

ISOLASI BAKTERI ASAM LAKTAT DARI TEMPOYAK DENGAN VARIASI DAUN PEMBUNGKUS DAN UJI AKTIVITAS ENZIM PROTEASE

Epi Supri Wardi^{1*}, Diza Sartika¹, Vindy Sandi Yuantika¹, Bastian Nova²

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Perintis Indonesia, Sumatra Barat, Indonesia

²Departemen Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Kampus Limau Manis, Universitas Andalas, Sumatra Barat, Indonesia

* Corresponding author email: epi.supriwardi@gmail.com

ABSTRAK

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan mikroorganisme fermentatif penghasil asam laktat yang berpotensi menghasilkan enzim proteolitik. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi BAL dari tempoyak dengan variasi daun pembungkus (daun alas, daun jati, dan daun papaya) serta mengevaluasi aktivitas enzim protease dan identifikasi molekuler isolat BAL terpilih. Hasil isolasi diperoleh empat kandidat isolat BAL (TT7, TP8, TJ9, TT10) yang berasal dari perlakuan pembungkus daun berbeda. Berdasarkan uji fenotipik isolat TT7 tidak termasuk BAL, sehingga tiga isolat lainnya dilanjutkan untuk pengujian aktivitas enzim. Aktivitas protease hanya terdeteksi pada isolat TP8 dengan diameter zona bening 12.67 mm, sedangkan isolat TJ9 dan TT10 tidak menunjukkan aktivitas proteolitik. Perbedaan ini mengindikasikan adanya pengaruh variasi daun pembungkus terhadap seleksi BAL proteolitik selama fermentasi tempoyak. Isolat TP8 diidentifikasi secara molekuler melalui gen 16S rRNA dan menunjukkan kemiripan 97% dengan *Leuconostoc suionicum*. Hasil ini menunjukkan bahwa tempoyak dengan variasi daun pembungkus dapat menjadi sumber BAL dengan aktivitas enzim spesifik, khususnya protease.

Kata kunci: bakteri asam laktat, daun pembungkus, tempoyak, protease, 16S rRNA

PENDAHULUAN

Enzim telah banyak dimanfaatkan baik dalam industri pangan maupun non pangan (Malau & Sianturi, 2019). Enzim yang digunakan dalam industri umumnya berasal dari beragam mikroorganisme. Mikroorganisme memiliki kemampuan untuk memproduksi enzim dalam berbagai jumlah dan jenis yang berbeda, dengan waktu produksi yang lebih cepat dan dapat dikendalikan dengan mudah (Poernomo, A. T., 2003)

Enzim protease diketahui salah satu enzim penting yang telah digunakan secara luas dalam aplikasi berbagai bidang industri dan merupakan 65% dari total penjualan enzim di dunia (Chutmanop J et al., 2008). Enzim protease merupakan enzim yang berfungsi menghidrolisis ikatan peptida pada

protein menjadi oligopeptida dan asam amino (Kamelia R, 2005). Dalam industri farmasi, protease digunakan dalam proses deproteinasi, yang merupakan metode untuk menghilangkan protein dari suatu substansi. Deproteinasi secara biologis dilakukan dengan menggunakan enzim protease, yang memiliki kemampuan untuk menghidrolisis ikatan peptida dalam protein (Bisping, B., 2005). Proses deproteinasi ini misalnya digunakan dalam proses pembuatan kitosan. Kitosan merupakan bahan alami yang direkomendasikan sebagai pengawet makanan karena tidak beracun dan aman bagi kesehatan.

Enzim protease dapat diisolasi dari berbagai organisme seperti bakteri 44,78%, tanaman 43,85%, dan hewan 11,15%. Protease dari bakteri merupakan jumlah yang

paling banyak dibandingkan dengan sumber lain (Kurnia, 2010). Salah satu kelompok bakteri yang dapat menghasilkan enzim protease adalah Bakteri Asam Laktat (BAL), dimana BAL merupakan golongan bakteri yang dapat menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir fermentasi (Hutkins RW, 2006). BAL merupakan mikroorganisme yang dianggap aman jika ditambahkan ke dalam pangan karena tidak menghasilkan toksin atau disebut juga sebagai mikroorganisme yang *Generally Recognized As Safe* (GRAS). Ini berarti bahwa mikroorganisme tersebut dianggap tidak berisiko bagi kesehatan, bahkan beberapa jenis bakteri tersebut bermanfaat bagi kesehatan (Kusmiati & Malik, 2002). Menurut penelitian yang dilakukan oleh Yusmarini et al., (2012) mengenai isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat proteolitik dari susu kedelai yang mengalami fermentasi spontan, didapati bahwa enzim protease dihasilkan oleh isolat bakteri asam laktat dari proses fermentasi susu kedelai.

