



Contents list available at JKP website

## Jurnal Kesehatan Perintis

Journal homepage: <https://jurnal.upertis.ac.id/index.php/JKP>



### Isolasi Bakteri Asam Laktat Dari Tape Beras Ketan Hitam (*Oryza sativa* L Var. *Glutinosa*) dan Uji Aktivitas Enzim Protease

Epi Supri Wardi<sup>1</sup>, Bastian Nova<sup>2\*</sup>, Diza Sartika<sup>1</sup>, Fahrul Rozi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Perintis Indonesia, Sumatera Barat, Indonesia

<sup>2</sup>Fakultas Teknologi Pertanian, Kampus Limau Manis, Universitas Andalas, Sumatera Barat, Indonesia

#### Article Information :

Received 19 May 2025 ; Accepted 28 June 2025; Published 30 June 2025

\*Corresponding author: [bastiannova@ae.unand.ac.id](mailto:bastiannova@ae.unand.ac.id)

#### ABSTRAK

Bakteri Asam Laktat merupakan golongan bakteri yang dapat menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir fermentasi serta beberapa jenis enzim yang terlibat dalam proses metabolismenya. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menguji aktivitas enzim protease pada bakteri asam laktat dari tape beras ketan hitam serta melakukan identifikasi secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA terhadap bakteri asam laktat yang memiliki aktivitas enzim protease tertinggi. Lima isolat bakteri asam laktat berhasil diperoleh melalui tahap pemurnian, kemudian dipilih 3 isolat bakteri asam laktat untuk pengujian aktivitas enzim protease dengan kode 11, 13 dan 14. Hasil pengujian aktivitas enzim protease menunjukkan bahwa dari 3 isolat yang dipilih hanya 1 isolat memiliki aktivitas enzim protease (zona bening) yaitu isolat 11 dengan diameter rata-rata 8 mm, sedangkan kontrol positif berdiameter rata-rata 30 mm. Hasil diidentifikasi molekuler dengan gen 16S rRNA terhadap isolat yang memiliki aktivitas enzim protease menunjukkan bahwa isolat 11 memiliki homologi 100% dengan *Weissella confuse* strain 1841.

Kata kunci : Bakteri asam laktat, protease, tape beras ketan hitam, gen 16S rRNA

#### ABSTRACT

*Lactic Acid Bacteria* are a group of bacteria capable of producing lactic acid as the end product of fermentation and several types of enzymes involved in their metabolic processes. This study aims to isolate and test the protease enzyme activity of lactic acid bacteria from black glutinous rice tape and to perform molecular identification using the 16S rRNA gene on the lactic acid bacteria with the highest protease enzyme activity. Five lactic acid bacteria isolates were obtained through purification steps, and then three isolates were selected for protease enzyme activity testing, labeled as isolates 11, 13, and 14. The results of the protease enzyme activity test showed that out of the three selected isolates, only one isolate exhibited protease enzyme activity (clear zone), which was isolate 11 with an average diameter of 8 mm, whereas the positive control had an average diameter of 30 mm. Molecular identification using the 16S

*rRNA gene for the isolate with protease enzyme activity revealed that isolate 11 has 100% homology with Weissella confuse strain 1841.*

*Key words: Lactic acid bacteria, protease, , black glutinous rice tape, 16S rRNA gene*

## PENDAHULUAN

Tape ketan hitam merupakan makanan pembawa probiotik, yaitu makanan yang mengandung mikroba non patogen yang masih hidup dan secara aktif bermanfaat untuk meningkatkan kesehatan dengan menjaga keseimbangan dalam usus (Mambrasar 2010). Probiotik adalah polisakarida tak tercernakan yang berperan sebagai pendukung pertumbuhan dan aktivitas mikroflora saluran pencernaan dan terbukti memberikan efek menguntungkan dalam metabolisme, probiotik biasanya terdapat pada bakteri asam laktat

Bakteri asam laktat merupakan bakteri Gram positif memiliki bentuk bulat atau batang, tidak berspora, suhu  $\pm 40^{\circ}\text{C}$ , tidak motil, bersifat anaerob, tidak membentuk gelembung dan oksidase positif serta asam laktat sebagai produk utama fermentasi karbohidrat. Bakteri asam laktat (BAL) dikenal sebagai bakteri yang bermanfaat bagi industri makanan dan minuman, contohnya yoghurt, tape, tempe, keju, oncom (Susilawati 2016). Pada penelitian Suliasti 2020, dari hasil penelitiannya mengatakan bahwa tempe dan tape mengandung banyak macam bakteri asam laktat dengan karakter fisiologi yang beragam.

Bakteri asam laktat memiliki kemampuan memproduksi beberapa metabolit, juga memiliki daya menghasilkan suatu enzim protease disekitar dinding sel, membran sitoplasma atau di dalam sel (Arulmani 2007). Enzim protease dapat memutuskan ikatan peptida pada protein (Yulianti 2005). Enzim protease sangat bermanfaat dan mempunyai nilai jual yang baik karena peranannya yang sangat luas, contoh industri pengguna enzim protease antara lain industri deterjen, kulit, tekstil, makanan, pengolahan susu, farmasi, bir dan limbah.

