



ISOLASI BAKTERI ASAM LAKTAT DARI TAPE UBI SINGKONG (*Manihot esculenta* Crantz) DAN UJI AKTIVITAS ENZIM PROTEASE

THE ISOLATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM CASSAVA TAPAI (*Manihot esculenta* Crantz) AND PROTEASE ENZYME ACTIVITY ASSAY

Epi Supri Wardi¹, Irwandi², Icha Febriani³, Bastian Nova^{*4}

^{1,2,3}Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Perintis Indonesia, Jl. Adinegoro
Simp. Kalumpang Lubuk Buaya, Padang, Sumatera Barat

⁴Departemen Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian,
Kampus Limau Manis, Universitas Andalas, Sumatera Barat, Indonesia
(bastiannova@ae.unand.ac.id)

ABSTRAK

Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan golongan bakteri yang dapat menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir fermentasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menguji aktivitas enzim protease pada BAL dari tape ubi singkong dan melakukan identifikasi secara molekuler terhadap BAL yang memiliki aktivitas enzim protease tertinggi. Terdapat 6 isolat bakteri yang berhasil diperoleh melalui tahap pemurnian dan 1 isolat bakteri asam laktat yang memiliki aktivitas enzim protease tertinggi. Uji aktivitas enzim protease BAL dilakukan menggunakan media agar yang mengandung 1% susu skim dan BAL diidentifikasi secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA. Hasil pengujian aktivitas enzim protease menunjukkan bahwa dari 3 isolat BAL yang diperoleh, hanya 1 isolat yang memiliki aktivitas enzim protease (zona bening) yaitu isolat kode 2 dengan diameter rata-rata 8,33 mm, sedangkan kontrol positif berdiameter 30 mm. Hasil identifikasi molekuler menunjukkan bahwa isolat tersebut memiliki homologi 100% dengan *Leuconostoc mesenteroides* Strain 176.

Kata Kunci: Tape Ubi Singkong, Bakteri Asam Laktat, Protease, Identifikasi Molekuler

ABSTRACT

Lactic Acid Bacteria (LAB) are a group of bacteria capable of producing lactic acid as the end product of fermentation. This study aimed to isolate and evaluate the protease enzyme activity of LAB from cassava tape and to perform molecular identification of the LAB with the highest protease enzyme activity. A total of six bacterial isolates were successfully obtained through purification, and one LAB isolate showed the highest protease enzyme activity. Protease activity testing of LAB was conducted using an agar medium containing 1% skim milk, and molecular identification was performed using the 16S rRNA gene. The results of the protease enzyme activity test indicated that out of three LAB isolates obtained, only one isolate, coded as isolate 2, exhibited protease activity (clear zone) with an average diameter of 8.33 mm, whereas the positive control had a diameter of 30 mm. Molecular identification results showed that this isolate had 100% homology with *Leuconostoc mesenteroides* Strain 176.

Keywords: Cassava Tape, Lactic Acid Bacteria, Protease, Molecular Identification

PENDAHULUAN

Pada bidang ilmu bioteknologi sudah menempatkan penggunaan enzim yaitu alternatif untuk berbagai kepentingan,

misalnya pada bidang industri dan pengobatan. Dimana enzim yang telah banyak digunakan adalah enzim protease untuk mengkatalis hidrolisis ikatan peptida

pada protein. Enzim protease merupakan enzim yang penting dan mempunyai nilai ekonomis yang tinggi. Salah satu contoh penggunaan enzim protease yaitu pada bidang industri seperti, industri deterjen, kulit, tekstil, makanan, pengolahan susu, farmasi, bir dan limbah (Moon & Parulekar, 1993)

Penggunaan enzim protease sendiri banyak dimanfaatkan dalam tubuh, namun juga banyak dimanfaatkan di luar tubuh makhluk hidup. Seperti di farmasi dimana kegunaan protease pada proses deproteinasi yaitu suatu proses untuk menghilangkan protein, dimana deproteinasi secara biologis dapat menggunakan enzim protease, dimana enzim protease merupakan enzim yang mampu menghidrolisis suatu ikatan peptida yang ada didalam protein (Bisping, B., G. Daun. and G, 2005). Pada proses deproteinasi telah banyak digunakan pada pembuatan chitosan. Chitosan merupakan bahan alami yang direkomendasikan sebagai pengawet makanan karena tidak beracun untuk tubuh dan sering digunakan untuk pembungkus kapsul karena mampu melepaskan obatnya ke dalam tubuh secara terkontrol.

Protease biasanya didapatkan ditanaman, hewan dan juga pada mikroorganisme (Munifah, 2014). Dimana mikroorganisme yang aman jika ditambahkan dalam pangan yaitu bakteri asam laktat yang juga dikenal dengan sebutan mikroorganisme Generally Recognized As Safe (GRAS) yaitu mikroorganisme yang tidak berefek merugikan atau beresiko terhadap kesehatan tubuh (Kusmiati & Malik, 2002).

