

SELEKSI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL AMILASE DAN PULULANASE DAN APLIKASINYA PADA FERMENTASI TALAS

[Selection of Amylase and Pullulanase Producing Lactic Acid Bacteria and Its Application on Taro Fermentation]

R. Haryo Bimo Setiarto^{1)*}, Betty Sri Laksmi Jenie²⁾, Didah Nur Faridah²⁾, Iwan Saskiawan¹⁾, dan Sulistiani¹⁾

¹⁾ Pusat Penelitian Biologi LIPI Jalan Raya Jakarta-Bogor Km 46, Cibinong, Bogor

²⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor

Diterima 18 Februari 2015 / Disetujui 12 Juni 2015

ABSTRACT

The objective of this study were to select amylase and pululanase producing lactic acid bacteria (LAB) for taro fermentation and to find out the length of fermentation time that will produce short chain polysaccharide. Fourty one LAB isolates were selected based on the amylase and pululanase activity (U/mL). Three isolates of LAB i.e. *Lactobacillus plantarum* D-240, SU-LS67 and SU-LS59 demonstrated the highest enzyme activities among other strains. The amylase activity for those three isolates was 2.57, 2.70, and 2.50 U/mL, respectively and the pullulanase activity was 2.72, 2.88 and 2.91 U/mL, respectively. Genotypic identification was conducted for strains SU-LS59 and SU-LS67. Strains identification by sequencing the gene encoding 16S rDNA and phylogenetic analysis using Neighbor Joining method showed that both isolates were identical to *Leuconostoc mesenteroides* NBRC 100496T (AB681194) with a bootstrap value of 100%. Either single or mixed culture of *L. plantarum* D-240 and *L. mesenteroides* SU-LS 67 were then used as starter in taro fermentation and DP values of the taro starch were examined at various fermentation times (0, 6, 12, 18, 24 h). The results showed that applying 2% mixed culture (10^8 CFU/mL) of *L. plantarum* D-240 and *L. mesenteroides* SU-LS 67) at the ratio of 1:1 as starter in taro fermentation was found more effective than the single cultures due to its ability to hydrolize and generate starch with DP value around 27 after 18 h fermentation. Starch with DP values between 19-29 was considered suitable for the formation of resistant starch (RS) during autoclaving-cooling cycles. This finding might be advantageous as preliminary treatment for the production of RS-rich taro flour through autoclaving-cooling process.

Keywords: amylase, degree of polymerization, taro fermentation, lactic acid bacteria, pullulanase

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah memilih bakteri asam laktat (BAL) yang mampu memproduksi amilase dan pululanase untuk fermentasi talas dan mengetahui lama waktu fermentasi untuk menghasilkan polisakarida rantai pendek. Sebanyak empat puluh satu isolat BAL dipilih berdasarkan parameter aktivitas amilase dan pululanasesnya (U/mL). Tiga isolat BAL yaitu *Lactobacillus plantarum* D-240, SU-LS67 dan SU-LS59 menunjukkan aktivitas enzim amilase dan pululanase tertinggi dibandingkan dengan strain isolat yang lainnya. Aktivitas enzim amilase untuk tiga isolat tersebut masing-masing adalah 2,57; 2,70; dan 2,50 U/mL sedangkan aktivitas enzim pululanase berturut-turut adalah 2,72; 2,88; dan 2,91 U/mL. Identifikasi genotipe dilakukan untuk strain SU-LS59 dan SU-LS67. Identifikasi strain dengan sekuensing gen pengkode 16S rDNA dan analisis filogenetik dengan metode *Neighbor Joining* menunjukkan bahwa kedua isolat identik dengan *Leuconostoc mesenteroides* NBRC 100496T (AB681194) dengan nilai *bootstrap* sebesar 100%. Baik kultur tunggal maupun kultur campuran dari *L. plantarum* D-240 dan *L. Mesenteroides* SU-LS 67 kemudian digunakan sebagai starter untuk fermentasi talas dengan variasi waktu (0, 6, 12, 18, 24 jam). Pada setiap interval waktu, nilai DP dari pati talas dianalisis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aplikasi 2% kultur campuran (10^8 CFU/mL) *L. plantarum* D-240 dan *L. mesenteroides* SU-LS 67 pada rasio 1:1 sebagai starter fermentasi talas diketahui lebih efektif daripada kultur tunggal karena kemampuannya untuk menghidrolisis dan menghasilkan pati dengan nilai DP sekitar 27 setelah 18 jam fermentasi. Pati talas dengan nilai DP antara 19-29 sesuai untuk pembentukan pati resisten (RS) selama proses pemanasan bertekanan-pendinginan. Penemuan ini mungkin menguntungkan sebagai perlakuan awal untuk produksi tepung talas kaya RS melalui siklus proses pemanasan bertekanan-pendinginan.

