
SKRINING BAKTERI ASAM LAKTAT DAN YEAST POTENSIAL PROTEOLITIK EKSTRASELULER DAN MILK CLOTTING ACTIVITY DARI GETAH PEPAYA (*CARICA PAPAYA L.*) DAN FRESH CHEESE

SKRINING OF LACTIC ACID BACTERIA AND YEAST POTENTIAL EXTRACELLULAR PROTEOLYTIC AND MILK CLOTTING ACTIVITY FROM LATEKS AND FRESH CHEESE PAPAYA (*CARICA PAPAYA L.*)

Received : Sept 12th 2023

Accepted : Oct 10th 2023

Felicia Aliifah¹

Mia Miranti Rustama²

Wendry Putranto Setiyadi³

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

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

³Fakultas Peternakan,
Universitas Padjadjaran,
Jatinangor, Kab. Sumedang,
45363, Indonesia

*Korespondensi:

Wendry Putranto Setiyadi

³Fakultas Peternakan,
Universitas Padjadjaran

Jln. Ir. Soekarno km. 21
Jatinangor, Kab. Sumedang
45363

Jawa Barat

e-mail:

wendry@unpad.ac.id

Abstract, *Fresh cheese is a type of cheese without a fermentation process which is formed due to the milk coagulation process using the enzyme rennin. The use of rennin can be replaced using protease enzymes produced from papaya fruit sap and microorganisms. Protease enzymes from microorganisms are more profitable because they are easy to produce and grow faster. This research was carried out by making fresh cheese using papaya sap coagulum and then isolating lactic acid bacteria and yeast which have proteolytic activity and milk clotting activity. This research method is exploratory descriptive. The results showed that the total amount of LAB from fresh cheese and papaya latex was 2.4×10^6 CFU/g and 1.1×10^7 CFU/ml respectively, and the total amount of yeast was 1.5×10^3 CFU/g and 2.4×10^6 CFU/ml. Candidate LAB isolates were found to have proteolytic activity with the highest to lowest Proteolytic Index values with isolate codes G4, G3, G5, and G1 of 1.7; 1.3; 1.08 and G1 was negative or < 0 . Y1 yeast isolate had an IP of 1.36 and Y4 isolate was negative or < 0 . The MCA values for isolates G4, G3, G5 and G1 were 267.2 SU/ml, 250.95 SU/ml, respectively. 156.8 SU/ml and 138.1 SU/ml and both yeast isolates could not coagulate milk. The four bacterial isolates found in this study did not belong to the LAB group. Isolates G3 and G4 have characteristics that are almost similar to the genus *Bacillus*, while the two yeast isolates belong to the genus *Pichia* and *Debaryomyces*. So in this study no potential isolates were found to come from lactic acid bacteria or yeast.*

Keywords: *Extracellular protease, Fresh cheese, Lactic acid bacteria, Milk clotting activity, Papaya (*Carica papaya*), Yeast.*

Sitasi:

Aliifah, F., Rustama, M. M., Setiyadi. W.P. (2023). Skrinig Bakteri Asam Laktat dan Yeast Potensial Proteolitik Ekstraseluler dan Milk Clotting Activity dari Getah Pepaya (*Carica papaya L.*) dan Fresh Cheese. *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*, 4(2):167-186.

PENDAHULUAN

Keju adalah produk olahan susu yang mengandung berbagai macam nutrisi, seperti protein, karbohidrat, lemak, mineral dan vitamin (Resnawati, 2020). Keju dapat dibagi menjadi keju keras dan keju lunak. *Fresh cheese* termasuk kedalam keju lunak yang proses pembuatannya tidak melalui fermentasi dan salah satu jenis keju paling sederhana (Nugroho, dkk. 2018). *Fresh cheese* dapat dibuat menggunakan susu dengan koagulan enzimatik ataupun kimia (Sulistyo, dkk. 2018).

Pada umumnya enzim rennin yang berasal dari lambung anak sapi digunakan dalam pembuatan keju. Ketersediaan rennin dibatasi oleh jumlah anak sapi yang tersedia dan juga proses penyembelihan hewan harus berdasarkan syariat Islam (Sulistyo, dkk. 2018). Alternatif lain pengganti rennin adalah dengan menggunakan enzim protease berasal dari tumbuhan dan mikroba. Tumbuhan yang ditemukan mengandung enzim protease diantaranya buah pepaya (Prihatini & Dewi, 2021), nanas (Rakhmah & Suryani, 2016) dan jahe (Nafisah, 2020).

Pepaya (*Carica papaya*) memiliki kandungan enzim papain yang mampu menghidrolisis bagian *kappa casein* pada susu sehingga dapat menggumpalkan susu (Sulistyo, dkk. 2018). Papain dapat ditemukan pada bagian getah pepaya (Nuryati, dkk. 2018). Aktivitas koagulasi susu pada papain berpengaruh terhadap *milk clotting*

activity. Hal ini yang menyebabkan kerusakan pada rasa dan tekstur keju (Tajalsir, dkk. 2021). Sulmiyati & Said (2018) menemukan bahwa pada konsentrasi 1-2% getah pepaya menghasilkan rasa pahit pada dangke yang merupakan sejenis olahan keju tradisional asal Kabupaten Enrekang, Sulawesi Selatan dan pada konsentrasi getah pepaya 0,5-1% dihasilkan dangke yang tidak pahit.

Mikroorganisme seperti bakteri dan *yeast* diketahui memiliki kemampuan menghasilkan enzim proteolitik. Mikroorganisme mempunyai kemampuan tumbuh lebih cepat, mudah diproduksi dalam jumlah besar dan biaya produksi terjangkau (Susanti, dkk. 2018). Bakteri asam laktat dan *yeast* yang mampu menghasilkan enzim protease dapat menghidrolisis ikatan peptida pada protein sehingga protein terurai menjadi bentuk yang lebih sederhana (Pratama, dkk. 2021). Keberadaan *yeast* pada keju dapat mempengaruhi rasa, aroma dan penampilan khas keju (Fröhlich-Wyder, dkk. 2019).

Kemampuan bakteri asam laktat dan *yeast* dalam memproduksi enzim protease dapat dicirikan dengan terbentuknya zona bening (*clear zone*) di sekitar koloni pada media selektif (Fitriana & Asri, 2022). Nur, dkk. (2015) menemukan bahwa pada dangke dengan koagulum getah buah pepaya ditemukan bakteri asam laktat spesies *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactobacillus fermentum*. Sarkono & Rahayu (2006) melaporkan bahwa pada buah pepaya ditemukan bakteri asam laktat

spesies *Lactobacillus acidophilus*. Beberapa genus bakteri asam laktat yang dapat ditemukan dalam keju, yaitu *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconoctoc* dan *Streptococcus* (Bottari, dkk. 2018).

Milk Clotting Activity (MCA) terjadi karena pembentukan gumpalan susu akibat adanya kerja enzim proteolitik yang dapat memecah ikatan peptida pada susu. MCA menjadi tahapan penting pada proses pembuatan keju karena kasein (protein susu) dapat digumpalkan membentuk *curd* (Setiadarma, dkk. 2020). Nilai MCA yang tinggi menunjukkan bahwa kerja enzim semakin baik kemampuannya dalam menghidrolisis kappa-kasein pada susu (Putri, dkk. 2020). Iskandar (2017) membuktikan bahwa nilai *milk clotting activity* pada getah pepaya kering sebesar 1878,99 SU/ml dengan kadar air 65%. Shresta (2019) juga menemukan bahwa nilai MCA dari getah pepaya murni sebesar 286,396 SU/ml dengan waktu 83 detik dan suhu 70°C.