Bakteri Asam Laktat merupakan suatu kelompok bakteri yang berfungsi mengubah glukosa menjadi asam laktat. BAL sangat berperan dalam kesehatan tubuh, seperti membantu sistem pencernaan tubuh dan mengendalikan kolesterol (Kusmiati et al., 2015). Bakteri asam laktat umumnya digunakan untuk menghasilkan makanan fermentasi. Dimana BAL sangat penting pada bidang industri fermentasi makanan karena bakteri asam laktat dapat memproduksi

peptida dan protein (bakteriosin) yang dapat menghambat proses pertumbuhan organisme patogen (Glazer, Alexander N., 2007). Bakteri asam laktat terdapat dalam makanan fermentasi yaitu pada tape (Bettache et al., 2012).

Tape adalah makanan hasil proses fermentasi bahan pangan berkarbohidrat menggunakan ragi khamir seperti *Saccharomyces cerevisiae*, *S. fibuligera*, *Candida utilis*, *Endomycopsis burtonii*, dan juga ada beberapa mikroorganisme lain seperti *R. oryzae*, *Mucor sp.*, *Pediococcus sp.*, dan termasuk kelompok bakteri asam laktat (Gandjar, 2003). Jenis tape yang umum diproduksi adalah tape ubi singkong. Tape ubi singkong merupakan makanan fermentasi yang telah banyak digunakan atau dikonsumsi di Indonesia yang dihasilkan dari proses fermentasi bahan pangan berkarbohidrat, yang melibatkan ragi di dalam proses pembuatannya (Astawan, 1991). Namun, informasi mengenai bakteri asam laktat pada tape singkong masih terbatas oleh karena itu diperlukan untuk dikaji lebih lanjut lagi.

Berdasarkan data penelitian yang dilakukan oleh (Barus, 2019), tentang Identifikasi dan Keragaman Genetik Bakteri Asam Laktat dari Tapai Singkong didapatkan hasil Sekuen Gen 16S rRNA adalah *L. fermentum*, lalu diikuti oleh *W. confusa*, *W. cibaria*, dan *W. paramesenteroides*.

Berdasarkan penjelasan diatas, dapat kita lihat belum adanya informasi mengenai isolat bakteri asam laktat pada tape ubi singkong yang memiliki enzim protease, oleh karena itu peneliti sangat tertarik untuk melakukan penelitian mengenai isolasi bakteri asam laktat dari tape ubi singkong dan mengetahui uji aktivitas enzim proteasenyanya. Isolasi bakteri asam laktat yang memiliki aktivitas enzim protease tertinggi maka dilakukan secara molekuler terhadap gen 16S rRNA dengan alat PCR (Polimerase Chain Reaction) agar dapat diketahui spesies dari bakteri asam laktat pada tape ubi singkong.

METODOLOGI PENELITIAN

1. Pembuatan Tape Ubi Singkong

Singkong dikupas kulitnya lalu dicuci, kemudian ditanak selama 30 menit. Setelah matang, singkong diangkat dan didinginkan selama ± 1 jam, selanjutnya ditimbang seberat 300 gram dan dibagi menjadi 3 bagian yang mana masing-masingnya 100 gram. kemudian ditaburi ragi sebanyak 0,85 gram ke masing-masingnya. Singkong yang sudah ditaburi ragi kemudian ditutup dengan daun talas, daun jati dan daun pepaya. Setelah itu dimasukkan kedalam wadah yang nantinya wadah akan ditutupi dengan kain serbet dan difermentasi selama 1 sampai 3 hari pada suhu ruangan. Terjadilah proses fermentasi yang mengubahnya menjadi tape.

2. Isolasi Bakteri Asam Laktat

Proses isolasi bakteri asam laktat dari tape ubi singkong diawali dengan mengambil sebanyak 5 gram tape dihomogenkan dengan 45 mL NaCl 0,9% lalu dihomogenkan dan ditanam kedalam media DeMan Rogosa and Sharp agar (MRSA) pada cawan petri. Kemudian ketiga cawan petri dibungkus dengan koran dan diikat dengan tali jagung. Petri yang berisi kultur lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.

3. Pemurnian

Setelah diisolasi maka selanjutnya dipilih beberapa koloni berdasarkan ukurannya yang diidentifikasi sebagai bakteri asam laktat yang mana nantinya akan ditanam pada media MRSA pada cawan petri yang berbeda lalu diisolasi didalam inkubator pada suhu 37°C selama 48 jam yang diulangi sebanyak 2 kali.

4. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Pewarnaan Gram

Diteteskan diatas gelas objek yaitu aquades steril lalu tambahkan 1 ose bakteri yang memiliki umur 48 jam kemudian diratakan secara merata diatas permukaan gelas obyek. Kemudian preparat difiksasi sampai terbentuknya noda. Diteteskan pewarna

kristal violet (gram A) diatas noda dan dibiarkan selama 1 menit kemudian di cuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Selanjutnya ditetesi dengan larutan mordan atau lugol (gram B) dan dibiarkan selama 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Tahap selanjutnya adalah ditetesi dengan alkohol-aseton (gram C) sampai tidak berwarna. Tahap terakhir dari pengecatan gram ini adalah ditetesi dengan pewarna safranin (gram D) selama 30 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Objek glass ditutup dengan deck glass dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Isolat BAL menunjukkan warna ungu dibawah mikroskop (Bell, C., P. Neaves, 2005).

Uji Motilitas

Isolat bakteri ditusukkan ke media SIM menggunakan ose lancip, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Jika motil maka akan terlihat pertumbuhan bakteri yang menyebar dan jika non motil maka akan terlihat pertumbuhan bakteri yang tidak menyebar.

Uji Katalase

Diteteskan diatas gelas obyek yaitu aquades steril kemudian ditambahkan 1 ose bakteri umur 48 jam dan diratakan pada permukaan atas gelas obyek lalu ditetesi dengan H₂O₂, didiamkan 1 menit. Jika timbul gelembung udara menunjukkan katalase positif dan jika tidak timbul gelembung udara menunjukkan katalase (Bell, C., P. Neaves, 2005).

Pewarnaan Endospora

Gelas obyek difiksasi diatas api bunsen kemudian NaCl di tetes kan diatas gelas obyek kemudian ditambahkan 1 ose bakteri umur 48 jam dan diratakan pada permukaan atas gelas obyek. Preparat difiksasi dengan melewatkannya diatas nyala api bunsen beberapa kali. Preparat yang sudah di fiksasi digenangi dengan pewarna malakit hijau dan dipanaskan diatas api hingga timbul uap air (± 10 menit) (dijaga agar pewarna jangan sampai kering), kemudian dicuci dengan aquadest, setelah itu ditetaskan safranin dikaca objek lalu dicuci dengan aquadest dan

dikeringanginkan. Preparat diamati menggunakan mikroskop (perbesaran 1000x) untuk mengetahui adanya spora dalam sel(endospora). Isolat BAL akan menunjukkan tidak ada spora dalam sel (Bell, C., P. Neaves, 2005).

5. Uji Aktivitas Enzim Protease

Seleksi bakteri asam laktat proteolitik dilakukan dengan uji aktivitas proteolitik pada media agar dengan menggunakan 1% skim milk (Nespolo & Brandelli, 2010). Uji aktivitas proteolitik dilakukan dengan prosedur (Benson, 2001) yaitu kultur cair isolat yang diperoleh dari hasil isolasi diinokulasikan ke paper disc blank sebanyak 10 μ L yang kemudian ditempatkan pada media skim milk agar (1%), diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Inokulasi bakteri dilakukan dengan cara memasukkan paper disc ke dalam kultur cair isolat bakteri menggunakan pinset. Aktivitas proteolitik tampak dari terbentuk zona jernih di sekitar paper disc. Uji aktivitas proteolitik pengamatan dilakukan selama 48 jam. Berdasarkan tingkat kemampuan menghidrolisis protein yang dihasilkan oleh masing-masing isolat ditunjukkan berupa zona jernih (Triyanto, , 2009). Kemudian dipilih satu isolat yang mamiliki aktivitas enzim protease yang tertinggi. Untuk kontrol positif, pada permukaan media skim milk diberikan 1 buah kertas cakram yang ditanam enzim protease murni (Proteinase-K) sebagai kontrol positif, kemudian diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37 °C selama 48 jam.

6. Isolasi DNA

Isolat bakteri asam laktat terpilih di media MRSA bakteri asam laktat diambil menggunakan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf yang telah berisi buffer GP1 sebanyak 400 μ L, kemudian dikocok. Selanjutnya sampel dalam tabung eppendorf dimasukkan ke dalam *thermoblock* pada suhu 60°C selama 15 menit. Tabung kemudian disentrifugasi (ultrasentrifugasi). Sampel kemudian dimasukkan buffer GP2

sebanyak 100 μ L, dan didinginkan dalam freezer selama 1 menit, disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung *spin column*, dan ditambahkan buffer GP3 sebanyak 750 μ L. Sebagian dari supernatan dipindahkan pada *collection tube* beserta *spin column* lalu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. Ditambahkan sisa supernatan yang ada dengan buffer GP3. Selanjutnya disentrifugasi 10.000 rpm selama 1 menit, filtrat dibuang. Ditambahkan buffer W1 sebanyak 400 μ L ke dalam tabung *spin column* disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. Setelah itu filtrat dibuang lalu dilakukan pencucian kedua dengan mencampurkan *wash buffer* sebanyak 600 μ L sentrifugasi kecepatan 15.000 rpm selama 1 menit. Sementara itu *elution buffer* dipanaskan pada *thermoblock* pada suhu 60°C. Setelah sentrifugasi selesai, membran dengan DNA dipindahkan ke dalam tabung eppendorf baru dan dikering-anginkan selama 2 menit. Membran ditambahkan *elution buffer* sebanyak 100 μ L ke dalam tabung *collection tube* dan *spin column*. Selanjutnya sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit (Sihombing et al., 2018).

