

SKRINING BAKTERI ASAM LAKTAT DAN KHAMIR POTENSIAL PROTEOLITIK EKSTRASELULER DAN MILK CLOTTING ACTIVITY DARI EKSTRAK DAN FRESH CHEESE NANAS (ANANAS COMOSUS (L.) MERR.)

SCREENING OF LACTIC ACID BACTERIA AND YEAST EXTRACELLULAR PROTEOLYTIC AND MILK CLOTTING ACTIVITY POTENTIAL FROM FRESH CHEESE AND PINEAPPLE EXTRACT (ANANAS COMOSUS (L.) MERR.)

Received : Sept 11th 2023

Accepted : Nov 02th 2023

Agni Annisa Putri¹

Mia Miranti Rustama²

Wendry Setiadi Putranto^{*3}

¹Departemen Biologi, Fakultas
Matematika dan Ilmu
Pengetahuan Alam, Universitas
Padjadjaran

²Departemen Teknologi dan
Hasil Peternakan, Fakultas
Peternakan, Universitas
Padjadjaran

*Korespondensi:
Wendry Setiadi Putranto

¹Program Studi Ilmu Peternakan
Fakultas Peternakan
Universitas Padjadjaran

Jalan Ir. Soekarno Km.21,
Jatinangor – Kabupaten
Sumedang,
Jawa Barat

e-mail:
wendry@unpad.ac.id

*Abstract. Fresh cheese is a dairy product produced from the coagulation process of milk using the rennin enzyme which does not require a ripening process. Extracellular proteolytic enzymes for cheese production can be produced from pineapple (Ananas comosus L. Merr) and microbes, such as Lactic Acid Bacteria (LAB) and yeast. This study aims to obtain Lactic Acid Bacteria (LAB) and yeast which have the potential for extracellular protease and Milk Clotting Activity (MCA) from fresh cheese and pineapple extract. The results showed that the total LAB from fresh cheese using pineapple was 5.6×10^5 CFU/g, from pineapple extract was 4.6×10^5 CFU/ml, and from pasteurized milk was 1.9×10^4 CFU/ml. The total yeast from fresh cheese using pineapple was 5.1×10^4 CFU/g, from pineapple extract was 4.2×10^4 CFU/ml and pasteurized milk was 4.0×10^3 CFU/ml. In this study found 8 LAB isolates from pineapple extract and fresh cheese had proteolytic activity with a proteolytic index value between 0.17 to 2.14 and had MCA abilities of 24 to 233 SU/ml. 5 yeast isolates from pineapple extract and fresh cheese that had proteolytic activity with a proteolytic index value between 1.14 to 2.14 and had MCA abilities of 1.7 to 2.1 SU/ml. LN-3 and YN-4 were the best isolates because they had a low proteolytic value with a high MCA value. BAL isolates from fresh cheese using pineapple belong to the genus *Leuconostoc* and *Lactobacillus*. Yeast isolates from fresh cheese using pineapple and Yeast from pineapple extract is belong to the genus *Pichia*. This study indicates that LAB and Yeast isolated from fresh cheese and pineapple extract cheese have extracellular proteolytic potential and Milk Clotting Activity (MCA).*

Keywords : *Extracellular proteolytic, Fresh cheese, Lactic acid bacteria, Milk Clotting Activity, Pineapple (Ananas Comosus (L) Merr), Yeast.*

Sitasi :

Putri, A. A., Rustama, M. M. & Putranto, W. S. (2023). Skrining Bakteri Asam Laktat Dan Khamir Potensial Proteolitik Ekstraseluler Dan Milk Clotting Activity Dari Ekstrak Dan Fresh Cheese Nanas (*Ananas comosus (L.) Merr.*). *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*, 4(2): 187-212

PENDAHULUAN

Keju merupakan produk olahan pangan yang dihasilkan dari proses koagulasi protein susu. Salah satu jenis keju yang dapat ditemukan di pasaran adalah *fresh cheese* atau keju segar. *Fresh cheese* merupakan jenis keju dengan tekstur lunak, serta tidak membutuhkan proses pematangan (Nugroho, *dkk.* 2018). Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian (2022) menyatakan konsumsi keju di Indonesia pada tahun 2022 sebesar 1,251 ons kapita/tahun, hasil tersebut meningkat dibandingkan tahun 2017 yang hanya 0,261 ons kapita/tahun. Saat ini produksi keju sulit ditingkatkan karena ketersediaan enzim penggumpal susu yaitu rennin hanya dapat memenuhi 20-30% permintaan koagulan industri keju (Alihanoglu, *dkk.* 2018)

Proses pembuatan keju melibatkan koagulasi susu secara enzimatis menggunakan rennin dan pengasaman susu. Penggumpalan terjadi karena rennin memotong ikatan *kappa*-kasein pada ikatan Phe₁₀₅ - Met₁₀₆ (Setiadarma, *dkk.* 2020). Penggunaan rennin pada keju masih diperdebatkan status kehalalannya menurut agama islam bergantung pada faktor penyembelihan hewan (Amen, *dkk.* 2020). Penggunaan rennin sebagai sumber protease dapat digantikan oleh bahan lain yang berasal dari hewan, mikroorganisme maupun tumbuhan (Susanti *dkk.* 2019). Beberapa tumbuhan seperti nanas, pepaya dan ficin diketahui mengandung enzim protease.

Nanas (*Ananas Comosus* (L.) Merr) mengandung bromelin yang dapat menggumpalkan keju, karena dapat menghidrolisis protein sehingga dapat digunakan sebagai alternatif rennin dalam pembuatan keju. Bromelin terdapat pada semua bagian nanas, dengan kandungan tertinggi pada buah nanas matang (Komansilan, *dkk.* 2019). Vergara-álvarez *dkk.* (2019) menyatakan ekstrak bromelin pada konsentrasi 5% memiliki potensi sebagai koagulan dalam produksi keju dengan kualitas terbaik. Selain itu, nanas juga menjadi tempat pertumbuhan BAL yang optimal karena mengandung nutrisi untuk perkembangannya, pH yang rendah dan protein yang tinggi (Yang, *dkk.* 2016).

Bakteri asam laktat (BAL) dan khamir diketahui memiliki aktivitas proteolitik ekstraseluler (Ahmad & Hassan, 2019; Fröhlich-Wyder, *dkk.* 2019). Beberapa enzim proteolitik ekstraseluler yang dihasilkan oleh BAL dan khamir memiliki kemampuan untuk melakukan aktivitas pembekuan susu atau *Milk Clotting Activity* (MCA) yang merupakan tahap terpenting dalam pembuatan keju. Kemampuan enzim dalam menghidrolisis kasein dapat dilihat dari kecepatan waktu penggumpalan (Guevara & Daleo, 2018). BAL yang biasa digunakan dalam proses pembuatan keju antara lain adalah *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* (Nugrahadi, *dkk.* 2020). Kadar air yang tinggi dalam *fresh cheese* dapat digunakan mikroorganisme tumbuh (Hamzah, *dkk.* 2022). Méndez-Romero *dkk.*

(2021) menyatakan bahwa pada fresh cheese ditemukan BAL lebih dengan genus yang paling banyak adalah *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, dan *Leuconostoc*. BAL juga dapat diperoleh dari buah nanas yaitu *Lactiplantibacillus plantarum*, *Furfurilactobacillus rossiae* dan *Lactobacillus acidophilus* Y1 (Barbosa, *dkk.* 2022; Phong, *dkk.* 2017; Riani, *dkk.* 2020). Cagno *dkk.* (2010) menyatakan bahwa khamir yang teridentifikasi pada buah nanas adalah *Pichia guilliermondii*. khamir yang ditemukan pada keju adalah *Debaryomyces hanseii* dan *Yarrowia lipolytica* (Bintsis, 2021).

Potensi proteolitik dari BAL dan khamir dapat diidentifikasi secara kualitatif pada media padat yang mengandung protein (Fitriana & Asri, 2021). Protease ekstraseluler yang dieksresikan isolat BAL dan khamir menghidrolisis substrat kasein (skim) menjadi potongan peptida yang lebih kecil sehingga terbentuk zona bening disekitar koloni pada media selektif. Skrining aktivitas proteolitik dilakukan menggunakan media selektif yaitu MRSA (BAL) dan MEA (khamir) yang ditambahkan skim susu 3% (Putranto, *dkk.* 2020). Jumlah BAL dan khamir dihitung menggunakan metode *Total Plate Count*. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan secara kualitatif melalui uji *Milk Clotting Activity*. Karakterisasi isolat potensial dilakukan secara morfologi dan biokimia. Enzim proteolitik dari mikroorganisme dinilai lebih menguntungkan karena mudah diproduksi dalam waktu singkat dan skala lebih besar, enzim lebih stabil,

serta tidak dihasilkan flavor pahit (Putranto, 2018; Soeka & Sulistiani, 2017)

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui keberadaan bakteri asam laktat dan khamir dalam ekstrak dan *fresh cheese nanas* yang memiliki potensi proteolitik dan *Milk Clotting Activity*. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat dijadikan acuan sebagai pengganti rennin dalam pengembangan produksi keju.

MATER DAN METODE PENELITIAN

1. Preparasi dan Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu kemudian dikeringkan. Alat dan bahan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15-20 menit.