Kata kunci: amilase, bakteri asam laktat, derajat polimerisasi, fermentasi talas, pululanase

*Penulis Korespondensi:
E-Mail: haryobimo42@yahoo.com

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri gram positif, katalase negatif yang dapat memproduksi asam laktat dengan cara memfermentasi karbohidrat. BAL yang memiliki kemampuan memanfaatkan pati sebagai substrat dikenal sebagai BAL penghasil amilase dan pululanase (Moradi *et al.*, 2014). Enzim alfa amilase (EC 3.2.1.1) adalah enzim yang menghidrolisis ikatan linier α -1,4 glikosidik pada amilosa secara acak sehingga menghasilkan campuran dekstrin, maltosa, dan glukosa (Alariya *et al.*, 2013; Bhanwar dan Ganguli, 2014). Sementara itu enzim pululanase (amilopektin 6-glucanohydrolase, EC 3.2.1.41) adalah eksoenzim yang menghidrolisis ikatan percabangan α -1.6 glikosidik penghubung amilopektin untuk menghasilkan oligosakarida rantai pendek (Asha *et al.*, 2013).

BAL yang menghasilkan dua molekul asam laktat dari fermentasi glukosa disebut BAL homofermentatif, sedangkan BAL yang menghasilkan satu molekul asam laktat dan satu molekul etanol serta satu molekul karbon dioksida disebut BAL heterofermentatif (Reddy *et al.*, 2008). Beberapa jenis BAL seperti *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *L. manihotivorans*, *L. amylophilus*, *L. amylovorus*, *L. amilolyticus*, *Leuconostoc cellobiosus*, *L. acidophilus*, *Leuconostoc sp.*, *Streptococcus bovis* dan *Streptococcus macedonicus* telah dilaporkan mampu menghasilkan enzim amilase dan pululanase untuk mendegradasi pati (Reddy *et al.*, 2008; Alariya *et al.*, 2013; Pokhrel *et al.*, 2013; Moradi *et al.*, 2014).

Talas Bogor sebagai komoditas lokal tersedia dalam jumlah besar yaitu mencapai 68.000 ton pada tahun 2012 sehingga berpotensi dikembangkan sebagai pangan fungsional melalui produksi tepung talas kaya pati resisten (RS) (Rahmawati *et al.*, 2012). Talas Bogor varietas pandan dipilih sebagai bahan baku pada penelitian ini karena memiliki kandungan amilosa tertinggi yaitu 25,78% jika dibandingkan dengan varietas lampung (23,12%) dan varietas sutera (24,56%) (Rahmawati *et al.*, 2012). Amilase dan pululanase bersama-sama menghidrolisis pati talas sehingga dihasilkan polisakarida rantai pendek dengan nilai Derajat Polimerisasi (DP) yang rendah (Reddy *et al.*, 2008). Pemanfaatan kedua enzim tersebut dengan melakukan optimasi waktu fermentasi dapat menghasilkan polisakarida rantai pendek dengan nilai DP sebesar 19-29 yang memenuhi syarat untuk pembentukan RS (Zaragoza *et al.*, 2010). Pemilihan polisakarida rantai pendek dengan nilai DP 19-29 sebagai bahan baku pembentukan RS karena sifatnya yang mudah mengalami retrogradasi setelah diberi perlakuan beberapa siklus pemanasan bertekanan-pendinginan (Faridah *et al.*, 2013). Sementara itu

Sajilata *et al.* (2006) melaporkan bahwa RS dapat dibentuk dari polisakarida rantai pendek dengan nilai DP kurang dari 35. Sebaliknya oligosakarida dengan nilai DP kurang dari 10 menurunkan kadar RS karena pembentukan gula pereduksi yang menghambat terjadinya retrogradasi pati (Sajilata *et al.*, 2006; Faridah *et al.*, 2013).

