

**IDENTIFIKASI BIOKIMIA DAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI ISOLAT BAKTERI
ASAM LAKTAT LIMBAH SAYUR BAYAM**
*Biochemical Identification and Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacterial Isolates in Spinach
Vegetable Waste*

Sukriani kursia*, Imrawati, Ismail, Aliansyah Halim, Nurunnisa Ramadhani,
Fadhillah Ramadhani, Fanni Priska, Fildzah Hanifah

Program studi Sarjana Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar

*Koresponden Email : sukriani.winie@yahoo.com

DOI: <https://doi.org/10.32382/mf.v16i1.1369>

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) works in carbohydrate metabolism to fight against pathogenic bacteria through peptide compounds. It can be obtained from vegetables containing carbohydrates and produces organic acid metabolites, hydrogen peroxide, and bacteriocin with antimicrobial properties. These antimicrobial compounds inhibit the growth of gram-positive and gram-negative bacteria, including the pathogenic and spoilage. This study determines the antibacterial activity of LAB isolates from spinach vegetable waste using the pour method. The biochemical testing includes TSIA, Indol, MR_VP, motility, and temperature and salt resistance tests. Furthermore, activity testing uses the disc diffusion method with Mueller Hinton Agar media against *Basillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella thypimurium*, and *Propionibacterium acnes*. Preparation of the test sample was carried out by inoculating the LAB isolate stock for 1x24 hours at 37 ° C. The results of biochemical identification showed the isolates fermented glucose and were negative in the indole and VP testing. Also, it was positive in MR testing, which was marked by acidic pH, non-motile nature, active at 37 ° C, and resistant to several salt concentrations. The antibacterial activity based on univariate analysis showed differences in the activity of each test bacteria. There was a significant difference between isolates A to B, D, and positive control. The isolates obtained included the LAB group from the Lactobacillaceae family, genus *Lactobacillus* sp. The best activity was shown in isolate A with a broad spectrum.

Keywords: identification, biochemistry, lactic acid bacteria, antibacterial, spinach, isolates A, B, and D.

ABSTRAK

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri pembentuk asam laktat dalam metabolisme karbohidrat. BAL mempunyai peranan penting untuk melawan bakteri patogen melalui senyawa peptida. BAL dapat diperoleh dari sayuran yang mengandung karbohidrat. BAL ini mampu menghasilkan metabolit asam organik, hidrogen peroksida, dan bakteriosin yang bersifat sebagai antimikroba. Senyawa antimikroba ini mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif, termasuk bakteri patogen dan bakteri pembusuk. Tujuan penelitian mengidentifikasi secara biokimia dan menentukan aktivitas antibakteri isolat BAL dari limbah sayur Bayam. Metode isolasi BAL menggunakan metode tuang, pengujian biokimia meliputi uji TSIA, Indol, MR_VP, motilitas, ketahanan suhu dan ketahanan garam. Sedangkan pengujian aktivitas menggunakan metode disc diffusion agar menggunakan media Mueller Hinton Agar terhadap bakteri *Basillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella thypimurium*, dan *Propionibacterium acnes*. Penyiapan sampel uji dilakukan dengan menginokulasi stok isolat BAL selama 1x24 jam pada suhu 37 ° C. Hasil identifikasi biokimia menunjukkan bahwa isolat BAL mampu memfermentasi glukosa, negatif pada pengujian indol dan VP, positif pada pengujian MR di tandai dengan diperolehnya pH asam, bersifat non motil, hidup pada suhu 37°C, serta tahan terhadap beberapa konsentrasi garam. Hasil pengujian aktivitas antibakteri berdasarkan analisis univariate menunjukkan perbedaan aktivitas dari masing-masing bakteri uji menunjukkan perbedaan signifikan antara

isolat A terhadap isolat B, D dan Kontrol positif. Kesimpulan isolat yang diperoleh termasuk kelompok BAL dari famili *Lactobacillaceae*, genus *Lactobacillus* sp dan aktivitas terbaik di tunjukkan pada isolat A dan bersifat spectrum luas.

Kata kunci : identifikasi, biokimia, bakteri asam laktat, antibakteri, Bayam, isolat A, B,dan D.

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri yang menghasilkan asam laktat sebagai produk utama dalam fermentasi karbohidrat yakni glukosa atau sukrosa. Bakteri asam laktat terdapat pada produk-produk daging mentah ataupun kalengan, produk susu (yoghurt, keju), beras ketan dan tape. Beberapa sumber juga memaparkan bahwa pada buah-buahan seperti durian, nangka, sirsak, nanas, cacao, dan pada sayuran yaitu tomat, kubis, asinan sawi, terong, timun, bawang dan lain sebagainya adalah potensial sebagai sumber BAL (Yuni and Sari, 2003); (Korhonen, 2010).