Tempoyak sebagai salah satu makanan fermentasi merupakan makanan hasil olahan buah durian dengan hasil akhir berupa bubur daging buah durian dengan rasa asam (Yuliana, N., Muhadi, Zuidar, 2005). Yuliani (2005) menjelaskan bahwa tempoyak dibuat dari daging buah durian yang difermentasi dengan tambahan garam dalam wadah yang tertutup. Fermentasi umumnya berlangsung selama 7 hari, di mana daging buah durian berubah dari tekstur padat menjadi semi-padat dengan aroma asam yang khas. Proses fermentasi tempoyak dipicu oleh aktivitas BAL. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Aisyah et al., (2014) yang mengisolasi dan mengkarakterisasi BAL dari pangan fermentasi tempoyak diperoleh hasil tujuh isolat bakteri yang mempunyai kemiripan dengan bakteri asam laktat.

Pada Penelitian lainnya yang dilakukan yang melakukan fermentasi tempoyak dengan variasi penambahan daun pisang, cabe 3 %, garam 3 %, dan tanpa

dibaluti daun diperoleh hasil bawah variasi pada saat fermentasi tempoyak didapatkan jumlah koloni dan jenis bakteri yang berbeda dimana menurut penelitian (Magdalena et al., 2021). Hal ini mengindikasikan bahwa lingkungan mikro yang terbentuk selama fermentasi terutama yang dipengaruhi oleh sifat fisik dan kimia daun pembungkus berperan dalam seleksi mikroba dominan. Fenomena serupa juga ditemukan pada berbagai fermentasi pangan tradisional lainnya. Pada fermentasi tempe, penggunaan daun jati sebagai pembungkus diketahui tidak hanya berfungsi sebagai pelindung fisik, tetapi juga berkontribusi terhadap dinamika mikroba melalui senyawa fenolik dan sifat antimikroba alaminya, yang pada akhirnya memengaruhi dominansi BAL tertentu seperti *Weissella* spp. Selain itu, beberapa studi pada fermentasi makanan berbasis nabati lain menunjukkan bahwa perbedaan jenis daun pembungkus (misalnya daun pisang, daun jati, dan daun kelor) dapat menyebabkan variasi komunitas BAL, baik dari segi jumlah maupun diversitas spesies yang terdeteksi.

Perbedaan ini dikaitkan dengan variasi kelembaban, aerasi, serta kandungan metabolit sekunder pada masing-masing daun yang dapat bertindak sebagai faktor seleksi mikroba selama proses fermentasi. Seiring dengan perkembangan teknologi identifikasi mikroorganisme, karakterisasi BAL tidak lagi hanya bergantung pada pendekatan fenotipik, tetapi telah banyak beralih ke metode molekuler berbasis gen 16S rRNA. Pendekatan ini memungkinkan identifikasi yang lebih akurat hingga tingkat genus bahkan spesies, sehingga variasi BAL akibat perbedaan bahan pembungkus dapat dikaji secara lebih komprehensif dan reliabel dalam berbagai sistem fermentasi tradisional.

Pada penelitian ini akan dilakukan isolasi BAL dari tempoyak dengan memvariasikan daun pembungkus pada proses pembuatan tempoyak tersebut: daun pepaya, daun talas dan daun jati, serta diuji aktivitas

enzim protease yang dihasilkan oleh BAL tersebut. Identifikasi BAL yang memiliki aktivitas enzim protease tertinggi dilakukan secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA.