Pada bidang keahlian seperti farmasi, protease bermanfaat dalam proses deproteinasi yaitu proses menghilangkan protein, dimana deproteinasi secara biologis

dilakukan dengan menggunakan enzim protease, yaitu enzim yang mampu menghidrolisis ikatan peptida dalam protein (Abun 2018). Proses deproteinasi diterapkan dalam pembuatan chitosan. Chitosan merupakan bahan alami yang bermanfaat sebagai pengawet makanan karena tidak beracun dan aman bagi kesehatan dan juga dapat digunakan sebagai pembungkus kapsul karena mampu melepaskan obatnya ke dalam tubuh secara terkontrol.

Enzim protease bisa diisolasi dari hewan, tanaman serta mikroorganisme seperti bakteri dan jamur. Penggunaan mikroorganisme untuk pembuatan enzim, khususnya protease memiliki banyak keuntungan, seperti mudah diproduksi dalam jumlah besar, efisien waktu dan dapat dibuat secara berkesinambungan dengan biaya yang murah. Mikroorganisme yang dapat menghasilkan protease dapat berupa bakteri, kapang maupun khamir. Protease dari bakteri merupakan jumlah yang paling banyak dibandingkan dengan sumber lain (Naiola dan Widhyastuti 2002).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Lestari (2018), isolat bakteri yang diisolasi dari sampel oncom merah pasca fermentasi 72 jam, terdapat satu isolat bakteri yaitu isolat IROD3, yang menunjukkan aktivitas protease diketahui dengan adanya zona bening berdiameter 78 mm di sekeliling koloni bakteri disekitar media Skim Milk Agar, kemudian penelitian yang dilakukan oleh Koriasih (2019) menunjukkan bahwa fermentasi tape Beras Ketan Hitam terdapat bakteri asam laktat dan berperan sebagai agen anti kapang maka dari itu peneliti tertarik untuk melakukan penelitian yang membahas tentang tape beras ketan hitam karena belum ada pelaporan mengenai aktivitas yang dapat menunjukkan enzim protease pada tape beras ketan Hitam. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi Bakteri Asam laktat dari fermentasi tape beras ketan hitam dan mengidentifikasi secara molekuler dengan

metode 16s rRNA terhadap isolat bakteri yang memiliki aktivitas protease.

## METODOLOGI PENELITIAN

### Isolasi Bakteri Asam Laktat

5 gram tape yang dibeli di pasar Lubuk Buaya kota Padang dihomogenkan dengan 45 mL NaCl 0,9% lalu dihomogenkan dengan vortex. Pengenceran secara bertahap dilakukan dari  $10^{-1}$ -  $10^{-6}$ . Selanjutnya, hasil pengenceran  $10^{-4}$ - $10^{-6}$  disebar diambil menggunakan pipet sebanyak masing-masingnya 1 mL dan ditanam dan ditaburkan kedalam media *DeMan Rogosa Sharp* agar (MRSA) pada cawan petri. Petri yang berisi kultur dimasukkan dalam inkubator pada suhu  $37^{\circ}\text{C} \pm 48$  jam.

### Pemurnian

Dipilih 3 koloni yang diidentifikasi sebagai bakteri asam laktat yang mana nantinya akan ditanam pada media MRS agar pada cawan petri yang berbeda lalu diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C} \pm 48$  jam yang diulangi sebanyak 2 kali.

### Identifikasi Bakteri Asam Laktat

#### Pewarnaan Gram

Aquadest steril pada tetes kan diatas gelas obyek lalu diububuhi 1 ose bakteri umur 48 jam & diratakan pada bagian atas kaca objek. Selanjutnya preparat difiksasi sampai terbentuk noda. Diatas noda tadi ditetaskan pewarna kristal violet (gr A) dandibiarkan selama 1 menit lalu pada cuci menggunakan air mengalir & dikering anginkan. Selanjutnya ditetesi menggunakan larutan mordan atau lugol (gr B) & dibiarkan selama 1 menit lalu dicuci menggunakan air mengalir & dikering anginkan. Tahap selanjutnya merupakan ditetesi menggunakan alkohol-aseton (gr C) hingga cat luntur dan tidak berwarna. Tahap terakhir menurut pengecatan gr ini merupakan ditetesi menggunakan pewarna safranin (gr D) selama 30 detik, lalu dicuci menggunakan air mengalir & dikeringkan. Objek gelas ditutup menggunakan *deck glass* dan diamati dibawah mikroskop menggunakan perbesaran 1000x. Isolat BAL menunjukkan warna ungu dibawah mikroskop.

### Uji Motilitas

Isolat bakteri ditusukkan kedalam SIM memakai ose lancip, kemudian diinkubasi dalam suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam. apabila pertumbuhan bakteri menyebar maka bakteri tadi bersifat motil & apabila pertumbuhan bakteri tidak menyebar, hanya berupa garis sepanjang tusukan saja maka bakteri tadi bersifat non motil.