Pada penelitian ini dilakukan penggunaan getah pepaya sebagai koagulan pembuatan *fresh cheese*. Isolasi BAL dan *yeast* menggunakan media selektif *deMan Rogosa and Sharp Agar* (MRSA) dan *Malt Extract Agar* (MEA) yang dicampurkan dengan susu skim. Isolat mikroorganisme yang didapatkan akan diuji aktivitas proteolitik, *milk clotting activity* dan karakterisasi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan isolat bakteri asam laktat dan *yeast* dari getah pepaya *fresh cheese*

yang memiliki aktivitas proteolitik ekstraseluler dan nilai *Milk Clotting Activity*.

MATERI DAN METODE PENELITIAN

1. Bahan Penelitian

Bahan utama pada penelitian ini, yaitu susu sapi yang diperoleh dari Koperasi Serba Usaha (KSU) Kecamatan Tanjungsari, Kabupaten Sumedang dan getah dari buah pepaya varietas California yang diperoleh dari UPTD Balai Pengembangan Benih Hortikultura dan Aneka Tanaman Jatinangor. Bahan lainnya yang digunakan, yaitu amoxicillin, bahan-bahan uji biokimia, *deMan Rogosa and Sharpe Agar* (MRSA), *deMan Rogosa and Sharpe Broth* (MRSB), *Malt Extract Agar* (MEA), *Malt Extract Broth* (MEB) dan susu skim. Alat yang digunakan dalam penelitian ini, diantaranya aluminium foil, *appendorf*, autoklaf, cawan petri *disposable*, erlenmeyer, *finntip*, gelas *beaker*, *hot plate*, inkubator, jarum ose, kaca objek, kain saring, *laminar air flow*, mikropipet, mikroskop, neraca analitik, *parafilm*, plastik *wrap*, sentrifugasi, tabung reaksi, thermometer dan *ziplock*.

2. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan, yaitu deskriptif eksploratif. Penelitian ini terdiri dari sterilisasi alat & bahan dan pembuatan media; penyadapan getah pepaya; pembuatan *fresh cheese* pepaya; isolasi dan enumerasi bakteri asam laktat dan *yeast*; pemurnian bakteri asam laktat

dan *yeast*; uji proteolitik bakteri asam laktat dan *yeast*; uji *Milk Clotting Activity* (MCA); dan karakterisasi bakteri asam laktat dan *yeast*.

3. Prosedur Penelitian

Pembuatan *Fresh Cheese* Pepaya

Susu sapi 500 ml dipasteurisasi hingga mencapai suhu 70°C selama 30 detik. Susu didinginkan hingga suhu 40°C kemudian dipindahkan ke dalam wadah steril dan ditambahkan 2 ml getah buah pepaya lalu diaduk selama 1 menit. Susu didiamkan 1 jam hingga terbentuk penggumpalan kasein (*curd*). *Curd* dipotong berbentuk dadu menggunakan pisau. *Curd* dengan *whey* dipisahkan menggunakan kain saring dan *whey* dibiarkan menetes selama 10 menit. *Curd* yang telah terpisah dari *whey* dilakukan pengepresan dengan beban 1 kg selama 60 menit agar tidak ada kadar air yang masih tersisa. Penggaraman dilakukan dengan menambahkan NaCl 2% dari masa *curd*. Hasil yang diperoleh, yaitu gumpalan *curd* padat yang disimpan dalam wadah lalu ditempatkan dalam suhu kulkas untuk dianalisis (Nugroho, dkk. 2018).

Isolasi dan Enumerasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dan *Yeast*

Tahap isolasi BAL dan *yeast* dari larutan getah pepaya dan *fresh cheese* pepaya yang dilakukan masing-masing dengan mengambil 1 ml larutan getah pepaya, 1 g *fresh cheese* pepaya dan 1 ml susu diambil dan disuspensikan ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml NaCl fisiologis sebagai pengenceran 10⁻¹

kemudian dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10⁻⁵. Masing-masing 0,1 ml suspensi dari 3 pengenceran terakhir, dituang di atas media kemudian disebar menggunakan batang L dengan metode *spread plate*. Cawan petri berisi ekstrak dan *fresh cheese* dibungkus dengan *parafilm* dan *ziplock* kemudian diinkubasi. Koloni yang tumbuh pada media dilakukan enumerasi lalu hasil inkubasi didokumentasikan. BAL dan *yeast* dari sampel getah, susu dan *fresh cheese* pepaya ditandai dengan terbentuknya zona bening (*clear zone*) proteolitik terbesar selanjutnya dilakukan pemurnian. Syarat khusus penghitungan koloni bakteri berkisar 30-300 koloni. Enumerasi dilakukan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) seperti yang dikemukakan oleh Jacob, dkk tahun 2018 dengan rumus sebagai berikut:

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

Syarat khusus penghitungan koloni *yeast* dilakukan dengan menghitung koloni berkisar 10-150 koloni. Dilaporkan dalam CFU/g atau CFU/ml berdasarkan jumlah rata-rata set rangkap tiga dan bulatkan hitungan sampai dua angka penting (Lingle, dkk. 2023).

Pemurnian dan Kultivasi Bakteri Asam Laktat dan *Yeast*

Koloni yang tumbuh pada media MRSA dan MEA dengan karakteristik adanya zona bening dan zona penggumpal diinokulasikan kembali ke media baru menggunakan ose steril

lalu digores dengan metode *streak plate*. Cawan petri dibalut dengan *parafilm* dan plastik *wrap* kemudian diberi label. Biakan murni selanjutnya diinkubasi dengan suhu 37°C selama 48 jam untuk BAL dan 25°C selama 48 jam untuk *yeast* agar terbentuk koloni yang tumbuh terpisah atau tunggal (Padmavathi, dkk. 2018). Isolat murni bakteri dan *yeast* dari hasil pemurnian diinokulasikan menggunakan ose steril dengan cara digores ke masing-masing cawan petri berisi media MRSA dan MEA. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam untuk bakteri dan suhu 25°C selama 48 jam untuk *yeast*. Hasil kultivasi disimpan di kulkas pada suhu 4°C (Widiatmono, dkk. 2020).