Semua BAL pada dasarnya mempunyai kesamaan sifat yaitu bersifat gram positif, berbentuk kokus atau batang, tidak membentuk spora, non motil, katalase negatif dan bersifat anaerob. BAL termasuk dalam kelompok bakteri yang memenuhi standar GRAS (*Generally Recognized as Safe*), yaitu bakteri yang baik yang aman bagi manusia (Nasution, 2012); (Wedajo, 2015); (Korhonen, 2010).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh (Sasmita *et al.*, 2018) menunjukkan bahwa limbah Bayam mampu memproduksi Bakteri Asam Laktat yang berpotensi memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan konsentrasi substrat glukosa 5%. Penelitian sejalan telah dilakukan oleh (Kursia *et al.*, 2019) melakukan identifikasi dan optimasi perolehan bakteri asam laktat dari bayam dengan melakukan beberapa variasi kondisi sampel dengan substrat adalah NaCl 2% dan glukosa 0,5% (b/b sampel). Hasil identifikasi menunjukkan bahwa diperoleh 6 isolat pada sampel bayam yang termasuk bakteri gram positif, berbentuk batang dan tidak menghasilkan spora serta diperoleh konsentrasi terbaik penggunaan substrat yakni pada 1,5 % glukosa yang menunjukkan profil pH yang baik yakni berada pada rentang 4-5.

Laporan ilmiah yang membuktikan BAL ini mampu menghasilkan metabolit asam organik, hidrogen peroksida, dan bakteriosin yang bersifat sebagai antimikroba. Senyawa antimikroba ini mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif, termasuk bakteri patogen

dan bakteri pembusuk. Substansi antimikroba yang dihasilkan oleh BAL ini dikenal dengan nama bakteriosin (Yuni and Sari, 2003). Bakteriosin merupakan suatu peptida antimikroba yang dihasilkan bakteri asam laktat selama fase pertumbuhan eksponensial yang dalam jumlah yang cukup, dapat membunuh atau menghambat bakteri lain yang berkompetisi dalam ekologi yang sama (Emmawati *et al.*, 2015). Oleh karena itu dilakukan penelitian tentang identifikasi biokimia aktivitas antibakteri dari limbah bayam. Identifikasi biokimia merupakan upaya untuk menentukan jenis spesifik isolat BAL yang diperoleh oleh peneliti sebelumnya yang hanya menggunakan identifikasi makroskopik dan mikroskopik saja. Pengujian aktivitas pada penelitian ini menggunakan isolat yang diperoleh dari hasil fermentasi menggunakan glukosa 1,5% terhadap bakteri *Basillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella thypimurium*, *Streptococcus mutans*, dan *Propionibacterium acnes*

METODE

Desain, tempat dan waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi pada tahun 2019. Desain penelitian eksploratif.

Bahan uji dan bakteri uji

Bahan uji menggunakan stok isolat BAL di peroleh dari Laboratorium Mikrobiologi stok peneliti sebelumnya. Bakteri uji yang digunakan adalah *Basillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella thypimurium*, dan *Propionibacterium acnes*.

Bahan yang digunakan CaCO₃, *de Man rogosa sharpe* Agar (Merck), *de Man rogosa sharpe* Broth (Merck), KOH 3 %, membrane filter bakteri, Mueller Hinton Agar (Merck), NaCL fisiologis 0,9%, pembawa bahan uji blank paper disc (Oxoid), reagen Kovac, reagen metal red, Sulfida indole motility (Merck), MR-VP (Merck), triple sugar iron agar (Merck).

Prosedur kerja

Peremajaan sampel uji

Bahan uji stok isolat bayam diinokulasikan pada medium MHA dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam.

Pengujian biokimia (Cappuccino and Sherman, 2014)

Pengujian TSIA

Isolat bakteri diinokulasikan pada media TSIA dengan cara ditusuk tegaklurus pada bagian butt dan carazigzag pada bagian slant. Kemudian biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati perubahan warna media. Apabila pada bagian slant media berwarna merah dan butt berwarna kuning, maka bakteri mampu memfermentasi glukosa. Apabila pada bagian slant dan butt media berwarna kuning, maka bakteri mampu memfermentasi glukosa, laktosa dan sukrosa.

