
**SKRINING BAKTERI ASAM LAKTAT DAN KHAMIR POTENSIAL PROTEOLITIK
EKSTRASELULER DAN *MILK CLOTTING ACTIVITY* DARI EKSTRAK DAN
FRESH CHEESE STROBERI (*Fragaria x ananassa Duch.*)**

***SCREENING OF LACTIC ACID BACTERIA AND YEAST EXTRACELLULAR
PROTEOLYTIC POTENTIAL AND MILK CLOTTING ACTIVITY OF STRAWBERRY
EXTRACT AND FRESH CHEESE (Fragaria x ananassa Duch.)***

Received : Sept 11th 2023

Accepted : Mar 11th 2024

Cindy Meylia Putri¹

Mia Miranti Rustama²

Wendry Setiyadi Putranto³

¹Program Studi Biologi, Fakultas
Matematika dan Ilmu Pengetahuan
Alam, Universitas Padjadjaran

²Departemen Biologi, Fakultas
Matematika dan Ilmu Pengetahuan
Alam, Universitas Padjadjaran

³Departemen Teknologi Hasil
Peternakan Fakultas Peternakan
Universitas Padjadjaran

*Korespondensi:

Wendry Setiyadi Putranto

Departemen Teknologi Hasil
Peternakan Fakultas Peternakan
Universitas Padjadjaran

Jl. Ir. Soekarno Km.21
Jatinangor - Kabupaten
Sumedang
Jawa Barat

e-mail:

wendry@unpad.ac.id

Abstract. Fresh cheese is one of the popular cheeses, it can be eaten directly and is made without going through ripening with coagulation by rennet. Strawberries (Fragaria x ananassa) are known to have proteolytic enzymes and endophytic microbes. Fresh cheese produced with coagulant extract of strawberry fruit isolated the presence of LAB and yeast which have proteolytic and MCA activity. This research method is descriptive exploratory. The fresh strawberry cheese produced in this study was whitish red in color and had a fine texture. The total LAB of extract, fresh strawberry cheese, and pasteurized milk were respectively 1.9×10^4 CFU/mL and 1.8×10^4 CFU/g, 1.5×10^4 CFU/mL, while for yeast it was 5.2×10^5 CFU/mL and 6.4×10^4 CFU/g, 5.0×10^3 CFU/mL. In this study, 3 LAB isolates and 2 yeast isolates were found from strawberry extract and fresh cheese. BAL and yeast from isolates ES3, FS4, FS5, YFC1, and YES2 had proteolytic indices of 0.375, 0.125, 0.25, 1.625, and 1.25, respectively. The MCA value for each isolate was 203.44; 212.53; 205.13; 3.7; and 1.73 SU/mL. The BAL obtained was suspected to be from the genus Lactobacillus and yeast isolates suspected to be of the genus Saccharomyces and Debaryomyces. In this study, BAL and yeast were found to have extracellular proteolytic potential and MCA.

Keywords : *Fresh Cheese, Lactic Acid Bacteria, Milk Clotting Activity, Strawberries, Yeast.*

Sitasi :

Putri, C.M., Rustama, M.M., Putranto, S.P. (2024). Skrining Bakteri Asam Laktat dan Khamir Potensial Proteolitik Ekstraseluler dan *Milk Clotting Activity* Dari Ekstrak dan *Fresh Cheese* Stroberi (*Fragaria x ananassa Duch.*). *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*, 5(1): 61-82

PENDAHULUAN

Fresh cheese merupakan salah satu olahan susu yang dibuat tanpa melalui pemeraman. Kandungan pada *fresh cheese* terdiri dari lemak 24%, protein 17%, dan garam 1,2%. *Fresh cheese* dapat dibuat dengan penambahan enzim (Putri, dkk. 2020). Koagulasi kasein dengan enzim renin dalam rennet, bekerja dengan merusak kestabilan *micelle* kasein. Enzim menghidrolisis kasein dalam peptida yang larut pada molekul air, kemudian memecah *kappa* kasein dan ikatan peptida antara fenilalanin dan metionin sehingga terbentuk makropeptida kasein dan para-k-kasein. Kasein tidak dapat menjaga kestabilan *micelle* karena kehilangan bagian dari molekul, selanjutnya para-k-kasein berdekatan dan bersatu dengan ikatan hidrofobik menghasilkan gumpalan (Putranto, dkk. 2020).

Stroberi (*Fragaria x ananassa*) merupakan salah satu tanaman yang kaya akan vitamin dan tergolong buah asam dengan asam askorbat yang tinggi serta memiliki pH 3,24 – 3,44 (Wulandari, dkk. 2021). Stroberi mengandung protease serin (Alici & Arabaci, 2018). Protease serin memiliki residu serin di situs aktifnya dan memiliki mekanisme katalitik (Amira, dkk. 2017). Protease serin umumnya aktif pada pH netral dan basa, optimal antara pH 7,0 – 11,0. Titik isoelektrik protease serin adalah antara pH 4,0 – 6,0. pH dan temperatur optimum serin stabil pada rentan suhu 40 – 70°C dan pH 3-9 (Alici & Arabaci, 2018).

Mikroorganisme diketahui dapat menghasilkan protease ekstraseluler dan memiliki aktivitas penggumpalan susu atau *milk clotting activity* (MCA). Aktivitas penggumpalan susu dapat dilakukan oleh kelompok bakteri asam laktat dan khamir (Putranto, dkk. 2020). Bakteri asam laktat merupakan bakteri gram positif, tidak berspora, bersifat non motil (Putranto, dkk. 2020). Khamir merupakan mikroorganisme yang termasuk kedalam fungi uniseluler, bersifat eukariotik, memiliki daya tahan tinggi serta dapat membantu dalam proses fermentasi (Pratiwi, 2020).

Pada buah Stroberi (*Fragaria x ananassa*) ditemukan bakteri *Lactobacillus bulgaricus* yang diisolasi dan diidentifikasi dengan media selektif *deMann Rogosa Sharpe Agar* (MRSA). Bakteri *Lactobacillus bulgaricus* merupakan bakteri gram positif dengan bentuk basil dan tidak membentuk endospora. *Lactobacillus bulgaricus* pada susu dapat mengonversikan laktosa menjadi asam laktat. Suhu optimal untuk pertumbuhannya sekitar 45°C dan bersifat homofermentatif atau sebagian besar hasil akhirnya merupakan asam laktat. Khamir ditemukan pada keju *cottage* yang dibuat dari susu sapi pasteurisasi dengan penambahan ekstrak stroberi sebagai koagulan. Jumlah khamir dihitung dengan menggunakan metode *total plate count* pada *Malt Extract Agar* dengan penambahan antibiotik 10 ppm dan menunjukkan bahwa penambahan 40% ekstrak buah stroberi menghasilkan rendemen terbaik sebesar 32,07%, dengan total

khamir sebesar $5,98 \times 10^7$ CFU/g dan *Cryptococcus albidus* ditemukan keju *cottage* tersebut (Roostita, dkk. 2017).

Aktivitas proteolitik pada mikroorganisme dapat diidentifikasi secara kualitatif dengan mengukur aktivitas proteolitik yang ditunjukkan dengan terbentuknya *clear zone* atau zona bening disekitar koloni. Hal ini dapat terjadi akibat adanya perubahan polimer protein menjadi senyawa peptida dan asam amino. Kinerja enzim dari mikroorganisme dapat dilihat dari *milk clotting activity* (MCA). Nilai *milk clotting activity* (MCA) yang semakin tinggi menandakan semakin baik kemampuan enzim dalam menghidrolisis *kappa-kasein* pada susu sehingga dapat terbentuk dadih. Produksi keju yang baik memiliki nilai *milk clotting activity* (MCA) yang lebih tinggi dibandingkan dengan nilai *proteolytic activity* (PA), karena nilai *proteolytic activity* (PA) yang tinggi dapat membentuk peptida yang pahit pada rasa keju (Manab, dkk. 2022).