Uji Proteolitik Bakteri Asam Laktat dan *Yeast*

Uji proteolitik mengacu pada penelitian Putranto, dkk. (2019) yang dilakukan menggunakan metode *Block Agar* dengan cara membuat media A : isolat potensial dikultur secara merata (*swab*) pada media MRSA+skim 3% dan MEA+skim 3% kemudian diinkubasi dan dibuat *plug*. Media B : membuat media MRSA+skim 3% dan MEA+skim 3% lalu dibuat lubang *plug* menggunakan bagian belakang *finntip* 1 ml steril pada media tersebut. *Plug* di media A yang ditumbuhi BAL dan *yeast* dipindahkan ke lubang *plug* di media B seperti memasang *block* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam untuk bakteri dan suhu 25°C selama 48 jam untuk *yeast*. Pengukuran dilakukan dengan mengu-

kur diameter zona bening yang terbentuk di sekitar koloni, zona penggumpal, diameter koloni dan indeks proteolitik. Seperti yang dikemukakan oleh Sumardi, dkk tahun 2018 dengan rumus indeks proteolitik (IP) sebagai berikut:

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

Uji *Milk Clotting Activity* (MCA)

Uji MCA mengacu pada El-Tanboly, dkk. (2013) dengan cara isolat BAL dan *yeast* terpilih dengan adanya zona bening pada media MRSA dan MEA masing-masing diinokulasikan ke MRSB dan MEB 5 ml lalu diinkubasi. Isolat disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 g selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan atau *crude enzyme* (enzim kasar) dipisahkan pada *ependorf* steril. MCA diukur dengan direaksikan 10% susu skim dengan 10mM CaCl₂ kemudian diambil 2,5 ml dari hasil reaksi tersebut dan ditambahkan 0,5 ml ekstrak enzim sampel dari hasil sentrifugasi. Inkubasi pada *waterbath* di suhu 37°C dengan waktu 5 menit untuk MRSB dan MEB. Waktu yang dibutuhkan dari penambahan enzim sampel sampai terjadinya penggumpalan susu diamati dan dicatat. Aktivitas penggumpalan susu ditentukan dengan perhitungan MCA 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)

Uji Karakterisasi Bakteri Asam Laktat

Identifikasi bakteri asam laktat mengacu pada buku "*Bergey's Manual of Determination Bacteriology 9th*". Karakterisasi dilakukan secara makroskopis dengan pengamatan morfologi koloni, yaitu mengamati warna, bentuk, tekstur, elevasi dan tepi koloni. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan gam untuk melihat bentuk sel. Uji biokimia dilakukan menggunakan pengujian *Methyl Red-Voges Proskauer* (MR-VP), *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), tipe fermentasi, indol, katalase, motilitas, ketahanan suhu dan ketahanan kadar garam.

Uji Karakterisasi Yeast

Identifikasi *yeast* mengacu pada buku "*The Yeasts A Taxonomic Study*". Karakterisasi dilakukan secara makroskopis dengan pengamatan morfologi koloni, yaitu mengamati warna, bentuk, tekstur, permukaan, elevasi dan tepi koloni. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan membuat preparat segar lalu diamati bentuk dan *budding* sel. Uji biokimia dilakukan menggunakan pengujian fermentasi gula, urease, kapsul dan pertumbuhan pada media cair.

Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian disajikan secara deskriptif dalam bentuk data kualitatif yang dapat memberikan gambaran mengenai suatu data yang diperoleh berupa jumlah bakteri asam laktat dan *yeast*, aktivitas proteolitik bakteri asam laktat dan *yeast*, nilai *Milk Clotting Activity* (MCA) dan karakterisasi makroskopis dan mikroskopis dari isolat terpilih. Data ditampilkan dalam bentuk gambar dan tabel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fresh Cheese

Fresh cheese dilakukan menggunakan susu 500 ml. *Fresh cheese* menunjukkan warna putih kekuningan dan menghasilkan berat *curd* sebesar 16% atau 80 gam. Hal ini berasal dari warna bahan baku yang digunakan dalam pembuatan *fresh cheese*, yaitu susu. Warna putih berasal dari adanya butiran koloid lemak, kalsium fosfat dan kalsium kaseinat sedangkan adanya warna kuning disebabkan oleh pigmen beta-karoten dan riboflavin (Sharma, dkk. 2020). Adanya getah pepaya sebagai koagulan juga dapat membentuk warna kuning pada *fresh cheese*. Syaikal (2016) menyatakan bahwa semakin tinggi jumlah penggunaan getah pepaya maka semakin pekat warna kuningnya. *Curd* yang terbentuk disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. *Fresh Chese Pepaya*

Fresh cheese yang dihasilkan memiliki tekstur lembut, rapuh dan kadar air yang banyak. Sulisty, dkk. (2018) mengatakan bahwa tekstur keju dipengaruhi oleh konsentrasi lemak yang tinggi dalam susu sehingga menghasilkan keju yang lunak dan rapuh sedangkan kandungan lemak yang rendah akan menghasilkan tekstur keras dan warna pucat. Lunak dan rapuhnya keju juga diduga karena getah pepaya yang digunakan kualitasnya kurang baik sehingga aktivitas enzim kurang optimal dalam menggumpalkan susu (Pulungan, dkk. 2020).

Fresh cheese yang dihasilkan memiliki aroma harum khas keju yang berasal dari susu sehingga aromanya kuat dan keju yang dihasilkan tidak beraroma pepaya. Hal ini disebabkan karena lemak dalam susu sapi yang mengandung asam lemak volatil yang berpengaruh dalam menghasilkan aroma khas susu (Pulungan, dkk. 2020). Rasa yang dihasilkan, yaitu gurih dan pahit. Adanya rasa pahit disebabkan oleh peptida yang terbentuk sebagai hasil proteolisis (kelebihan aktivitas protease) dari koagulan getah pepaya dan lipolisis (enzim dipecah oleh lemak) (Pulungan, dkk. 2020).

Jumlah Total Bakteri Asam Laktat dan *Yeast*

Hasil penghitungan Total Plate Count (TPC) bakteri dan khamir pada sampel fresh cheese, getah pepaya dan susu selanjutnya dianalisis berdasarkan Standar Plate Count (SPC) yang hasilnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. *Total Plate Count* Bakteri Asam Laktat

Sampel	TPC (CFU/ml/gr)
<i>Fresh Cheese</i>	$2,4 \times 10^6$
Getah Pepaya	$1,1 \times 10^7$
Susu Pasteurisasi	$7,5 \times 10^2$

Hasil penghitungan *Total Plate Count* (TPC) bakteri asam laktat menunjukkan bahwa pada sampel *fresh cheese*, yaitu $2,4 \times 10^6$ CFU/g, getah pepaya sebanyak $1,1 \times 10^7$ CFU/ml dan susu sebanyak $7,5 \times 10^2$ CFU/ml. Total BAL pada susu pasteurisasi hasilnya lebih rendah dibandingkan dengan *fresh cheese* dan getah pepaya. Hal ini dapat disebabkan karena terdapat proses pemanasan pada susu yang mengakibatkan sebagian BAL mati (Nawangsih, dkk. 2020). Pada getah pepaya ditemukan jumlah bakteri lebih banyak dibandingkan *fresh cheese* dan susu pasteurisasi yang menunjukkan bahwa di dalam getah pepaya terdapat mikroorganisme yang artinya pada getah pepaya BAL lebih tahan untuk hidup. Hal ini didukung oleh penelitian lain yang menemukan mikroorganisme dengan 14 jenis jamur dan 2

jenis bakteri terdapat dalam getah kuning buah manggis (Suada & Suniti, 2014). John & Taysum (1963) dalam Salomez, dkk. (2014) yang telah mengisolasi 1000 strain eubacteria, yaitu diketahui bahwa bakteri lebih banyak daripada *yeast* dalam getah segar pohon karet. Genus tersebut diantaranya *Bacillus*, *Lactococcus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Streptomyces* dan *Micrococcus*. Bakteri dan *yeast* dalam getah segar pohon karet memiliki jumlah total mikroorganisme 10^5 - 10^7 CFU/ml (Salomez, dkk. 2014). Hasil TPC pada media MEA untuk menghitung jumlah khamir, disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. *Total Plate Count* Khamir