METODE PENELITIAN

Pembuatan Tempoyak dan Isolasi BAL

Buah durian yang telah matang dibelah dan dipisahkan daging durian dengan bijinya setelah itu daging durian ditimbang seberat 300 gram dan dibagi menjadi 3 bagian dengan masing-masing 100 gram, daging durian yang sudah dipisahkan 3 bagian masing-masing diberikan perlakuan: ditutup daun talas, daun jati, dan daun papaya. Setelah itu difermentasi dengan memasukkan kedalam toples yang tertutup rapat. Selanjutnya toples dibiarkan pada suhu ruang selama tujuh hari, setelah tujuh hari toples dibuka dan BAL siap untuk diisolasi. Proses Isolasi BAL diawali dengan mengambil sebanyak 5 gr tempoyak, dihomogenkan dengan 45 mL NaCl 0,9% dan ditanam kedalam media *DeMan Rogosa and Sharp* (MRS) agar pada cawan petri. Cawan petri dibungkus dengan koran dan diikat dengan tali jagung. Petri yang berisi kultur lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.

Pemurnian Isolat BAL

Bakteri yang tumbuh pada proses isolasi dipilih beberapa koloni berdasarkan bentuk koloni yang berbeda, kemudian diinokulasikan kembali pada media MRS agar pada cawan petri yang berbeda untuk setiap koloninya, diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 48 jam yang dan diulangi proses inokulasi kembalinya sebanyak 2 kali sampai didapatkan pada masing-masing cawan petri bakteri dengan bentuk koloni yang seragam.

Identifikasi Bakteri Asam Laktat

Pewarnaan Gram (Bell et al., 2005)

Setetes aquades steril diteteskkan di atas kaca objek, kemudian ditambahkan satu ose

bakteri dan diratakan di permukaan kaca objek tersebut. Preparat ini kemudian difiksasi hingga terbentuk noda. Selanjutnya, noda tersebut diberi pewarna kristal violet (Gram A) dan dibiarkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Setelah itu, preparat ditetesi dengan larutan mordant atau lugol (Gram B) dan dibiarkan selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Pada tahap berikutnya, preparat ditetesi dengan alkohol-aseton (Gram C) sampai pewarna luntur dan tidak berwarna. Tahap terakhir dari pengecatan Gram ini adalah dengan meneteskan pewarna safranin (Gram D) selama 30 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat kemudian ditutup dengan kaca penutup (*deck glass*) dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa isolat bakteri asam laktat (BAL) berwarna ungu di bawah mikroskop.

Uji Motilitas (Arina Aisyah et al., 2014)

Isolat bakteri ditusukkan kedalam SIM menggunakan ose lancip, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Jika pertumbuhan bakteri menyebar maka bakteri tersebut bersifat motil dan jika pertumbuhan bakteri tidak menyebar, hanya berupa garis sepanjang tusukan saja maka bakteri tersebut bersifat non motil.

Uji Katalase (Bell et al., 2005)

Aquades steril di tetes kan diatas gelas objek kemudian ditambahkan 1 ose bakteri umur 48 jam dan diratakan pada permukaan atas gelas objek lalu ditetesi dengan H₂O₂, didiamkan selama 1 menit. Apabila timbul gelembung udara menunjukan katalase positif dan apabila tidak timbul gelembung udara menunjukan katalase

Pewarnaan Endospora (Bell et al., 2005)

Preparasi sampel dimulai dengan fiksasi kaca objek di atas api bunsen. Setelah itu, setetes NaCl diteteskkan di atas kaca objek, kemudian ditambahkan satu ose bakteri

berumur 48 jam dan diratakan di permukaan kaca objek tersebut. Preparat difiksasi kembali dengan melewatkannya di atas nyala api bunsen beberapa kali. Selanjutnya, preparat yang telah difiksasi digenangi dengan pewarna malakit hijau dan dipanaskan di atas api hingga timbul uap air selama ± 10 menit, dengan menjaga agar pewarna tidak sampai kering. Setelah itu, preparat dicuci dengan air destilasi mengalir, kemudian ditetesi dengan safranin. Setelah penetesan safranin, preparat dicuci kembali dengan air destilasi dan dikeringkan. Preparat yang telah kering diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x untuk mengidentifikasi keberadaan spora dalam sel (endospora). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa isolat bakteri asam laktat (BAL) tidak memiliki spora dalam sel.