Pada penelitian ini akan dilakukan skrining bakteri asam laktat dan khamir dari ekstrak dan fresh cheese stroberi melalui tahap isolasi dan enumerasi dengan metode *total plate count* (TPC), kemudian dilakukan uji aktivitas protease pada isolat bakteri asam laktat dan khamir, selanjutnya isolat mikroorganisme terpilih diuji kemampuan *milk clotting activity* (MCA) yang merupakan tahap pengujian aktivitas enzim secara kualitatif. Isolat bakteri asam laktat dan

khamir yang menghasilkan enzim akan diidentifikasi hingga tingkat genus.

MATERI DAN METODE

1. Pembuatan Ekstrak Buah Stroberi

Buah stroberi (*Fragaria x ananassa* Duch.) varietas California yang didapatkan dari daerah Ciwidey diambil dengan tingkat kematangan warna *fresh red* dicuci bersih kemudian ditiriskan. Stroberi yang sudah bersih dihancurkan dengan bantuan *juice extractor* tanpa dipotong dan tidak ditambahkan air dengan hasil ekstrak buah dan ampas buah terpisah. Ekstrak buah yang sudah terpisah dari ampasnya siap digunakan sebagai sampel penelitian (Wulandari, dkk. 2021).

2. Pembuatan *Fresh Cheese* Ekstrak Buah Stroberi

Proses Pembuatan *fresh cheese* dilakukan berdasarkan Wulandari, dkk. (2021) yaitu susu segar dipasteurisasi sebanyak 1 liter pada suhu 70°C selama 30 detik, lalu susu didinginkan hingga 40°C. Ekstrak stroberi ditambahkan sebanyak 40% (400 mL kedalam 1 liter susu), selanjutnya dihomogenkan. *Curd* yang terbentuk dipisahkan dari *whey* dengan cara dipotong, lalu ditiriskan dengan saringan. *Curd* selanjutnya ditekan dengan menggunakan beban seberat 1 kg selama 60 menit dengan tujuan agar kadar air berkurang.

3. Isolasi dan Enumerasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dan Khamir Ekstrak *Fresh Cheese* Buah Stroberi

Sampel yang diisolasi pada penelitian ini adalah ekstrak stroberi, *fresh cheese* stroberi, dan susu pasteurisasi

dari pembuatan *fresh cheese* stroberi. Isolasi dilakukan dengan metode *spread plate*. Media yang digunakan untuk isolasi bakteri asam laktat dan khamir ini yaitu media agar MRSA dan MEA dengan penambahan substrat kasein. Metode ini dikenal mampu memperoleh isolat potensial dalam protease ekstraseluler (Putranto, dkk. 2018). Suspensi dari faktor pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} diinokulasikan sebanyak 0,1 mL secara aseptik pada media MRSA dan MEA yang telah ditambah susu skim. Suspensi diratakan dengan menggunakan batang L, selanjutnya cawan petri tersebut dibalut dengan *plastic wrap* dan diinkubasi 48 jam pada suhu 37°C untuk media MRSA dan suhu 25°C untuk media MEA. Kemudian koloni yang tumbuh pada medium diamati dan diberi kode untuk penamaan. Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri menandakan bakteri asam laktat (BAL) dan khamir memiliki aktivitas proteolitik.

Hasil koloni bakteri asam laktat dan khamir yang tumbuh dari ingineran 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-5} selanjutnya dihitung menggunakan metode *Total plate count* (TPC). Rumus untuk menghitung *Total Plate Count* (TPC) sebagai berikut :

$$\text{Total bakteri} = \sum \text{koloni} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

4. Pemurnian Bakteri Asam Laktat (BAL) dan Khamir

Proses pemurnian isolat dilakukan dengan menggunakan metode *streak* (gores) dengan koloni yang tumbuh dipindahkan secara terpisah dan berbeda berdasarkan warna dan bentuk.

Koloni biakkan bakteri asam laktat dan khamir yang memiliki zona bening dimurnikan kembali pada media MRSA dengan skim milk (3%) untuk bakteri asam laktat dan MEA dengan skim milk (3%) untuk khamir. Koloni bakteri asam laktat dan khamir masing-masing diambil menggunakan jarum ose secara aseptik, kemudian koloni di *streak* secara *zig-zag* pada cawan petri berisi masing-masing media. Cawan petri dibalut dengan plastik *wrap* dan diberi label. Isolat pada media MRSA diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 48 jam, sedangkan isolat dari media MEA diinkubasi selama 48 jam dalam suhu 25°C .

5. Uji Aktivitas Proteolitik Bakteri Asam Laktat (BAL) dan Khamir

Uji aktivitas proteolitik pada penelitian ini mengacu pada Putranto, dkk. (2018). Kuantifikasi kemampuan untuk menguji suatu biakan bakteri menghasilkan enzim protease ekstraseluler, maka bakteri tersebut harus ditumbuhkan pada medium padat yang mengandung kasein seperti *skim milk agar*. Uji aktivitas proteolitik dilakukan menggunakan media MRSA dan MEA yang dimodifikasi dengan metode *block agar*. Media A yaitu isolat potensial (Selective Medium Agar positif) dikultur merata (*spread*) pada media masing-masing (BAL : MRSA) dan (khamir : MEA), selanjutnya isolat diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam untuk bakteri asam laktat dan suhu 25°C selama 48 jam untuk khamir. Pada media B berisi media MRSA (BAL) dan MEA (khamir)

yang masing-masing ditambahkan substrat (kasein) 2-3% dan dibuat lubang *plug*. Pada media A yang telah diinkubasi dibuat *plug* dan dipindahkan pada lubang *plug* pada media B.

Isolat yang sudah dipindahkan kedalam media B selanjutnya diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C untuk BAL dan suhu 25°C selama 48 untuk khamir. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya *clotting zone* yang dihasilkan (cm) disekitar pertumbuhan koloni, selanjutnya ditentukan indeks proteolitik (IP) dengan rumus sebagai berikut :

$$IP = \frac{\text{diameter zona bening} - \text{diameter koloni}}{\text{diameter koloni}}$$

6. Uji *Milk Clotting Activity* (MCA)

Isolat bakteri asam laktat dan khamir yang memiliki aktivitas proteolitik dan zona penggumpal yang besar, selanjutnya dilakukan pengujian kuantifikasi aktivitas MCA (SU/mL). Isolat BAL dikultur pada 5 mL MRS *broth* dan khamir dikultur pada 5 mL *malt extract broth*, lalu diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C untuk BAL dan suhu 25°C selama 48 untuk khamir. Isolat pada masing-masing media dipindahkan ke dalam *microtube* steril, selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 g dengan suhu 4°C dalam waktu 30 menit. Supernatan yang merupakan *crude enzyme* dipisahkan pada *microtube* steril dan dilakukan pengujian MCA.

Uji *milk clotting activity* (MCA) mengacu pada metode Putri, dkk., (2020). Substrat sebanyak 2,5 mL (susu skim 10% dalam 10 mM CaCl₂) diinku-

basi hingga suhu mencapai 50°C, selanjutnya ekstrak enzim ditambahkan sebanyak 0,5 mL. Pengukuran lama waktu dimulai dari penambahan ekstrak enzim hingga terbentuknya partikel pertama. MCA dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$SU = 2400 \times 2,5 \times D / T \times 0,5$$

Keterangan :

SU = Sedimentation Unit

T = waktu pembekuan susu (detik)

D = pengenceran enzim.

7. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dan Khamir

Karakterisasi kandidat - kandidat bakteri asam laktat dan khamir dilakukan dengan pengamatan makroskopis berdasarkan karakteristik morfologi koloni dan pengamatan mikroskopis berdasarkan morfologi sel serta dilakukan pengujian biokimia. karakterisasi bakteri asam laktat meliputi pengamatan makroskopis, pewarnaan gram, Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP), Triple Sugar Iron Agar (TSIA), indol, motilitas, katalase, pertumbuhan suhu, ketahanan garam, tipe fermentasi, sedangkan untuk khamir terpilih meliputi pengamatan makroskopis, mikroskopis, uji pertumbuhan media cair, uji fermentasi gula, pewarnaan kapsul, dan uji urease.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. *Fresh Cheese Stroberi*

Fresh cheese dibuat dari susu yang ditambahkan koagulan dari ekstrak stroberi (*Fragaria x ananassa* Duch) yang dibuat dengan bantuan *juice extractor* tanpa penambahan air. Susu yang telah dipasteurisasi selanjutnya

ditambahkan ekstrak buah stroberi sebanyak 40% dari volume susu yang digunakan (400 mL ekstrak buah stroberi, 1 L susu) (Wulandari, dkk. 2021). Pembuatan *fresh cheese* pada penelitian ini dilakukan dengan dua kali pengulangan. Susu yang telah terbentuk *curd* menghasilkan *fresh cheese* yang dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. *Fresh Cheese Stroberi*

Pada Gambar 1. dapat dilihat bahwa *fresh cheese* memiliki warna cenderung merah keputihan dan bertekstur halus. *Fresh cheese* yang dihasilkan memiliki berat masing-masing 14,5% dan 13%. Warna pada *fresh cheese* dipengaruhi dari bahan baku yang digunakan, warna putih dari susu dan warna merah dari ekstrak stroberi. Warna putih susu disebabkan oleh penyebaran butiran-butiran koloid lemak, kalsium fosfat dan kalseinat, sedangkan warna merah disebabkan karena terdapat pigmen antosianin dalam stroberi (Wulandari, dkk. 2021). Sementara itu, tekstur pada *fresh cheese* yang halus memiliki kadar air yang tinggi. Kadar air merupakan sejumlah air yang terkandung dalam suatu bahan, dapat berbentuk bebas, terikat, ataupun tertahan (Prasetyo, dkk. 2019 ; Wulandari, dkk. 2021).

2. Total Bakteri Asam Laktat dan Khamir

Sampel yang disolasi pada penelitian ini adalah ekstrak stroberi, *fresh cheese*, dan susu pasteurisasi yang digunakan saat pembuatan *fresh cheese*. Hasil perhitungan total bakteri asam laktat dan khamir setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (BAL) dan 25°C selama 48 jam (khamir) dapat dilihat pada Tabel 1. dan Tabel 2.

Berdasarkan hasil Tabel 1. dapat diketahui untuk jumlah total bakteri paling tinggi berturut-turut yaitu pada ekstrak stroberi yaitu $1,9 \times 10^4$ CFU/g, pada *fresh cheese* yaitu $1,8 \times 10^4$ CFU/g, kemudian susu pasteurisasi yaitu $1,5 \times 10^4$ CFU/mL. Tingginya total bakteri pada ekstrak stroberi ini karena buah-buahan merupakan substrat yang ideal untuk mikroba karena mengandung mineral, vitamin, antioksidan, dan serat (Thakur, dkk. 2017). Pada ekstrak buah stroberi memiliki nilai gizi dan sumber β -karoten, asam askorbat, vitamin, gula, dan asam fenolik yang baik sehingga mikroba mampu tumbuh (Balthazar, dkk. 2019). Sedangkan rendahnya total bakteri pada susu pasteurisasi ini dapat diakibatkan karena adanya pemanasan pada saat susu di pasteurisasi.

Pada susu pasteurisasi diduga tidak semua mikroorganisme mati, beberapa bakteri termotoleran mampu bertahan. Bakteri yang bertahan pada susu pasteurisasi yaitu bakteri termotoleran dimana bakteri ini mampu bertahan terhadap suhu panas dan dapat tumbuh kembali setelah dipasteurisasi (Wulandari, dkk. 2020).

Tabel 1. Total Bakteri Asam laktat

No	Sampel	Total Bakteri
1.	Susu Pasteurisasi	$1,5 \times 10^4$ CFU/mL
2.	Ekstrak Stroberi	$1,9 \times 10^4$ CFU/mL
3.	<i>Fresh Cheese</i> Stroberi	$1,8 \times 10^4$ CFU/mL

Tabel 2. Total Khamir

No	Sampel	Total Bakteri
1.	Susu Pasteurisasi	$5,0 \times 10^3$ CFU/mL
2.	Ekstrak Stroberi	$5,2 \times 10^5$ CFU/mL
3.	<i>Fresh Cheese</i> Stroberi	$6,4 \times 10^4$ CFU/mL

Micrococcus, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus* dan *Clostridium* adalah kelompok bakteri termodurik dan *Aspergillus* serta *Penicillium* adalah jenis kapang yang mampu tumbuh pada suhu pasteurisasi (Kristanti, dkk. 2017). Untuk jumlah total bakteri pada susu pasteurisasi yang telah ditetapkan oleh BPOM Nomor HK.00.06.1.52.4011 bahwa tidak melebihi 5×10^4 CFU/mL.

Berdasarkan hasil Tabel 2. dapat diketahui untuk jumlah total khamir paling tinggi berturut-turut yaitu pada ekstrak buah stroberi sebesar $5,2 \times 10^5$ CFU/mL, *fresh cheese* stroberi yaitu $6,4 \times 10^4$ CFU/g, dan susu pasteurisasi yaitu $5,0 \times 10^3$ CFU/mL. Jumlah total tertinggi pada khamir berasal dari ekstrak stroberi, hal ini sama seperti pada jumlah total tertinggi pada bakteri.

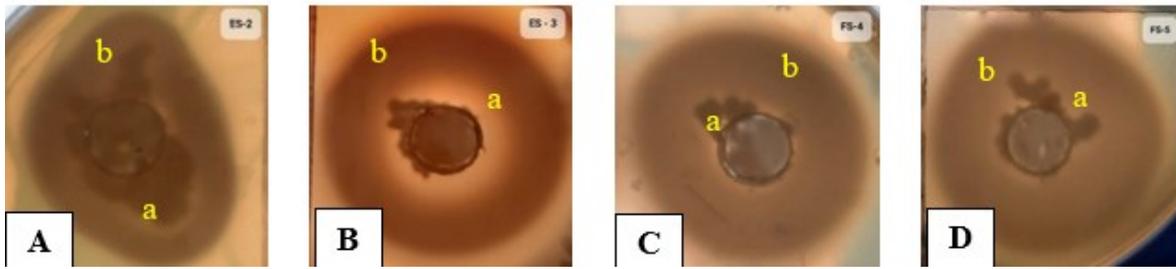
Hasil penelitian pada *fresh cheese* stroberi memiliki total khamir sebesar $6,4 \times 10^4$ CFU/g. Roostita, dkk. (2017) menemukan bahwa total khamir yang didapatkan sebesar $5,98 \times 10^7$ CFU/g dari keju *cottage* dengan koagulan ekstrak buah stroberi. Ekstrak buah

stroberi tidak hanya berperan sebagai koagulan alami, tetapi juga sebagai kontributor mikroba seperti khamir. Sedangkan untuk susu pasteurisasi memiliki nilai terendah yaitu $5,0 \times 10^3$ CFU/mL. Secara umum khamir tumbuh pada suhu optimal 20-25°C, namun terdapat beberapa khamir yang mampu tumbuh di lingkungan yang ekstrim.

3. Skrining Kandidat Bakteri asam Laktat dan Khamir Proteolitik

Skrining aktivitas proteolitik pada kandidat bakteri asam laktat dan khamir dilakukan menggunakan media MRSA (BAL) dan MEA (khamir) yang ditambahkan *skim milk* 3% (Putranto, dkk. 2018). Hasil skrining kandidat bakteri asam laktat dapat dilihat pada Gambar 2.

Berdasarkan hasil pada Gambar 2. diperoleh empat kandidat isolat BAL dari susu pasteurisasi yang diberi kode isolat SS1, lalu dari ekstrak stroberi dengan kode isolat ES3 dan dari *fresh cheese* stroberi dengan kode isolat FS4 dan FS5. Pada keempat isolat menunjukkan adanya zona bening dan



Gambar 2. Isolat BAL pada media MRSA + skim 3%. A) Isolat SS1, B) Isolat ES3, C) Isolat FS4, D) Isolat FS5

Keterangan : a) Zona Bening

b) Zona Penggumpal



Gambar 3. Isolat khamir pada media MEA + skim 3%. A) Isolat YFC1, B) Isolat YES2

Keterangan : a) Zona Bening

b) Zona Penggumpal

clotting zone disekitar koloninya. Hal ini dapat menjadi indikator bahwa kandidat isolat BAL mampu memproduksi protease ekstraseluler yang memiliki aktivitas dalam menggumpalkan *skim* (Putranto, dkk. 2018). Hasil skrining kandidat khamir dapat dilihat pada Gambar 3.