7. Identifikasi Bakteri dengan Gen 16S rRNA

Alat yg digunakan adalah : menggunakan Go Taq green mastermix (Promega), untuk mengamplifikasi sekuen 16S Rrna digunakan pasangan Primer Forward 27F (5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3) dan 1492 R (5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACTT-3'). Mesin PCR dijalankan dengan pengaturan : predenaturasi 1 siklus pada suhu 95°C selama 1 menit, denaturasi 35 kali siklus pada suhu 95°C selama 30 detik/siklus, *annealing* pada suhu 50°C selama 1 menit, *extension* pada suhu 72°C selama 1 menit, *post-extension* pada suhu 72°C selama 7 menit. Hail PCR kemudian divisualisasi dengan melakukan elektroforesis pada Bubuk agarose 0.8% ditimbang dalam 50 ml TBE buffer dalam erlenmeyer, kemudian dicampur dan

dididihkan gel (*sop microwave*) selama 1-2 menit sampai larut hingga berwarna jernih, lalu tuangkan dalam cetakan *Casting tray* beserta sisirnya. Setelah itu dilakukan visualisasi dengan sinar UV pada UV-transiluminator.

Hasil deteksi didokumentasikan (Sihombing *et al.*, 2018). Sekuensing Gen 16S rRNA BAL dilakukan dengan mengirim data ke 1st BASE Singapura melalui PT. Genetika Science. Hasil sekuensing DNA dianalisis menggunakan metode BLAST secara online pada website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) untuk dicocokkan dengan data spesies pada Gen Bank untuk mencari kesamaan urutan nukleotida gen 16S rRNA dalam menentukan spesies isolat bakteri asam laktat dari tape ubi singkong yang memiliki aktivitas enzim protease tertinggi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada ubi singkong memiliki protein 0,5 gram/100 gram bahan. Dimana protein sendiri berguna dalam pertumbuhan serta perkembangan tubuh, pergantian sel jaringan tubuh yang telah rusak, dan juga sebagai produksi enzim pencernaan serta enzim metabolisme (Winarno, 1993). Tape yang bagus atau siap dikonsumsi yaitu tape yang terfermentasi selama 2-3 hari. Setelah dilakukan fermentasi 3 hari maka akan didapatkan tape ubi singkong yang memiliki tekstur lembut, rasa manis, agak masam. Kemudian dilakukan isolasi bakteri asam laktat dengan dilakukan penanaman isolat pada media MRSA ke cawan petri dengan metode Streak plate (cara goresan) dan dimasukkan dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 48 jam.

Setelah bakteri asam laktat tumbuh, kemudian dilakukan pemurnian bakteri asam laktat untuk mendapatkan biakan murni pada bakteri. Hasil pemurnian diperoleh 6 isolat bakteri murni, yang masing-masing isolat diberi kode 1, 2, 3, 4, 5, 6. Pada pengujian selanjutnya dilakukan uji fenotipik terlebih dahulu dan kemudian dilanjutkan dengan uji identifikasi molekuler dengan menggunakan

gen 16S rRNA untuk mengetahui jenis bakteri yang didapatkan (WHO, 2006). Uji fenotipik dilakukan dengan cara pengamatan morfologi makroskopik dan pengamatan morfologi mikroskopik. Didapatkan hasil identifikasi morfologi secara makroskopis menunjukkan bahwa dari keenam bakteri asam laktat memiliki bentuk seperti bulat, elevasi cembung, warna putih dan berukuran yang berbeda-beda ada yang berukuran besar, kecil, halus dan sedang. Selanjutnya dilakukan identifikasi secara mikroskopis dengan beberapa uji pengamatan yaitu uji pewarnaan gram, uji katalase, uji motilitas dan uji endospora.