### Uji Katalase

Aquadest steril ditetaskan diatas objek gelas lalu dibubuhi 1 ose bakteri umur 48 jam dan diratakan pada bagian atas objek gelaskemudian ditetesi dengan  $\text{H}_2\text{O}_2$  3%, didiamkan selama 1 menit. Jikamuncul gelembung udara menandakan katalase positif dan ketika tidakmuncul gelembung udara menandakan katalase negatif.

### Pewarnaan Endospora

Objek gelas difiksasi diatas bunsen lalu NaCl ditambahkan pada gelas objek setelah itu diberi ose bakteri 48 jam dan diratakan pada bagian gelas objek. Preparat difiksasi dengan melewatkannya diatas bunsen beberapa kali. Preparat yang telah difiksasi digenangi menggunakan pewarna malakit hijau dan dipanaskan (dijaga agar pewarna tidak kering), lalu dicuci menggunakan aquadest, Langkah selanjutnya ditetaskan safranin dikaca objek serta dicuci menggunakan aquadest dan dikering-anginkan. Preparat diamati memakai mikroskop (perbesaran 1000x) agar mengetahui adanya spora pada sel (endospora). Isolat BAL tidak ada spora dalam sel.

### Uji Aktivitas Enzim Protease

Seleksi bakteri asam laktat proteolitik dilakukan dengan uji aktivitas proteolitik pada media agar dengan menggunakan 1% susu skim (Nespolo et al., 2010). Uji aktivitas proteolitik menggunakan cara kerja Benson (2001) memakai kultur cair isolat yang didapat dari hasil isolasi setelah itu di inokulasikan ke *paper disc blank* sebanyak 10  $\mu\text{L}$  pada media susu skim agar (1%), diinkubasi pada temperatur  $30^{\circ}\text{C}$  dengan memakan waktu 1-3 hari. Inokulasi bakteri memakai cara dengan memasukkan *paper disc* ke dalam kultur cair isolat bakteri memakai pinset. Aktivitas proteolitik tampak

jika zona jernih di sekitar *paper disc*. Uji aktivitas proteolitik pengamatan dilakukan dengan waktu 48 jam. Berdasarkan tiap kemampuan menghidrolisis protein yang didapat oleh masing-masing isolat ditunjukkan berupa zona jernih

### Identifikasi BAL Secara Molekuler

#### Isolasi DNA

Isolat bakteri asam laktat terpilih di media miring diambil menggunakan pipet mikro dan ke dalam tabung eppendorf yang berisi buffer GP1 sebanyak 400 µL, kemudian dikocok. Selanjutnya sampel dalam tabung eppendorf dimasukkan ke dalam *thermoblock* pada temperatur 60°C dengan waktu 15 menit. Tabung kemudian disentrifugasi (ultrasentrifugasi). Sampel kemudian dimasukkan buffer GP2 sebanyak 100 µL, dan didinginkan dalam *freezer* 1 menit, disentrifugasi 2 menit pada 10.000 rpm. Supernatan dipindahkan pada tabung *spin column*, dan ditambahkan buffer GP3 sebanyak 750 µL. Sebagian dari supernatan dipindahkan pada *collection tube* beserta *spin column* lalu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. Ditambahkan sisa supernatan yang ada dengan buffer GP3. Selanjutnya disentrifugasi 10.000 rpm dengan waktu 1 menit, filtrat dibuang. Ditambahkan buffer W1 sebanyak 400 µL ke dalam tabung *spin column* disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. Setelah itu filtrat dibuang lalu dilakukan pencucian kedua dengan mencampurkan *wash buffer* sebanyak 600 µL sentrifugasi kecepatan 15.000 rpm 1 menit. Sementara itu *elution buffer* dipanaskan pada *thermoblock* pada temperatur 60°C. Setelah sentrifugasi selesai, membran dengan DNA dipindahkan ke tabung eppendorf baru dan dikering-anginkan lebih kurang 2 menit. Membran ditambahkan *elution buffer* sebanyak 100 µL ke tabung *collection tube* dan *spin column*. Terakhir disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm waktu yg dibutuhkan 1 menit

#### Sekuensing Gen 16S rRNA dan Analisis Data

Proses sekuensing dilakukan dengan mengirim data ke 1<sup>st</sup> BASE Malaysia melalui PT. Genetika Science. Hasil sekuensing dianalisis menggunakan metode BLAST

secara online pada website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Bakteri Asam Laktat hasil isolasi dilakukan pemurnian untuk mendapatkan biakan murni dengan menginokulasi 1 ose bakteri yang tumbuh pada media MRSA, diinkubasi pada temperatur 37°C waktu 48 jam. Rusmana (2012) menyatakan bahwa umumnya produksi asam laktat meningkat dengan waktu inkubasi (6-48 jam) dan menurut Agus (2016) bakteri memiliki variasi dalam suhu optimal untuk pertumbuhan dan pembentukan asam. Kebanyakan bakteri dalam kultur laktat memiliki suhu optimal 30°C, namun terdapat beberapa kultur yang dapat menghasilkan asam dengan kecepatan yang sama baik pada suhu 37°C maupun 30°C. Sebagai produk akhir fermentasi, bakteri asam laktat (BAL) menghasilkan sejumlah besar asam laktat, baik secara homofermentatif (>95% asam laktat dari glukosa) maupun heterofermentatif (menghasilkan asam asetat, etanol, dan karbon dioksida selain asam laktat).