Pengujian Indol

Isolat bakteri diinokulasi ke dalam media SIM dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengamatan hasil uji indol dilakukan dengan menambahkan 10 tetes reagen Kovac's. Uji positif ditandai dengan terbentuknya lapisan berwarna merah di bagian atas biakan.

Pengujian motilitas

Uji motilitas dilakukan dengan menusukkan satu koloni isolat bakteri ke dalam media SIM kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Pertumbuhan bakteri di sekitar tusukan menunjukkan hasil uji negatif. Pertumbuhan bakteri yang menyebar pada media menunjukkan hasil uji positif.

Pengujian MR-VP

Isolat bakteri diinokulasi ke dalam media MR-VP dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Pengamatan uji MR dilakukan dengan menambahkan tiga tetes reagen MR ke dalam media.

Uji positif ditandai dengan perubahan warna media menjadi merah, artinya terbentuk asam. Uji VP dilakukan dengan menambahkan tiga tetes KOH 3% dan lima tetes alfanafтол, lalu dikocok selama 30 detik.

Pengujian ketahanan suhu

Isolat bakteri diinokulasi ke dalam media MRS broth dan diinkubasi pada suhu 5°C dan 37°C. Pertumbuhan bakteri ditandai dengan adanya kekeruhan pada media.

Pengujian ketahanan garam

Isolat bakteri diinokulasi ke dalam media MRS broth dengan konsentrasi NaCl 5% ; 6,5% dan 10%. Kemudian biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 7 hari. Pertumbuhan bakteri ditandai dengan adanya kekeruhan pada media.

Pembuatan kultur uji

Isolat yang sudah diremajakan dikultur pada medium MRSB selama 2x24 jam pada suhu 37 °C. Kultur cair disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 RPM (Rotary per Minute) pada suhu 4°C selama 15 menit. Filtrat dinetralkan hingga pH 7,0 menggunakan pH meter dengan menambahkan larutan NaOH 1 N. Filtrat disterilkan dengan filter bakteri berdiameter 0,22 µm ke dalam tabung steril untuk memperoleh supernatan antibakteri (Sari, Apridamayanti and Octaviani, 2018).

Pengujian Biuret

Supernatan sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 1 mL NaOH 2,5 M kemudian dihomogenkan. Tambahkan setetes CuSO₄ 0,01 M lalu dihomogenkan sampai berwarna ungu untuk melihat apakah positif mengangfung protein (Bintang, 2010)

Pengujian aktivitas antibakteri

Medium *MHA* sebanyak 20 ml dimasukkan ke dalam beberapa cawan petri dibiarkan hingga memadat. Selanjutnya digoreskan masing-masing bakteri uji yakni *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella thypimurium*, *Streptococcus mutans*, dan *Propionibacterium acnes*. Setelah itu diambil supernatan sebanyak 20 mikroliter dan diteteskan pada paper disk kosong. Paperdisk selanjutnya di letakkan secara teratur diatas media *MHA* yang telah mengandung mikroba uji dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Diameter zona hambat diukur untuk menentukan aktivitas antibakteri bahan uji.

Pengolahan dan analisis data

Data pengujian biokimia di analisis berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* dan data pengujian aktivitas antibakteri diolah dengan SPSS analisis univariat dan LSD.

HASIL

Tabel 1. Hasil pengujian biokimia

Isolat	Pengujian Biokimia									
	Motilitas	Indol	TSIA	MR	VP	Ketahanan suhu		Ketahanan garam		
						5°C	37°C	5%	6,5%	10%
A	-	-	y/y	+	-	-	+	+	+	+
B	+/H	-	y/y	+	-	-	+	+	+	+
C	-	-	y/y	+	-	-	+	+	+	+
D	-	-	y/y	+	-	-	+	+	+	+
E	-	-	y/y	+	-	-	+	+	+	+

Menurut *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* dari hasil identifikasi biokimia tersebut diduga bahwa isolat yang diperoleh termasuk kelompok BAL dari famili *Lactobacillaceae*, genus *Lactobacillus* sp.