2. Pembuatan Ekstrak Nanas

Pembuatan ekstrak nanas menggunakan buah nanas madu varietas *cayyene* asal subang yang matang dengan umur panen terhitung 18-24 bulan sejak penanaman. Nanas dibersihkan kemudian dipotong buahnya. Potongan daging buah nanas ditimbang sebanyak 200 g dan dihaluskan menggunakan blender. Ekstrak disaring dengan menggunakan saringan 60 mesh agar hasil ekstrak buah nanas terpisah dari ampasnya (Raisanti, *dkk.* 2022)

3. Pembuatan *Fresh Cheese* Nanas

Prosedur pembuatan *fresh cheese* mengacu pada metode Raisanti *dkk.* (2022) dengan modifikasi. Susu sapi

segar sebanyak 1 liter dipasteurisasi dengan suhu 70°C selama 30 detik, kemudian didinginkan hingga suhu mencapai suhu 50 °C. Ekstrak nanas ditambahkan kedalam susu yang sudah dipasteurisasi sebanyak 5% atau 50 mL (Vergara-álvarez, *dkk.* 2019). Susu dibiarkan selama 30 menit hingga terbentuk gumpalan *curd*. Gumpalan *curd* yang terbentuk kemudian dipotong dan disaring menggunakan kain saring untuk memisahkan dari *whey* selama 10 menit. *Curd* dilakukan pengepresan untuk mengurangi air yang terkandung selama 60 menit. Terakhir, penggaraman dilakukan dengan menambahkan NaCl 2% dari masa *curd* sehingga terbentuklah *fresh cheese*.

4. Isolasi dan Enumerasi Total BAL dan Khamir

Isolasi dan enumerasi Total BAL dan khamir diperoleh dari ekstrak dan *fresh cheese* nanas serta susu pasteurisasi menggunakan metode *total plate count* (TPC) pada media MRSA (BAL) dan media MEA (khamir) yang ditambahkan skim susu 3% (Putranto, *dkk.* 2020). Sampel ekstrak murni dan *fresh cheese* nanas serta susu diambil menggunakan mikropipet sebanyak 1 ml kemudian disuspensikan ke dalam tabung berisi 9 ml NaCl fisiologis sebagai pengenceran 10^{-1} . Pengenceran bertingkat dilakukan hingga pengenceran 10^{-5} . Penanaman sampel dilakukan dengan metode *spread plate*. Suspensi diambil dari pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-5} sebanyak 0,1 ml dan dimasukkan ke

dalam masing-masing cawan petri. Cawan petri berisi media MRSA diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dan media MEA diinkubasi pada suhu 25°C selama 48 jam. Koloni yang tumbuh diamati dan diberi kode untuk penamaan. Zona bening yang terbentuk disekitar koloni menandakan BAL dan khamir memiliki aktivitas proteolitik ekstraseluler. Jumlah koloni BAL dan khamir yang tumbuh diamati dan dihitung menggunakan menggunakan rumus menurut (Laili, *dkk.* 2022) :

$$CFU / mL = \text{Jumlah Koloni Percawan} \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}}$$

5. Pemurnian BAL dan Khamir

Pemurnian isolat BAL dari sampel ekstrak nanas, *fresh cheese* nanas, serta susu yang membentuk zona bening dilakukan dengan menggunakan metode metode gores (*streak plate*) pada media MRSA (BAL) dan MEA (khamir) yang ditambahkan susu skim 3%. Koloni diambil dengan menggunakan ose kemudian di streak pada media cawan petri berisi media. Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam untuk BAL dan pada suhu 25°C selama 48 jam untuk khamir.

6. Uji Aktivitas Proteolitik BAL dan Khamir

Pengujian aktivitas proteolitik ekstraseluer dari isolat BAL dan khamir terduga diuji dengan metode *block agar* mengacu pada Putranto *dkk.* (2020). Pertama, media A disiapkan yaitu isolat potensial yang dikultur secara merata (*swab*) pada media MRSA(BAL) dan MEA (khamir) + susu

skim 3%, selanjutnya isolat diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C untuk BAL dan 25°C untuk khamir. Media B disiapkan yaitu MRSA dan MEA + skim susu 3% dan dibuat lubang atau *plug*. Pada media A yang telah diinokulasikan isolat yang akan diuji dibuat lubang menggunakan belakang *finntip* (1 ml) steril, kemudian dipindahkan pada lubang di media B seperti memasang *block* selanjutnya dilakukan inkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C (BAL) dan pada suhu 25°C (khamir). Isolat yang mempunyai aktivitas proteolitik ekstraseluler akan membentuk zona bening dan zona penggumpalan pada media, diameter koloni, zona bening dan zona penggumpalan diukur. Sumardi *dkk.* (2018) menyatakan bahwa indeks proteolitik (IP) merupakan perbandingan diameter zona bening dengan diameter koloni dengan rumus sebagai berikut :

$$IP = \frac{\text{Diameter Zona Bening (mm)} - \text{Diameter Koloni (mm)}}{\text{Diameter Koloni (mm)}}$$

7. Uji Milk Clotting Activity (MCA) BAL dan Khamir

Isolat BAL dan khamir yang memiliki aktivitas proteolitik ekstraseluler dan zona penggumpalan (*clotting zone*) terbesar, selanjutnya dilakukan pengujian *Milk Clotting Activity* (MCA) (SU/mL) yang mengacu pada metode Putranto *dkk.* (2020). Isolat BAL dikultur pada media MRSA sebanyak 5 ml kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dan khamir dikultur pada media MEB sebanyak 5 ml dan diinkubasi

pada suhu 25°C selama 48 jam. Isolat dilakukan sentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 10.000 g dan suhu 4°C. Supernatan yang merupakan enzim kasar dipisahkan pada eppendorf steril dan dilakukan pengujian MCA.

Pengujian *Milk Clotting Activity* (MCA) dilakukan dengan membuat substrat berupa 10% susu skim yang direaksikan dalam 10 mM CaCl₂. Substrat tersebut diambil sebanyak 2,5 ml, kemudian diinkubasikan di *water-bath* selama 5 menit pada 50°C yang masing-masing ditambahkan 0,5 ml enzim sampel. Waktu dari penambahan enzim sampel sampai terjadinya koagulasi dicatat. Perhitungan MCA dinyatakan dalam SU (*Soxhlet Unit*) dihitung menggunakan rumus menurut Putranto *dkk.* (2019) sebagai berikut :

$$MCA (SU/mL) = \frac{2400 \times 2,5 \times D}{T \times 0,5}$$

Keterangan:

- SU = Jumlah enzim yang diperlukan untuk menggumpalkan 1 ml substrat selama 40 menit pada suhu 35°C
D = Faktor pengenceran enzim
t = Waktu koagulasi (detik)

8. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dan Khamir

Karakterisasi BAL dan Khamir dilakukan dengan pengamatan morfologi dan biokimia. Karakterisasi morfologi BAL meliputi pengamatan makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis dilakukan dengan melihat langsung morfologi isolat BAL yang tumbuh pada medium meliputi pemeriksaan

bentuk, elavasi, tekstur, tepi dan warna koloni bakteri (Nadia, *dkk.* 2020). Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan metode pewarnaan gram (Surbakti, 2019). Karakterisasi biokimia BAL meliputi uji katalase, uji motilitas, uji indol, uji MR-VP, uji TSIA, uji tipe fermentasi, uji konsentrasi garam 4% dan 6,5% dan uji pertumbuhan suhu yang berbeda dengan seri temperatur 10°C, 37°C, dan 45°C. (Amaliah, *dkk.* 2018; Ismail, *dkk.* 2018) Karakterisasi morfologi khamir meliputi pengamatan makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis dilakukan dengan pengamatan morfologis meliputi ciri karakteristik yang dijelaskan oleh Akbar *dkk.* (2019) yakni, pemeriksaan bentuk, elavasi, permukaan, tekstur, tepi dan warna koloni khamir. Pengamatan mikroskopis mengacu pada metode Dharma *dkk.* (2019) meliputi, bentuk sel, dan tipe *budding* sel dengan cara membuat apusan sel khamir pada perbesaran 1000x. Karakterisasi biokimia khamir meliputi uji kapsul, uji urease, uji pertumbuhan pada media cair, uji fermentasi gula (Linawati, *dkk.* 2021; Pratiwi *dkk.* 2020).

9. Analisis Data

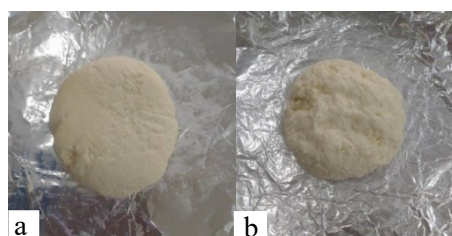
Data hasil penelitian dianalisis secara deskriptif berupa jumlah bakteri asam laktat dan *khamir*, besar aktivitas proteolitik, nilai *Milk Clotting Activity* (MCA), serta karakteristik morfologi dan biokimia. Data tersebut akan

ditampilkan dalam bentuk gambar dan tabel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. *Fresh Cheese* Nanas

Fresh cheese nanas dihasilkan dari campuran susu segar pasteurisasi sebanyak 1 Liter yang ditambahkan ekstrak nanas sebanyak 5% dari volume susu atau sebanyak 50 ml (Vergara-álvare, *dkk.* 2019). Hasil produksi *fresh cheese* nanas dengan cara ini dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil *Fresh Cheese* nanas

(a) Pengulangan 1

(b) Pengulangan 2

Berdasarkan Gambar 1. dapat dilihat bahwa *fresh cheese* nanas yang dihasilkan menunjukkan warna putih kekuningan. Warna *fresh cheese* ini dipengaruhi oleh bahan-bahan yang digunakan yaitu warna putih dari susu dan warna kuning dari ekstrak nanas. Warna putih pada susu disebabkan oleh adanya penyebaran butiran-butiran koloid lemak, kalsium kaseinat dan kalsium fosfat. Warna kuning pada ekstrak nanas disebabkan adanya pigmen karoten pada buah nanas (Yusrina, *dkk.* 2019). Berat *curd* ditimbang dari pengulangan pertama dan kedua adalah 100 g dan 115 g dengan persentase *curd* hasil pembuatan *fresh cheese* secara berurutan

adalah 10% dan 11,5%. Tekstur dari *fresh cheese* nanas yang dihasilkan yaitu lembut dan agak padat. Barokah *dkk.* (2018) menyatakan bahwa koagulan ekstrak nanas memiliki kadar air yang cukup tinggi sehingga mempengaruhi tekstur pada keju menjadi lembut. Rasa *fresh cheese* yang dihasilkan tidak pahit serta terdapat rasa khas keju. Vergara-álvarez *dkk.* (2019) menyatakan bahwa penggunaan koagulan 5% bromelin pada keju menghasilkan rasa yang tidak pahit

2. Jumlah Total Bakteri Asam Laktat (BAL) dan Khamir

Fresh cheese nanas dihasilkan dari campuran susu Hasil dari enumerasi jumlah total bakteri asam laktat pada media MRSA+ susu skim 3% setelah masa inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dapat dilihat pada Tabel 1.