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 berdasarkan prosedur Benson (2001). Kultur cair isolat yang diperoleh dari hasil isolasi diinokulasikan ke *paper disc* sebanyak 10 μ L. *Paper disc* yang telah diinokulasi kemudian ditempatkan pada media skim milk agar (1%), dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Inokulasi bakteri dilakukan dengan memasukkan *paper disc* ke dalam kultur cair isolat bakteri menggunakan pinset steril. Aktivitas proteolitik diamati dari terbentuknya zona jernih di sekitar *paper disc* setelah masa inkubasi selama 48 jam. Zona jernih ini menunjukkan kemampuan bakteri dalam menghidrolisis protein, yang menjadi indikator aktivitas proteolitik (Triyanto, 2009). Sebagai kontrol positif, digunakan enzim protease murni (Proteinase-K) dengan perlakuan yang sama.

Identifikasi BAL secara Molekuler

Isolasi DNA

Isolat bakteri asam laktat (BAL) diambil menggunakan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf yang telah berisi 400 μ L buffer GP1, kemudian dikocok hingga homogen. Sampel dalam tabung eppendorf dimasukkan ke dalam thermoblock pada suhu 60°C selama 15 menit. Setelah itu, tabung disentrifugasi. Selanjutnya, 100 μ L buffer GP2 ditambahkan ke dalam sampel dan tabung didinginkan dalam freezer selama 1 menit. Setelah itu, tabung disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 10.000 rpm. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung spin column dan ditambahkan 750 μ L buffer GP3. Sebagian supernatan dipindahkan ke dalam tabung koleksi (*collection tube*) bersama spin column, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. Sisa supernatan yang ada ditambahkan dengan buffer GP3 dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. Filtrat dibuang dan ditambahkan 400 μ L buffer W1 ke dalam tabung spin column, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. Setelah itu, filtrat dibuang dan dilakukan pencucian kedua dengan menambahkan 600 μ L wash buffer, lalu disentrifugasi pada kecepatan 15.000 rpm selama 1 menit. Sementara itu, elution buffer dipanaskan pada thermoblock pada suhu 60°C. Setelah proses sentrifugasi selesai, membran yang mengandung DNA dipindahkan ke dalam tabung eppendorf baru dan dikeringkan selama 2 menit. Kemudian, 100 μ L elution buffer yang telah dipanaskan ditambahkan ke dalam tabung collection tube dan spin column, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. (Sihombing et al., 2018).

Amplifikasi Gen 16S rRNA Isolat BAL, Elektroforesis, dan Sekuensing

Pada tahapan ini digunakan *Go Taq green mastermix* (Promega) untuk mengamplifikasi sekuen 16S rRNA. Untuk primernya digunakan pasangan primer forward 27F (5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3) dan 1492R (5'-

GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Mesin *polymerase chain reaction* (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. Hasil PCR kemudian divisualisasi dengan melakukan elektroforesis menggunakan agarose 0.8% yang dilarutkan dengan 50 ml TBE buffer dalam, dicampur dan dididihkan gel dengan *microwave* selama 1-2 menit, lalu dituangkan dalam cetakan *Casting tray* beserta sisirnya. Setelah itu dilakukan visualisasi dengan sinar UV pada UV-transiluminator. Hasil elektroforesis dideteksi 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>.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tempoyak memiliki kandungan protein 2,7 gram per 100 gram bahan. Protein diperlukan untuk pertumbuhan, perkembangan tubuh, perbaikan, pergantian sel-sel jaringan tubuh yang rusak, produksi enzim pencernaan serta enzim metabolisme (Winarno, 1993). Tempoyak siap dikonsumsi setelah fermentasi selama 7 hari. Setelah 7 hari tekstur berubah dari massa yang padat ke semisolid dengan aroma asam yang kuat. BAL dapat diisolasi setelah proses fermentasi tempoyak tersebut selesai.

Setelah BAL tumbuh, selanjutnya dilakukan pemurnian bakteri asam laktat untuk mendapatkan biakan murni pada bakteri. Hasil pemurnian diperoleh 4 isolat bakteri murni dimana masing-masing isolat diberi kode TT7, TP8, TJ9, dan TT10. Setelah itu selanjutnya dilakukan uji fenotipik terlebih dahulu dan kemudian dilakukan dengan uji identifikasi molekuler dimana menggunakan gen 16S rRNA untuk mengetahui jenis bakteri yang diperoleh (WHO, 2006). Hasil identifikasi morfologi makroskopis menunjukkan bahwa dari keempat bakteri asam laktat memiliki bentuk seperti bulat, permukaan cembung, warna putih dan berukuran yang berbeda-beda ada yang berukuran besar, kecil, halus dan sedang.