Sebanyak 41 strain isolat BAL berhasil diisolasi dari sumber nira siwalan (*Borassus flabellifer* L.) dan dari sayur asin. Sulistiani *et al.* (2014) melaporkan bahwa isolat BAL yang diisolasi dari sayur asin berhasil diidentifikasi melalui sekuensing gen pengkode 16S rDNA bakteri dengan metode *Polymerase Chain Reactions* (PCR) dan teridentifikasi sebagai *L. plantarum* D-240. Seluruh strain isolat BAL tersebut belum diidentifikasi dan kemampuannya belum diketahui dalam menghasilkan enzim amilase dan pululanase, kecuali strain isolat *Lactobacillus plantarum* D-240. Identifikasi BAL dapat dilakukan berdasarkan sifat fenotipik dan genotipik. Identifikasi fenotipik didasarkan pada hasil pengamatan morfologi koloni, pengamatan mikroskopis (pewarnaan Gram), uji fisiologis, metabolik (biokimia) atau kemotaksonomi (Ammor *et al.*, 2005). Identifikasi genotipik dilakukan dengan menggunakan metode molekuler melalui sekuensing gen pengkode 16S rRNA bakteri dengan metode PCR (Nikolova *et al.*, 2009). Pada penelitian ini dilakukan identifikasi genotipik isolat BAL unggul penghasil amilase dan pululanase dengan metode molekuler dan analisis filogenetik metode *neighbor joining* menggunakan program *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA) versi 5.2 dengan *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation* (MUSCLE) (Tamura *et al.*, 2011). Penelitian ini bertujuan melakukan seleksi isolat BAL yang memiliki kemampuan menghasilkan aktivitas amilase dan pululanase tinggi, menentukan jenis kultur BAL terbaik (kultur tunggal atau campuran) sebagai starter dan waktu fermentasi terbaik yang mampu menghasilkan polisakarida rantai pendek (DP 19-29) selama fermentasi talas.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 41 strain BAL (koleksi Pusat Penelitian Biologi LIPI) yang terdiri dari 40 strain isolat BAL asal nira siwalan (*Borassus flabellifer* L.) dari kota Kupang, Nusa Tenggara Timur, dan satu strain *Lactobacillus plantarum* D-240 asal sayur asin (Sulistiani *et al.*, 2014) dari Bogor, Jawa Barat. Sebagai sumber pati digunakan talas Bogor varietas pandan dengan umur panen 8 bulan yang diperoleh dari petani di Kecamatan Cijeruk, Bogor.

Persiapan Kultur BAL (Sujaya *et al.*, 2008)

Sampel isolat murni BAL ditumbuhkan dalam erlenmeyer 100 mL dengan menginokulasikan kultur murni BAL tersebut masing-masing ke dalam 50 mL Mann Rogose and Sharp Broth (MRSB) (Sigma-Aldrich, USA). Selanjutnya kultur diinkubasi dalam inkubator (Isuzu, Japan) pada suhu 37°C selama 24 jam.

Produksi ekstrak kasar enzim amilase dan pululanase

Produksi ekstrak kasar enzim amilase dilakukan dengan menumbuhkan isolat BAL (10^8 CFU/mL, 2%) ke dalam 25 ml media MRSB dengan 0,5% (b/v) amilosa (Sigma-Aldrich, USA) sebagai sumber karbon utama selama 24 jam pada suhu 37°C. Untuk produksi ekstrak kasar enzim pululanase, sebanyak 2% kultur BAL (10^8 CFU/mL) ditumbuhkan dalam 25 mL media MRSB dengan 0,5% (b/v) amilopektin (Sigma-Aldrich, USA) sebagai sumber karbon utama selama 24 jam pada suhu 37°C. Untuk menganalisis kemampuan pertumbuhan isolat BAL selama 24 jam dilakukan analisis *plate count* dalam media MRSA sehingga dapat diketahui jumlah total populasi BAL. Ekstrak kasar amilase dan pululanase ekstraseluler dari isolat BAL dalam media MRSB diperoleh dengan melakukan sentrifugasi (9,000 rpm, 10 menit, 4°C) dengan *High Speed Refrigerated Centrifuge* Type 6500 (Kubota, Japan). Ekstrak kasar enzim amilase dan pululanase berada dalam supernatan, sementara biomassa sel BAL terendap menjadi *pellet*. Supernatan ekstrak kasar enzim amilase dan pululanase selanjutnya digunakan dalam analisis aktivitas enzim amilase (Moradi *et al.*, 2014) dan pululanase (Asha *et al.*, 2013).