Hasil isolasi menunjukkan koloni yang terpisah, yaitu koloni murni dengan satu karakteristik morfologi yang sama. Dari proses pemurnian ini, diperoleh lima isolat bakteri asam laktat murni. Masing-masing isolat diberi kode 11, 12, 13, 14, dan 15. Kelima isolat ini berhasil tumbuh pada media agar MRSA dan dilanjutkan dengan uji pendahuluan secara fenotipik. Menurut Ontario (2021.), karena sifat probiotik terkait dengan strain, disarankan agar identifikasi strain (pengetikan genetik) dilakukan dengan metodologi seperti elektroforesis gel medan pulsa (PFGE). Direkomendasikan agar uji fenotipik dilakukan terlebih dahulu, kemudian dilanjutkan dengan uji identifikasi genetik menggunakan metode seperti hibridisasi DNA/DNA atau pengurutan RNA 16S.

Uji pendahuluan secara fenotipik dalam penelitian ini meliputi morfologi koloni dan morfologi sel. Tujuan dari uji pendahuluan ini adalah untuk memastikan bahwa bakteri yang diperoleh memiliki karakteristik bakteri asam laktat (BAL). Morfologi koloni diamati secara makroskopik, termasuk bentuk, tepian,

elevasi, dan warna. Morfologi sel diamati secara mikroskopik, meliputi pewarnaan Gram, uji katalase, motilitas, dan pembentukan endospora.. Karakterisasi dapat dilakukan berdasarkan sifat morfologi koloni, morfologi sel dan biokimia (Ismail 2017). Hasil identifikasi morfologi secara makroskopis menunjukkan bahwa kelima isolat bakteri asam laktat mempunyai bentuk bulat, elevasi cembung, warna putih dan berukuran yang berbeda-beda, ada yang memiliki ukuran kecil dan besar. Hasil tersebut sesuai dengan pernyataan Putri (2018) membuktikan BAL akan tumbuh ketika diinkubasi pada temperatur 37°C memiliki ciri-ciri putih, berbentuk bundar dan tidak memiliki serat.

Hasil identifikasi secara morfologi mikroskopis dengan pengamatan secara Pewarnaan Gram, Uji Katalase, Uji Motilitas dan Uji Endospora. Pada pewarnaan gram menunjukkan hasil bahwa kelima isolat bakteri asam laktat merupakan bakteri gram positif yang ditunjukkan dengan koloni berwarna ungu (Tabel 1). Bakteri gram positif ditunjukkan dengan adanya koloni berwarna ungu karena bakteri gram positif mampu mempertahankan zat warna utama dalam pewarnaan Gram, yaitu kristal violet sehingga tampak warna ungu saat pengamatan dikarenakan dinding sel kelompok bakteri ini tersusun oleh sebagian besar peptidoglikan yang tebal yang mampu mengikat zat warna dan tidak merusak saat dicuci dengan alkohol. Bakteri gram positif lebih kompleks dalam memproteksi pertahanan dari gangguan fisik maupun patogen dalam jaringan inang, jika dilihat dari struktur dan komposisi dinding sel, bakteri gram positif relatif lebih sederhana dibandingkan dengan bakteri gram negatif yang lebih kompleks (Rosiatul 2020).

**Tabel 1. Hasil uji pewarnaan Gram**

Kode Isolat	Pewarnaan Gram	Bentuk
11	Positif	Basil
12	Positif	Basil
13	Positif	Basil
14	Positif	Kokobasil
15	Positif	Basil
Hasil pewarnaan Gram menunjukkan		

bahwa bakteri yang diperoleh berupa basil dan kokobasil. Perbedaannya terletak pada bentuk bakteri, di mana basil berbentuk batang dan kokobasil berbentuk batang yang lonjong. Pengujian motilitas menunjukkan bahwa bakteri tidak bersifat motil, karena tidak ada pergerakan yang menyerupai awan pada media (Tabel 2). Hasil ini didukung oleh pernyataan dari Haspanti (2016) yang melaporkan bahwa isolat bakteri asam laktat setelah diisolasi mempunyai sifat non motil yang ditandai dengan tidak adanya pergerakan bakteri yang menyerupai rambatan-rambatan akar disekitar daerah tusukan.

**Tabel 2. Hasil uji motilitas**

Kode Isolat	Motilitas
11	Non Motil
12	Non Motil
13	Non Motil
14	Non Motil
15	Non Motil

Uji katalase merupakan uji untuk mengetahui adanya enzim katalase pada bakteri, enzim ini berperan dalam memecah  $H_2O_2$  menjadi air dan oksigen. Amaliah (2018) mengatakan jika terbentuk gelembung mengindikasikan bakteri positif katalase dan jika tidak maka mengindikasikan bakteri negatif katalase. Bakteri asam laktat (BAL) tidak menunjukkan aktivitas katalase atau tidak menghasilkan gelembung saat terpapar  $H_2O_2$ . Penelitian yang dilakukan oleh Mergypa (2014) telah membuktikan bahwa BAL merupakan katalase negatif, memiliki toleransi terhadap lingkungan asam, dan bersifat anaerob.