Tabel 1. Hasil Pengamatan Bakteri Berdasarkan Pewarnaan Gram

Kode Isolat	Pewarnaan Gram	Bentuk
Kode 1	Positif	Basil
Kode 2	Positif	Basil
Kode 3	Positif	Cocus Basil
Kode 4	Positif	Basil
Kode 5	Positif	Basil
Kode 6	Positif	Basil

Berdasarkan tabel 1 diatas pada uji pewarnaan gram didapatkan hasil keenam isolat bakteri asam laktat merupakan bakteri gram positif yang dicirikan dengan koloni bakteri asam laktat yang berwarna ungu. Dimana Bakteri Gram positif yaitu bakteri yang mempertahankan warna ungunya, dimana warna ungu dari pewarnaan Gram positif terjadi karena bakteri dapat menyerap warna dari kristal violet. Bakteri Gram positif akan mengambil warna kristal violet walaupun sudah dicuci dengan alkohol dan ketika diberi safranin berwarna merah, bakteri tersebut nantinya akan tetap berwarna ungu sedangkan warna merah muda menunjukkan Gram negatif (Aisyah *et al.*, 2014).

Tabel 2. Hasil Pengamatan Uji Motilitas

Kode Isolat	Motilitas
Kode 1	Non Motilitas
Kode 2	Non Motilitas
Kode 3	Non Motilitas
Kode 4	Non Motilitas
Kode 5	Non Motilitas
Kode 6	Non Motilitas

Berdasarkan tabel 2 diatas pada uji motilitas menunjukkan hasil dari keenam isolat bakteri asam laktat adalah non motilitas karena tidak adanya pertumbuhan menyebar bakteri disekitar tusukan yang seperti awan didalam media SIM, dimana sesuai dengan pernyataan Nuryady (2003), menyatakan bahwa isolat bakteri asam laktat yang diisolasi mempunyai sifat non motil yang ditandai tidak terjadinya suatu gerakan pada bakteri yang biasanya menyerupai rambatan akar disekitar tusukan.

Selanjutnya dilakukan uji katalase untuk mengetahui adanya enzim katalase pada isolat bakteri, dimana pada enzim katalase berperan dalam memecahkan hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Dimana berdasarkan karakteristiknya bakteri asam laktat adalah katalase negatif, toleran terhadap asam dan bersifat anaerob (Mozzi et al., 2010)

Tabel 3. Hasil Pengamatan Uji Katalase

Kode Isolat	Katalase
Kode 1	Katalase Negatif
Kode 2	Katalase Negatif
Kode 3	Katalase Positif
Kode 4	Katalase Negatif
Kode 5	Katalase Positif
Kode 6	Katalase Negatif

Berdasarkan pengujian katalase didapatkan hasil bahwa 2 isolat dari keenam isolat bakteri asam laktat membentuk gelembung ketika ditambahkan H_2O_2 dimana menunjukkan bahwa 2 isolat tersebut merupakan positif katalase oleh karena itu untuk pengujian selanjutnya 2 isolat bakteri yang positif katalase tidak dilanjutkan

pengujiannya untuk uji berikutnya.

Tabel 4. Hasil Pengamatan Uji Endospora

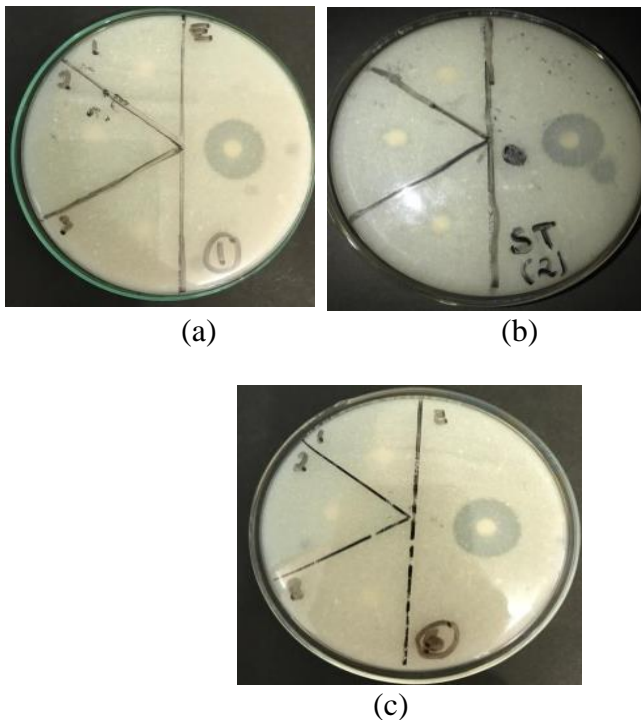
Kode Isolat	Endospora
Kode 1	Tidak Berspora
Kode 2	Tidak Berspora
Kode 4	Tidak Berspora
Kode 6	Tidak Berspora

Selanjutnya dilakukan pengujian endospora, dimana berdasarkan hasil tabel 8 menunjukkan hasil pengujian pada kode isolat kode 1, kode 2, kode 4 dan kode 6 didapatkan tidak berspora ketika diamati dibawah mikroskop, dimana sesuai dengan pernyataan dari Axelsson (2004) yang menyatakan bahwa bakteri asam laktat merupakan suatu bakteri memiliki ciri-ciri tidak membentuk spora.