Identifikasi BAL terpilih (Nikolova *et al.*, 2009)

BAL dengan aktivitas amilase dan pululanase serta jumlah total koloni BAL (Log CFU/mL) tertinggi diidentifikasi secara molekuler dengan mengamplifikasi daerah 16S rDNA. Amplifikasi PCR dilakukan dengan volume sampel per reaksi sebesar 30 μ L menggunakan primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Macrogene Inc, South Korea). Primer 27F mempunyai posisi 8-27 dan primer 1492R mempunyai posisi 1510-1492 pada kromosom *E. coli*. Komposisi reaksi PCR terdiri atas: 15 μ L GoTag® Green master mix 2x (Macrogene Inc, South Korea), 2,4 μ L primer 27F 10 μ M dan 2,4 μ L primer 1492R 10 μ M, 9,2 μ L NFW (Macrogene Inc, South Korea) dan 1 μ L (10-100 ng) DNA *template* (Macrogene Inc, South Korea). Reaksi PCR menggunakan Thermal Cyclers PCR (Bio-Rad, UK) dengan pradenaturasi pertama suhu 94°C selama 90 detik, dilanjutkan dengan 30 siklus yang terdiri

dari denaturasi suhu 95°C selama 30 detik, penempelan primer suhu 50°C selama 30 detik dan ekstensi suhu 72°C selama 90 detik. Setelah 30 siklus selesai, diikuti fase ekstensi pada suhu 72°C selama 5 menit dan pendinginan pada suhu 4°C selama 20 menit.

Hasil amplifikasi selanjutnya dielektroforesis dalam agarosa (Sigma-Aldrich, USA) 1% selama 25 menit pada 100 V. Gel hasil elektroforesis direndam dalam larutan ethidium bromide (Sigma-Aldrich, USA) selama 15 menit. Hasil amplifikasi DNA didokumentasi menggunakan *gel documentation system* (Bio-Rad, UK). Ukuran pita DNA hasil amplifikasi PCR diukur menggunakan DNA *ladder* 1 kb plus (Qiagen, USA). Purifikasi, *cycle sequencing*, purifikasi produk *cycle sequencing*, dan *sequencing* produk PCR 16S rDNA dilakukan di laboratorium Macrogene Inc., Korea selatan. Semua sekuensing produk PCR 16S rDNA menggunakan 27F (Macrogene Inc, South Korea). Sekuen DNA dibandingkan dengan *database* pada *GenBank* menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) algorithm.

Penentuan jenis starter BAL dan waktu fermentasi

Talas Bogor diiris tipis dengan ketebalan 5 mm, selanjutnya irisan talas direndam dalam larutan 1% NaCl (Merck, Germany) menggunakan rasio talas:larutan sebesar 3:4 selama 1 jam untuk menghilangkan kandungan kristal oksalat. Setelah proses perendaman, irisan talas dipisahkan, ditiriskan lalu dicuci beberapa kali dengan akuades steril. Prosedur penentuan jenis kultur tunggal atau campuran BAL dan waktu fermentasi talas terbaik dilakukan sebagai berikut: sebanyak 20 g irisan talas difermentasi dalam 200 mL akuades steril yang telah diinokulasi dengan kultur tunggal *L. Mesenteroides* SU-LS 67, kultur tunggal *L. plantarum* D-240, dan kultur campuran *L. mesenteroides* SU-LS 67:*L. plantarum* D-240 (1:1) masing-masing sebanyak 2% dengan konsentrasi 10^8 CFU/mL. Selanjutnya semua perlakuan sampel talas diinkubasi pada suhu ruang selama 0, 6, 12, 18, dan 24 jam. Sampel irisan talas diambil sebanyak 1 g pada setiap interval waktu fermentasi dan dihancurkan dengan blender (Philips, Netherlands) sampai terbentuk suspensi untuk dianalisis jumlah total koloni BAL, nilai pH, dan DP. Setiap perlakuan tersebut dilakukan triplo. Proses fermentasi talas dihentikan jika nilai DP telah mencapai kisaran antara 19-29. Rancangan percobaan untuk penentuan waktu fermentasi terbaik irisan talas oleh kultur tunggal maupun kultur campuran adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan lama fermentasi sebagai *variable* dan nilai rata-rata DP sebagai respon. Pengolahan data dilakukan dengan Analisis ragam

(ANOVA) menggunakan perangkat lunak SPSS 17.0. Jika data berbeda signifikan, maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada level 95% ($\alpha=0,05$).