Berdasarkan hasil pada Gambar 3. diperoleh dua kandidat isolat khamir yang berasal dari *fresh cheese* dengan diberi kode isolat YFC1 dan dari ekstrak stroberi diberi kode isolat YES2 dengan terbentuknya zona bening dan *clotting zone* disekitar koloni. Hasil penelitian terlihat bahwa isolat khamir memiliki zona bening yang lebih lebar (besar) dibandingkan dengan kandidat isolat BAL. Hal ini menandakan bahwa

aktivitas proteolitik pada khamir cukup tinggi dalam menghidrolisis kasein, sehingga menunjukkan zona bening yang lebar (besar). Menurut Putranto, dkk. (2018) bahwa terdapat isolat spesifik mikroorganisme yang mampu dalam memproduksi *rennin like protease*.

Hasil pada penelitian ini masing-masing isolat memiliki karakter *clotting* dan *clear zone* disekitar koloni. Karakteristik penggumpalan dari bakteri asam laktat dan khamir dapat dibedakan menjadi dua karakter, yaitu (1) karakter penggumpalan (*clotting*) disekitar koloni dan terdapat pola *clear zone* (2) karakter yang menunjukkan aktivitas penggumpalan (*clotting*), namun tidak terdapat *clear zone* disekitar

koloni (Putranto, dkk. 2018). Kandidat isolat bakteri asam laktat dan khamir dengan zona bening dan zona penggumpal disekitar koloni tersebut selanjutnya diuji proteolitik dan *milk clotting activity* (MCA) untuk diketahui potensialnya.

4. Hasil Uji Aktivitas Proteolitik

Uji aktivitas proteolitik merupakan uji kualitatif untuk mengetahui aktivitas enzim proteolitik pada suatu isolat mikroorganisme, karena hal ini dapat mempengaruhi citarasa yang terbentuk dalam produksi keju (Setiadarma, dkk. 2020 ; Hengkengbala, dkk. 2021) Aktivitas proteolitik dapat diketahui dengan menghitung zona bening atau *clear zone* dan zona penggumpalan atau *clotting zone* disekitar isolat bakteri asam laktat (Putranto, dkk. 2018). Hasil dari uji aktivitas proteolitik yang didapatkan dari masing-masing isolat dapat dilihat pada Tabel 3.

Berdasarkan hasil data pada Tabel 3. bahwa isolat kandidat BAL yang memiliki zona bening terbesar berturut-turut yaitu isolat SS1 dengan besar 12 mm, ES3 dengan besar 11 mm, FS5 dengan besar 10 mm, dan FS4 dengan besar 9 mm, sehingga didapatkan nilai indeks proteolitik pada masing-masing kandidat BAL secara berturut-turut yaitu isolat SS1 sebesar 0.5, isolat ES3 sebesar 0.375, isolat FS5 sebesar 0.25, dan isolat FS4 sebesar 0.125. Sedangkan untuk khamir isolat dengan zona bening terbesar yaitu isolat YFC1 dengan besar 21 mm dan nilai indeks proteolitik sebesar 1.625, selanjutnya isolat YES2 dengan besar zona bening 18 mm dan nilai indeks proteolitik sebesar 1.25. Pada penelitian ini, khamir memiliki karakteristik proteolitik dengan zona bening yang besar disekitar kolni, diikuti dengan pembentukan zona penggumpal. Aktivitas proteolitik yang tinggi akan menghidrolisis kasein secara sempurna sehingga tidak diperoleh gumpalan kasein (Putranto, dkk. 2020).

Tabel 3. Hasil Uji Proteolitik

Isolat	Aktivitas Proteolitik (mm)			Indeks Proteolitik (IP)
	<i>Clear Zone</i>	<i>Clotting Zone</i>	Diamter koloni	
SS1	12	30	8	0,500
ES3	11	26	8	0,375
FS4	9	31	8	0,125
FS5	10	32	8	0,250
YFC1	21	28	8	1,625
YES2	18	15	8	1,250

Semakin tinggi zona bening maka semakin tinggi pula nilai indeks proteolitiknya. Tingginya indeks proteolitik ini menandakan bahwa isolat mampu menghasilkan protease ekstraseluler yang tinggi pula (Putranto, dkk. 2018). Aktivitas protease pada bakteri dan khamir ini tergolong rendah jika dibandingkan dengan aktivitas protease dari *Lactobacillus lactis* yaitu 2.875 Unit/mL (Anggraeni, dkk. 2022).

Zona bening pada setiap isolat ini merupakan indikator bahwa terjadi pemecahan molekul ikatan peptida menjadi molekul-molekul sederhana yang terkandung di dalam *skim milk* pada media. Pada *skim milk* mengandung kasein yang digunakan sebagai substrat enzim. Enzim protease ekstraseluler atau merupakan enzim pemecah protein yang dibuat di dalam sel, lalu dilepaskan keluar sel ini dapat diproduksi oleh beberapa mikroorganisme (Simamora & Sukmawati, 2020). Menurut Kieliszek, dkk. (2021) bakteri asam laktat dapat menghasilkan enzim proteolitik di dalam sel ataupun di luar sel. Bakteri asam laktat mampu mendegradasi protein dengan produk akhir yang paling sering berupa asam amino yang digunakan sebagai sumber nitrogen.

Faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim yaitu konsentrasi substrat dan enzim, pH, suhu, serta adanya *activator* ataupun *inhibitor* (Kieliszek, dkk. 2021). Adanya perbedaan nilai indeks proteolitik pada setiap isolat menandakan bahwa aktivitas proteolitik yang dihasilkan sangat beragam. Setiap mikro-

organisme menghasilkan enzim yang beragam sehingga aktivitas atau kemampuan mikroba dalam menguraikan protein yang dihasilkan dapat berbeda antara satu spesies dengan spesies yang lain (Hastuti, dkk. 2017). Putranto, dkk. (2018) menyatakan bahwa semakin besar *clotting zone* yang dihasilkan maka semakin besar juga potensinya dalam menghasilkan enzim penggumpal. Selain itu, indeks proteolitik pada setiap isolat dipengaruhi oleh masa inkubasi isolat pada masing-masing media uji.

5. Hasil Uji *Milk Clotting Activity*

Pengujian *Milk Clotting Activity* (MCA) merupakan pengujian aktivitas enzim secara kuantitatif. Kandidat isolat BAL dan khamir sebelumnya ditumbuhkan pada 5 mL media MRS *broth* dan *malt extract broth*, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C untuk bakteri dan 48 jam suhu 25°C untuk khamir. Isolat BAL dan khamir tersebut disentrifugasi dan digunakan ekstrak enzimnya untuk dilakukan uji aktivitas penggumpalan susu atau *milk clotting activity* pada suhu substrat 50°C. Nilai MCA pada masing-masing isolat dapat dilihat pada Tabel 4.

Berdasarkan hasil data Tabel 4. pada kandidat bakteri asam laktat yang memiliki nilai MCA tertinggi berturut-turut yaitu isolat FS4 dengan nilai 212.53 SU/mL, isolat FS5 dengan nilai 205.13 SU/mL, isolat ES3 dengan nilai 203.44 SU/mL, dan terkecil adalah isolat SS1 dengan nilai 186.32 SU/mL, semakin cepat terjadi penggumpalan

Tabel 4. Hasil Pengujian Milk Clotting Activity

Isolat	Lama Waktu 1 (Detik)	Lama Waktu 2 (Detik)	Nilai MCA (SU/mL)
SS1	67	62	186,32
ES3	60	58	203,44
FS4	58	55	212,53
FS5	59	58	205,13
YFC1	3600	2880	3,70
YES2	7155	6700	1,73

maka semakin tinggi nilai MCA yang dihasilkan. Faktor utama yang menentukan nilai MCA adalah kecepatan penggumpalan *skim milk* (Putranto, dkk. 2018). Dari beberapa penelitian diketahui bahwa *Lactiplantibacillus plantarum* 1.13 memiliki aktivitas penggumpalan susu sebesar 414.67 SU/mL (Putranto, dkk. 2020). *Enterococcus faecium* 1.15 yang diisolasi dari Bakasam memiliki aktivitas penggumpalan susu sebesar 20 SU/mL (Putranto, dkk. 2017). *Lactobacillus paracasei* 2.12 memiliki aktivitas penggumpalan susu sebesar 105.26 SU/mL (Putranto, dkk. 2021).