Tabel 1. Hasil Pengamatan Bakteri Berdasarkan Pewarnaan Gram

Kode Isolat	Perwarnaan Gram	Bentuk	Motilitas	Katalase
TT7	Positif	Basil	Non Motilitas	Katalase Positif
TP8	Positif	Cocus Basil	Non Motilitas	Katalase Negatif
TJ9	Positif	Basil	Non Motilitas	Katalase Negatif
TT10	Positif	Cocus Basil	Non Motilitas	Katalase Negatif

Berdasarkan hasil uji pewarnaan gram didapatkan hasil keempat isolat bakteri asam laktat adalah bakteri gram positif yang mempunyai ciri-ciri sama dengan koloni bakteri asam laktat yaitu berwarna ungu. Dimana Bakteri Gram positif mampu mempertahankan zat warna utama dalam perwarnaan gram yaitu Kristal violet sehingga tampak warna ungu saat pengamatan

dikarnakan dinding sel kelompok bakteri ini tersusun oleh sebagian besar peptidoglikan yang tebal dan mampu mengikat zat warna serta tidak merusak saat dicuci dengan alkohol dan jika dilihat dari struktur dan komposisi dinding sel, bakteri gram positif relatif lebih sederhana dibandingkan dengan bakteri gram negatif yang lebih kompleks (Imawati, 2015). Uji motilitas menunjukkan

hasil dari keempat isolat bakteri asam laktat adalah non motilitas karena tidak ada pergerakan bakteri seperti awan didalam media SIM (Tabel 1), hal ini sesuai dengan pernyataan dari Nuryady *et al.* (2013) menyatakan bahwa isolat bakteri asam laktat yang diisolasi mempunyai sifat non motil yang ditandai dengan tidak adanya pergerakan bakteri yang menyerupai rambatan-rambatan

akar disekitar daerah tusukan. Pengujian katalase menunjukkan hasil bahwa satu dari keempat isolat bakteri asam laktat tidak menunjukan ciri-ciri BAL, yaitu membentuk gelembung ketika ditambahkan H_2O_2 dimana hal ini menunjukkan bahwa satu isolat tersebut merupakan katalase positif sehingga pada pengujian selanjutnya satu isolat tersebut tidak dilanjutkan untuk pengujian lainnya.

Tabel 2. Hasil Pengamatan Uji Endospora

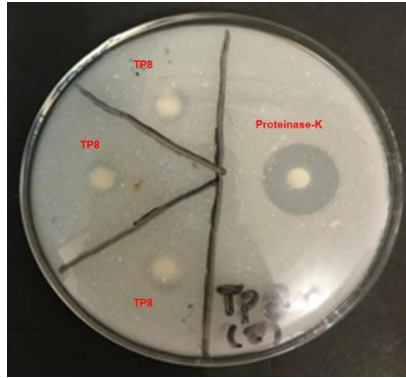
Kode Isolat	Endospora
TP 8 KHP (Koloni Halus Putih)	Tidak Berspora
TJ 9 KSP (Koloni Sedang Putih)	Tidak Berspora
TT 10 KHP (Koloni Halus Putih)	Tidak Berspora

Selanjutnya, hasil pengujian endospora menunjukan bahwa pada isolat TP8, TJ9, dan TT10 tidak membentuk spora ketika diamati dibawah mikroskop (Tabel 2), hal ini sesuai dengan pernyataan Axelsson (2004), bakteri yang tidak membentuk spora adalah BAL, sehingga ketika dilakukan pewarnaan endospora yang tampak hanya sel vegetatif yang menghasilkan warna merah muda pada akhir tahap pewarnaan. Uji aktivitas enzim

protease dilakukan pada 3 isolat tersebut dengan menggunakan kertas cakram yang sudah diletakkan pada media susu skim. Media susu skim adalah suatu media memiliki potensi menghasilkan protease yang ditandai dengan kemampuannya dalam menghasilkan zona bening pada media MRSA (Afifah, D.N., 2014).