Berdasarkan data pada Tabel 1. dapat diketahui bahwa hasil enumerasi total BAL menunjukkan hasil dengan jumlah tertinggi terdapat pada *fresh cheese* nanas yaitu sebesar $5,6 \times 10^5$ CFU/g, selanjutnya ekstrak nanas yaitu sebesar $4,6 \times 10^5$ CFU/ml, dan terendah pada susu pasteurisasi sebesar $1,9 \times 10^4$ CFU/ml. Jumlah total BAL tertinggi pada *fresh cheese* nanas diduga karena *fresh cheese* dibuat menggunakan susu dan ekstrak nanas

yang masing-masing memiliki BAL indigenus, serta ekstrak nanas mengandung gula yang dapat menstimulasi pertumbuhan serta meningkatkan aktivitas BAL (Wardani, *dkk.* 2017). Jumlah total BAL terendah terdapat pada susu pasteurisasi, hal ini terjadi karena adanya pemanasan dalam proses pembuatannya sehingga menyebabkan kematian pada sebagian BAL. Keberadaan bakteri dalam susu pasteurisasi diindikasikan memiliki stabilitas yang tinggi terhadap suhu tinggi karena sifat termofilik nya (Malik, *dkk.* 2019).

Berdasarkan data pada Tabel 1. hasil enumerasi jumlah total khamir menunjukkan hasil bahwa jumlah total khamir tertinggi terdapat pada *fresh cheese* nanas yaitu sebesar $5,1 \times 10^4$ CFU/ml, selanjutnya ekstrak nanas yaitu sebesar $4,2 \times 10^4$ CFU/ml, dan terendah pada susu pasteurisasi sebesar $4,0 \times 10^3$ CFU/ml.

Tingginya jumlah khamir pada *fresh cheese* dengan koagulan ekstrak nanas terjadi karena populasi khamir berasal dari ekstrak nanas dan susu. Roostita *dkk.*(2017) menyatakan bahwa ekstrak buah tidak hanya berperan sebagai koagulan alami, tetapi juga sebagai kontributor utama populasi

Tabel 1. Jumlah Total Bakteri Asam Laktat

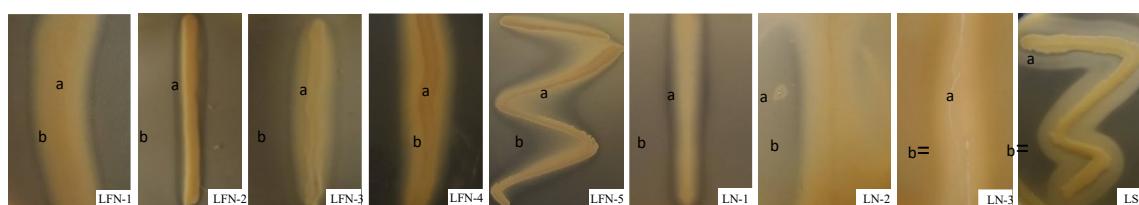
No	Sampel	Total BAL	Total Khamir
1	<i>Fresh Cheese</i> Nanas	$5,6 \times 10^5$ CFU/g	$5,1 \times 10^4$ CFU/g
2	Ekstrak Nanas	$4,6 \times 10^5$ CFU/ml	$4,2 \times 10^4$ CFU/ml
3	Susu pasteurisasi	$1,9 \times 10^4$ CFU/ml	$4,0 \times 10^3$ CFU/ml

Total khamir pada susu pasteurisasi lebih rendah dari pada ekstrak dan *fresh cheese* nanas. Hal ini karena dilakukan pemanasan dalam susu pasteurisasi sehingga menyebabkan kematian pada sebagian khamir. Khamir dapat hidup di lingkungan yang sangat dingin atau panas, namun sebagian besar hidup mesofilik yaitu suhu pertumbuhan optimal pada 20-25 °C (Segal-Kischinevsky, *dkk.* 2022).

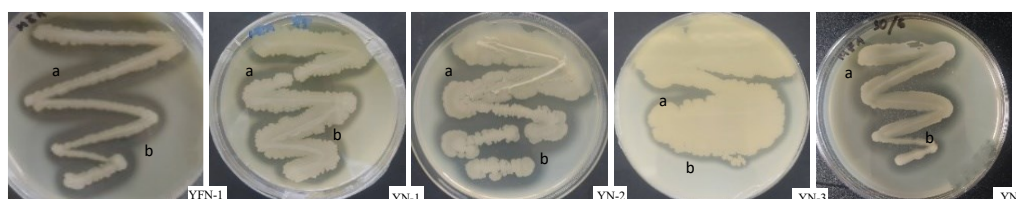
3. Skrining Kandidat Bakteri Asam Laktat dan Khamir Proteolitik

Skrining kandidat BAL dan khamir proteolitik dilakukan berdasarkan hasil isolasi BAL media MRSA + susu skim 3% dan khamir pada MEA + susu skim 3%. Hasil skiring BAL dan khamir dari *fresh cheese* nanas, ekstrak nanas dan susu pasteurisasi ditunjukkan pada Gambar 2. Dan Gambar 3.

Berdasarkan Gambar 2. Didapatkan 9 isolat BAL yang diduga memiliki aktivitas proteolitik karena mampu menghidrolisis kasein, ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening dan zona penggumpal di sekitar koloni pada media MRSA yang mengandung susu skim. Sampel *fresh cheese* nanas didapatkan sebanyak 5 isolat proteolitik diantaranya yaitu LFN-1, LFN-2, LFN-3, LFN-4 dan LFN-5. Sampel ekstrak nanas didapatkan 3 isolat proteolitik diantaranya yaitu LN-1, LN-2, LN-3. Sampel susu pasteurisasi didapatkan 1 isolat proteolitik yaitu LS-1. Hasil inokulasi menunjukkan bahwa isolat bakteri asam laktat seluruh sampel memiliki zona bening (*clear zone*) dan zona penggumpal (*clotting zone*) disekitar isolat. Putranto *dkk.* (2020) dan Ahmed *dkk.* (2018) menunjukkan bahwa terdapat isolat BAL yang memproduksi protease ekstraseluler ditandai dengan adanya zona bening dan zona penggumpal disekitar koloni dapat menggumpalkan susu



Gambar 2. Isolat Bakteri Asam Laktat Proteolitik (a) zona bening (b) zona penggumpal



Gambar 3. Isolat Khamir Proteolitik (a) zona bening(b) zona penggumpal

Berdasarkan Gambar 3. didapatkan 5 isolat khamir yang diduga memiliki aktivitas proteolitik karena mampu menghidrolisis kasein, ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening dan zona penggumpal di sekitar koloni. Isolat khamir dari *fresh cheese* nanas yang memiliki potensi aktivitas proteolitik yaitu YFN-1, isolat khamir dari ekstrak nanas yang yaitu YN-1, YN-2, YN-3, YN-4. Aktivitas proteolitik pada khamir ditunjukkan dengan adanya zona bening (*clear zone*) yang menunjukkan kemampuan menghidrolisis kasein. Putranto *dkk.* (2020) menyatakan bahwa aktivitas proteolitik ditandai pembentukan zona bening yang besar akan menghidrolisis kasein (skim) secara sempurna.

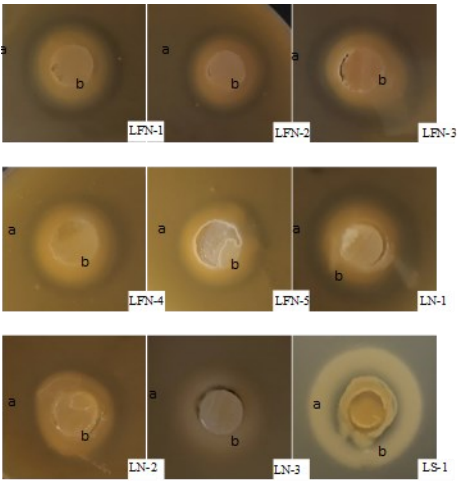
4. Hasil Uji Aktivitas Proteolitik BAL

Uji aktivitas proteolitik dilakukan pada isolat BAL menunjukkan zona bening dan zona penggumpal disekitar koloni pada media MRSA+ susu skim 3%. Hasil perhitungan uji aktivitas proteolitik BAL dapat dilihat pada Tabel 2. Berdasarkan data pada Tabel 2. menunjukkan bahwa terdapat 9 isolat terduga BAL yang memiliki aktivitas

proteolitik ditandai dengan adanya zona bening dan zona penggumpal (*clotting zone*) disekitar isolat bakteri yang ditanam yaitu isolat dengan kode LFN-1, LFN-2, LFN-3, LFN-4, LFN-5, LN-1, LN-2, dan LN-3. Hasil pengukuran diameter zona bening yang dihasilkan dari 9 isolat sebesar 18; 17; 20; 18; 15; 22; 17; 19 dan 14 mm, sedangkan zona penggumpal yang dihasilkan dari 9 isolat yaitu sebesar 17;16;17;17;14;17;15;18; dan 22 mm. Adapun indeks proteolitik (IP) dari 9 isolat tersebut berturut-turut yaitu dengan nilai 1,57; 1,43; 1,86; 1,57; 1,14; 2,14; 1,43; 1,71 dan 0,17. Hasil uji aktivitas proteolitik menunjukkan bahwa IP tertinggi didapat oleh isolat LN-1 dengan nilai sebesar 2,14, sedangkan IP terendah didapat oleh isolat LS-1 nilai sebesar 0,17. Zona bening tertinggi yaitu oleh isolat LN-1 dengan nilai 22 mm, sedangkan zona bening terendah didapat oleh isolat LS-1 dengan nilai 14 mm. Zona penggumpal tertinggi yaitu isolat LS-1 dengan nilai 22 mm dan zona penggumpal terendah oleh LFN-5 dengan nilai 14 mm.