Penggumpalan kasein dapat terjadi karena adanya asam atau enzim. Penggumpalan enzimatis susu atau *Milk Clotting Enzyme* (MCE) disebabkan oleh hilangnya ikatan peptida antara fenilalanin dan metionin (urutan 105 – 106) dari polipeptida kappa kasein, kemudian menghasilkan para-k-kasein dan makropeptida. Kappa kasein merupakan molekul kompleks dengan kandungan asam amino esensial yang dimanfaatkan oleh tubuh, namun sulit untuk dicerna. *Milk clotting enzyme ini* dapat membantu proses pencernaan kappa kasein

dengan memutus ikatan fenilalanin 105 – metionin 106 sehingga kappa kasein dapat berikatan dengan ion kalsium dan dapat mengendap atau tergumpal (Putranto, dkk. 2020 ; Setiadarma, dkk. 2020). Aktivitas enzim ditunjukkan dengan lamanya waktu yang diperlukan sejak ekstrak enzim ditambahkan pada koagulasi kasein (Putranto, dkk. 2017).

6. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat

Karakterisasi kandidat bakteri asam laktat dilakukan pengamatan morfologi koloni. Indikator variasi fenotipik dan proses adaptasi suatu bakteri terhadap lingkungannya dapat dilihat dari morfologi koloni bakteri tersebut (Wardhani, dkk., 2020). Karakteristik morfologi koloni bakteri asam laktat dapat dilihat pada tabel 5.

Sulmiyati, dkk. (2018) menyatakan bahwa koloni yang diperkirakan sebagai bakteri asam laktat berdasarkan pengamatan makroskopik memiliki bentuk melingkarr dengan tepi rata, permukaan cembung, dan koloni berwarna putih susu. Hasil karakterisi dari masing-masing isolat dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 5. Karakteristik Morfologi Koloni Bakteri Asam Laktat

Pengamatan	SS - 1	ES - 3	FS - 4	FS - 5
Tekstur	Halus	Halus	Halus	Halus
Warna	Putih susu	Putih susu	Putih susu	Putih susu
Bentuk	Bulat keruh	Bulat keruh	Bulat keruh	Bulat keruh
Elevasi	Cembung	Cembung	Cembung	Cembung
Permukaan	Halus	Halus	Halus	Halus

Tabel 6. Hasil Karakterisasi Bakteri Asam Laktat

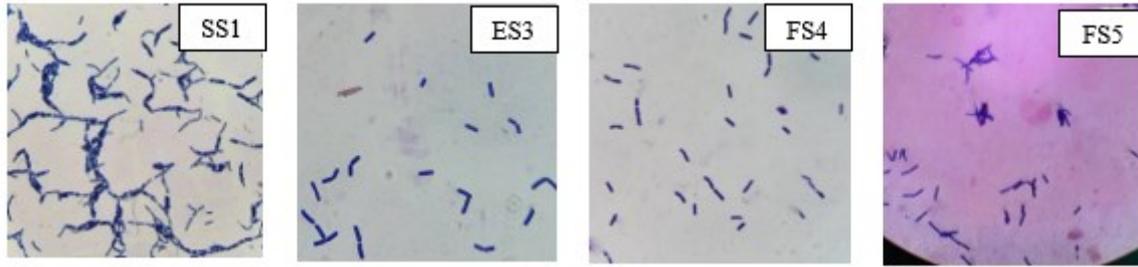
Jenis Uji	Isolat			
	ES - 3	FS - 4	FS - 5	SSI
Bentuk sel	Basil	Basil	Basil	Basil
Katalase	-	-	-	+
Motilitas	-	-	-	+
Indol	-	-	-	-
TSIA				
B/S	y/y	y/y	y/y	y/y
Gas	+	+	-	-
H ₂ S	-	-	-	-
MR	Merah	Merah	Merah	Merah
VP	Kuning	Kuning	Kuning	Kuning
Suhu				
10°C	w	w	w	w
37°C	+	+	+	+
45°C	+	+	+	+
Garam				
4%	+	+	+	+
6,5%	+	+	+	+
Tipe	Hetero	Hetero	Homo	Homo
Fermentasi	fermentatif	fermentatif	fermentatif	fermentatif
Hasil Identifikasi	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bacillus</i>

Keterangan :

+ : Reaksi Positif

- : Reaksi negatif

B : *Butt*S : *Slant*Y : *Yellow*w : *Weak*



Gambar 4. Hasil Perwarnaan Gram Perbesaran 1000x

6.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram keempat isolat dilakukan dengan pengamatan menggunakan mikroskop perbesaran 1000x. Hasil pengamatan pewarnaan gram dapat dilihat pada Gambar 4.

Hasil pada Gambar 4. pada isolat SS1, ES3, FS4, dan FS5 menunjukkan bahwa semua isolat tersebut merupakan bakteri gram positif yang ditandai dengan warna ungu pada sel dan memiliki bentuk basil (batang). Hal ini terjadi karena bakteri gram positif memiliki dinding sel berupa peptidoglikan yang tebal, sehingga dinding sel tetap menahan kristal violet (Putri & Kusdiyantini, 2018).

6.2 Uji Kalatase

Hasil pengujian katalase menunjukkan bahwa isolat ES3, FS4, dan FS5 menunjukkan hasil negatif, sedangkan isolat dengan kode SS1 menunjukkan hasil positif. Hal ini dapat disimpulkan bahwa 3 isolat dengan katalase negatif diduga termasuk kelompok bakteri asam laktat. Hal ini sesuai dengan ciri-ciri bakteri asam laktat yang termasuk kedalam katalase negatif (Utama, dkk. 2018). Gelembung - gelembung udara yang terbentuk pada hasil positif ini terjadi karena terbentuknya gas O_2 dari penguraian H_2O_2 oleh enzim katalase dari bakteri tersebut.

6.3 Uji Motilitas

Hasil uji motilitas pada isolat ES3, FS4, dan FS5 menunjukkan hasil non-motil, karena pertumbuhannya hanya sepanjang garis inokulasi, sedangkan isolat SS1 menunjukkan hasil positif karena terdapat penyebaran pertumbuhan pada media. Hasil ini sesuai dengan sifat bakteri asam laktat yang merupakan bakteri non-motil yang tidak memiliki flagella (Ismail, dkk. 2018).

6.4 Uji Indol

Hasil menunjukkan bahwa isolat SS1, ES3, FS4, dan FS5 negatif indol yang ditandai dengan warna kuning atau tetap. Hal ini terjadi karena keempat isolat tidak memiliki sifat dalam memproduksi indol dari asam amino triptofan sebagai energi sel nya (Thakur, dkk. 2017).

6.5 Uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)

Hasil pada uji TSIA menunjukkan bahwa keempat isolat berwarna kuning pada bagian *slant* dan *butt* dan tidak terbentuk H_2S atau tidak adanya cincin hitam pada media (Sya'baniar, dkk. 2017). Hal ini menunjukkan bahwa keempat isolat mampu memfermentasi glukosa, laktosa, dan sukrosa. Pada isolat FS5 dan SS1 tidak terdapat gas, sedangkan isolat ES3 dan FS4 terbentuk gas yang ditandai dengan terangkatnya media.

6.6 Uji *Methyl Red (MR)* dan *Voges-Proskauer (VP)*

Hasil uji MR pada isolat SS1, ES3, FS4, dan FS5 menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya warna merah saat penambahan reagen *Methyle red*, hal ini menandakan bahwa keempat isolat membentuk produk akhir asam. Hasil dari uji VP pada semua isolat berwarna kuning atau negatif setelah ditambah KOH 3%, hal ini menandakan bakteri tersebut tidak membentuk produk akhir non asam atau netral (Thakur, dkk. 2017).