Hasil pengujian katalase menunjukan hasil katalase positif pada isolat 15 (Tabel ).

**Tabel 3. Hasil uji katalase**

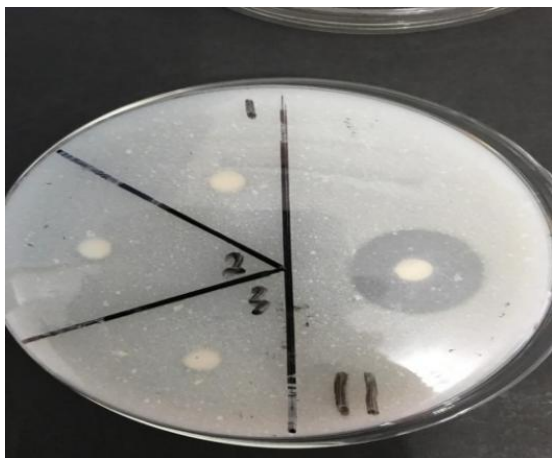
Kode Isolat	Katalase
11	Katalase Negatif
12	Katalase Negatif
13	Katalase Negatif
14	Katalase Negatif
15	Katalase Positif

Isolat 15 tidak dilanjutkan untuk pengujian selanjutnya. Pada pengujian endospora dari keempat isolat yang tersisa menunjukkan hasil bahwa isolat bakteri tidak satupun terbentuk spora ketika diamati dibawah mikroskop (Tabel 4). Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Laily (2013) BAL saat diamati di mikroskop tidak membentuk spora, sehingga ketika dilakukan pengamatan yang tampak adalah sel vegetative dari bakteri yang menghasilkan warna merah muda pada akhir tahap pewarnaan.

**Tabel 4. Pengujian uji endospora**

Kode Isolat	Endospora
11	Tidak berspora
12	Tidak berspora
13	Tidak berspora
14	Tidak berspora

Pengujian aktivitas enzim protease dilakukan pada tiga isolat bakteri asam laktat yang dipilih dengan kode berbeda, yaitu 11, 13, dan 14, menggunakan kertas cakram pada media skim milk agar. Kertas cakram digunakan untuk mempermudah pertumbuhan bakteri dan memungkinkan pengukuran diameter zona bening. Skim milk agar merupakan media yang berpotensi menunjukkan aktivitas protease, yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar kertas cakram pada media tersebut (Afifah 2014). Hasil pengujian setelah inkubasi selama 48 jam



**Gambar 1. Hasil uji aktivitas enzim protease isolat 11 dengan 3 kali ulangan, pada bagian kanan gambar merupakan hasil uji untuk kontrol positif**

menunjukkan bahwa isolat bakteri asam laktat dengan kode 11 memiliki zona bening di sekitar kertas cakram dengan rata-rata diameter 8 mm. Sebagai perbandingan, kontrol positif menunjukkan zona bening dengan rata-rata diameter 30 mm (Gambar 1).

Untuk menilai tingkat aktivitas enzim protease, dilakukan perhitungan indeks proteolitik (PI, proteolytic index) dengan rumus:

$$PI = \frac{\text{Diameter total (zona bening + koloni)} - \text{Diameter koloni}}{\text{Diameter koloni}}$$

Namun, karena menggunakan kertas cakram dan bukan koloni langsung, maka diameter cakram digunakan sebagai pengganti diameter koloni. Dalam hal ini, diameter cakram adalah 6 mm, dan zona bening untuk isolat 11 adalah 8 mm, sehingga PI dapat dihitung sebagai berikut:

$$PI = \frac{(8 \text{ mm} - 6 \text{ mm})}{6 \text{ mm}} = 0,33$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, aktivitas enzim protease dari isolat 11 dikategorikan sebagai lemah (Tabel 5). Hal ini menunjukkan bahwa meskipun isolat tersebut mampu menghasilkan enzim protease, kemampuannya untuk mendegradasi protein pada media masih tergolong rendah jika dibandingkan dengan kontrol positif (PI = 4,0), yang menghasilkan zona bening jauh lebih besar.