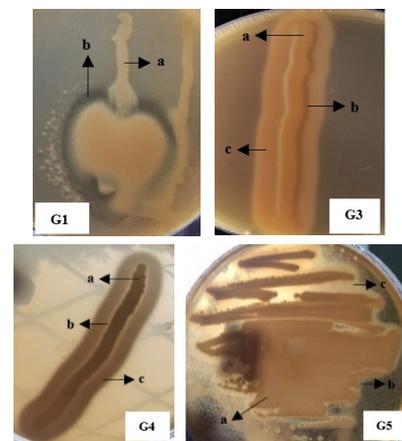
Sampel	TPC (CFU/ml/gr)
<i>Fresh Cheese</i>	$1,5 \times 10^3$
Getah Pepaya	$2,4 \times 10^6$
Susu Pasteurisasi	5×10^2

Hasil penghitungan TPC *yeast* pada sampel *fresh cheese*, yaitu $1,5 \times 10^3$ CFU/g, getah pepaya sebanyak $2,4 \times 10^6$ CFU/ml dan susu pasteurisasi sebanyak 5×10^2 CFU/ml. Total *yeast* pada getah pepaya diketahui lebih banyak jumlahnya dibandingkan dengan *fresh cheese* dan susu pasteurisasi. Hal ini menunjukkan bahwa di dalam getah pepaya terdapat mikroorganisme lebih banyak yang artinya pada getah pepaya *yeast* lebih tahan untuk hidup. John & Taysum (1963) dalam Salomez, dkk. (2014) menemukan bahwa *yeast* terdapat dalam getah segar pohon karet tetapi

jumlahnya lebih sedikit dibandingkan dengan bakteri.

Skrining Kandidat Isolat Bakteri Asam Laktat Proteolitik

Bakteri asam laktat diindikasikan dengan terbentuknya zona bening (*clear zone*) dan zona penggumpal (*clotting zone*) di sekitar koloni bakteri. Pada penelitian ini bakteri asam laktat diisolasi dari sampel *fresh cheese*, getah pepaya dan susu pasteurisasi. Berdasarkan Gambar 2. didapatkan satu kandidat isolat BAL berasal dari *fresh cheese* yang diberi kode G1. Bakteri ini menunjukkan adanya pembentukan zona bening disekitar koloni. Hal ini menunjukkan bahwa di dalam *fresh cheese* terdapat nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroba ini (Detha, 2019).



Gambar 2. Hasil Skrining Kandidat Bakteri Asam Laktat Asal Getah dan Fresh Cheese Pepaya

Keterangan: (a) Koloni, (b) Zona bening (Clear zone), dan (c) Zona penggumpal (Clotting zone)

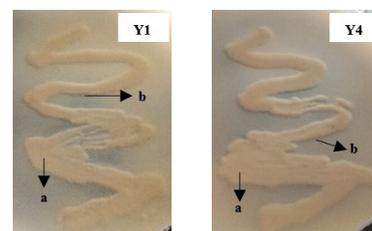
Adanya zona bening disekitar koloni bakteri G1 menunjukkan isolat tersebut memiliki potensi untuk menghasilkan proteolitik. Pada dangke dengan koagulan getah pepaya ditemukan BAL spesies *Lactobacillus plantarum* (Melliawati dkk., 2015), *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactobacillus fermentum* (Nur, dkk. 2015). Berdasarkan Gambar 2. didapatkan tiga kandidat isolat BAL berasal dari getah pepaya yang menunjukkan ciri terbentuknya zona bening dan zona penggumpal di sekitar koloni dengan kode G3, G4 dan G5. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga isolat tersebut dapat menghasilkan enzim proteolitik yang memiliki kemampuan dalam menggumpalkan susu. Pada penelitian ini tidak ditemukan BAL berasal dari susu yang berpotensi memiliki aktivitas proteolitik.

Skrining Kandidat Isolat *Yeast* Proteolitik

Yeast proteolitik diindikasikan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni. Berdasarkan Gambar 3. terlihat bahwa satu kandidat isolat *yeast* berasal dari *fresh cheese* menunjukkan pembentukan zona bening yang kurang jelas terlihat disekitar koloni. Namun, hal ini masih dapat menggambarkan bahwa isolat *yeast* tersebut memiliki aktivitas proteolitik. *Yeast* dapat tumbuh di kondisi lingkungan dengan persediaan air yang cukup (Puspita, 2020). *Fresh cheese* memiliki kelembaban yang cukup tinggi sehingga *yeast* dapat ditemukan di-

dalamnya. Kurnianingtyas (2020) juga menemukan *yeast* dengan genus *Candida* dan *Trichosporon* dari keju Halloumi.

Berdasarkan Gambar 3. terlihat bahwa satu kandidat isolat *yeast* dari getah pepaya menunjukkan pembentukan zona bening yang kurang jelas terlihat disekitar koloni. Hal ini menunjukkan bahwa *yeast* tersebut memiliki kemampuan aktivitas proteolitik. Keberadaan *yeast* dalam getah pepaya dapat berasal dari buah pepaya. Parameswari (2015) menemukan bahwa *yeast* umumnya berasal dari buah pepaya dengan genus *Saccharomyces*. Beberapa peneliti juga menemukan bahwa di bagian permukaan kulit buah juga ditemukan *yeast* seperti: spesies *yeast* epifit, *Candida tropicalis* ditemukan di permukaan buah mangga dan *Rhodotorula* ditemukan di permukaan buah cabai Sriram & Poornachanddra (2013) dalam Hartati, dkk. (2021). Pada penelitian ini tidak ditemukan *yeast* berasal dari susu yang berpotensi memiliki aktivitas proteolitik.



Gambar 3. Hasil Skrining Kandidat Khamir Asal Getah (Y1) dan *Fresh Cheese* Pepaya (Y4)

Keterangan: (a) Koloni, (b) Zona bening (*Clear zone*)

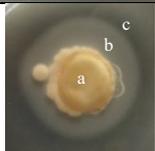
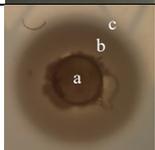
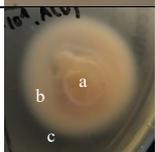
Hasil Uji Proteolitik

Kemampuan bakteri asam laktat dan *yeast* dalam memproduksi enzim protease dapat dicirikan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni (Fitriana & Asri, 2022). Aktivitas proteolitik bakteri dan *yeast* dapat diketahui dengan menghitung diameter zona bening (*clear zone*), zona penggumpal (*clotting zone*) dan indeks proteolitik. Bakteri asam laktat memiliki karakteristik penggumpalan, yaitu (1) Karakter penggumpalan (*clotting*) di sekitar koloni serta terbentuknya zona bening, dan (2) Karakter yang menunjukkan aktivitas penggumpalan (*clotting*) namun tidak membentuk zona bening disekitar koloni (Putranto, dkk. 2018).

Hasil uji aktivitas proteolitik pada kandidat isolat bakteri asam laktat dengan waktu inkubasi 24 jam di suhu 37°C menghasilkan zona bening dan *clotting zone* yang terbentuk di sekitar koloni pada semua isolat. Hal ini menunjukkan bahwa keempat kandidat isolat BAL dari *fresh cheese* dan getah pepaya berpotensi untuk menghasilkan *Rennin Like Protease* (RLP). Hasil uji aktivitas proteolitik dapat dilihat pada Tabel 3.