6.7 Ketahanan Garam 4% Dan 6,5%

Hasil uji ketahanan garam menunjukkan bahwa isolat SS1, ES3, FS4, dan FS5 dapat tumbuh pada konsentrasi garam 4% dan 6,5%. Bakteri asam laktat yang mampu tumbuh pada konsentrasi garam 5-30% termasuk ke dalam kelompok bakteri asam laktat holofilik (Ismail, dkk. 2018). Setiap bakteri asam laktat memiliki toleransi yang berbeda untuk tumbuh pada media dengan konsentrasi garam yang berbeda. Bakteri asam laktat dari genus *Lactobacillus*, *Pediococcus* dan *Leuconostoc* diketahui memiliki kemampuan tumbuh dan berkembang pada lingkungan dengan salinitas yang tinggi (Ismail, dkk. 2018).

6.8 Ketahanan Suhu Pada 10°C, 37°C dan 45°C

Hasil pengujian menunjukkan isolat SS1 dapat tumbuh pada suhu 10°C, 37°C, dan 45°C, hal ini ditandai dengan terbentuknya endapan dalam jumlah banyak pada dasar tabung. Bakteri asam laktat yang mampu tumbuh pada suhu 10 - 45°C termasuk ke dalam

kelompok bakteri mesofilik (Ismail, dkk. 2018). Sedangkan isolat ES3, FS4 dan FS5 pada suhu 37°C dan 45°C terbentuk banyak endapan pada dasar tabung yang menandakan bahwa isolat mampu tumbuh dengan baik, namun pada suhu 10°C tidak terdapat banyak endapan, hal ini menandakan bahwa isolat (ES3, FS4, FS5) tumbuh kurang optimal pada suhu 10°C. Suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri asam laktat adalah 30 - 40°C dan setiap genus bakteri asam laktat memiliki suhu optimum pertumbuhan yang berbeda (Ismail, dkk. 2018).

6.9 Uji Tipe Fermentasi

Hasil uji tipe fermentasi pada empat isolat bakteri asam laktat menunjukkan bahwa isolat SS1 dan FS5 termasuk kedalam kelompok homofermentatif. Hal ini ditandai dengan tidak adanya gelembung gas dalam tabung durham. Sementara itu untuk isolat ES3 dan FS4 termasuk kedalam kelompok heterofermentatif, yang ditandai dengan adanya gelembung gas dalam tabung durham. Bakteri yang bersifat homofermentatif tidak dapat menghasilkan CO₂ karena bakteri tersebut tidak memiliki enzim piruvat oksidase yang mampu mengubah piruvat menjadi CO₂ dan asetil fosfat yang kemudian menghasilkan hidrogen peroksida (Suardana, dkk. 2018).

Klasifikasi isolat bakteri didasarkan pada sifat morfologi koloni, morfologi sel, dan uji biokimia yang mengacu pada buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Hasil identifikasi menunjukkan isolat ES3, FS3, dan FS4 yang diperoleh diduga termasuk

kelompok bakteri asam laktat dari famili *Lactobacillaceae*, genus *Lactobacillus*. *Lactobacillus* memiliki sel berbentuk batang (basil), tetapi terdapat pula yang berantai pendek. Genus *Lactobacillus* termasuk ke dalam bakteri Gram positif, tidak berspora, tidak bergerak (non-motil), anaerob fakultatif, dengan kadar NaCl 3 – 7%. Koloni pada agar biasanya berdiameter 2-5 mm, elevasi cembung dengan tepi utuh serta tidak memiliki pigmen (Sulmiyati, dkk. 2018). Produk akhir fermentasi dari *Lactobacillus* adalah asam laktat, namun ada pula yang termasuk kelompok homofermentatif. Tumbuh pada suhu optimum sekitar 30 - 40°C.

Isolat SS1 diduga kelompok bakteri dari genus *Bacillus*. Karakter biokimia dari bakteri kelompok genus *Bacillus* adalah motil, mampu menghasilkan enzim katalase, sebagian mampu mengasimilasi jenis gula dan sebagian tidak, tidak dapat menghasilkan gas,

H₂S dan indol, serta bersifat aerob dan beberapa spesies bersifat anaerob fakultatif (Flori, dkk. 2020).

Bakteri asam laktat berpotensi dikembangkan dalam produksi *rennin like protease* (RLP) karena merupakan bakteri yang aman dan tidak bersifat patogen. Beberapa mikroba telah memproduksi RLP seperti *Bacillus cereus*, *Rhizomucor miehei*, *Lactobacillus* dan beberapa BAL memiliki kemampuan *milk clotting activity* seperti *Lactobacillus plantarum* 1.13, *Lactobacillus paracasei* 2.12 (Putranto, dkk. 2020 ; Putranto, dkk. 2021).

7. Karakterisasi Khamir

Karakterisasi khamir dilakukan dengan pengamatan morfologi koloni dan dilakukan uji biokimia seperti uji kapsul, uji urease, dan fermentasi gula seperti glukosa, galaktosa, sukrosa, laktosa, dan maltosa. Hasil pada masing-masing uji dapat dilihat pada Tabel 7.

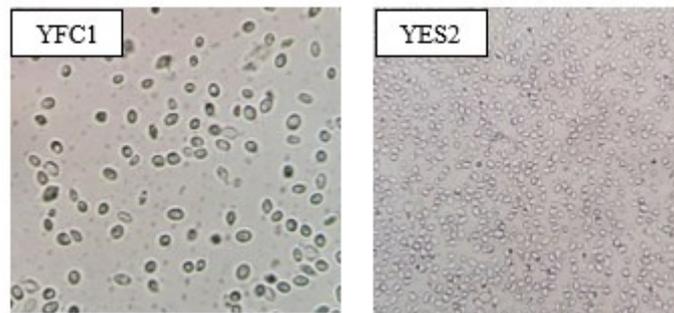
Tabel 7. Karakterisasi Khamir

Karakterisasi	Isolat	
	YFC - 1	YES - 2
Morfologi		
- Tekstur	- Krim	- Krim
- Warna	- Putih susu	- Putih susu
- Bentuk	- Bulat	- Bulat
- Elevasi	- Cembung	- Cembung
- Permukaan	- Halus	- Halus
- <i>Budding</i>	- Multilateral	- Multilateral
Bentuk Sel	Bulat oval	Bulat
Pertumbuhan media cair (MEB)	+	+
Uji Kapsul	+	+

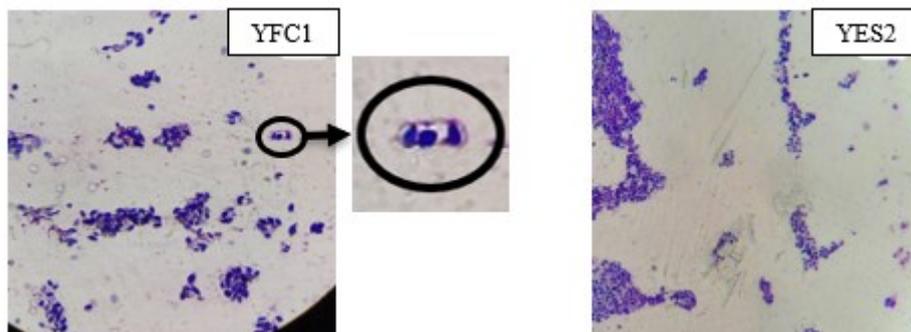
Uji Gula-Gula		
Glukosa	Kuning (+)	Kuning (+)
Galaktosa	Merah	Orange
Sukrosa	Merah	Kuning (+)
Laktosa	Merah	Merah
Maltose	Orange	Merah
Uji urease	+	+
Hasil identifikasi	<i>Saccharomyces</i>	<i>Debaryomyces</i>

Keterangan :

+ : terdapat kapsul / gas - : tidak ada kapsul / gas



Gambar 5. Hasil Pengamatan Bentuk Sel Khamir. Perbesaran 1000x



Gambar 6. Hasil Pengamatan Perwarnaan Kapsul. Perbesaran 1000x

7.1 Morfologi Koloni

Hasil pengamatan morfologi dari solat YFC1 dan YES2 memiliki tekstur *butyrous* (krim), warna putih, bentuk bulat, elevasi cembung (*convex*), dan permukaan yang halus.