**Tabel 5. Kategori aktivitas enzim protease berdasarkan nilai PI (Hengkebala et al. 2021)**

Kode Isolat	Endospora
PI < 1,0	Lemah
PI 1,01 - 2,0	Sedang
PI > 2,01	Kuat

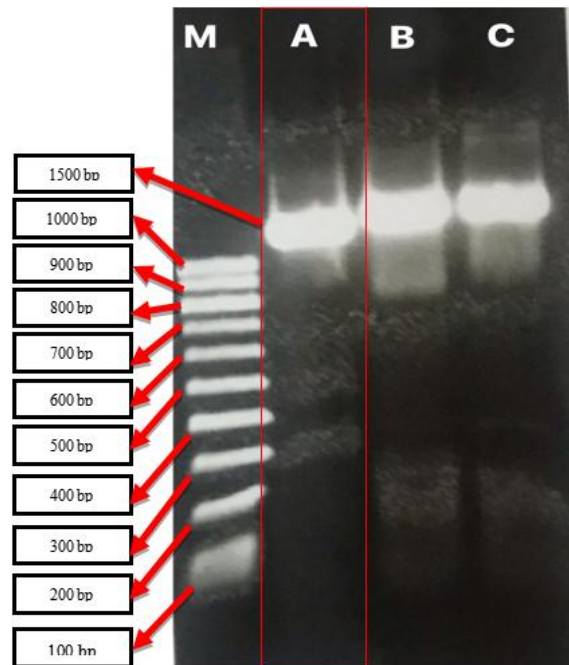
Timbulnya zona bening disebabkan oleh bakteri yang tumbuh menghasilkan enzim protease, yang mampu memutuskan ikatan protein pada susu skim. Bakteri proteolitik mengonsumsi sumber karbon sederhana yang terkandung di dalam medium. Jumlah karbon yang rendah dan persentase protein yang tinggi mendorong pembentukan enzim protease. Ketika kadar karbon sedikit, bakteri proteolitik akan

menghasilkan enzim protease untuk menguraikan protein menjadi sumber karbon yang dapat digunakan (Asoodeh, 2012).

Isolat bakteri asam laktat dengan kode 11, yang menunjukkan aktivitas enzim protease, dilanjutkan untuk uji genetik dengan identifikasi molekuler menggunakan gen 16S rRNA. Proses identifikasi molekuler mikroorganisme melibatkan empat tahap utama, yaitu ekstraksi DNA, PCR (Reaksi Rantai Polimerase), elektroforesis, dan sekuen. Tahap ekstraksi DNA bertujuan untuk memisahkan DNA dari komponen sel lainnya, sehingga menghasilkan DNA murni yang dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut. Ekstraksi DNA diperoleh dengan cara memecahkan dinding sel sehingga DNA keluar dari dalam sel (Harvianti, 2017).

Setelah isolasi DNA, langkah berikutnya adalah proses PCR, yang bertujuan untuk melipatgandakan suatu fragmen DNA menjadi banyak salinan. Terdapat 3 reaksi berantai pada proses PCR yaitu denaturasi (95°C) annealing (55°C) dan extension (72°C) (Rosiatul 2020). Tahap selanjutnya adalah elektroforesis DNA, mereka (Rosiatul 2020). Hasil elektroforesis menunjukkan adanya pita-pita DNA yang

terpisah dan sejajar dengan marka 1500 bp (Gambar 2). Hal ini mengindikasikan bahwa fragmen-gen yang teramplifikasi memiliki ukuran yang sesuai dengan panjang nukleotida dari gen 16S rRNA, yaitu 1500 bp (Rinanda 2011).



**Gambar 2. Hasil elektroforesis**

```
CNCCTTAAGAACGGCTGGCTCCCGAAGGTTACCCACCGGCTTTGGGTGTTACACAAC
TTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTG
CTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCG
AACTGAGACGTACTTTAAGAGATTAGCTCACCTCGCGGGTTGGCAACTCGTTGTATAC
GCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCC
CCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGC
AACTAGTAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAG
CTGACGACAACCATGCACCACCTGTACCTTGTCGCCGAAGGGAACGCTCCATCTCTG
GAGTTGTCAAGGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCA
CATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTGC
TACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCGGCACTTAAGGGCGGAAACCTC
AAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGTGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCT
ACCCACACTTTTCGAGCCTCAACGTCAGTTACAGTCCAGAAAGCCGCCTTCGCCACTGG
TGTTCTTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTTTCCTCTACTG
CACTCAAGTCATCCAGTTTCCAAAGCAATTCTCAGTTGAGCTGAGGGCTTTCACTTCA
GACTTAAATAACCGTCTGCGCTCGCTTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGGAAC
ATACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTATTTAGCCGTTCTTTCTGGTAAGATACCGT
CACACATTGAACAGTTACTCTCAATGTCATTCTTCTTACAACAGTGTTTTACGAGCCG
AAACCCTTCATCACACACGCGGCGTTGCTCCATCAGGCTTTCGCCATTGTGGAAGATC
CCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAATATGGGCCGTGTCTCAGTCCCATTGTGGCCGATCA
GTCTCTACACTCGGCTTNCATCATCGCCTTGGAACCATTAACCTTACCACTAACTAATGC
CCGCGGGANANTCCTTATGGAAACAGAACCTCTTTTAAAAAAC
```