Pada Tabel 3. dapat dilihat bahwa isolat G5 menunjukkan diameter zona bening paling besar, yaitu sebesar 27 mm. Isolat lainnya, yaitu G4, G3 dan G1 masing-masing menunjukkan diameter zona bening sebesar 25 mm, 23 mm dan 3 mm.

Tabel 3. Hasil Uji Proteolitik Kandidat Bakteri Asam Laktat

Isolat Potensial Bakteri Asam Laktat					
Kode Isolat	Hasil	<i>Clear Zone</i> (mm)	<i>Clotting Zone</i> (mm)	Diameter Koloni (mm)	Indeks Proteolitik (IP)
G1		3	8	12	-
G3		23	19	10	1,3
G4		25	22	9	1,7
G5		27	22	13	1,08

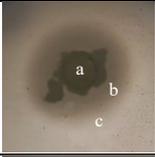
Keterangan: (a) Koloni, (b) Zona penggumpal (*Clotting zone*), dan (c) Zona bening (*Clear zone*)

Keempat isolat tersebut juga menghasilkan zona penggumpal dengan diameter terbesar pada G4 dan G5 sebesar 22 mm. Isolat lainnya, yaitu G3 dan G1 masing-masing menunjukkan diameter zona penggumpal sebesar 19 mm dan 8 mm. Diameter zona bening dan *clotting zone* yang besar mengindikasikan bahwa bakteri tersebut memiliki aktivitas penggumpalan yang tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi diameter *clotting zone* menunjukkan aktivitas *Rennin Like Protease* (RLP) yang tinggi (Putranto, dkk. 2018). Putranto (2018) menyatakan bahwa terbentuknya zona bening disebabkan karena enzim proteolitik menghidrolisis substrat kasein (skim) menjadi peptida dan asam amino sehingga terjadi perubahan warna dari putih kecoklatan menjadi tidak berwarna. Hidrolisat tersebut merupakan sumber protein yang dipakai dalam metabolisme pertumbuhan sel bakteri. Diameter zona bening dari keempat isolat selanjutnya dihitung nilai Indeks Proteolitik (IP) untuk diketahui perbandingan antara diameter zona bening terhadap diameter koloni isolat. Adanya IP memberikan gambaran perbandingan besarnya diameter koloni bakteri dengan zona bening yang terbentuk. Pada penelitian ini diketahui bahwa nilai IP tertinggi ke terendah dari keempat isolat, yaitu G4 sebesar 1,7; G3 sebesar 1,3; G5 sebesar 1,08 dan G1 hasilnya negatif atau < 0 . Kandidat

isolat BAL dengan kode G3, G4 dan G5 termasuk ke dalam kategori yang memiliki nilai IP sedang ($1 > IP < 3$) sedangkan pada isolat G1 tidak dihasilkan IP karena < 0 . Cahyaningum dkk. (2021) menyatakan bahwa indeks proteolitik dikategorikan rendah apabila nilai $IP \leq 1$, kategori sedang dengan IP antara 1 sampai 3 ($1 > IP < 3$) dan kategori tinggi dengan $IP \geq 3$. Indeks 3 sangat potensial untuk dikembangkan sebagai sumber protease.

Pada Tabel 4. menunjukkan bahwa kedua isolat *yeast* menghasilkan diameter zona bening yang kurang jelas atau tidak terlihat. Pada isolat Y1 dihasilkan zona bening dengan ukuran 0,5 mm, zona penggumpal 1,2 mm dan diameter koloni sebesar 1,1 mm. Pada isolat Y4 dihasilkan zona bening sebesar 0,2 mm dengan diameter koloni 1,4 mm. Kemampuan kedua isolat *yeast* dalam mendegradasi protein dapat dilihat pada nilai Indeks Proteolitik (IP) yang diperoleh. Hasil penghitungan IP dari kedua isolat *yeast*, yaitu 0,54 pada isolat Y1 dan isolat Y4 hasilnya negatif atau < 0 . Cahyaningum, dkk. (2021) menyatakan bahwa indeks proteolitik dikategorikan rendah apabila nilai $IP \leq 1$. Hal ini membuktikan bahwa kedua isolat *yeast* yang diperoleh dalam penelitian ini merupakan *yeast* yang memiliki aktivitas proteolitik yang sangat rendah.

Tabel 4. Hasil Uji Proteolitik Kandidat Khamir

Kode Isolat	Hasil	Isolat Potensial Khamir			Indeks Proteolitik (IP)
		Clear Zone (mm)	Clotting Zone (mm)	Diameter Koloni (mm)	
Y1		26	23	11	1,36
Y4		2	-	14	-

Keterangan: (a) Koloni, (b) Zona penggumpal (*Clotting zone*), dan (c) Zona bening (*Clear zone*)

Hasil Uji *Milk Clotting Activity* (MCA)

Hasil uji MCA pada Tabel 5. menunjukkan bahwa keempat isolat mampu menggumpalkan susu dengan rata-rata nilai MCA paling tinggi pada isolat G4, yaitu sebesar 267,2 SU/ml. dan koagulasi terjadi dengan cepat selama 45 detik. Semakin cepat koagulasi yang terjadi maka semakin tinggi nilai MCA. Semakin tinggi nilai MCA maka semakin baik pula kemampuan suatu enzim dalam menghidrolisis kappa-kasein pada susu

(Putranto, dkk. 2020). Sun, dkk. (2014) dalam Putranto, dkk. (2020) menemukan bahwa suhu optimal untuk *Rennin Like Protease* (RLP) umumnya pada suhu kisaran 30-75°C. Shrestha & Maskey (2019) menyatakan bahwa nilai MCA yang dihasilkan dari getah pepaya murni sebesar 286,396 SU/ml. Pada penelitian ini hasil penggumpalan susu menggunakan isolat bakteri tidak berbeda jauh dengan penggunaan getah pepaya. Hasil uji MCA dapat dilihat pada Gambar 4 dan 5.

Tabel 5. Hasil Uji *Milk Clotting Activity* (MCA) Bakteri Asam Laktat

Kode Isolat	Waktu (detik)		Rata-rata Waktu (detik)	Nilai MCA (SU/ml)		Rata-rata Nilai MCA (SU/ml)
	Pengulangan			Pengulangan		
	1	2		1	2	
G1	90	84	87	133,3	142,9	138,1
G3	51	45	48	235,3	266,6	250,95
G4	47	43	45	255,3	279,1	267,2
G5	83	71	77	144,6	169	156,8



Gambar 4. Hasil Uji MCA Pengulangan Pertama

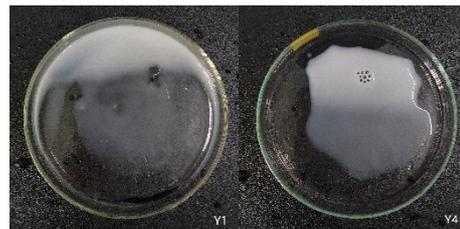


Gambar 5. Hasil Uji MCA Pengulangan Kedua

Hasil uji MCA menunjukkan bahwa karakteristik *curd* bertekstur lunak dan berwarna putih kecoklatan yang berasal dari media yang digunakan, yaitu MRS *broth*. Isolat bakteri G3 dan G4 merupakan bakteri gam positif berspora yang menghasilkan nilai MCA lebih tinggi daripada bakteri gam negatif pada isolat G1 dan G5. Zhang, dkk. (2021) menemukan *Bacillus subtilis* yang merupakan bakteri berspora memiliki nilai MCA sebesar 874,5 SU/ml dengan suhu optimum 55°C. Pada isolat G1 dan G5 merupakan bakteri gam negatif diduga merupakan bakteri proteolitik yang dapat mendegradasi protein sehingga mampu menggumpalkan susu.