Tabel 2. Hasil Uji Aktivitas Proteolitik Bakteri Asam Laktat.

Kode BAL	LFN-1	LFN-2	LFN-3	LFN-4	LFN-5	LN-1	LN-2	LN-3	LS-1
Diameter koloni (mm)	7	7	7	7	7	7	7	7	12
Diameter zona bening (mm)	18	17	20	18	15	22	17	19	14
Diameter zona penggumpal (mm)	17	16	17	17	14	17	15	18	22
Indeks Proteolitik	1,57	1,43	1,86	1,57	1,14	2,14	1,43	1,71	0,17



Gambar 4. Hasil Uji Proteolitik BAL
a) zona bening
b) zona penggumpal

Uji aktivitas proteolitik secara kualitatif merupakan gambaran kemampuan isolat bakteri proteolitik dalam menghidrolisis protein dengan membandingkan antara diameter zona bening disekitar koloni dengan diameter koloni bakteri. Metode *block agar* dapat memberikan gambaran awal mengenai potensi isolat BAL dalam memproduksi *Milk Clotting Enzyme*. Koloni BAL menunjukkan diameter

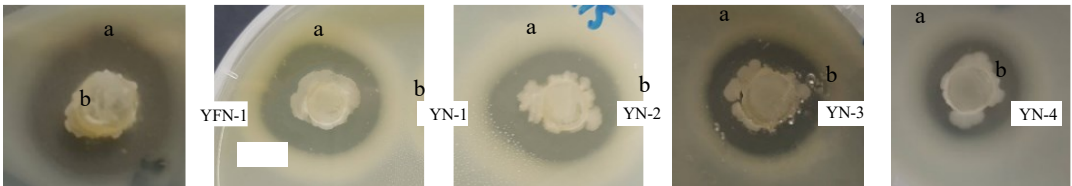
clotting zone yang besar memberikan indikasi bahwa isolat tersebut menghasilkan aktivitas penggumpal susu yang tinggi (Putranto, *dkk.* 2020). Semakin tinggi indeks yang terbentuk maka semakin tinggi pula kemampuan isolat tersebut untuk menghasilkan aktivitas enzim protease pada substrat yang terkandung dalam media pertumbuhannya (Pradana *dkk.* 2023). Isolat BAL GP1 asal *Ileum Gallus gallus* memiliki nilai IP sebesar 1,5. *Lactobacillus casei* 2,12 memiliki nilai *clotting zone* sebesar 15 mm (Putranto, *dkk.* 2019).

5. Hasil Uji Aktivitas Proteolitik Khamir

Uji aktivitas proteolitik dilakukan pada isolat khamir yang menunjukkan zona bening dan zona penggumpal disekitar koloni pada media MEA+ susu skim 3%. Hasil perhitungan uji aktivitas proteolitik pada khamir dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Uji Aktivitas Proteolitik Isolat Khamir

Kode Khamir	YFN-1	YN-1	YN-2	YN-3	YN-4
Diameter koloni (mm)	7	8	9	8	7
Diameter zona bening (mm)	22	22	22	21	15
Diameter zona penggumpal (mm)	24	25	28	26	23
Indeks Proteolitik	2,14	1,75	1,44	1,63	1,14



Gambar 4. Hasil Uji Proteolitik Khamir a) zona bening b) zona penggumpal

Berdasarkan data pada Tabel 3. menunjukkan bahwa terdapat enam isolat *khamir* yang memiliki aktivitas proteolitik ditandai dengan adanya zona bening dan zona penggumpal disekitar isolat *khamir* yang ditanam yaitu isolat dengan kode YFN-1, YN-1, YN-2, YN-3, YN-4. Secara berturut-turut diameter zona bening yang dihasilkan dari 5 isolat yaitu sebesar 22, 22, 22, 21 dan 15 mm, sedangkan zona penggumpal yang dihasilkan dari 5 isolat secara berturut-turut yaitu sebesar 24, 25, 28, 26 dan 23 mm. Adapun indeks proteolitik (IP) dari 5 isolat yaitu dengan nilai 2,14; 1,75; 1,44; 1,63; dan 1,14. Hasil uji aktivitas proteolitik menunjukkan bahwa IP tertinggi yaitu isolat YFN-1 dengan nilai 2,14, sedangkan IP terendah oleh isolat YN-4 yaitu sebesar 1,14.

Karakteristik proteolitik yang didapat pada isolat khamir memiliki zona bening (*clear zone*) yang besar disekitar koloni kemudian terdapat zona penggumpal (*clotting zone/ precipitation zone*). Putranto *dkk.* (2020) menyatakan aktivitas proteolitik yang tinggi akan menghidrolisis kasein (skim) secara sempurna sehingga tidak diperoleh gumpalan kasein (*curd*) atau *clotting zone*. Namun, pada penelitian

ini diketahui bahwa khamir memiliki zona penggumpal setelah zona bening terbentuk sehingga mengindikasikan bahwa penggumpalan susu atau protein terjadi setelah hidrolisis kasein. Carvalho *dkk.* (2021) menyatakan khamir *Naganishia diffluens* memiliki nilai indeks proteolitik sebesar 3,50.

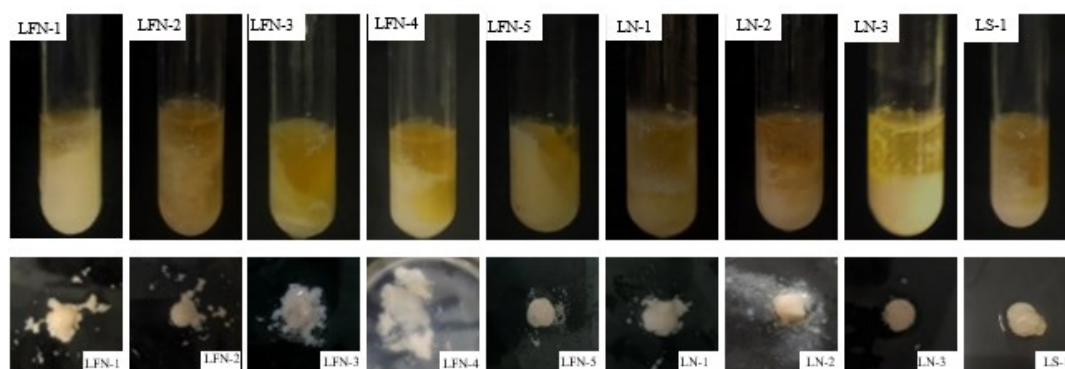
6. Hasil Uji *Milk Clotting Activity* (MCA) BAL

Uji *Milk Clotting Activity* (MCA) dilakukan pada BAL yang memiliki aktivitas proteolitik diinkubasi pada media MRSB pada suhu 37 °C selama 24 jam. Uji MCA diinkubasi pada suhu 50 °C pada *waterbath* dan dilakukan pencatatan waktu terbentuknya *curd*. Hasil pengujian MCA dari ekstrak kasar protease BAL dapat dilihat pada Tabel 4.

Berdasarkan data hasil pada Tabel 4. menunjukkan bahwa isolat bakteri LFN-1, LFN-2, LFN-3, LFN-4, LFN-4, LFN-5, LN-1, LN-2, LN-3 dan LS-1 memiliki aktivitas penggumpalan susu berturut-turut yaitu 161, 159, 168, 217, 24, 178, 191, 233, dan 232 SU/ml. Isolat LN-3 memiliki aktivitas penggumpalan tertinggi dengan nilai 233 SU/ml.

Tabel 4. Hasil Pengujian MCA dari Ekstrak Kasar Protease BAL

Kode Isolat		LFN-1	LFN-2	LFN-3	LFN-4	LFN-5	LN-1	LN-2	LN-3	LS-1
Waktu (s)	Ulangan 1	98	70	75	50	600	60	60	60	56
	Ulangan 2	60	82	68	62	433	77	66	45	48
MCA (SU/mL)		161	159	168	217	24	178	191	233	232



Gambar 5. Hasil Pengujian MCA dan *curd* yang dihasilkan Ekstrak Kasar Protease BAL

Isolat menunjukkan *Milk Clotting Activity* pada suhu 50 °C, hal ini sesuai dengan penelitian Artifon *dkk.* (2023) bahwa aktivitas protease memiliki stabilitas menggumpalkan susu dalam kisaran suhu 30-75°C. Semakin tinggi aktivitas penggumpalan maka waktu yang dibutuhkan enzim tersebut untuk menggumpalkan susu hingga *whey* dan *curd* terpisah akan semakin singkat (Guevara & Daleo, 2018). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *Lactobacillus paracasei* 2,12 memiliki potensi MCA dengan nilai sebesar 105,26 SU/mL, *L. plantarum* 1,13 memiliki nilai MCA sebesar 414,67 SU/ml (Putranto, *dkk.* 2020).