Tabel 3. Hasil Pengujian Aktivitas Enzim Protease

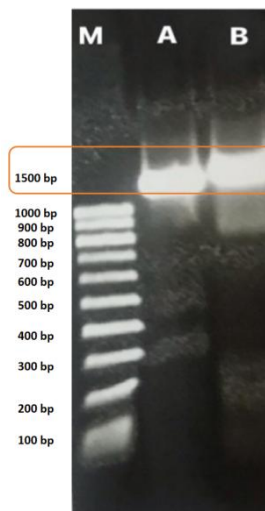
Kode Isolat	Percobaan 1	Percobaan 2	Percobaan 3	Rata-Rata
TP8	12 mm	11 mm	15 mm	12,67 mm
TJ9	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
TT10	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Kontrol+(Proteinase-K)	30 mm	28 mm	28 mm	28,67 mm



Gambar 1. Aktivitas enzim protease BAL isolat TP8 dan kontrol positif (Proteinase-K)

Pengujian aktivitas enzim protease menunjukkan bahwa BAL isolat TP8 memiliki aktivitas enzim protease (zona bening) disekitar kertas cakram (Gambar 1), dimana terbentuknya zona bening karna bakteri yang tumbuh menghasilkan enzim protease, sehingga mampu menguraikan protein pada

susu skim dalam medium tumbuh. Sedangkan dua isolat lainnya tidak menunjukkan adanya aktivitas enzim protease (Tabel 3). Isolat TP8 dilanjutkan untuk identifikasi molekuler dengan menggunakan gen 16S rRNA untuk mengetahui jenis bakteri tersebut.



Gambar 2. Hasil elektroforesis dari produk amplifikasi gen 16S rRNA isolat TP8 dengan ukuran pita DNA ± 1500 bp: M (DNA marker) 100 bp DNA ladder; B (isolat TP8)

Pada proses identifikasi molekuler mikroorganisme terdapat 4 tahap utama yaitu isolasi DNA, PCR, elektroforesis, dan sekuensing. ekstraksi DNA didapatkan dengan

merusak dinding sel sehingga DNA ini keluar dari dalam sel (Romlah, 2018). Dimana hasil dari elektroforesis dari isolate TP 8 KHP terlihat pada Gambar 2.

GCTTACGACAGTCGCATTCGACGCATGACTAGCGCTAGTGGTGAGGCGGGCGGTGCGTACTAAACCCAGCGA
 CTGAATCCGGAGCGGCTCGATGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAA
 TCCGAAGTGAAGCTACTTTAAGAGATTAGCTCACCCTCGCGGGCTGGCAACTCGTTGTATACGCCATTGTAGC
 ACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATCTGACGTCGTCGCCGCTTCTCCGTTTGTACCCGGC
 AGTCTCGCTAGAGTGCCCATCTGAATGCTGGCAACTAACATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAA
 CATCTCAGGACACGAGCTGACGACGACCATGCACCACCTGTCACCTTGTCTCCGAAGAGAACACTTCTATCTCT
 AAAAGCTTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCT
 TGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTAATCCACAGGCGGAACACTTAATGCGTT
 AGCTTCGGCACTAAGAGGCGGAGACCTCCTAACACCTAGTGTTTCATCGTTTACGGTGTGGACTACCAGGGTATC
 TAATCCTGTTTGTACCCACACTTTCGAGCCTCAACGTCAGTTGCAGTCCAGTAAGCCGCTTCGCCACTGGTG
 TTCTTCCATATATCTACGCATTCCACCGCTACACATGGAGTTCCACTTACCTCTACTGCACTCAAGTTAACCAGTT
 TCCAATGCCATTCCGGAGTTGAGCTCCGGGCTTTCACATCAGACTTAATAAACCGTCTGCGCTCGCTTTACGCC
 CAATAATCCGGATAACGCTCGGGACATACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTATTAGCCGTCCTTTCTGGT
 ATGGTACCGTCAAACATAAGATCATTTCTATTCTAGCTGTTCTTCCATACAACAGTGCTTTACGACCCGAAAGC
 CTTTCATCAANNACGCGCGTGTGCTCCATCAGGCTTTCGCCATTGTGGAAGATCCCTACTGCAGCCTCCCCGA
 AGAATTTGGGCCGGGTCTCAATCCCAATGGGGCCGATCA