7.2 Pengamatan Bentuk Sel

Pengamatan bentuk sel dilakukan dengan pengamatan preparat segar menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x. Berdasarkan hasil

pada Gambar 5. pada isolat YFC1 dan YES2 memiliki bentuk sel bulat, oval, dengan *budding* multilateral, dan tidak terlihat adanya pseudohifa.

7.3 Uji Kapsul

Uji kapsul dilakukan dengan pewarnaan menggunakan kristal violet dan dibilas menggunakan CuSO_4 . Hasil dari pewarnaan kapsul dapat dilihat pada Gambar 6.

Berdasarkan Gambar 6. hasil dari pengujian kapsul yaitu pada isolat YFC1 terlihat adanya lingkaran berwarna biru pucat mengelilingi sel-sel berwarna ungu yang diduga merupakan kapsul, sedangkan isolat YES2 tidak terdapat kapsul disekitar selnya. Kapsul pada khamir berfungsi sebagai pelindung dinding sel yang dapat mempertahankan sel dari kondisi lingkungan yang asam (Linawati, dkk. 2021).

7.4 Uji Urease

Hasil pada uji urease untuk isolat YFC1 menunjukkan *slant* berwarna merah muda dan *but* berwarna merah muda kekuningan, sedangkan YES2 menunjukkan *slantt* dan *butt* berwarna merah muda yang menunjukkan hasil positif, hal ini menandakan bahwa isolat mampu menghasilkan enzim urease. Prinsip dari uji urease adalah urease akan mengubah substrat urea menjadi amoniak dan karbondioksida dan akan menciptakan lingkungan yang alkalin pada medium, hal ini ditandai dengan adanya perubahan warna dari kuning menjadi merah muda pada indikator *phenol red* (Thakur, dkk. 2017).

7.5 Fermentasi Gula

Hasil dari fermentasi gula dari isolat YFC1 yaitu hanya mampu memfermentasi glukosa dan muncul gas pada tabung durham, kemudian maltosa hanya saja untuk memfermentasi maltosa cukup lemah karena warna yang dihasilkan *orange* dan tidak terdapat gas. Isolat YES2 mampu memfermentasi glukosa, sukrosa yang ditandai dengan terbentuknya warna

dari merah menjadi kuning, dan dapat memfermentasi galaktosa dan maltosa cukup lemah karena warna yang dihasilkan adalah *orange/kuning* lemah. Terbentuknya gas pada tabung durham hanya pada glukosa dan sukrosa saja. Perubahan warna media terjadi karena pemanfaatan gula sebagai sumber karbon mampu menghasilkan asam, sehingga terjadi perubahan pH saat proses fermentasi, sedangkan terbentuknya gas pada tabung durham terjadi karena adanya proses fermentasi gula menjadi etanol dan melepaskan CO₂ atau bersifat fermentatif (Rahmawati, dkk. 2017; Anggrayeni & Kusdiyantini, 2019).

7.6 Pertumbuhan Pada Media Cair

Pertumbuhan media cair dilakukan menggunakan media *Malt extract broth* (MEB). Pada uji pertumbuhan media cair isolat YFC1 dan YES2 tumbuh pada dasar tabung membentuk endapan putih dan tidak adanya pelikel pada permukaan. Menurut Anggrayeni & Kusdiyantini, (2019) terbentuknya endapan pada dasar tabung menunjukkan khamir dasar (*bottom yeast*) yang tidak pertumbuhannya terhambat, dan memproduksi CO₂ secara lambat sehingga sel-sel mengumpul pada dasar tabung.

Khamir diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologi makroskopis, mikroskopis, dan uji biokimia dengan mengacu pada buku *The Yeast A Taxonomy Study Edition 5th*, (2011). Berdasarkan ciri-ciri karakteristik pada isolat YFC1 diduga termasuk kedalam genus *Saccharomyces*. Khamir *Saccharomyces* memiliki morfologi koloni

berbentuk bulat, berwarna putih dan krem, tekstur krim, permukaan halus dan kusam, elevasi datar, sedikit menonjol, terlipat, dan cembung. *Saccharomyces* memiliki bentuk sel bulat, oval, dan silinder memanjang. *Saccharomyces* juga dapat tumbuh pada media cair dengan adanya endapan putih atau krem pada dasar media dan tidak terdapat pelikel. *Saccharomyces* diketahui merupakan khamir yang dapat menambah aroma dan rasa pada produk pangan, karena memiliki aktivitas proteolitik dan lipolitik yang tinggi, sehingga dapat menghidrolisis protein maupun lemak untuk menghasilkan asam amino, ester, asam lemak, etanol etanol, acetaldehid, ethil acetate dan ethyl butyrate yang merupakan komponen rasa dan aroma (Rizal, dkk. 2018)

Isolat YES2 diduga berasal dari genus *Debaryomyces* yang memiliki sel berbentuk bulat, oval, sampai silindris dengan atau tanpa pseudohifa, cenderung lemah dan lamban dalam memfermentasi gula (Kurtzman, dkk. 2006). Terlihat bahwa pada isolat YES2 mampu memfermentasi glukosa, sukrosa dengan menghasilkan warna kuning pada media, namun cenderung lemah dalam memfermentasi galaktosa yang ditandai dengan terbentuknya warna *orange*.

KESIMPULAN

Berdasarkan identifikasi masalah pada penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa jumlah bakteri asam laktat dari ekstrak dan *fresh cheese* stroberi masing-masing yaitu $1,9 \times 10^4$ CFU/mL

dan $1,8 \times 10^4$ CFU/g, sedangkan untuk khamir sebesar $5,2 \times 10^5$ CFU/mL dan $6,4 \times 10^4$ CFU/g. Bakteri asam laktat yang ditemukan diduga berasal dari genus *Lactobacillus* sedangkan untuk khamir diduga berasal dari genus *Saccharomyces* dan *Debaryomyces*. Isolat bakteri asam laktat dan khamir dapat menghasilkan enzim proteolitik ekstraseluler yang ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni serta memiliki nilai *milk clotting activity* yang memiliki kemampuan dalam menggumpalkan susu. Isolat yang memiliki potensi sebagai pengganti rennet karena memiliki aktivitas proteolitik rendah dan *milk clotting activity* tinggi yaitu isolat FS4 yang diduga berasal dari genus *Lactobacillus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Alici, E. H. dan Arabaci, G. (2018). A novel serine protease from strawberry (*Fragaria ananassa*): Purification and biochemical characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114 (2017) : 1295–1304. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.165>
- Amira, B. A., Besbes, S., Attia, H. dan Blecker, C. (2017). Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. *International Journal of Food Properties*, 20 (1) : S76–S93. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1289959>