Tabel 2. Hasil pengujian aktivitas antibakteri

Perlakuan	Rata-rata diameter zona hambat (mm)						
	BS	EC	SA	SE	ST	SM	PA
Isolat A	7,8	10,28	10,22	8,71	8,93	15,6	11,1
Isolat B	7,1	9,1	7,35	9,21	8,26	9,1	8,5
Isolat C	7,45	10,16	10,09	9,05	8,33	12,6	7,45
Isolat D	7,3	8,1	7,45	8,15	8,26	9,2	8,3
Isolat E	7,5	10,16	10,17	9,05	8,26	9,5	8,2
Kontrol (+)	17,4	21,9	21,25	14,55	15,90	18,70	21,20

Sedangkan hasil analisis data menunjukkan one way anavadi perolah nilai $p=0,000$ ($p<0,05$) yang berarti ada pengaruh jenis isolat terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri uji . hasil pengujian LSD menunjukkan perbedaan antara isolat yang berbeda sigbifikan ditunjukkan pada isolat A terhadap Isolat B ($p=0,05$), isolat A terhadap isolat B ($p=0,027$) dan isolat A terhadap kontrol positif ($p=0,000$)

PEMBAHASAN

Pada pengujian motilitas terlihat rata-rata isolat yang diisolasi merupakan non motil kecuali isolat B yang bersifat motil dan menghasilkan H₂S/pengendapan berwarna hitam. Menurut Gappucino J dan Sherman N , 2014 jika hidrogen sulfida diproduksi maka warna hitam akan terbentuk pada media.

Pada pengujian indol menunjukkan rata-rata isolat tidak terbentuk indol yang ditandai dengan warna merah dibagian permukaan agar, dengan demikian isolat BAL yang telah diisolasi

tidak mampu menggunakan asam amino triptofan sebagai energiselynya(Lay, 1994).

Pengamatan uji TSIA dilakukan berdasarkan perbedaan pola fermentasi karbohidrat. Pola fermentasi yang dihasilkan diantaranya, isolat BAL yang memfermentasi glukosa yang ditandai dengan pembentukan warna merah pada slant dan kuning pada butt. Organisme ini cenderung menguraikan glukosa terlebih dahulu karena substrat ini berada dalam konsentrasi yang kecil. Sedangkan isolat BAL yang dapat memfermentasi glukosa, laktosa dan sukrosa yang ditandai dengan pembentukan warna kuning pada slant dan butt. Karena berada dalam konsentrasi yang lebih tinggi, senyawa ini berperan sebagai substrat untuk aktivitas fermentasi dengan mempertahankan reaksi asam baik pada permukaan maupun pada dasar media.

Isolat BAL lainnya positif MR karena isolat berada pada kisaran pH 4, yang ditandai dengan terbentuknya warna merah saat penambahan indikator. Sedangkan menurut (Cappuccino and Sherman, 2014)uji Voges-Proskauer dilakukan

untuk menentukan kemampuan beberapa organisme membentuk produk akhir non-asam atau netral dari asam-asam organik yang dihasilkan dari metabolisme glukosa. Hasil uji V P terhadap isolat BAL yang diperoleh yaitu negatif VP karena tidak terbentuknya perubahan warna saat penambahan pereaksi yang menandakan organisme tidak membentuk produk akhir non-asam atau netral.

Pada pengujian ketahanan suhu terlihat isolat mampu bertahan atau tumbuh pada suhu 37°C karena terjadi kekeruhan pada media yang menandakan bahwa bakteri dapat tumbuh. Sedangkan pada suhu 5°C isolat tidak mengalami pertumbuhan karena tidak terjadinya kekeruhan pada media. Menurut Khalid, 2011 suhu optimum bagi pertumbuhan BAL adalah 10-45°C.

Pada pengujian ketahanan garam dengan konsentrasi garam 5%, 6,5% dan 10% diperoleh hasil positif, dimana isolat BAL yang diperoleh dapat tumbuh dengan tanda terjadinya kekeruhan pada media setelah diinkubasi.

Dari hasil tabel 2 menunjukkan bahwa semua isolat bakteri asam laktat limbah sayur bayam memiliki aktivitas antibakteri terhadap masing-masing bakteri uji. Rata-rata diameter zona untuk masing-masing isolat berkisar antara 7,1-7,8 mm untuk bakteri *Bacillus subtilis*, 8,1-10,28 mm untuk bakteri *Escherichia coli*, 7,35-10,22 mm untuk *Staphylococcus aureus*, 8,71-9,21 mm untuk bakteri *Staphylococcus epidermidis*, 8,26-8,93 mm untuk bakteri *Salmonella thymurium*, 9,1 – 15,6 mm untuk bakteri *Streptococcus mutans* dan 8,2- 11,1 mm untuk bakteri *Propionibacterium acnes*. Berdasarkan klasifikasi yang dikemukakan oleh David dan Stout, 1971 maka diameter zona hambat tergolong kategori sedang (5-10 mm) dan kuat (10-20 mm). Aktivitas yang dihasilkan diduga karena adanya kandungan bakteriosin pada isolat BAL Bayam. Hal ini sejalan dengan hasil pengujian kualitatif menggunakan metode biuret menunjukkan hasil positif mengandung protein,

Menurut (Kusmiati, 2002) bahwa beberapa jenis bakteriosin dari bakteri asam laktat bersifat spektrum luas dan memiliki aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan beberapa bakteri patogen. Zona bening yang terbentuk pada uji antibakteri terlihat zona bening dengan batas tepi lingkaran yang jelas dan tegas hal ini disebabkan karena adanya aktivitas bakteriosin, *inactivation* yang artinya satu bakteriosin akan membunuh satu sel bakteri indikator.