Gambar 3. Hasil sekuensing dari isolat BAL TP8

Pada hasil sekuensing dari isolat TP8 didapatkan ukuran pita 1500 bp (Gambar 3), dimana menurut pernyataan Laut & Riau (2012) menyatakan hasil uji molekuler dengan amplifikasi DNA PCR universal isolat bakteri probiotik menghasilkan pita tunggal dengan ukuran sekitar 1500 bp. Hasil analisis BLAST dari isolat TP8 menunjukkan bahwa spesies isolat TP adalah *Leuconostoc mesenteroides* dengan tingkat kesamaan nukleotida 99 %

(Gambar 4). *Leuconostoc mesenteroides* merupakan bakteri asam laktat yang memiliki ciri-ciri berbentuk bulat, tersusun berpasangan seperti rantai, dan termasuk gram positif. Menurut Suciati *et al.*, (2019), BAL dapat menghasilkan enzim seperti protease, α -amilase, fitase, kitinase, lipase. Oleh karena itu *Leuconostoc mesenteroides* dapat menunjukkan adanya aktivitas Enzim protease.

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

DownloadSelect columnsShow100?

☒ select all

100 sequences selected

GenBank

Graphics

Distance tree of results

MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ Leuconostoc suionicum strain CECT 8484 whole genome shotgun sequence	Leuconostoc s...	1890	1890	96%	0.0	97.30%	5339	NZ_OMON01000011.1
☒ Leuconostoc mesenteroides strain SRM102733 chromosome complete genome	Leuconostoc...	1884	7538	96%	0.0	97.21%	1988249	NZ_CP028251.1
☒ Leuconostoc lithii strain MB7 contig_9 whole genome shotgun sequence	Leuconostoc lit...	1884	1884	96%	0.0	97.21%	5268	NZ_SDGY01000009.1
☒ Leuconostoc pseudomesenteroides strain FDAARGOS_1003 chromosome complete genome	Leuconostoc p...	1868	7472	96%	0.0	96.94%	2114657	NZ_CP065993.1
☒ Leuconostoc falkenbergense strain CIRM-BIA1261 NODE_44_length_5448_cov_4.014684_whol...	Leuconostoc f...	1862	1862	96%	0.0	96.85%	5542	NZ_RIVN01000037.1
☒ Leuconostoc mijuikimchii strain JCM 17445 contig11 whole genome shotgun sequence	Leuconostoc...	1818	1818	96%	0.0	96.13%	5383	NZ BPKY01000011.1
☒ Leuconostoc gasicomitatum LMG 18811 complete sequence	Leuconostoc g...	1807	7223	96%	0.0	95.95%	1954080	NC_014319.1

Gambar 4. Hasil analisis BLAST dari isolat BAL TP8

KESIMPULAN

Terdapat empat isolat bakteri yang berhasil diisolasi dari fermentasi tempoyak dengan variasi daun pembungkus, yaitu TT7 (daun talas), TP8 (daun pepaya), TJ9 (daun jati), dan TT10 (daun talas). Berdasarkan karakteristik morfologi dan biokimia yang meliputi pewarnaan Gram, bentuk sel, uji

katalase, serta uji endospora, tiga isolat menunjukkan karakteristik sebagai bakteri asam laktat (BAL), yaitu TP8, TJ9, dan TT10.

Dari ketiga isolat BAL tersebut, hanya isolat TP8 (daun pepaya) yang menunjukkan aktivitas enzim protease. Selanjutnya, hasil identifikasi molekuler berbasis gen 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat TP8 memiliki