**Gambar 3. Urutan nukleotida gen 16S rRNA isolat 11**



Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

DownloadSelect columnsShow100

☒ select all

100 sequences selected

GenBank

Graphics

Distance tree of results

MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Weissella confusa strain 1841 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Weissella confusa	2233	2233	99%	0.0	98.13%	1485	MT597669.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weissella sp. strain RI1570 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Weissella sp.	2231	2231	99%	0.0	98.20%	1362	MH704220.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weissella confusa strain 2990 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Weissella confusa	2230	2230	99%	0.0	98.13%	1479	MT611922.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weissella confusa strain 2693 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Weissella confusa	2228	2228	99%	0.0	98.05%	1466	MT611710.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weissella confusa strain 2336 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Weissella confusa	2228	2228	99%	0.0	98.05%	1490	MT604794.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weissella confusa strain 2333 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Weissella confusa	2228	2228	99%	0.0	98.05%	1482	MT604791.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weissella confusa strain 1777 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Weissella confusa	2228	2228	99%	0.0	98.05%	1488	MT597625.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weissella confusa strain 1422 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Weissella confusa	2228	2228	99%	0.0	98.05%	1486	MT573830.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weissella confusa strain 1256 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Weissella confusa	2228	2228	99%	0.0	98.05%	1474	MT573700.1

Gambar 4. Hasil BLAST isolat 11

Hasil PCR dilanjutkan untuk proses sekuensing, yang memiliki peran penting dalam menentukan urutan nukleotida pada fragmen DNA yang terdeteksi dari hasil visualisasi DNA yang teramplifikasi dalam proses PCR. Urutan nukleotida gen 16S rRNA isolat 11 terlihat pada Gambar 3. Sekuensing gen 16S rRNA memungkinkan identifikasi spesies bakteri yang resisten dengan menganalisis hasil elektroforesis isolat dan menentukan kemiripan urutan nukleotida gen 16S rRNA. Analisis dilakukan secara menyeluruh di 1<sup>st</sup> BASE Malaysia melalui PT. Genetika Science. Pada sekuen tersebut, dilakukan pencarian kesamaan menggunakan program BLAST-N (*Basic Local Alignment Search Tool-Nucleotide*).

Analisis BLAST dilakukan dengan tujuan membandingkan hasil sekuen DNA dengan sekuen DNA yang ada di seluruh dunia yang telah didokumentasikan dalam database Gen Bank. Melalui analisis BLAST, kita dapat memperoleh informasi tentang bakteri yang memiliki kesamaan dengan urutan DNA sampel, yang dapat sangat berguna dalam proses identifikasi bakteri.

Hasil analisis BLAST dari isolat bakteri asam laktat kode 11 menunjukkan bahwa spesies bakteri asam laktat yang diisolasi adalah *Weissella confuse* Strain 1841, dengan tingkat kesamaan nukleotida 100%. *Weissella confuse* merupakan bakteri asam laktat yang memiliki ciri-ciri berbentuk bulat, tersusun dalam susunan pasangan seperti rantai, dan termasuk dalam golongan bakteri gram positif. Selain karakterisasi morfologi dan genetik, *Weissella confuse* juga

memiliki potensi pemanfaatan yang luas, terutama sebagai probiotik. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa *Weissella* spp. dapat memberikan manfaat kesehatan dengan cara meningkatkan keseimbangan mikrobiota usus, memperkuat sistem imun, dan menekan pertumbuhan patogen di saluran pencernaan. Oleh karena itu, isolat *W. confuse* ini berpotensi dikembangkan sebagai probiotik untuk aplikasi dalam produk pangan fungsional, seperti yoghurt, susu fermentasi, atau produk olahan lainnya (Onur and Önlü 2024).

Di bidang pangan, *Weissella confuse* juga dikenal dapat berkontribusi pada proses fermentasi tradisional dengan menghasilkan senyawa bioaktif seperti asam laktat dan bakteriosin yang dapat memperpanjang umur simpan produk serta meningkatkan keamanan mikrobiologis. Selain itu, kemampuannya memproduksi enzim protease, seperti yang diuji pada penelitian ini, menunjukkan potensi aplikasinya dalam industri pangan untuk meningkatkan nilai gizi dan tekstur produk fermentasi (Al-Kharousi 2025).

Di bidang farmasi, probiotik dari genus *Weissella* mulai dieksplorasi untuk potensi penggunaan dalam terapi pencegahan dan pengobatan penyakit gastrointestinal, serta sebagai agen adjuvan dalam pengembangan produk farmasi berbasis mikroorganisme hidup. Oleh sebab itu, isolat *Weissella confuse* ini tidak hanya penting dari segi taksonomi, tetapi juga memiliki nilai tambah potensial untuk aplikasi di bidang kesehatan dan pangan, yang membuka



peluang penelitian lanjutan untuk mengoptimalkan manfaat tersebut (Ahmed et al. 2022).

## KESIMPULAN

Terdapat lima isolat bakteri asam laktat dari hasil isolasi tape beras ketan hitam, yang diberi kode isolat 11, 12, 13, 14, dan 15, memiliki morfologi bakteri serupa, yaitu bulat, kecil, cembung, dan berwarna putih. Isolat 11 menunjukkan kemampuan aktivitas enzim protease. Hasil identifikasi molekuler menggunakan gen 16S rRNA pada isolat bakteri 11 menunjukkan homologi 100% dengan *Weissella confuse* strain 1841.