Berdasarkan Gambar 6. Menunjukkan bahwa karakteristik *curd* yang dihasilkan oleh koagulasi ekstrak kasar protease BAL yaitu berwarna putih kekuningan, lunak dan menunjukkan tingkat kekompakkan yang baik. Gumpalan susu yang dihasilkan dari percobaan memiliki warna putih kekuningan. Putih kekuningan dihasilkan karena medium yang digunakan ialah *MRS Broth* dan juga susu sebagai bahan baku (Rohmatussolihat, *dkk.*

2015). Artifon *dkk.* (2023) menyatakan bahwa koagulasi kasein dapat terjadi karena adanya enzim protease. Koagulasi susu terjadi karena adanya *Milk Clotting Enzymes* (MCE) yang merupakan bagian protease berfungsi untuk memutuskan ikatan peptida pada rantai Phe₁₀₅-Met₁₀₆ dari κ -casein, sehingga menghasilkan κ -casein dan makropeptida. Makropeptida yang dihasilkan larut dalam air, sedangkan kasein akan mengendap atau tergumpal. Putusnya ikatan Phe dan Met menyebabkan ketidakstabilan pada misel kasein sehingga menyebabkan fraksi kasein lainnya mengendap. Faktor utama yang menentukan nilai MCA adalah kecepatan penggumpalan susu skim. Semakin cepat terjadi penggumpalan maka semakin tinggi nilai MCA (Putranto *dkk.* 2019). Karakteristik MCE yang baik yaitu enzim yang memiliki MCA yang tinggi dengan aktivitas proteolitik yang rendah. Hal ini terjadi karena MCE tidak akan merusak protein susu ketika susu menggumpal, sehingga kualitas keju yang diperoleh optimal (Rohmatussolihat, *dkk.* 2015)

7. Hasil Uji *Milk Clotting Activity* (MCA) Khamir

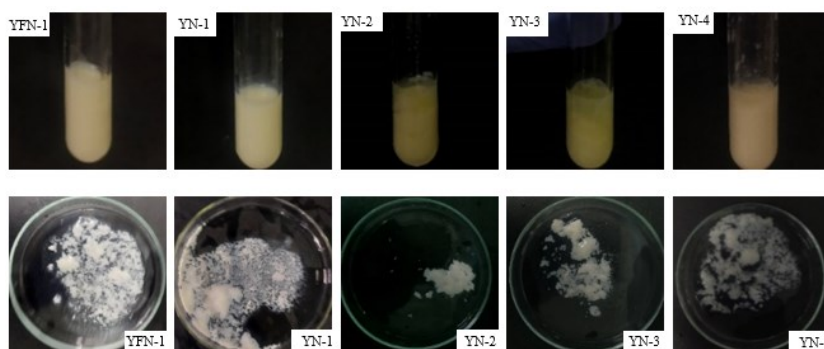
Uji *Milk Clotting Activity* (MCA) dilakukan pada Khamir yang memiliki aktivitas proteolitik diinkubasi pada media MEB suhu 25 °C selama 48 jam. Uji MCA diinkubasi pada suhu 50 °C pada *waterbath* dan dilakukan pencatatan waktu terbentuknya *curd*. Hasil pengujian *Milk Clotting Activity* (MCA) dari Khamir dapat dilihat pada Tabel 5. Berdasarkan data hasil pada Tabel 5. menunjukkan bahwa seluruh isolat khamir memiliki aktivitas penggumpalan susu yang rendah. Isolat khamir YFN-1, YN-1, YN-2, YN-3, dan YN-4 memiliki nilai MCA secara berturut turut yaitu 1,7; 1,9; 2,1; 1,8; dan 2,0 SU/ml. Seluruh isolat memiliki nilai MCA yang rendah karena melebihi waktu 40 menit, hal ini terjadi karena tinggi nya aktivitas hidrolisis protein

yang dimiliki oleh khamir sehingga membuat substrat susu yang ditambahkan ekstrak kasar protease menjadi terhidrolisis sempurna. Putranto *dkk.* (2020) menyatakan bahwa isolat *khamir* dengan aktivitas proteolitik yang tinggi akan menghidrolisis kasein pada skim secara sempurna, sehingga tidak ada gumpalan kasein. Namun, pada penelitian ini terjadi penggumpalan *curd* dengan memerlukan waktu lebih lama.

Karakteristik *curd* yang dihasilkan oleh koagulasi ekstrak kasar protease *khamir* yaitu *curd* berwarna putih, jumlah *whey* yang banyak serta menunjukkan tingkat kekompakan *curd* yang rendah (Gambar 7). Luo *dkk.* (2016) menyatakan *Pichia pastoris* dapat menjadi sumber alternatif produksi rennin karena memiliki nilai MCA 14,55 SU/ml.

Tabel 5. Hasil Pengujian MCA pada Ekstrak Kasar Protease Khamir

Kode Isolat		YFN-1	YN-1	YN-2	YN-3	YN-4
Waktu (s)	Ulangan 1	6600	6000	6000	6900	6000
	Ulangan 2	7200	6900	5400	6300	5760
MCA (SU/mL)		1,7	1,9	2,1	1,8	2,0



Gambar 6. Hasil Pengujian MCA dan *curd* yang dihasilkan Ekstrak Kasar Protease Khamir

Sebagian besar enzim proteolitik dapat menggumpalkan susu, namun dalam beberapa kasus tidak ada keju yang terbentuk secara stabil, karena koagulum dicerna lebih lanjut oleh proteolitik lanjutan (Ahmed, *dkk.* 2018). Abebe & Emire (2020) menyatakan karakteristik *Milk Clotting Enzyme* (MCE) yang baik adalah ditandai dengan aktivitas kaseinolitik yang tinggi dan aktivitas proteolitik rendah agar susu tidak mengalami penguraian (*dissolution*) yang berlebihan, karena sifat proteolitik sangat mempengaruhi sifat sensorik keju.

8. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat

Karakterisasi isolat Bakteri Asam Laktat dilakukan pengamatan morfologi secara makroskopis dan mikroskopis serta uji biokimia. Hasil karakteristik morfologi dan biokimia dari 9 isolat bakteri proteolitik yang

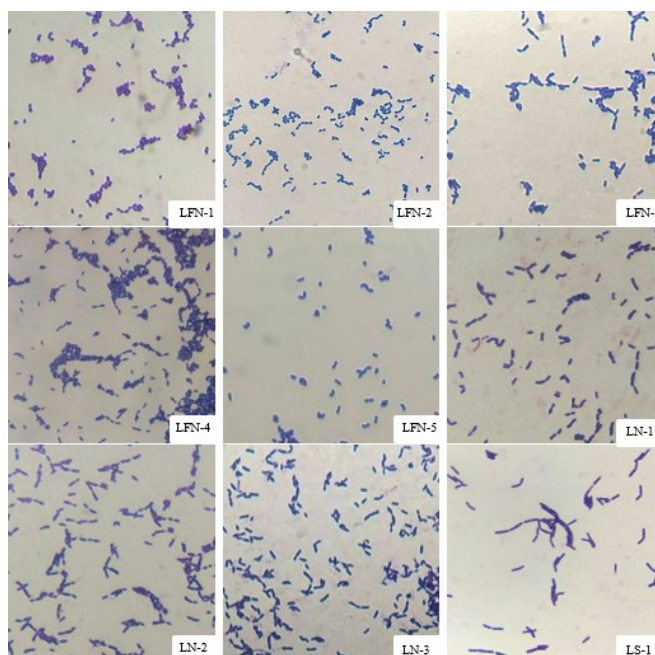
diisolasi dari *fresh cheese* nanas, ekstrak nanas dan susu ditunjukkan pada Gambar 8. serta Tabel 6. Dan Tabel 7.

Klasifikasi isolat BAL ke dalam genus didasarkan pada sifat morfologi koloni, morfologi sel dan sifat biokimia yang mengacu pada literatur dan buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition* (1994). Berdasarkan hasil karakterisasi menunjukkan dari 9 isolat yang telah dikarakterisasi terdapat 5 isolat asal *fresh cheese* dan 3 isolat asal ekstrak nanas menunjukkan karakteristik BAL, sedangkan 1 isolat dari susu menunjukkan karakteristik bukan kelompok BAL. Kelompok bakteri yang telah dikarakterisasi diperoleh merupakan BAL dengan dugaan genus *Lactobacillus* dan *Leuconostoc*.

Tabel 6. Karakterisasi Morfologi Isolat BAL

Kode Isolat	LFN-1	LFN-2	LFN-3	LFN-4	LFN-5	LN-1	LN-2	LN-3	LS-1
Bentuk koloni	<i>Circular</i>	<i>Circular</i>	<i>Circular</i>	<i>Circular</i>	<i>Circular</i>	<i>Circular</i>	<i>Pinpoint</i>	<i>Circular</i>	<i>Circular</i>
Elavasi	<i>Convex</i>	<i>Convex</i>	<i>Flat</i>	<i>Flat</i>	<i>Convex</i>	<i>Flat</i>	<i>Flat</i>	<i>Flat</i>	<i>Convex</i>
Tekstur	<i>Smooth</i>	<i>Smooth</i>	<i>Smooth</i>	<i>Smooth</i>	<i>Smooth</i>	<i>Smooth</i>	<i>Smooth</i>	<i>Smooth</i>	<i>Dry</i>
Warna	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Krem	Putih	Putih keabuan
Tepian	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>
Pewarnaan gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bentuk sel	Kokus	Kokus	Basil	Basil	Kokus	Basil	Basil	Basil	Basil

Keterangan: (+): positif



Gambar 7. Hasil Pewarnaan Gram Isolat Bakteri Asam Laktat

Tabel 7. Hasil Karakterisasi Biokimia Isolat Bakteri Asam Laktat

Kode Isolat		LFN-1	LFN-2	LFN-3	LFN-4	LFN-5	LN-1	LN-2	LN-3	LS-1
Katalase		-	-	-	-	-	-	-	-	+
Motilitas		-	-	-	-	-	-	-	-	+
Indol		-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Methyl Red</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Voges Proskauer</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSIA	B/S	k/k	k/k	k/k	k/k	k/k	k/k	k/k	k/k	k/k
	Gas	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentasi		Hetero	Hetero	Hetero	Hetero	Hetero	Hetero	Hetero	Hetero	Homo
Suhu	10 °C	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w	-	+ ^w	+ ^w
	37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	45°C	+	+	+	+	+	+	-	+	+
NaCl	4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6,5%	-	+	+	-	-	+	+	+	+