Terhambatnya pertumbuhan mikroba uji pada hasil yang diperoleh menurut penelitian yang telah dilakukan oleh (Yuni and Sari, 2003), bahwa metabolit yang terdapat pada bakteri asam laktat berdifusi pada media pertumbuhannya dengan tingkat kemampuan yang berbeda-beda, tergantung dari spesies bakteri asam laktat dan komposisi media pertumbuhan yang digunakan.

Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat merupakan substansi protein yang memiliki berat molekul yang kecil dan dapat berperan sebagai bakteriosida. Bakteriosin pada bakteri asam laktat banyak digunakan dalam produk fermentasi karena dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Ogunbanwo, Sanni and Onilude, 2003).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis statistik maka disimpulkan bahwa

1. Isolat BAL limbah sayur bayam termasuk dalam Famili *Lactobacillaceae*, genus *Lactobacillus* sp
2. Aktivitas terbaik di tunjukkan pada isolat A dan bersifat spektrum luas

SARAN

Untuk pengembangan disarankan untuk penelitian karakterisasi bakteriosin menentukan kadarnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

1. Terima kasih kepada pihak KEMENRISTEK DIKTI yang telah memberikan fasilitas berupa dana untuk melaksanakan penelitian ini.
2. Terima kasih kepada pihak Laboratorium Mikrobiologi dan Penelitian Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar yang telah memberikan fasilitas untuk melaksanakan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bintang, M. (2010) *Biokimia*.
- Cappuccino, J. G. and Sherman, N. (2014) *Manual Laboratorium Mikrobiologi*. 8th edn. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Emmawati, A. et al. (2015) 'Karakterisasi Isolat Bakteri Asam Laktat Dari Mandai Yang Berpotensi Sebagai Probiotik', *Jurnal Agritech*, 35(02), p. 146. doi:

10.22146/agritech.9400.

- Korhonen, J. (2010) *Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria. Dissertation in Forestry and Natural Sciences ISBN: 978-952-61-0097-5*. Eastern Finland: Publications of the University of Eastern Finland.
- Kursia, S. et al. (2019) 'Optimasi produksi bakteri asam laktat dari limbah sayuran hijau', in, pp. 1–4.
- Kusmiati (2002) 'Aktivitas bakteriosin dari bakteri *Leuconostoc mesenteroides Pba1* pada berbagai media', Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Universitas Indonesia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan, 6(1), pp. 1–7.
- Lay, B. (1994) *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta: PT. Raja Grafiika Persada.
- Nasution, F. S. (2012) 'Identifikasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Pada Kotoran Ayam Broiler Sebagai Agensi Probiotik', Digital Repository Universitas Negeri Medan. Available at: <http://digilib.unimed.ac.id/id/eprint/10255>.
- Ogunbanwo, S. T., Sanni, A. I. and Onilude, A. A. (2003) 'Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* FI and *Lactobacillus brevis* OGI', *African Journal of Biotechnology*, 2(8), pp. 223–235. doi: 10.5897/ajb2003.000-1045.
- Sari, R., Apridamayanti, P. and Octaviani, M. (2018) 'Optimasi Aktivitas Bakteriosin yang Dihasilkan oleh Bakteri *Lactobacillus plantarum* dari Minuman Ce Hun Tiau', 5(1), pp. 1–6.
- Sasmitha et al. (2018) 'Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Dari Liur Basa (Limbah Sayur Bayam Dan Sawi)', *As-Syifaa Jurnal Farmasi*, 10(2), pp. 141–151.
- Wedajo, B. (2015) 'Lactic Acid Bacteria: Benefits, Selection Criteria and Probiotic Potential in Fermented Food', *Journal of Probiotics & Health*, 03(02). doi: 10.4172/2329-8901.1000129.
- Yuni and Sari, N. M. (2003) 'Isolasi, Karakterisasi, Dan Identifikasi Dna Bakteri Asam Laktat (Bal) Yang Berpotensi Sebagai Antimikroba Dari Fermentasi Markisa Kuning (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*)', 21(6), pp. 465–499. Available at: <http://scholar.unand.ac.id/id/eprint/8203>.