Hasil uji MCA isolat *yeast* menunjukkan bahwa kedua isolat tidak dapat menggumpalkan susu. Pada suhu 50°C supernatan kedua isolat *yeast* dimasukkan kedalam substrat MCA kemudian setelah didiamkan selama 2 jam kedua isolat tidak menunjukkan ciri-ciri penggum-

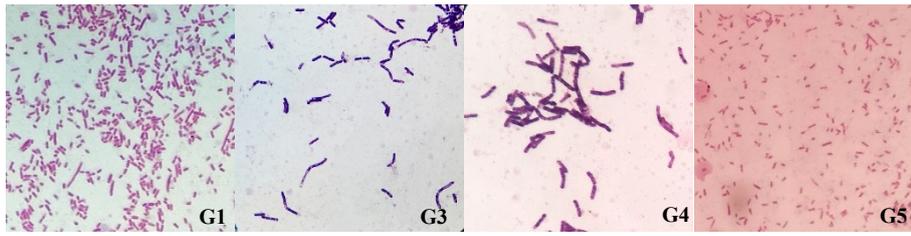
palan sehingga dapat disimpulkan bahwa kedua isolat *yeast* tidak memiliki aktivitas penggumpalan susu. Hal ini dapat disebabkan karena zona bening yang dihasilkan pada uji proteolitik sangat kecil bahkan tidak terdapatnya enzim protease pada *yeast* yang ditemukan dari *fresh cheese* dan getah pepaya. Berikut merupakan hasil uji MCA kedua isolat *yeast* pada **Gambar 6.**



Gambar 6. Hasil Uji MCA Khamir

Uji Karakterisasi Bakteri Asam Laktat

Hasil identifikasi menunjukkan bahwa keempat isolat bakteri tersebut bukan termasuk ke dalam kelompok bakteri asam laktat. Krishnan (2012) dalam Mubarokhah, dkk. (2020) bahwa



Gambar 7. Pewarnaan Gram

ditemukan *Bacillus* berasal dari pepaya yang merupakan endofit di dalam biji dan buah pepaya. Isolat G3 dan G4 merupakan bakteri gam positif berspora yang memiliki kemiripan dengan genus *Bacillus*. Berikut merupakan hasil dari pewarnaan gam dari keempat isolat bakteri menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x pada Gambar 7.

Pada penelitian ini terdapat proses penyadapan getah dengan cara menyayat kulit buah pepaya yang diduga bakteri tersebut terbawa dari permukaan kulit buah pepaya atau berasal dari buahnya. Dapat disimpulkan bahwa keempat isolat bakteri yang ditemukan dari *fresh cheese* dan getah pepaya tidak ditemukan bakteri asam laktat. Bakteri yang ditemukan tersebut diduga merupakan bakteri epifit atau endofit dari buah pepaya dimana bakteri tersebut termasuk ke dalam bakteri proteolitik yang genusnya belum diketahui.

Uji Karakterisasi *Yeast*

Identifikasi genus *yeast* mengacu pada buku "*The Yeasts A Taxonomic Study*". Identifikasi isolat *yeast* dari *fresh cheese* dan getah pepaya pada penelitian ini telah dilakukan melalui pengamatan makroskopis, mikros-

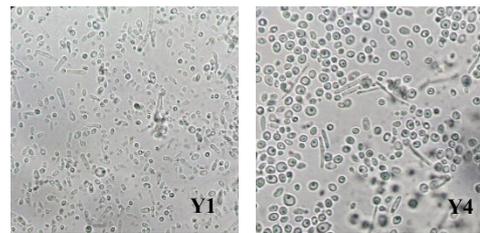
kopis dan uji biokimia. Berdasarkan hasil identifikasi isolat *yeast* dengan kode Y1 bahwa *yeast* ini memiliki karakteristik morfologi koloni berwarna putih susu, berbentuk sirkuler, tekstur lembut, permukaan kusam, elevasi convex dan tepian rata. Morfologi sel berbentuk bulat, *budding* multilateral dan memiliki pseudohifa. Uji biokimia yang dihasilkan menunjukkan reaksi positif kuat pada fermentasi gula glukosa dan sukrosa, positif urease, tidak berkapsul, isolat tumbuh pada media MEB dengan terbentuknya endapan putih di dasar tabung dan pelikel tipis di permukaan tabung. Berdasarkan kemiripan tersebut dapat disimpulkan bahwa isolat Y1 merupakan *Pichia*.

Nurhalimah, dkk. (2022) menemukan bahwa genus *Pichia* memiliki ciri koloni berbentuk bulat, warna putih atau krem, bertekstur padat, elevasi convex, dan permukaan kusam tidak mengkilat. Ciri sel berbentuk elips, bulat atau memanjang, membentuk pseudohifa tetapi jarang membentuk *true* hifa dan reproduksi secara aseksual dengan pertunasan (*budding*) multilateral. Kurtzman, dkk. (2011) dan Lina, dkk. (2021) meneliti bahwa genus *Pichia* ini memiliki kemampuan melakukan fermentasi glukosa dan sukrosa, dapat menghasilkan urease,

tidak berkapsul dan tumbuh pada media cair dengan membentuk pelikel serta endapan putih di dasar tabung. Berdasarkan kemiripan tersebut dapat disimpulkan bahwa isolat Y1 merupakan *Pichia* sp yang diisolasi dari *fresh cheese*. *Pichia* ditemukan pada keju didukung oleh penelitian Bintsis (2021) yang menemukan spesies *Pichia fari-nosa* dan *Pichia membranefasciens* dari keju Manouri. *Fresh cheese* memiliki kelembaban yang tinggi dan genus *Pichia* dapat tumbuh di lingkungan yang ekstrim dengan pH rendah atau tinggi dimana *fresh cheese* pepaya yang dihasilkan rasanya pahit (basa) (Ma, dkk. 2021).

Hasil penelitian pada isolat Y4 menunjukkan karakteristik berwarna putih mengkilat, berbentuk sirkuler, tekstur lembut, permukaan licin, elevasi convex dan tepian rata. Morfologi sel berbentuk bulat, *budding* multilateral dan memiliki pseudohifa. Uji biokimia yang dihasilkan menunjukkan reaksi positif lemah pada fermentasi gula, positif urease, tidak berkapsul, isolat tumbuh pada media MEB dengan terbentuknya endapan putih di dasar tabung. Kurtzman, dkk. (2011) mengatakan bahwa genus *Debaryomyces* mampu memfermentasi gula tetapi sangat lambat dan lemah, tidak mampu memfermentasi laktosa, mampu menghasilkan urease, tidak memiliki kapsul dan dapat tumbuh pada media cair yang dicirikan dengan terbentuknya endapan putih di dasar tabung, sehingga dapat disimpulkan bahwa isolat Y4 diduga merupakan *Debaryomyces*. dari getah

pepaya. *Debaryomyces* mampu bertahan hidup di kondisi ekstrim, seperti garam tinggi atau tingkat pH yang relatif basa seperti getah pepaya (Ramos-Moreno, dkk. 2021). Berikut merupakan hasil pengamatan sel *yeast* dari isolat Y1 dan Y4 menggunakan mikroskop perbesaran 1000x pada Gambar 8.