BAL dengan isolat LFN-3, LFN-4 , LN-1, LN-2, dan LN-3 termasuk ke dalam genus *Lactobacillus* karena memiliki karakteristik mikroskopis dan makroskopis yaitu bentuk bulat (*circular*) dan pinpoint, warna putih, bentuk tepian rata (*entire*), bentuk elavasi cembung (*convex*) dan datar (*flat*), tekstur *smooth*, gram positif,

bentuk basil atau *coccobacilli*, katalase negatif, non motil, indol negatif, MR positif, VP negatif, dapat memfermentasi glukosa dan laktosa, menghasilkan gas sehingga termasuk ke dalam tipe fermentasi heterofermentatif, beberapa dapat tumbuh pada suhu 10-45° C, tumbuh pada konsentrasi garam 4% dan 6,5%. Hasil

penelitian Ismail *dkk.* (2017) menunjukkan bahwa *Lactobacillus* dapat tumbuh pada konsentrasi NaCl 4% dan 6,5%. Hasil ini juga sesuai dengan penelitian Mulaw *dkk.* (2019) bahwa beberapa spesies *Lactobacillus* termasuk ke dalam kelompok bakteri heterofermentatif, katalase negatif, bentuk basil, beberapa dapat hidup pada suhu 15°C dan 45°C dan beberapa spesies *Lactobacillus* tidak dapat hidup pada suhu tersebut, beberapa spesies *Lactobacillus* dapat hidup pada kandungan NaCl 4,5 % dan 6,5%, dan terdapat *Lactobacillus* yang hanya mampu hidup pada konsentrasi NaCl 4%.

Isolat LFN-1, LFN-2, LFN-5 diduga termasuk ke dalam genus *Leuconostoc* karena memiliki karakteristik morfologi yaitu bentuk bulat (*circular*), warna putih, bentuk tepian rata (*entire*), bentuk cembung (*convex*), tekstur *smooth*, gram positif, bentuk kokus, katalase negatif, non motil, indol negatif, MR positif, VP negatif, dapat memfermentasi glukosa dan laktosa, menghasilkan gas sehingga termasuk ke dalam tipe fermentasi heterofermentatif. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hamdaoui *dkk.* (2023) menyatakan bahwa koloni *Leuconostoc* berwarna putih, termasuk bakteri gram positif, bentuk kokus berpasangan atau rantai pendek, bakteri heterofermentatif yang menghasilkan asam laktat, asam asetat, atau etanol, dan karbon dioksida serta *Leuconostoc* diketahui memiliki enzim proteolitik. Suhu optimum *Leuconostoc* yaitu pada 25-30 °C (Endo, *dkk.* 2022). Beberapa

spesies *Leuconostoc* dapat hidup pada 10°C dan suhu 45 °C (Ruppitsch, *dkk.* 2021).

Isolat bakteri yang berasal dari susu yaitu LS-1 bukan merupakan kelompok BAL dan diduga termasuk kedalam genus *Bacillus* karena memiliki karakteristik yaitu katalase negatif dan motil. Rokhim (2023) menyatakan bahwa *Bacillus* sp. merupakan bakteri gram positif berbentuk basil, motil dan katalase positif. Beberapa jenis spesies *Bacillus* bersifat mesofilik, juga terdapat bersifat termofilik. Hal ini sesuai dengan Malik *dkk.* (2019) menyatakan bahwa, sebagian besar bakteri bertahan dalam susu pasteurisasi dikenal sebagai bakteri termotoleran salah satunya yaitu genus *Bacillus*.

9. Karakterisasi Khamir

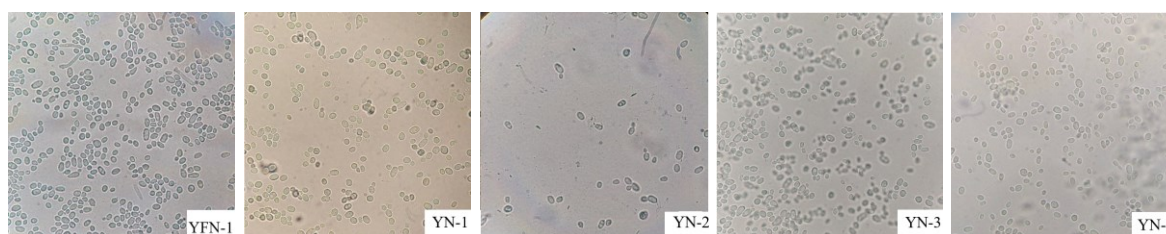
Karakterisasi isolat Khamir dilakukan pengamatan serta uji biokimia. Hasil karakteristik morfologi dan biokimia dari 5 isolat khamir proteolitik yang diisolasi dari fresh cheese nanas, ekstrak nanas dan susu ditunjukkan pada Gambar 9. serta Tabel 8. Dan Tabel 9.

Klasifikasi genus *khamir* dilakukan berdasarkan karakteristik morfologi makroskopis dan mikroskopis, reproduksi seksual serta ciri fisiologis dan biokimia berdasarkan literatur dan buku *The Khamir A Taxonomic Study* (2011). Isolat YFN-1, YN-1, YN-2, YN-3 dan YN 4 menunjukkan terdapat perbedaan pada karakter morfologi, namun dari seluruh isolat yang diuji termasuk kedalam satu genus yaitu *Pichia*.

Tabel 8. Hasil Karakterisasi Morfologi Khamir

Kode Isolat	YFN-1	YN-1	YN-2	YN-3	YN-4
Bentuk	<i>Circular</i>	<i>Irregular</i>	<i>Circular</i>	<i>Circular</i>	<i>Circular</i>
Elavasi	<i>Raised</i>	<i>Raised</i>	<i>Raised</i>	<i>Raised</i>	<i>Raised</i>
Tekstur	<i>Butyrous</i>	<i>Butyrous</i>	<i>Butyrous</i>	<i>Butyrous</i>	<i>Butyrous</i>
Permukaan	<i>Smooth</i>	<i>Smooth</i>	<i>Smooth</i>	<i>Smooth</i>	<i>Smooth</i>
Warna	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih
Tepian	<i>Undulate</i>	<i>Serrate</i>	<i>Undulate</i>	<i>Undulate</i>	<i>Entire</i>
Bentuk	<i>Bulat,</i> <i>Ovoid</i>	<i>Bulat,</i> <i>Ovoid</i>	<i>Bulat,</i> <i>Ovoid</i>	<i>Bulat,</i> <i>Ovoid</i>	<i>Bulat,</i> <i>Ovoid</i>
Budding	<i>Multilateral</i>	<i>Multilateral</i>	<i>Multilateral</i>	<i>Multilateral</i>	<i>Multilateral</i>
Jenis Hifa	Pseudohifa	-	-	-	-

Keterangan: (-) : Negatif

**Gambar 8.** Penampakan Sel Khamir di Bawah Mikroskop pada Perbesaran 1000x**Tabel 8.** Hasil Karakterisasi Biokimia Khamir

Kode Isolat	YFN-1	YN-1	YN-2	YN-3	YN-4
Pertumbuhan Media Cair	Tumbuh pelikel di atas dan endapan	Tumbuh pelikel di atas dan endapan	Tumbuh pelikel di atas dan endapan	Tumbuh pelikel di atas dan endapan	Tumbuh pelikel di atas dan endapan
Urease	+	+	+	+	+
Kapsul	-	-	-	-	-
Glukosa	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w
Galaktosa	-	-	-	-	-
Laktosa	-	-	-	-	-
Maltosa	-	-	-	-	-
Sukrosa	-	-	-	-	-
Genus	<i>Pichia</i>	<i>Pichia</i>	<i>Pichia</i>	<i>Pichia</i>	<i>Pichia</i>

Keterangan: (+): Positif; (-) : Negatif; (+^w) : *weakly positive*

Kurtzman *dkk.* (2011) menyatakan bahwa koloni genus *Pichia* memiliki tepi *entire*, *undulate* hingga *serrate*, elavasi datar (*flat*) hingga timbul (*raised*), tekstur krim (*butyrous*), dan memiliki warna putih. Sel *Pichia* berbentuk bulat, bulat persegi, bulat

telur (*ovoid*), atau memanjang pendek. Reproduksi aseksual dengan pertunasan multilateral dan beberapa spesies menunjukkan budding unipolar. Tumbuh di permukaan berupa pelikel dan endapan pada media MEB serta berpotensi menghasilkan etanol karena

mempunyai kemampuan untuk memfermentasi glukosa (Phale, 2018). Pratiwi *dkk.* (2020) menyatakan bahwa genus *Pichia* yang ditemukan mampu menghasilkan enzim urease. Pada penelitian Widiastutik & Alami (2014) menemukan genus *Pichia* dari dari Rhizosfer *Rhizophora mucronata* Wonorejo tidak memiliki kapsul. Pada isolat YF-1 terlihat adanya *pseudohifa*. Kurtzman *dkk.* (2011) menyatakan bahwa *pseudohifa* dan *true hyphae* mungkin dapat diproduksi oleh beberapa spesies. Genus *Pichia* mungkin atau tidak melakukan fermentasi gula.

Penelitian Cagno *dkk.* (2010) menunjukkan bahwa genus *Pichia* merupakan *khamir* yang teridentifikasi pada buah nanas. Lata *dkk.* (2022) menyatakan *Pichia* dapat menghasilkan protease ekstraseluler. Papademas & Bintis (2018) menyatakan genus *Pichia* ditemukan pada keju artisan atau keju tradisional.

