambar 1 yaitu gambar hasil analisa antibakteri asam laktat *Lactobacillus paracasei* terhadap bakteri patogen OMSK, dimana daerah "Halo" atau daerah yang bening pada petri menunjukkan bahwa daerah itu tidak ditumbuhi oleh bakteri patogen dengan kata lain isolat bakteri asam laktat itu dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen OMSK. Analisa ini menunjukkan besarnya kemampuan bakteri asam laktat khususnya *Lactobacillus paracasei* menghambat pertumbuhan bakteri patogen dari sekret penderita OMSK.

Mengacu pada Gambar 2, yaitu Tabel hasil pengukuran diameter zona bening sebagai Daya Hambat (mm) isolat *Lactobacillus paracasei* terhadap Bakteri Uji (patogen OMSK) mendukung pernyataan bahwa isolat bakteri asam laktat ini dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen OMSK. Dimana kemampuan *Lactobacillus paracasei* paling bagus menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aureginosa* yaitu diameter hambatnya rata-rata 12 mm.