Analisis aktivitas ekstrak kasar enzim amilase (Moradi *et al.*, 2014)

Sebanyak 250 μL sampel ekstrak kasar amilase dan 250 μL larutan substrat 1% (b/v) amilosa dicampurkan, lalu dihomogenkan dengan menggunakan vortex dan diinkubasi selama 15 menit. Setelah masa inkubasi ditambahkan sebanyak 500 μL 3,5-Di Nitro Salisilic Acid (DNS) (Sigma-Aldrich, USA), lalu dipanaskan selama 5 menit dalam penangas air bersuhu 100°C untuk menghentikan reaksi enzimatik dan agar DNS bercampur dengan produk glukosa yang terbentuk. Pengenceran dilakukan dengan menambahkan 4 mL akuades, kemudian dihomogenkan dengan vortex. Selanjutnya absorbansi setiap larutan sampel diukur dengan spektrofotometer UV-Vis 1700 (Shimadzu, Japan) pada $\lambda=540$ nm. Blangko sampel dan blangko substrat dibuat sebagai faktor koreksi kadar glukosa sampel terhadap nilai aktivitas enzim amilase. Blangko sampel adalah ekstrak kasar enzim amilase ekstraseluler dari masing-masing isolat tanpa substrat amilosa. Blangko substrat adalah larutan substrat 1% (b/v) amilosa tanpa ekstrak kasar amilase ekstraseluler. Nilai absorbansi yang diperoleh diplotkan pada kurva standar glukosa untuk mengetahui konsentrasi produk glukosa pada sampel. Satu Unit aktivitas enzim amilase dinyatakan sebagai jumlah produk glukosa (μmol) hasil hidrolisis enzim amilase per satu menit pada kondisi pengujian.

Analisis aktivitas ekstrak kasar enzim pululanase (Asha *et al.*, 2013)

Sebanyak 250 μL sampel ekstrak kasar enzim pululanase dan 250 μL larutan substrat 1% (b/v) amilopektin dicampurkan, lalu dihomogenkan dengan menggunakan vortex dan diinkubasi selama 15 menit. Setelah masa inkubasi ditambahkan sebanyak 500 μL DNS, lalu dipanaskan selama 5 menit dalam penangas air pada suhu 100°C. Pengenceran dilakukan dengan menambahkan 4 mL akuades, kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Selanjutnya absorbansi setiap larutan sampel diukur dengan spektrofotometer UV-Vis 1700 pada $\lambda=540$ nm. Blangko sampel dan blangko substrat dibuat sebagai faktor koreksi kadar glukosa sampel terhadap nilai aktivitas enzim pululanase. Blangko sampel adalah ekstrak kasar enzim pululanase ekstraseluler dari masing-masing isolat tanpa substrat amilopektin. Sementara blangko substrat adalah larutan substrat amilopektin 1% (b/v)

tanpa ekstrak kasar enzim pululanase ekstraseluler. Nilai absorbansi yang diperoleh diplotkan pada kurva standar glukosa untuk mengetahui konsentrasi produk glukosa pada sampel. Satu Unit aktivitas enzim pululanase dinyatakan sebagai jumlah produk glukosa (μmol) hasil hidrolisis enzim pululanase per satu menit pada kondisi pengujian.

Analisis derajat polimerisasi (DP) irisan talas

Sampel suspensi talas dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit agar kandungan gula dalam suspensi terlarut secara homogen. Nilai rata-rata DP dihitung berdasarkan persamaan berikut:

$$\frac{\text{Kadar total gula}}{\text{Kadar gula pereduksi}}$$

Analisis kadar gula total diukur dengan metode fenol-sulfat (Dubois *et al.*, 1956). Sebanyak 0,5 mL sampel suspensi talas bebas lemak dan gula-gula sederhana ditambah 0,5 mL fenol 5% (b/v) (Merck, Germany) dan 2,5 mL asam sulfat pekat (Merck, Germany). Selanjutnya sampel dihomogenkan dengan menggunakan vortex, diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit, dan dipanaskan dalam penangas air pada suhu 40°C selama 20 menit. Sampel lalu diencerkan dengan penambahan 12 mL akuades dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis 1700 pada $\lambda=490$ nm. Hasil absorbansi kemudian dimasukkan ke dalam persamaan kurva standar glukosa 0-100 mM.

Gula pereduksi dianalisis menggunakan metode (Miller, 1959) sebagai berikut. Sebanyak 250 μL sampel suspensi talas bebas lemak dan gula sederhana ditambah dengan 500 μL larutan reagen DNS kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Setelah itu, sampel dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit sampai berubah warna menjadi merah kecoklatan. Selanjutnya sampel diencerkan dengan akuades sebanyak 4 mL dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis 1700 pada $\lambda=540$ nm. Hasil absorbansi dimasukkan ke dalam persamaan kurva standar glukosa 0-5 mM.

Analisis jumlah total koloni BAL (Kim *et al.*, 2008)

Jumlah total koloni BAL (CFU/mL) diukur pada setiap interval waktu fermentasi talas dengan metode tuang. Sebanyak 1 mL suspensi talas yang telah dihancurkan ditambah dengan 9 mL akuades steril, dan dilakukan pengenceran berseri yaitu 10^5 , 10^6 , dan 10^7 . Tiga seri hasil pengenceran dipipet sebanyak 1 mL dan diinokulasi pada media MRSA, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 hari.