## REFERENSI

- Abun, 2018. 2018. "UTILIZATION OF LIQUID WASTE OF CHITIN EXTRACT FROM SKIN OF SHRIMP PRODUCTS OF CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROCESSING AS FEED." *agrolifejournal.usamv.ro* 7(1).
- Afifah, 2014. 2014. "Protease Fibrinolitik Dari Mikroba Pangan Fermentasi Oncom Merah Dan Tempe Gembus." *Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor*. 10.
- Agus, 2016. 2016. "Kemampuan Tumbuh Isolat Bakteri Asam Laktat Asal Saluran Pencernaan Broiler Umur Tiga Hari Pada Berbagai Uji Probiotik."
- Ahmed, Sadia et al. 2022. "The Weissella Genus: Clinically Treatable Bacteria with Antimicrobial/Probiotic Effects on Inflammation and Cancer." *Microorganisms* 10(12).
- Al-Kharousi, Zahra S. 2025. "Highlighting Lactic Acid Bacteria in Beverages: Diversity, Fermentation, Challenges, and Future Perspectives." *Foods* 14(12): 2043.
- Amaliah, 2018. 2018. "Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Dari Limbah Cair Rendaman Kacang Kedelai." *jurnal.farmasi.umi.ac.id* 5(1): 253–57.
- Arulmani, 2007. 2007. "Purification and Partial Characterization of Serine Protease from Thermostable Alkalophilic Bacillus Laterosporus-AK1." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(4): 475–81.
- Asoodeh, 2012. "Purification and Characterization of a Thermostable Neutrophilic Metalloprotease from Pseudomonas Sp. DR89." *ijbiotech.com*.
- Haspianti, 2016. "Pengaruh Penambahan Tepung Daun Pepaya (Carica Papaya) Dan Lama Pemanasan Terhadap Karakteristik Fisik, Kimia Dan Organoleptik Minyak Kelapa." *ojs.uho.ac.id* 1(2): 121–24.
- Hengkengbala, Sabrina I et al. 2021. "Karakteristik Morfologi Dan Aktivitas Enzim Protease Bakteri Simbion Nudibranch." *Jurnal Pesisir Dan Laut Tropis* 9(3): 83.
- Ismail, 2017. 2017. "Isolasi, Karakterisasi Dan Uji Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat Dari Fermentasi Biji Kakao (Theobroma Cacao L.)." *Jurnal Bioleuser* 1(2): 45–53.
- Koriasih, 2019. "Isolasi Bakteri Asam Laktat Dari Tape Ketan Dan Potensinya Sebagai Agen Antikapang Terhadap Pertumbuhan Aspergillus Flavus." *core.ac.uk*.
- Laily, 2013. "Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Riboflavin Dari Produk Fermentasi Sawi Asin." *jatp.ift.or.id* 2(4).
- Lestari, 2018. 2018. "Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Bacillus Megaterium Irod3 Dari Oncom Merah Pasca Fermentasi 72 Jam." *jurnal.unimus.ac.id*.
- Mambrasar, 2010. 2010. "Antioksidan Dan Imunomodulator Pada Serealia." *Seminar Nasional Pendidikan Biologi FKIP UNS*: 154–63.
- Mergypta, 2014. 2014. "Isolasi, Karakterisasi Bakteri Asam Laktat, Dan Analisis Proksimat Dari Pangan Fermentasi Rusip Ikan Teri (Stolephorus Sp.)." *ejournal3.undip.ac.id* 3(2): 11–19.
- Naiola dan Widhyastuti, 2002. 2002. "Isolasi, Seleksi Dan Optimasi Produksi Protease Dari Beberapa Isolat Bakteri." *Berita Biologi* 6(3): 467–73.
- Ontario, 2021. "Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization."
- Onur, Melda, and Harun Önlü. 2024. "Isolation, Characterization of Weissella Confusa and Lactococcus

- Lactis from Different Milk Sources and Determination of Probiotic Features.” *Brazilian Journal of Microbiology* 55(1): 663–79. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01208-7>.
- Putri, 2018. 2018. “Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Dari Pangan Fermentasi Berbasis Ikan (Inasua) Yang Diperjualbelikan Di Maluku-Indonesia.” *ejournal2.undip.ac.id* 1(2): 6–12.
- Rinanda, 2011. 2011. “Analisis Sekuensing 16S RRNA Di Bidang Mikrobiologi.” *e-repository.unsyiah.ac.id* 3: 172–77.
- Rosiatul, 2020. 2020. “ISOLASI Dan IDENTIFIKASI DENGAN GEN 16S RRNA BAKTERI ENDOFIT DARI DAUN PEPAYA (Carica Papaya L.) SERTA UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERINYA.”
- Rusmana, 2012. 2012. “Senyawa Antimikroba Yang Dihasilkan Oleh Bakteri Asam Laktat Asal Bekasam.” *journal.unpad.ac.id* III(2): 135–45.
- Susilawati, 2016. 2016. Universitas Riau *Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (Bal) Dari Air Cucian Beras*.
- Yulianti, 2015. 2005. “Uji Aktifitas Enzim Protease Dari Isolat Bacillus Sp. Galur Lokal Riau.” *Jurnal JOM FMIPA* 1(2): 116–22.