KESIMPULAN

Jumlah Bakteri Asam Laktat (BAL) pada *fresh cheese* nanas yaitu sebesar $5,6 \times 10^5$ CFU/g, ekstrak nanas dengan nilai sebesar $4,6 \times 10^5$ CFU/ml, serta jumlah khamir pada *fresh cheese* nanas yaitu sebesar $5,1 \times 10^4$ CFU/g, ekstrak nanas dengan nilai sebesar $4,2 \times 10^4$ CFU/ml. Bakteri asam laktat yang diisolasi dari *fresh cheese* nanas diduga termasuk ke dalam genus *Leuconostoc* dan *Lactobacillus*, dan BAL asal ekstrak nanas diduga termasuk genus *Lactobacillus* serta khamir asal *fresh cheese* dan ekstrak nanas termasuk

genus *Pichia*. Isolat Bakteri Asam Laktat dan khamir yang didapat pada *fresh cheese* dan ekstrak nanas diketahui memiliki aktivitas proteolitik dengan karakteristik adanya zona bening (*clear zone*) dan zona penggumpal (*clotting zone*) dengan nilai indeks proteolitik BAL sebesar 0,17 hingga 2,14 dan khamir sebesar 1,14 hingga 2,14. Nilai *Milk Clotting Activity* (MCA) dari ekstrak kasar protease isolat BAL yaitu sebesar 24 hingga 233 SU/ml, dan ekstrak kasar protease khamir yaitu sebesar 1,7 hingga 2,1 SU/ml. Isolat LN-3 dan YN-4 merupakan isolat terbaik karena memiliki nilai proteolitik yang rendah dengan nilai MCA yang tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abebe, B., & Emire, S. (2020). Manufacture of fresh cheese using east African *Calotropis procera* leaves extract crude enzyme as milk coagulant. *Food Science and Nutrition*, 8 (9), 4831–4842. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1765>
- Ahmad, M., & Hassan, Z. (2019). Detection of Milk Clotting Enzyme Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Food. *Alexandria Science Exchange Journal*, 40, 415–418. <https://doi.org/10.21608/asejaiqjsae.2019.46830>

- Ahmed, S. A., Abdel-Naby, M. A., & Abdel-Fattah, A. F. (2018). Applicability of wool covalent bonded *Bacillus circulans* 25 cells for milk-clotting enzyme production by batch, repeated batch and continuous process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 35 (3), 847–856. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20180353s20170175>
- Akbar, G. P., Endang, K., & Wijanarka1, D. (2019). Isolasi dan karakterisasi secara morfologi dan biokimia khamir dari limbah kulit nanas madu (*Ananas comosus* L.) untuk produksi bioetanol. *Berkala Bioteknologi*, 2 (2), 1–11.
- Alihanoglu, S., Ektiren, D., Akbulut, Ç., Hasan, Ç., Karaaslan, A., & Karaaslan, M. (2018). Effect of *Oryctolagus cuniculus* (rabbit) rennet on the texture , rheology , and sensory properties of white cheese. *Food Science & Nutrition*, 6 (4), 1100–1108. <https://doi.org/10.1002/fsn3.649>
- Amaliah, Z. Z. N., Bahri, S., & Amelia, P. (2018). Limbah Cair Rendaman Kacang Kedelai. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 5 (1), 253–257.
- Amen, O., Jumiono, A., & Fulazzaky, M. A. (2020). Penjaminan Mutu dan Kehalalan Produk Olahan Susu. *Jurnal Pangan Halal*, 2 (1), 43–47. <https://doi.org/10.9734/ajob/2016/30954>
- Artifon, S. E. S., Sumny, E. H., Fabris, T., Jesus, B. A. P. de, Magalhães, M. de L. B., Silva, G. F. da, Dognini, J., Andrade, N. C., Moroni, L. S., & Kempka, A. P. (2023). Biosynthesis of the acid protease produced by *Lactocaseibacillus casei* LBC 237 and *Limosilactobacillus fermentum* LBF 433 and their potential application in the bovine milk clotting. *Food Bioscience*, 54 (102879). <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102879>
- Barbosa, J. P., Pires de Amorim Trindade, D., Maurício Furtado Martins, E., & Amaral Souza Tette, P. (2022). Lactic Acid Bacteria Isolated from Fruits: A Review on Methods for Evaluation of Probiotic Potential. *Journal of Food and Nutrition Research*, 10 (10), 711–726. <https://doi.org/10.12691/jfnr-10-10-9>

- Barokah, Y., Angkasa, D., & Melani, D. V. (2018). Evaluasi Sifat Fisika Kimia dan Nilai Gizi Keju Berbahan Dasar Kacang Tunggak dengan Bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* sebagai keju Nabati Rendah Lemak. *Jurnal Science and Technology*, 2 (3), 12–21.
<http://jurnal.unimus.ac.id>
- Bergey D H. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Bintsis, T. (2021). Yeasts in different types of cheese. *AIMS Microbiology*, 7 (4), 447–470.
<https://doi.org/10.3934/MICROB IOL.2021027>
- Carvalho, J. K., Panatta, A. A. S., Silveira, M. A. D., Tav, C., Johann, S., Rodrigues, M. L. F., & Martins, C. V. B. (2021). Yeasts isolated from a lotic continental environment in Brazil show potential to produce amylase, cellulase and protease. *Biotechnology Reports*, 30.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00630>
- Dharma, B., Mallisa, E., & Oktavianingsih, L. (2019). Khamir Penghasil Lipase dan Karakterisasi Parsial Morfologinya. *Jurnal Mikologi Indonesia*, 3(2), 84–93.
<https://doi.org/10.46638/jmi.v6i1.180>
- Di Cagno, R., Cardinali, G., Minervini, G., Antonielli, L., Rizzello, C. G., Ricciuti, P., & Gobbetti, M. (2010). Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. *Food Microbiology*, 27(3), 381–389.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.012>
- Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian. (2022). Statistik Peternakan dan Kesehatan Hewan 2021. *Issn 2964-1047*, 1, 1–276.
- Endo, A., Maeno, S., & Liu, S. Q. (2022). Lactic Acid Bacteria: Leuconostoc spp.☆. In P. L. H. McSweeney & J. P. McNamara (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Third Edition)* (Third Edit, pp. 226–232). AcademicPress.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00859-3>
- Fitriana, N., & Asri, M. T. (2021). Aktivitas Proteolitik pada Enzim Protease dari Bakteri Rhizosphere Tanaman Kedelai (*Glycine max* L.) di Trenggalek. *LenteraBio%: Berkala Ilmiah Biologi*, 11 (1), 144–152.
<https://doi.org/10.26740/lenterabio.v11n1.p144-152>

- Fröhlich-Wyder, M. T., Arias-Roth, E., & Jakob, E. (2019). Cheese yeasts. *Yeast*, 36 (3), 129–141.
<https://doi.org/10.1002/yea.3368>
- Guevara, M. G., & Daleo, G. R. (2018). Biotechnological applications of plant proteolytic enzymes. In *Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes*.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-97132-2>
- Hamdaoui, N., Rokni, Y., Asahraou, A., Mouncif, M., Mennane, Z., Omari, A., Sellam, A., Hammouti, B., & Meziane, M. (2023). Technological Aptitude and Sensitivity of Lactic Acid Bacteria *Leuconostoc* Isolated from Raw Milk of Cows: From Step-by-Step Experimental Procedure to the Results. *Indonesian Journal of Science and Technology*, 8(2), 157–170.
<https://doi.org/10.17509/ijost.v8i2.53730>
- Hamza, T. A. (2017). Bacterial Protease Enzyme: Safe and Good Alternative for Industrial and Commercial Use Sugar Cane Production Via Tissue Culture Methods View project Bacterial Protease Enzyme: Safe and Good Alternative for Industrial and Commercial Use. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science*, 3(1), 1–10.
- Hamzah, B., Wijaya, A., & Widowati, T. W. (2022). *Teknologi Fermentasi pada Industri Pengolahan Keju*. UPT. Universitas Sriwijaya.
- Ismail, Y. S., Yulvizar, C., & Mazhitov, B. (2018). Characterization of lactic acid bacteria from local cows milk kefir. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 130(1).
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/130/1/012019>
- Ismail, Y. S., Yulvizar, C., & Putriani. (2017). Isolation, Characterization And Antimicrobial Activity Of Lactic Acid Bacteria From The Fermented Cacao See (*Theobroma cacao* L.). *Bioleuser*, 1 (2), 45–53.
- Komansilan, S., Rosyidi, D., Radiati, L. E., & Purwadi, D. (2019). Pengaruh Variasi PH dengan Penambahan Enzim Bromelin Alami (*Ananas comucus*) terhadap Sifat Organoleptik Keju Cottage. *Jurnal Sains Peternakan*, 7(1), 54–61.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.