Analisis statistik

Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan Analisis ragam (ANOVA). Jika berbeda signifikan maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada level 95% ($\alpha=0,05$). Data diolah menggunakan perangkat lunak SPSS 17.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi bakteri asam laktat penghasil enzim amilase dan pululanase

Pada penelitian ini seleksi terhadap 41 isolat BAL dilakukan dengan menggunakan tiga parameter yaitu aktivitas amilase dan pululanase serta jumlah total koloni BAL yang ditumbuhkan selama 24 jam. Aktivitas amilase dan pululanase yang tinggi mengindikasikan potensi isolat BAL dalam menghidrolisis substrat amilosa maupun amilopektin. Hasil hidrolisis dari kedua enzim tersebut pada substrat pati menghasilkan beberapa oligosakarida rantai pendek, maltosa, maltotriosa dan monomer α -D-glukosa (Reddy *et al.*, 2008). Jumlah total koloni BAL yang tinggi dapat mendukung kemampuan BAL dalam menghasilkan aktivitas amilase dan pululanase yang tinggi. Semakin tinggi nilai logaritmik pertumbuhan menunjukkan isolat BAL tersebut semakin cepat dan mudah tumbuh pada substrat pati.

Aktivitas amilase dari 41 isolat BAL tersebut berada pada kisaran 1,24–2,70 Unit/mL, sedangkan aktivitas pululanase pada kisaran 0,69–2,91 unit/mL. Jumlah total koloni BAL dari 41 isolat BAL relatif tinggi yaitu berada pada kisaran 6,18–8,43 (Tabel 1). Berdasarkan aktivitas amilase dan pululanase serta jumlah total koloni BAL tertinggi, maka tiga isolat BAL terpilih untuk digunakan pada penelitian selanjutnya yaitu isolat SU-LS 59 dan SU-LS 67 serta *L. plantarum* D-240 (Tabel 1). Berdasarkan hasil ANOVA dan uji BNT ($P<0,05$) diketahui bahwa baik aktivitas amilase (2,50-2,70 U/mL), pululanase (2,72-2,91 U/mL) maupun jumlah total koloni BAL (8,04-8,29 Log CFU/mL) dari ketiga isolat BAL tersebut tidak berbeda nyata. Sebanyak tujuh isolat BAL lain (SU-LS 38, SU-LS42, SU-LS57, SU-LS 61, SU-LS62, SU-LS63, SU-LS72) juga memiliki aktivitas amilase dan pululanase yang tinggi akan tetapi tidak dipilih karena rendahnya jumlah total koloni BAL dan memerlukan waktu yang lebih lama untuk tumbuh (48 jam). Vishnu *et al.* (2006) melaporkan bahwa kultur *Lactobacillus amylophilus* GV6 mampu menghidrolisis substrat pati dengan menghasilkan ekstrak kasar enzim amilase dan pululanase masing-masing dengan aktivitas 0,59 U/mL dan 0,34 U/mL. Sementara itu Bhanwar dan Ganguli (2014) melaporkan bahwa *Lactobacillus lactis* yang diisolasi dari piket ubi mampu memproduksi ekstrak kasar enzim α -amilase dengan aktivitas 2,54 U/mL.

Tabel 1. Aktivitas enzim amilase, pululanase, dan total koloni BAL pada substrat amilosa maupun amilopektin selama 24 jam