Gambar 8. Preparat Segar Khamir

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat diketahui bahwa Jumlah bakteri asam laktat yang didapatkan dalam *fresh cheese* sebesar $2,4 \times 10^6$ CFU/g dan getah pepaya sebesar $1,1 \times 10^7$ CFU/ml. Jumlah total *yeast* dalam *fresh cheese* sebesar $1,5 \times 10^3$ CFU/g dan getah pepaya sebesar $2,4 \times 10^6$ CFU/ml. Kandidat isolat BAL dan *yeast* berasal dari *fresh cheese* dan getah pepaya dapat menghasilkan enzim proteolitik dengan karakteristik adanya zona bening dan *clotting zone* di sekitar koloni. Keempat isolat bakteri memiliki Indeks Proteolitik tertinggi ke terendah pada masing-masing isolat G4, G3, G5 dan G1, yaitu sebesar 1,7; 1,3; 1,08 dan G1 hasilnya negatif atau < 0 . Isolat *yeast* Y1 memiliki IP sebesar 1,36 dan isolat Y4 hasilnya negatif atau < 0 . Tidak dihasilkannya IP karena zona bening yang terbentuk sangat kecil. Nilai *Milk*

Clotting Activity (MCA) dari ekstrak kasar protease isolat bakteri berasal dari *fresh cheese* dan getah pepaya didapatkan rata-rata nilai MCA tertinggi pada isolat G4, G3, G5 dan G1, yaitu sebesar 267,2 SU/ml, 250,95 SU/ml, 156,8 SU/ml dan 138,1 SU/ml. Pada ekstrak kasar protease isolat *yeast* tidak diperoleh nilai MCA karena kedua isolat *yeast* tidak dapat menggumpalkan susu. Pada penelitian ini tidak didapatkan isolat potensial berasal dari bakteri asam laktat maupun *yeast* karena empat isolat bakteri yang ditemukan bukan termasuk kelompok BAL dan dua isolat *yeast* yang ditemukan tidak dapat menggumpalkan susu.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih ditujukan kepada Dr. Wendry Setiyadi Putranto, M.Si. selaku ketua *project* penelitian dan Dr. Mia Miranti Rustama, MP. selaku dosen pembimbing penelitian yang telah membantu penulis dalam pengambilan data dan pengerjaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Bintsis, T. (2021). *Yeasts* In Different Types Of Cheese. *AIMS microbiology*, 7 (4), 447.
- Cahyaningum, E., Dan, W., & Lunggani, A. T. (2021). Isolasi dan Pengaruh Monosodium Glutamat Terhadap Pertumbuhan Bakteri Proteolitik Limbah Cair Tahu. *Bioma: Berkala Ilmiah Bio-logi*, 23 (2), 84-90.
- Detha, A., Datta, F. U., Beribe, E., Foeh, N., & Ndaong, N. (2019). Karakteristik Bakteri Asam Laktat Yang Diisolasi Dari Susu Kuda Sumba (*Characteristics of Lactic Acid Bacteria from Sumba Mares Milk*). *Jurnal Kajian Veteriner*, 7 (1), 85–92.
<https://doi.org/10.35508/jkv.v7i1.08>
- El-Tanboly, E.-S., El-Hofi, M., Youssef, Y. B., El-Desoki, W., & Ismail, A. (2013). Utilization of Salt Whey From Egyptian Ras (Cephalotyre) Cheese In Microbial Milk Clotting Enzymes Production. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 12(1), 9–20.
- Fitriana, N., & Asri, M. T. (2022). Aktivitas Proteolitik Pada Enzim Protease dari Bakteri Rhizosphere Tanaman Kedelai (*Glycine max* L.) di Trenggalek. *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 11(1), 144–152.
- Fröhlich-Wyder, M., Arias-Roth, E., & Jakob, E. (2019). Cheese *Yeasts*. *Yeast*, 36(3), 129–141.
- Hartati, S., Wiyono, S., Hidayat, S. H., & Sinaga, M. S. (2021). Identifikasi Isolat *Yeast* Berpotensi Sebagai Agens Antagonis dan Uji Produksi Toksin Hemolisin. *Agrikultura*, 32 (2), 190-198.
- Irfan, M. (2018). Kualitas Mikrobiologis Dangke Yang Dibuat Pada Berbagai Level Ekstrak Getah Pepaya dan Suhu Pemanasan. *Perbal: Jurnal Pertanian Berkelanjutan*, 6 (3), 7–15.

- Iskandar, N. M. (2017). *Pengaruh Penambahan Cacl₂ Pada Proses Koagulasi Susu Menggunakan Getah Pepaya Kering Terhadap Rendemen, Milk Clotting Activity, Dan Kadar Air Fresh Cheese*. Universitas Padjadjaran.
- Kurnianingtyas, M. V. (2020). *Isolasi dan Identifikasi Yeast dari Keju Halloumi yang Diproduksi oleh UKM Mazaraart Artisan Cheese Yogyakarta*. Universitas Gadjah Mada.
- Kurtzman, C., Fell, J. W., & Boekhout, T. (Eds.). (2011). *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier.
- Lina, L., Rusmiyanto, E., & Kurniatuhadi, R. (2021). *Yeast Potensial Probiotik Hasil Isolasi dari Fermentasi Jus Jeruk Siam (*Citrus nobilis* var. *Microcarpa*). *Biologica Samudra*, 3(2), 115-132.*
- Ma, Y., Sun, Z., Zeng, Y., Hu, P., Sun, W., Liu, Y., ... & Tang, Z. (2021). *Isolation, Identification and Function of *Pichia anomala* AR2016 and Its Effects on the Growth and Health of Weaned Pigs. *Animals*, 11 (4), 1179.*
- Nafisah, L. (2020). *Konsentrasi Jahe Merah (*Zingiber Officinale* Rosc) Terhadap Karakteristik Fisikokimia dan Organoleptik Daging Sayat Ayam Kampung (*Gallus domesticus*). *Jurnal Teknologi Pangan Dan Hasil Pertanian*, 15 (1), 11–16.*
- Nawangsih, E. N., Valensia, S., Lahni, H. N., Rahmat, I. I., & Paryanti, S. P. Y. (2020). *Gambaran Kualitas Mikrobiologi Susu Sapi di Desa" X"*, Cibodas, Lembang. In *Prosiding Seminar Hasil Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Unjani Expo (Unex)*, 1(1), 40-43.
- Nugoho, P., Dwiloka, B., & Rizqiati, H. (2018). *Rendemen, Nilai Ph, Teksstur, Dan Aktivitas Antioksidan Keju Segar Dengan Bahan Pengasam Ekstrak Bunga Rosella Ungu (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Jurnal Teknologi Pangan*, 2(1).*
- Nur, F., Hafsana, H., & Wahdiniar, A. (2015). *Isolasi Bakteri Asam Laktat Berpotensi Probiotik Pada Dangke, Makanan Tradisional Dari Susu Kerbau di Curio Kabupaten Enrekang. *Biogenesis: Jurnal Ilmiah Biologi*, 3 (1), 60–65.*
- Nurhalimah, N., Muhibuddin, A., & Syib'li, M. A. (2022). *Screening Of Yeast Isolates For The Biocontrol Of *Sclerotium rolfsii*. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23 (7).*
- Nuryati, N., Budiantoro, T., & Inayati, A. S. (2018). *Pembuatan Enzim Papain Kasar dari Biji, Daun dan Kulit Pepaya dan Aplikasinya untuk Pembuatan Virgin Coconut Oil (VCO). *Jurnal Teknologi Agro-Industri*, 5 (2), 77–89.*