- Laili, N. H., Abida, I. W., & Junaedi, A. S. (2022). Nilai Total Plate Count (TPC) Dan Jumlah Jenis Bakteri Air Limbah Cucian Garam (Bittern) Dari Tambak Garam Desa Banyuajuh Kecamatan Kamal Kabupaten Bangkalan. *Juvenil: Jurnal Ilmiah Kelautan Dan Perikanan*, 3 (1), 26–31.
<https://doi.org/10.21107/juvenil.v3i1.15075>
- Lata, P., Kumari, R., Sharma, K. B., Rangra, S., & Savitri. (2022). In vitro evaluation of probiotic potential and enzymatic profiling of *Pichia kudriavzevii* Y33 isolated from traditional home-made mango pickle. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1), 132.
<https://doi.org/10.1186/s43141-022-00416-2>
- Linawati, Rusmiyanto, E., & Kurniatuhadi, R. (2021). Khamir Potensial Probiotik Hasil Isolasi dari Fermentasi Jus Jeruk Siam (*Citrus nobilis* var. microcarpa). *Jurnal Biologica Samudra*, 3 (2), 1–18.
- Luo, F., Jiang, W. H., Yang, Y. X., Li, J., & Jiang, M. F. (2016). Cloning and expression of yak active chymosin in pichia pastoris. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29 (9), 1363–1370.
<https://doi.org/10.5713/ajas.16.0038>
- Méndez-Romero, J. I., Reyes-Díaz, R., Santiago-López, L., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B., Sayago-Ayerdi, S. G., Gómez-Gil, B., & González-Córdova, A. F. (2021). Artisanal Fresco cheese from Sonora: Physicochemical composition, microbial quality, and bacterial characterization by high-throughput sequencing. *International Journal of Dairy Technology*, 74 (2), 359–370.
<https://doi.org/10.1111/1471-0307.12751>
- Mulaw, G., Sisay Tessema, T., Muleta, D., & Tesfaye, A. (2019). In vitro evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from some traditionally fermented ethiopian food products. *International Journal of Microbiology*, 2019.
<https://doi.org/10.1155/2019/7179514>
- Nadia, A. B., Jannah, S. N., & Purwantisari, S. (2020). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from *Apis mellifera* stomach and their potential as antibacterial using in vitro test against growth of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium*. *NICHE Journal of Tropical Biology*, 3 (1), 35–44.

- Nugrahadi, Nyoman Puspawati, N., & Made Sugitha, I. (2020). Pengaruh Perlakuan 3 Jenis Bakteri Asam Laktat Dan Kombinasinya Terhadap Karakteristik Keju Kedelai. *Jurnal Itepa*, 9(4), 412–425.
- Nugroho, P., Dwiloka, B., & Rizqiaty, H. (2018). Rendemen, Nilai pH, Tekstur, dan Aktivitas Antioksidan Keju Segar dengan Bahan Pengasam Ekstrak Bunga Rosella Ungu (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Jurnal Teknologi Pangan*, 2(1), 33–39.
- Papademas, P., & Bintis, T. (2018). Global Cheesemaking Technology: Cheese Quality And Characteristics. In *Global Cheesemaking Technology*. John Wiley & Sons.
- Phale, S. (2018). Yeast: Characteristics and Economic Significance. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 08(05), 8–10.
<https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000337>
- Phong, H. X., Quyen, M. T., Thanh, N. N., Long, B. H. D., & Dung, N. T. P. (2017). Selection of high acid producing lactic acid bacteria and potential application in pineapple juice fermentation. *Bioprocess Engineering*, 1 (2), 58–64.
<https://doi.org/10.11648/j.be.20170102.15>
- Pradana, T. G., Putra, A., Siswoyo, P., Rusdhi, A., Kurniawan, M. A., Negara, A. B. W., & Haz, I. N. (2023). Eksplorasi Bakteri Proteolitik Dari Ileum *Gallus Gallus* Sebagai Kandidat Agen Probiotik Pakan Ternak Unggas Lokal. *Seminar of Social Sciences Engineering & Humaniora*, 322–331.
- Pratiwi, E., Akhdiya, A., & Akhdiya, A. (2020). Keragaman Karakter Morfologi dan Biokimia Isolat Khamir Rizosfer dan Endofit Tanaman Padi. *Buletin Plasma Nutfah*, 26(1), 39.
<https://doi.org/10.21082/blpn.v26n1.2020.p39-50>
- Putranto, W., Mustopa, A., Mamangkey, J., & Aritonang, N. (2020). Characteristics of Curds With Milk Clotting Enzyme from Indonesian Local Isolate of Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Science, Technology & Management*, 1 (2), 79–86.
<https://doi.org/10.46729/ijstm.v1i2.18>
- Putranto, W. S. (2018). *Rennin Like Protease dari Isolat Lokal Lactobacillus plantarum 1.13 Untuk Pembuatan Keju*. Institut Pertanian Bogor.

- Putranto, W. S., Suhartono, M. T., Kusumaningrum, H. D., Egirawono, P., Mustopa, A. Z., Suradi, K., & Chairunnisa, H. (2019). Fresh Cheese Probiotic with Local Isolate *Lactobacillus casei* 2.12 as starter in fermentation. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 334 (1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/334/1/012048>
- Putranto, W. S., Suhartono, M. T., Kusumaningrum, H. D., Giriwono, P. E., & Mustopa, A. Z. (2020). A novel rennin like protease from *Lactobacillus plantarum* 1.13 isolated from Indonesian fermented meat (Bakasam). *Bio-catalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 1878–8181. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101818>
- Putranto, W., Suryaningsih, L., Mustopa, A. Z., Triratna, L., & Pratama, A. (2019). Inovasi Strategi Screening Isolat Bakteri Asam Laktat (BAL) yang Diisolasi dari Daging dan Susu Sebagai Penghasil Milk Clotting Enzyme (MCE). *Prosiding Seminar Nasional Peternakan Berkelanjutan Ke-10 Fapet Unpad*, 174–183.
- Raisanti, I. A. M., Putranto, W. S., & Badruzzaman, D. Z. (2022). Pengaruh Penambahan Mono-sodium Fosfat pada Pembuatan Processed Cheese dengan Koagulan Sari Nanas terhadap Kadar Air, Rendemen dan Akseptabilitas. *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.24198/jthp.v3i1.39078>
- Riani, C. R., Nuraida, L., & Meryandini, A. (2020). Isolasi BAL dari Sari Buah Nanas. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan*, 31(2), 103–112. <https://doi.org/10.606/jtip.2020.21.2.103>
- Rohmatussolihat, Nurindah Sari, M., Lisdiyanti, P., Widyastuti, Y., & Sukara, E. (2015). Utilization of Milk Clotting Enzyme from *Lactobacillus casei* D11 for Mozzarella Cheese Making. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan*, 26(1), 63–71. <https://doi.org/10.6066/jtip.2015.26.1.63>
- Rokhim, N. (2023). Isolation of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus* sp. on Garbage at TPA Segawe, Tulungagung Regency. *Asian Journal of Natural Sciences*, 2 (1), 1–8. <https://doi.org/10.55927/ajns.v2i1.3005>

- Roostita, T., Suryaningsih, L., Lengkey, H. A. W., Pratama, A., & Utama, G. L. (2017). Isolation and Identification of Yeast in Traditional Cottage Cheese With Strawberry As Coagulant. *Scientific Papers-Series D-Animal Science*, 60, 300–302.
- Ruppitsch, W., Nisic, A., Hyden, P., Cabal, A., Sucher, J., Stöger, A., Allerberger, F., & Martinović, A. (2021). Genetic diversity of *Leuconostoc mesenteroides* isolates from traditional montenegrin brine cheese. *Microorganisms*, 9(8), 1–16.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9081612>
- Segal-Kischinevzky, C., Romero-Aguilar, L., Alcaraz, L. D., López-Ortiz, G., Martínez-Castillo, B., Torres-Ramírez, N., Sandoval, G., & González, J. (2022). Yeasts Inhabiting Extreme Environments and Their Biotechnological Applications. *Microorganisms*, 10 (4).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10040794>
- Setiadarma, W., Mayun Permana, D. G., & Ayu Nocianitri, K. (2020). Optimasi Waktu Inkubasi *Lactobacillus rhamnosus* SKG 34 Dalam Produksi Enzim Penggumpal Susu. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan (ITEPA)*, 9 (2), 108.
<https://doi.org/10.24843/itepa.2020.v09.i02.p01>
- Soeka, Y. S., & Sulistiani, S. (2017). Karakterisasi Enzim Protease dari Bakteri *Stenotrophomonas* sp. Asal Gunung Bromo, Jawa Timur. *Berita Biologi*, 16 (2), 203–211.
<https://doi.org/10.14203/beritabiologi.v16i2.2940>
- Susanti, E., Tirta, S., Paramitha, A., Lutfiana, N., & Malang, U. N. (2019). Seleksi Bakteri Proteolitik dari Pangan Fermentasi Lokal Indonesia sebagai Sumber Protease untuk Produksi. *MSOpen Book Chapter*, 78–92.
- Syed Malik, N., Lani, M. N., & Tufail Ahmad, F. (2019). Stability of lactic acid bacteria and physico-chemical properties of pasteurized cow's and goat's milk. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 15 (2–1), 341–345.
<https://doi.org/10.11113/mjfas.v15n2-1.1560>
- Vergara-álvarez, W., Arteaga-Márquez, M., & Hernández-Ramos, E. J. (2019). Sensory acceptance and shelf life of fresh cheese made with dry bromelain extract as a coagulating agent. *DYNA (Colombia)*, 86(210), 270–275.
<https://doi.org/10.15446/dyna.v86n210.76949>

- Wardani, E. K., Zulaekah, S., & Purwani, E. (2017). Pengaruh Penambahan Sari Buah Nanas (*Ananas comosus*) terhadap Jumlah Bakteri Asam Laktat (BAL) dan Nilai pH Soyghurt. *Jurnal Kesehatan*, 10(1), 68.
<https://doi.org/10.23917/jurkes.v10i1.5494>
- Widiastutik, N., & Alami, N. H. (2014). Isolasi dan Identifikasi Yeast dari Rhizosfer *Rhizophora mucronata* Wonorejo. *Jurnal Sains Dan Seni Pomits*, 3(1), 11–16.
- Yusrina, I. H., Purwasih, R., & Fathurohman, F. (2019). Pemanfaatan Limbah Keju Mozzarella sebagai Minuman Fungsional dengan Penambahan Rasa Nanas dan Jeruk Siam. *Bulletin of Applied Animal Research*, 1 (1), 1–7.
<https://doi.org/10.36423/baar.v1i1.157>