Jenis Isolat	Total Koloni BAL (Log CFU/mL)	Aktivitas Enzim Amilase (Unit/mL)	Aktivitas Enzim Pululanase (Unit/mL)
SU-LS50	6,40 ^a	1,24±0,018 ^a	0,99±0,015 ^a
SU-LS45	8,33 ^d	1,75±0,028 ^d	1,06±0,012 ^a
SU-LS42	6,54 ^a	2,18±0,017 ^c	2,50±0,024 ^d
SU-LS36	8,38 ^d	1,85±0,020 ^d	0,72±0,016 ^c
SU-LS37	6,18 ^a	1,41±0,010 ^a	0,83±0,022 ^c
SU-LS48	8,22 ^b	1,95±0,015 ^d	2,57±0,013 ^b
SU-LS43	6,17 ^a	1,99±0,018 ^d	0,93±0,019 ^a
SU-LS49	7,48 ^c	1,83±0,045 ^d	2,53±0,01 ^d
SU-LS39	7,86 ^c	1,37±0,018 ^a	2,56±0,011 ^d
SU-LS61	8,11 ^d	2,25±0,022 ^c	2,52±0,011 ^d
SU-LS58	7,90 ^c	1,66±0,008 ^b	0,82±0,015 ^c
SU-LS64	8,15 ^b	1,43±0,008 ^a	2,47±0,011 ^b
SU-LS70	8,31 ^d	2,33±0,008 ^c	0,88±0,013 ^c
SU-LS52	8,43 ^d	2,38±0,010 ^c	1,09±0,012 ^a
SU-LS57	7,46 ^c	2,11±0,022 ^d	2,60±0,018 ^d
SU-LS71	7,69 ^c	2,10±0,013 ^d	0,90±0,008 ^a
SU-LS69	8,31 ^d	2,10±0,013 ^d	0,98±0,008 ^a
SU-LS60	8,26 ^d	1,66±0,006 ^b	2,58±0,008 ^d
SU-LS68	8,20 ^b	1,72±0,012 ^d	0,69±0,021 ^c
SU-LS41	7,08 ^c	1,90±0,014 ^d	0,78±0,008 ^c
SU-LS40	6,78 ^a	1,90±0,016 ^d	0,91±0,008 ^a
SU-LS63	7,55 ^c	2,27±0,020 ^c	2,68±0,007 ^d
SU-LS 65	8,09 ^d	2,11±0,007 ^d	1,36±0,008 ^e
SU-LS 67	8,04 ^b	2,50±0,016 ^e	2,91±0,015 ^f
SU-LS75	7,89 ^c	1,76±0,012 ^b	2,61±0,020 ^d
SU-LS74	6,78 ^a	2,31±0,028 ^c	1,21±0,007 ^e
SU-LS66	8,12 ^d	1,84±0,031 ^d	0,90±0,007 ^a
SU-LS62	7,02 ^d	2,37±0,029 ^c	2,74±0,011 ^f
SU-LS59	8,11 ^d	2,70±0,021 ^e	2,88±0,007 ^f
SU-LS38	6,40 ^a	2,10±0,040 ^d	2,24±0,007 ^g
SU-LS44	8,41 ^b	1,89±0,020 ^d	0,92±0,011 ^a
SU-LS47	6,18 ^a	2,15±0,021 ^c	1,90±0,010 ^g
SU-LS46	8,36 ^d	1,71±0,015 ^b	0,89±0,007 ^a
SU-LS54	7,06 ^c	2,41±0,022 ^c	0,94±0,013 ^a
SU-LS72	7,83 ^c	2,08±0,011 ^d	2,65±0,007 ^d
SU-LS53	8,43 ^b	1,45±0,012 ^a	1,07±0,018 ^a
SU-LS55	8,31 ^d	2,60±0,012 ^e	1,19±0,017 ^e
SU-LS51	8,19 ^d	1,00±0,018 ^f	1,04±0,011 ^a
SU-LS73	7,68 ^c	1,39±0,033 ^a	0,89±0,011 ^a
SU-LS56	8,23 ^d	2,11±0,015 ^d	1,13±0,011 ^a
<i>L. plantarum</i> D240	8,29 ^d	2,57±0,021 ^e	2,72±0,016 ^f

Keterangan: Huruf yang sama pada kolom menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata ($\alpha=5\%$), setelah dilakukan uji statistik dengan uji BNT pada SPSS 17.0

Ketiga isolat BAL terpilih dalam penelitian ini memiliki aktivitas amilase dan pululanase yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan *Lactobacillus amylophilus* GV6 dan *Lactobacillus lactis*. Dari ketiga isolat BAL unggulan tersebut, ada satu isolat yang sudah teridentifikasi yaitu *L. plantarum* D-240.

Sementara itu dua isolat lainnya yaitu SU-LS 59 dan SU-LS 67 masih belum diidentifikasi, sehingga kedua isolat ini perlu diidentifikasi pada tahapan selanjutnya.

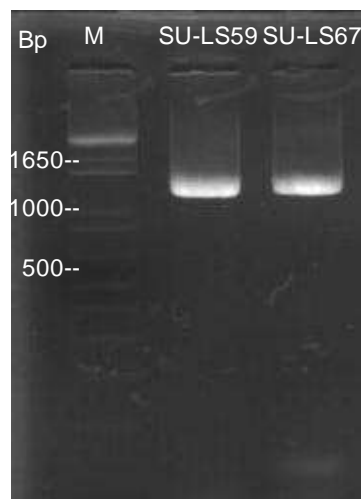
Identifikasi BAL terpilih penghasil enzim amilase dan pululanase