Uji aktivitas enzim protease dilakukan pada 3 isolat bakteri asam laktat dengan kode yang berbeda yaitu kode 1, kode 2, dan kode 6 dengan menggunakan kertas cakram yang telah diletakkan pada media susu skim. Media susu skim merupakan suatu media yang mampu menghasilkan protease yang ditandai dengan menghasilkan zona bening pada media skim milk agar (Afifah, 2014)

Tabel 5. Hasil Pengujian Aktivitas Enzim Protease

Kode Isolat	Percobaan 1	Percobaan 2	Percobaan 3	Rata-Rata
Kode 1	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Kode 2	5 mm	9 mm	11 mm	8,33 mm
Kode 6	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Kontrol Positif	30 mm	30 mm	30 mm	30 mm

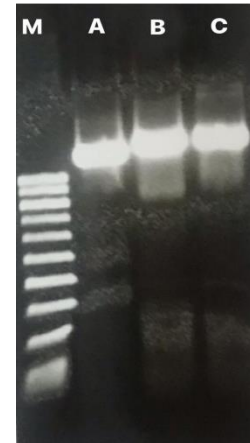


Gambar 1. Aktivitas Enzim Protease Bakteri Asam Laktat dan Kontrol Positif Enzim Protease (Enzim Proteinase-K), (a) kode 1, (b) kode 2, (c) kode 6.

Berdasarkan hasil diatas didapatkan bahwa bakteri asam laktat dengan kode isolat 2 memiliki aktivitas enzim protease dimana menunjukkan adanya zona bening disekitar kertas cakram dengan ukuran zona bening yaitu 5 mm, 9 mm, 11 mm dengan kontrol positifnya 30 mm. Terbentuknya zona bening karena bakteri yang tumbuh menghasilkan enzim protease, sehingga mampu menguraikan protein pada susu skim dalam media.

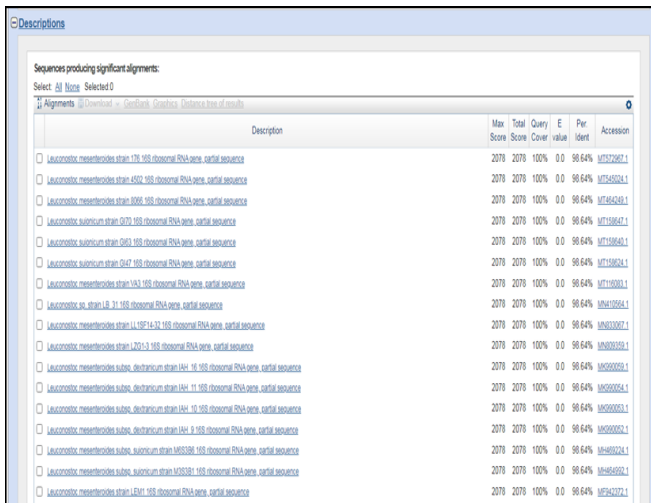
Setelah didapatkan isolat bakteri dengan kode 2 yang memiliki aktivitas enzim protease tertinggi kemudian dilanjutkan untuk dilakukan identifikasi molekuler dengan menggunakan gen 16S rRNA untuk mengetahui jenis bakteri yang didapatkan. Pada proses identifikasi molekuler mikroorganisme terdapat 4 tahap utama yaitu ekstraksi/isolasi DNA, PCR, elektroforesis, dan Sequensing. ekstraksi DNA didapatkan dengan merusak dinding sel sehingga DNA ini

keluar dari dalam sel (Romlah, 2018) Dimana hasil dari elektroforesis dari isolat DM didapatkan hasil sebagai berikut:



Gambar 2. Hasil Elektroforesis dari Produk Amplifikasi Gen 16S rRNA isolat bakteri asam laktat dengan kode 2 dengan ukuran pita DNA ± 1000 bp. M (DNA marker) 100 bp DNA ladder. M = DNA Marker, A = Tape Ketan Hitam, B = Tempoyak, C = Tape Ubi Singkong.

Berdasarkan hasil gambar diatas dimana pada proses amplifikasi bakteri berhasil dilakukan didapatkan benak yang terseparasi dengan marka 1000 bp. Selanjutnya isolat dideterminasi dengan menggunakan sekuen 16S rRNA yang dianalisis secara lengkap di 1st BASE Malaysia melalui PT. Genetika Science. Pada sekuen tersebut dilakukan dengan program BLAST-N (*Basic Local Aligment Search Tool-Nukelotida*). Hasil analisis BLAST dari isolat Kode 2 seperti pada Gambar 3.



Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Leuconostoc messenteroides strain 176 16S ribosomal DNA gene, partial sequence	2070	2070	100%	0.0	98.64%	MT529827.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc messenteroides strain 650 16S ribosomal DNA gene, partial sequence	2070	2070	100%	0.0	98.64%	MT545224.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc messenteroides strain 594 16S ribosomal DNA gene, partial sequence	2070	2070	100%	0.0	98.64%	MT545243.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc mesenteroides strain 573 16S ribosomal DNA gene, partial sequence	2070	2070	100%	0.0	98.64%	MT538647.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc mesenteroides strain 543 16S ribosomal DNA gene, partial sequence	2070	2070	100%	0.0	98.64%	MT538662.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc mesenteroides strain 547 16S ribosomal DNA gene, partial sequence	2070	2070	100%	0.0	98.64%	MT538624.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc messenteroides strain 153 16S ribosomal DNA gene, partial sequence	2070	2070	100%	0.0	98.64%	MT193003.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc sp. strain 18 31 16S ribosomal DNA gene, partial sequence	2070	2070	100%	0.0	98.64%	MH49564.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc messenteroides strain 11 16S ribosomal DNA gene, partial sequence	2070	2070	100%	0.0	98.64%	MH602027.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc messenteroides strain 120 16S ribosomal DNA gene, partial sequence	2070	2070	100%	0.0	98.64%	MH602039.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc messenteroides subsp. decursivum strain 144 16S ribosomal DNA gene, partial sequence	2070	2070	100%	0.0	98.64%	MH602059.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc messenteroides subsp. decursivum strain 144 11 16S ribosomal DNA gene, partial sequence	2070	2070	100%	0.0	98.64%	MH602054.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc messenteroides subsp. decursivum strain 144 10 16S ribosomal DNA gene, partial sequence	2070	2070	100%	0.0	98.64%	MH602053.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc messenteroides subsp. decursivum strain 144 9 16S ribosomal DNA gene, partial sequence	2070	2070	100%	0.0	98.64%	MH602052.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc messenteroides subsp. succinum strain 16508 16S ribosomal DNA gene, partial sequence	2070	2070	100%	0.0	98.64%	MH495224.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc messenteroides subsp. succinum strain 16508 16S ribosomal DNA gene, partial sequence	2070	2070	100%	0.0	98.64%	MH495222.1
<input type="checkbox"/> Leuconostoc messenteroides strain 150 16S ribosomal DNA gene, partial sequence	2070	2070	100%	0.0	98.64%	MT545272.1

Gambar 3. Hasil Analisis BLAST dari Isolat Bakteri Asam Laktat Kode 2

Analisis BLAST dilakukan untuk membandingkan hasil yang diperoleh dengan hasil sekuen DNA dari seluruh dunia yang didepositkan pada database Gen Bank. Analisis hasil BLAST tersebut memberikan informasi mengenai bakteri apa yang mempunyai kesamaan dengan urutan DNA sampel sehingga dapat digunakan untuk identifikasi bakteri. Informasi dari hasil BLAST tersebut berupa Query Coverage dan Maximum identity. Hasil analisis BLAST dari isolat bakteri asam laktat kode 2 menunjukkan bahwa spesies isolat kode 2 adalah bakteri *Leuconostoc messenteroides* Strain 176 dengan tingkat kesamaan nukleotida 100%.

Leuconostoc messenteroides merupakan bakteri asam laktat yang memiliki ciri-ciri berbentuk bulat, bersusun berpasangan seperti rantai dan termasuk gram positif. Menurut Suciati (2016) bakteri asam laktat dapat menghasilkan enzim seperti protease, α -amilase, fitase, kitinase, lipase. Oleh karena itu *Leuconostoc messenteroides* dapat menunjukkan adanya aktivitas enzim protease.

KESIMPULAN

Terdapat 3 isolat dari ke 6 isolat bakteri yang menunjukkan karakteristik BAL secara morfologis. Satu dari tiga isolat BAL tersebut menunjukkan adanya kemampuan aktivitas enzim protease yaitu isolat 2. Identifikasi secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA dilakukan pada isolat 2 tersebut, didapatkan hasil BLAST bahwa isolat 2 memiliki kesamaan nukleotida 100% dengan *Leuconostoc messenteroides* Strain 176.