tingkat kesamaan nukleotida sebesar 97,3% dengan *Leuconostoc suionicum*. Hasil ini mengindikasikan bahwa variasi daun pembungkus berpengaruh terhadap keberadaan dan karakteristik BAL yang dihasilkan selama fermentasi tempoyak, baik dari aspek distribusi isolat maupun potensi aktivitas enzimatisnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Afifah, D.N. (2014). *Protease Fibrinolitik Dari Mikroba Pangan Fermentasi Oncom Merah Dan Tempe Gembus*. Disertai. 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.
- Axelsson, L. (2004). *Lactic acid Bacteria: Classification and physiology*. In: Salminen, S., Wright, A.V., Ouwehand, A., editors. *Lactic Acid Bacteria*. Marcel Dekker, Inc: New York Baehaki
- Bell, C., P. Neaves, A. P. W. (2005). *Food Microbiology: Laboratory Practice*, Blackwell Publishing, USA.
- Benson (2001). *Microbiological Applications. Laboratory Manual in General Microbiology*. (pp. 72–175). New York: McGraw-Hill Science Company.
- Bisping, B., G. D. and G. H. (2005). *Aerobik Deproteinization and Decalcification of Shrimp Wastes for Chitin Extraction. Discussion Forum "Prospect of Chitin Production and Application In Indonesia"*. Held on.
- Chutmanop J., Chuichulcherm S., Chisti Y., & S. P (2008). *Protease Production by Aspergillus oryzae in solid-state Fermentation using Agroindustrial Substrates*.
- Hutkins RW. (2006). *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Iowa. 3–49.
- Imawati, R. (2015). *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit dari Rimpang Temulawak (curcuma xanthorizza) sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri Pseudomonas aeruginosa dan Staphylococcus epidermidis*. 1–9.
- Kamelia R, M.S. dan D.N. (2005). *Isolasi dan karakterisasi protease intraselular termotabil dari bakteri Bacillus stearothermophilus RP1*.
- Kurnia, D. R. D. (2010). *Studi Aktivitas Enzim Lipase dari Aspergillus niger sebagai biokatalis pada proses gliserolisis untuk menghasilkan monoasilgliserol (phdthesis)*.
- Kusmiati & Malik, A. (2002). *Aktivitas bakteriosin dari bakteri Leuconostoc mesenteroides Phac1 pada berbagai media*. *Makara Kesehatan* 6 (1).
- Laut, L. M., & Riau, U. (2012). *Laboratorium Mikrobiologi Laut, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau Diterima: 20 Februari 2012 Disetujui: 1 April 2012*. 1, 16–25.
- Magdalena, S., Yogiara, Y., & Yulandi, A. (2021). *Profil Bakteri Asam Laktat dan Evaluasi Sensori dari Tempe Bungkus Daun Jati yang Disuplementasi dengan Daun Kelor*. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 10(1), 208–215.
- Malau, N. D., & Sianturi, M. (2019). *Analisa interaksi hidrofobik terhadap kestabilan termal enzim xilanase Aspergillus niger: Edumatsains: Jurnal Pendidikan, Matematika Dan Sains*, 3(2), 215–227.
- 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, Ubaidillah S, Mahmudi Z dan Sutoyo. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Asal Yoghurt*. *Jurnal UNEJ*. 1(5): 1-11.
- Poernomo, A. T., D. P. (2003). *Uji aktifitas crude enzim proteolitik Bacillus subtilis FNCC 0059 hasil fermentasi curah*. 3, 103–107.

- Purwoko, T. (2007). *Fisiologi Mikroba*. Bumi Aksara, Jakarta.
- 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*. 7(2), 41–52.
- Suciati, P., Tjahjaningsih, W., Dewi Masithah, E., & Pramono, H. (2019). Aktivitas Enzimatis Isolat Bakteri Asam Laktat dari Saluran Pencernaan Kepiting Bakau (*Scylla spp.*) Sebagai Kandidat Probiotik Enzymatic of Isolate Lactic Acid Bacteria from the Digestive Tract of Mud Crab (*Scyllaspp.*) as a Candidate Probiotics]. *Jurnal Ilmiah Perikanan Dan Kelautan*, 8(2), 94.
- 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).
- WHO, F. (2006). *Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. Rome.
- Winarno, F. . (1993). *Pangan: Gizi, Teknologi dan Konsumen*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Yuliana, N., Muhadi, Zuidar, A. (2005). *Produksi Tempoyak Secara terkontrol Menggunakan *Pedlococcus acidilaticl* sebagai stater*. Laporan Penelitian RGTPSDP Batch 1 Universitas Lampung.
- Yuliani, N. (2005). *Komponen Asam Organik Tempoyak*. *Jurnal Teknologi Dan industri Pangan 1* (16). 90–95.
- Yusmarini, Y., Indrati, R., Utami, T., & Marsono, Y. (2012). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Proteolitik dari Susu Kedelai yang Terfermentasi Spontan. *Jurnal Natur Indonesia*, 12(1)