- Anggraeni, S. L., Jayus, J., Ratnadewi, A. A. I. dan Nurhayati, N. (2022). Edamame protein hydrolysis using *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus paracasei* produce short peptides with higher antioxidant potential. *Biodiversitas*, 23 (7) : 3604–3613. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d230737>
- Anggrayeni, Y. T. W. dan Kusdiyantini, E. (2019). Isolasi Dan Identifikasi Morfologi Serta Biokimia Khamir Hasil Isolasi Dari Buah Tomat (*Lycopersicum Esculentum*) Yang Berpotensi Menghasilkan Bioetanol. *Bioma : Berkala Ilmiah Biologi*, 21 (1) : 16–24.
- Balthazar, C. F., Santillo, A., Guimarães, J. T., Capozzi, V., Russo, P., Caroprese, M., Marino, R., Esmerino, E. A., Raices, R. S. L., Silva, M. C., Silva, H. L. A., Freitas, M. Q., Granato, D., Cruz, A. G. dan Albenzio, M. (2019). Novel milk-juice beverage with fermented sheep milk and strawberry (*Fragaria × ananassa*): Nutritional and functional characterization. *Journal of Dairy Science*, 102 (12) : 10724–10736.
- Flori, F., Mukarlina, M. dan Rahmawati, R. (2020). Karakterisasi *Bacillus* spp. dan *Fusarium* sp. Dari Tanaman Lada (*Piper nigrum* L.) Di Desa Jaga. *Jurnal Protobiont*, 9 (1): 50–55.
- Hengkengbala, S. I., Lintang, R. A. J., Sumilat, D. A., Mangindaan, R. E. P., Ginting, E. L. dan Tumembouw, S. (2021). Karakteristik Morfologi dan Aktivitas Enzim Protease Bakteri Simbion Nudibranch. *Jurnal Pesisir Dan Laut Tropis*, 9 (3) : 83–94.
- Ismail, Y. S., Yulvizar, C. dan 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>
- Kieliszek, M., Pobiega, K., Piwowarek, K. dan Kot, A. M. (2021). Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria. *Molecules*, 26 (7).
- Kristanti, N. D., Warnaen, A. dan Daning, D. R. A. (2017). Titik Kontrol Kritis Pada Pengolahan Susu Pasteurisasi Di Koperasi Unit Desa (KUD) Dau Kabupaten Malang. *Sains Peternakan*, 15 (1): 1. <https://doi.org/10.20961/sainspet.v15i1.4134>
- Kurtzman C.P. dan Piškur J. (2006). *Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts (in Comparative Genomics: Using Fungi as Models*. Berlin: Springer, 29–46. ISBN 978-3-540-31480-6.

- Linawati, Rusmiyanto, E. dan Kurniatuhadi, R. (2021). Khamir Potensial Probiotik Hasil Isolasi dari Fermentasi Jus Jeruk Siam (*Citrus nobilis* var. *microcarpa*). *Jurnal Biologica Samudra*, 3 (2): 1–18.
- Manab, A., Sawitri, M. E., Umam, K., Awwaly, A., Andriani, R. D. dan Putri, G. M. (2022). Protease Kelor (*Moringa Oleifera*) sebagai Koagulan Susu dalam Pembuatan Keju. *Prosiding Seminar Teknologi Dan Agribisnis Peternakan*, 14–15.
- Prasetyo, T. F., Isdiana, A. F. dan Sujadi, H. (2019). Implementasi Alat Pendeteksi Kadar Air pada Bahan Pangan Berbasis Internet Of Things. *SMARTICS Journal*, 5(2): 81–96.
<https://doi.org/10.21067/smartics.v5i2.3700>
- Pratiwi, E. (2020). Keragaman Karakter Morfologi dan Biokimia Isolat Khamir Rizosfer dan Endofit Tanaman Padi. *Buletin Plasma Nutfah*, 26 (1): 39–50.
- Putranto, W., Mustopa, A., Mamangkey, J. dan 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.
- Putranto, W. S., Mustopa, A. Z., Kusumawati, A. dan Prastyowati, A. (2021). The Purification Of Rennin-Like Protease From *Lactobacillus paracasei* Isolated From Ettawa Goat Milk. *Annales Bogorienses*, 24 (2): 74.
- Putranto, W. S., Suhartono, M. T., Kusumaningrum, H. D., Giriwono, P. E. dan Mustopa, A. Z. (2020). A novel rennin like protease from *Lactobacillus plantarum* 1.13 isolated from Indonesian fermented meat (Bakasam). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29.
- Putranto, W. S., Suhartono, M. T., Kusumaningrum, H. D., Giriwono, P. E., Mustopa, A. Z. dan Chairunnisa, H. (2018). *Lactobacillus casei* 2.12 Isolated from Ettawa Goat Milk Showed Milk Activity.
- Putranto, W. S., Suradi, K., Chairunnisa, H., Mustopa, A. Z., Giriwono, P. E., Kusumaningrum, H. D. dan Suhartono, M. T. (2017). *Enterococcus faecium* 1.15 Isolated from Bakasam Showed Milk Clotting Activity. *Annales Bogorienses*, 21 (1): 9.
- Putri, A. L. dan Kusdiyantini, E. (2018). Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat dari pangan fermentasi berbasis ikan (Inasua) yang diperjual belikan di Maluku-Indonesia. *Jurnal Biologi Tropika*, 1(2): 6.

- Putri, S. Y. V., Putranto, W. S. dan Pratama, A. (2020). Sifat Fisik dan Akseptabilitas Keju yang Ditambahkan CaCl_2 Menggunakan Ekstrak Jahe Merah. *Jurnal Peternakan Indonesia (Indonesian Journal of Animal Science)*, 22 (1): 29.
- Rahmawati, F. C., Kusdiyantini, E., & Budiharjo, A. (2017). Isolasi dan Identifikasi Molekuler Khamir dari Molase serta Kemampuannya dalam Produksi Etanol. *Jurnal Biologi*, 6(4), 89–98.
- Rizal, S., Kustyawati, M. E. dan Hasanudin, U. (2018). Pengaruh Konsentrasi *Saccharomyces cerevisiae* terhadap Kadar Abu, Kadar Protein, Kadar Lemak dan Kandungan Beta-Glukan Tempe. *Seminar Nasional UNS*, 2 (1): 96–103.
- Roostita, T., Suryaningsih, L., Lengkey, H. A. W., Pratama, A. dan 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.
- Setiadarma, W., Mayun Permana, D. G. dan 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>
- Simamora, C. J. K. dan Sukmawati, S. (2020). Identification and Characterization of PrTK 2 Bacterial Isolate Producing Extracellular Protease Enzyme From Tempeh Rubber Seeds. *Bioscience*, 4 (1): 79.
<https://doi.org/10.24036/0202041108255-0-00>
- Sri Hastuti, U., Sarwendah Asri Nugraheni, F. dan Al Asna, P. M. (2017). Identifikasi dan Penentuan Indeks Hidrolisis Protein pada Bakteri Proteolitik dari Tanah Mangrove di Margomulyo, Balikpapan. *Proceeding Biology Education Conference*, 14(1): 265–270.
- Suardana, I. W., Sukoco, H. dan Antara, N. S. (2018). Identifikasi Bakteri Asam Laktat Isolat 18A Secara Fenotipik. *Buletin Veteriner Udayana*, 10 (1): 1.
<https://doi.org/10.24843/bulvet.2018.v10.i01.p01>
- Sulmiyati, Said, N. S., Fahrodi, D. U., Malaka, R. dan Maruddin, F. (2018). The characteristics of lactic acid bacteria isolated from Indonesian commercial kefir grain. *Malaysian Journal of Microbiology*, 14 (7): 632–639.
- Sya'baniar, L., Erina dan Sayuti, A. (2017). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) Genus *Lactobacillus* dari Feses Orangutan Sumatera (*Pongo abelii*) di Kebun Binatang Kasang Kulim Bangkinang Riau. *JIMVET*, 01 (3): 351–359.

- Thakur, M., Deshpande, H, W. dan Bhate, M. A. (2017). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria and their Exploration in Non-Dairy Probiotic Drink. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(4): 1023–1030.
<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.604.127>
- Utama, C. S., Zuprizal, Hanim, C. dan Wihandoyo. (2018). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Selulolitik yang Berasal dari Jus Kubis Terfermentasi. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 7 (1): 1–6.
- Wardhani, A. K., Uktolseja, J. L. dan Djohan. (2020). Identifikasi Morfologi Dan Pertumbuhan Bakteri Pada Cairan Terfermentasi Silase Pakan Ikan. *Seminar Nasional Pendidikan Biologi Dan Saintek (SNPBS) Ke-V*, 5 (1): 411–419.
- Wulandari, E., Harlia, E., & Permatasari, M. C. (2021). Karakteristik Fisik dan Kimia *Fresh Cheese* dengan Ekstrak Stroberi (*Fragaria ananassa*) sebagai Koagulan. *Jurnal Ilmu Ternak Universitas Padjadjaran*, 21 (2): 117.
<https://doi.org/10.24198/jit.v21i2.36318>
- Wulandari, E. Y., Hindun, I. dan Husamah, H. (2020). Pengaruh suhu pasteurisasi dan lama penyimpanan pada *refrigerator* terhadap jumlah koloni bakteri susu sapi. *Prosiding Seminar Nasional V 2019*, 147–152.