- Pratama, A., Balia, R. L., & Suryaningsih, L. (2021). Pengaruh Penambahan *Yeast (Candida apicola)* Pada Sosis Fermentasi Daging Domba Terhadap Kualitas Fisik, Kimia Dan Akseptabilitas. *Agointek: Jurnal Teknologi Industri Pertanian*, 15 (2), 574–582.
- Prihatini, I., & Dewi, R. K. (2021). Kandungan Enzim Papain pada Pepaya (*Carica papaya* L) Terhadap Metabolisme Tubuh. *Jurnal Tadris IPA Indonesia*, 1 (3), 449–458.
- Pulungan, M. H., Kamilia, M. M., & Dewi, I. A. (2020). Optimasi Konsentrasi Enzim Papain Dan Suhu Pemanasan Pada Pembuatan Danke Dengan Response Surface Method (RSM). *Jurnal Teknologi Pertanian*, 21 (1), 57-68.
- Puspita, D. (2020). Isolasi, Identifikasi dan Uji Produksi *Yeast* yang Diisolasi Dari Nira Kelapa. *Biosfer: Jurnal Biologi Dan Pendidikan Biologi*, 5 (1), 1–5.
- Putranto, W. S., Suhartono, M. T., Kusumaningum, H. D., Giriwono, P. E., Mustopa, A. Z., & Chairunnisa, H. (2018). *Lactobacillus casei* 2.12 Isolated From Ettawa Goat Milk Showed Milk Clotting Activity. In *Proceeding The Fourth International Seminar On Animal Industry* (pp. 1-6).
- Putranto, W. S., Suhartono, M. T., Kusumaningum, H. D., EGiriwono, 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), 012048.
- Putranto, W. S., Suhartono, M. T., Kusumaningum, 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). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101818>
- Putri, S. Y. V, Putranto, W. S., & Pratama, A. (2020). Sifat Fisik dan Akseptabilitas Keju Yang Ditambahkan CaCl₂ Menggunakan Ekstrak Jahe Merah. *Jurnal Peternakan Indonesia (Indonesian Journal of Animal Science)*, 22 (1), 29–37.
- Rakhmah, R. F., & Suryani, T. (2016). Pemanfaatan Buah Lokal Sebagai Koagulan Soy Cheese. *Bioeksperimen: Jurnal Penelitian Biologi*, 2 (1), 8–16.

- Ramos-Moreno, L., Ruiz-Pérez, F., Rodríguez-Castro, E., & Ramos, J. (2021). *Debaryomyces hansenii* Is A Real Tool To Improve A Diversity Of Characteristics In Sausages and Dry-Meat Products. *Microorganisms*, 9 (7), 1512.
- Resnawati, H. (2020). Kualitas Susu Pada Berbagai Pengolahan Dan Penyimpanan. *Semiloka Nasional Prospek Industri Sapi Perah Menuju Perdagangan Bebas*, 497-502.
- Rheisa, M. D. (2021). *Efektivitas Hasil Pertumbuhan Jamur Aspergillus Flavus Pada Media Sda (Sabouraud Dextrose Agar) Dan Mea (Malt Extract Agar) Yang Dibandingkan Dengan Media Pda (Potato Dextrose Agar)* (Doctoral dissertation, Poltekkes Kemenkes Yogyakarta).
- Salomez, M., Subileau, M., Intapun, J., Bonfils, F., Sainte-Beuve, J., Vaysse, L., & Dubreucq, E. (2014). Microorganisms in Latex and Natural Rubber Coagula of *Hevea brasiliensis* and Their Impact On Rubber Composition, Structure And Properties. *Journal of Applied Microbiology*, 117 (4), 921-929.
- Sarkono, L. S., & Rahayu, E. S. (2006). Isolasi, Seleksi, Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin Dari Berbagai Buah Masak. *Sains Dan Sibernatika*, 19 (2006).
- Saweng, C., Sudimartini, L. M., & Suartha, I. N. (2020). Uji Cemaran Mikroba pada Daun Mimba (*Azadiractha indica* A. Juss) Sebagai Standarisasi Bahan Obat Herbal. *Indonesia Medicus Veterinus*, 9 (2), 270–280.
- Setiadarma, W., Permana, D. G. M., & Nocianitri, K. A. (2020). Optimasi Waktu Inkubasi *Lactobacillus rhamnosus* SKG 34 Dalam Produksi Enzim Penggumpal Susu. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan (ITEPA)*, 9 (2), 108–116.
- Sharma, A., Bachheti, A., Sharma, P., Bachheti, R. K., & Husen, A. (2020). Phytochemistry, Pharmacological Activities, Nanoparticle Fabrication, Commercial Products and Waste Utilization of *Carica papaya* L.: A Comprehensive Review. *Current Research in Biotechnology*, 2, 145–160.
- Shrestha, N. K. (2019). *Optimization of crude papaya (Carica papaya) protease in cream cheese preparation by response surface methodology* (Doctoral dissertation, Department of Food Technology Central Campus of Technology Institute of Science and Technology Tribhuvan University, Nepal).

- Suada, I. K., & Suniti, N. W. (2014). Isolasi dan Identifikasi Patogen Getah Kuning Manggis Melalui Pendekatan Postulat Koch dan Analisis Secara Molekuler. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*, 14 (2), 142-151.
- Sulistyo, B., Chairunnisa, H., & Wulandari, E. (2018). Pengaruh Penggunaan Kombinasi Enzim Papain dan Jus Lemon Sebagai Koagulan Terhadap Kadar Air, Berat Rendemen, dan Nilai Kesukaan *Fresh Cheese*. *Jurnal Ilmu Ternak Universitas Padjadjaran*, 18 (1), 8–15.
- Sulmiyati, S., & Said, N. S. (2018). Karakteristik Dangke Susu Kerbau Dengan Penambahan *Crude Papain Kering*. *Agitech*, 38 (3), 345–352.
- Susanti, E., Tirta, S., Paramitha, A., & Lutfiana, N. (2019). Seleksi Bakteri Proteolitik Dari Pangan Fermentasi Lokal Indonesia Sebagai Sumber Protease Untuk Produksi. *MSOpen B. Chapter Evi* . 78-92.
- Tajalsir, A. E., Ebraheem, A. S. A., Abdallah, A. M., Khider, F. J., Elsamani, M. O., & Ahmed, I. A. M. (2021). Partial Purification of Milk-clotting Enzyme From The Seeds Of Moringa Oleifera. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 58–62.
- Zhang, X., Tong, Y., Wang, J., Lyu, X., & Yang, R. (2021). Skrining of a *Bacillus subtilis* Strain Producing Both Nattokinase and Milk-Clotting Enzyme and Its Application In Fermented Milk With Thrombolytic Activity. *Journal of Dairy Science*, 104 (9), 9437–9449.
<https://doi.org/10.3168/jds.2020-19756>