DAFTAR PUSTAKA

- Afifah, D. N. (2014). *Protease Fibrinolitik Dari Mikroba Pangan Fermentasi Oncom Merah Dan Tempe Gembus*. Bogor: Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Aisyah, A., Kusdiyantini, E., & Supriyadi, A. (2014). *Isolasi, Karakterisasi Bakteri Asam Laktat, Dan Analisis Proksimat Dari Pangan Fermentasi "tempoyak"*. *Jurnal Akademika Biologi*, 3(2), 31–39.
- Astawan, M. dan M. W. A. (1991). *Teknologi Pengolahan Pangan Nabati Tepat Guna*. Bogor : Akademika Pressiada.
- Axelsson, L. (2004). *Lactic acid Bacteria: Classification and physiology*. Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker, Inc : New York.
- Barus, T. (2019). *Identifikasi dan Keragaman Genetik Bakteri Asam Laktat dari Tapai Singkong berdasarkan Sekuen Gen 16S rRNA*. *Journal of Biota*, 2(2), 46–52.
- Bell, C., P. Neaves, A. P. W. (2005). *Food Microbiology*. USA: Laboratory Practice, Blackwell Publishing.
- Benson. (2001). *Microbiological Applications. Laboratory Manual in General Microbiology*. (pp. 72–175). New York: McGraw-Hill Science Company.
- Bettache, G., Fatma, A., Miloud, H., & Mebrouk, K. (2012). *Isolation and identification of lactic acid bacteria from Dhan, a traditional butter and their major technological traits*. *World Applied Sciences Journal*, 17(4), 480–488.



- Bisping, B., G. Daun. and G. H. (2005). *Aerobik Deproteinization and Decalcification of Shrimp Wastes for Chitin Extraction. Discussion Forum "Prospect of Chitin Production and Application In Indonesia"*. BPPT, Jakarta.
- Gandjar, I. (2003). *Tapai from Cassava and Cereals*. Dalam First International Symposium and Workshop on Insight to the World of Indigenous Fermented Foods for Technology Development and Food Safety. Bangkok : Kasetsart University, August 13-17 2003 (pp. 1-10.).
- Glazer ,Alexander N., & B. H. N. (2007). *Microbial Biotechnology : Fundamentals of Applied Microbiology, Second Edition*. New York : Cambridge University Press.
- Kusmiati, M., Herdiansyah, K. D., & Nuraeni, S. (2015). *Gambaran Kadar Glukosa Dan Kolesterol Total Pada Penderita Obesitas Sebelum Dan Sesudah Mengkonsumsi Minuman Probiotik*. Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada, 14 (1): 48-51
- Kusmiati, & Malik, A. (2002). *Aktivitas Bakteriosin Dari Bakteri Leuconostoc mesenteroides Pbac1 Pada Berbagai Media*. Makara Kesehatan, 6(1), 1–7.
- Moon, S. -H, & Parulekar, S. J. (1993). *Some observations on protease production in continuous suspension cultures of Bacillus firmus*. Biotechnology and Bioengineering, 41(1), 43–54.
- Mozzi, F., Raya, R. R., Vignolo, G. M., & Love, J. C. (2010). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria–Novel Applications*. USA : Wiley Blackwell Publishing.
- Munifah, I. (2014). *Isolasi, seleksi dan identifikasi bakteri proteolitik serta produksi protease dari terasi Cirebon*.
- Nespolo, C. R., & Brandelli, A. (2010). *Production of bacteriocin-like substances by lactic acid bacteria isolated from regional ovine cheese*. Brazilian Journal of Microbiology, 41(4) : 1009-1018.
- Nuryady MM, Istiqomah T, Faizah R, U. S. M. Z. dan S. (2003). *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Asal Youghurt*. Jurnal UNEJ. (pp. 1(5): 1-11.).
- Romlah, S., Naully, P. G., & Nurasyiah, S. (2018). *Perbandingan Efektivitas Metode Isolasi DNA (Boiling Water dan CTAB) pada Bakteri Klebsiella pneumoniae*. Prosiding Pertemuan Ilmiah Nasional Penelitian & Pengabdian Masyarakat (PINLITAMAS 1) Dies Natalis Ke-16, 1(1), 627–633.
- Sihombing, M. C. H., Simbala, H. E. I., & Yudistira, A. (2018). *ISOLASI , IDENTIFIKASI SECARA MOLEKULER MENGGUNAKAN SIMBION ENDOFIT ALGA Padina sp .* Manado: PHARMACON Jurnal Ilmiah Farmasi, 7(2), 41–52.
- Suciati, P., Tjahjaningsih, W., Dewi Masithah, E., & Pramono, H. (2016). *Aktivitas Enzimatis Isolat Bakteri Asam Laktat dari Saluran Pencernaan Kepiting Bakau (Scylla spp.)*. Jurnal Ilmiah Perikanan Dan Kelautan, 8(2), 94–108.
- Triyanto, A. Isnansetyo, I.D. Prijambada, J. W. dan A. T. (2009). *Isolasi, Karakterisasi Dan Uji Infeksi Bakteri Proteolitik Dari Lumpur Kawasan Hutan Bakau*. Jurnal Perikanan (Journal of Fisheries Sciences), 11(1), 13–18.
- WHO, F. (2006). *Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. Rome.
- Winarno, F. G. (1993). *Pangan: Gizi, Teknologi dan Konsumen*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.