Identifikasi dilakukan terhadap isolat SU-LS 59 dan SU-LS 67 yang belum diketahui strain jenis spesiesnya. Hasil amplifikasi PCR berupa sekuen 16S rDNA bakteri dielektroforesis dalam media 1% agarose. Produk PCR sampel SU-LS 59 dan SU-LS 67 divisualisasi menggunakan *gel documentation system*. Panjang molekul daerah 16S rDNA hasil amplifikasi menggunakan primer 27F dan 1492R berukuran 1500 bp, seperti ditampilkan dalam Gambar 1. Sekuen 16S rDNA strain BAL SU-LS59 dengan panjang 976 bp dibandingkan dengan *GenBank database* NCBI menggunakan BLAST algorithm menunjukkan homologi 99% terhadap *L. mesenteroides* qz-504. Berdasarkan hasil tersebut BAL strain SU-LS59 teridentifikasi sebagai *L. mesenteroides*. Klasifikasi BAL strain SU-LS59 sebagai berikut kingdom: Bacteria, Filum: Firmicutes, Kelas: Bacilli, Ordo: Lactobacillales, Famili: Leuconostocaceae, Genus: Leuconostoc, Spesies: *L. mesenteroides* SU-LS59.

Analisis filogenetik sekuen 16S rDNA strain SU-LS59 dan SU-LS67 ditampilkan pada Gambar 2 dilakukan menggunakan program MEGA versi 5.2 dengan MUSCLE (Tamura *et al.*, 2011). Konstruksi pohon filogenetik berdasarkan jarak kekerabatan genetik dengan metode *neighbor joining* (Saitou dan Nei, 1987). Parameter-parameter yang digunakan yaitu: model substitusi menggunakan Kimura 2-parameter model, *gap* diperlakukan sebagai 'missing data'. Pemilihan model substitusi didasarkan pada hasil analisis menggunakan *Find best DNA/Protein Models* (ML) pada program MEGA. Kekuatan pohon filogenetik diuji menggunakan metode *bootstrap* (Efron, 1979) dengan 100 kali ulangan.

Hasil analisis filogenetik berdasarkan metode *Neighbor Joining* menunjukkan bahwa sekuen 16S rDNA strain SU-LS59 dan SU-LS67 berada satu klaster dengan spesies tipe *L. mesenteroides* NBRC 100496^T (AB681194) dengan nilai *bootstrap* 100%. Nilai *bootstrap* menunjukkan ke-dekatan homologi. Dengan mengacu pada data hasil BLAST dan analisis filogenetik tersebut maka strain SU-LS59 dan SU-LS67 teridentifikasi sebagai *L. mesenteroides* (Gambar 2). Berdasarkan metode *Neighbor Joining* tersebut juga dapat diketahui bahwa strain SU-LS 59 dan SU-LS 67 memiliki nilai kedekatan homologi dengan *Leuconostoc pseudomesenteroides* NRIC 1777^T (AB023-237) sebesar 98%, *Leuconostoc palmae* TMW 2.694^T (AM940225)

sebesar 95%, dan dengan *Leuconostoc citreum* ATCC 49370^T (AF111948) sebesar 94%. Identifikasi isolat BAL *Leuconostoc* sp. juga pernah dilakukan oleh (Dziuba, 2011) dengan metode kombinasi teknik PCR dan analisis spektroskopi FTIR pada bilangan gelombang 4.000 cm⁻¹–500 cm⁻¹. Kombinasi metode tersebut mampu mengidentifikasi strain *Leuconostoc* sp. sampai level spesies dengan tingkat kedekatan homologi mencapai 83-92%.



Gambar 1. Hasil amplifikasi 16S rDNA bakteri asam laktat isolat SU-LS59 dan SU-LS67

Keterangan: Produk PCR 16S rDNA strain SU-LS59 dan SU-LS67 berukuran ±1500 bp; Madalah Ladder DNA 1 kb plus 100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1000, 1650, 2000, 3000 bp

Pemilihan terhadap salah satu strain di antara *L. mesenteroides* SU-LS 59 dan *L. mesenteroides* SU-LS 67 dilakukan karena kedua strain tersebut berasal dari spesies yang sama, diisolasi dari sumber yang sama, serta memiliki aktivitas amilase dan pululanase yang tidak berbeda nyata. Pada penelitian ini dipilih strain isolat *L. mesenteroides* SU-LS 67 yang lebih mudah dan lebih cepat ditumbuhkan sebagai variabel uji.

Pengaruh waktu fermentasi dan jenis kultur starter BAL

Waktu fermentasi talas dan jenis starter BAL terbaik ditetapkan berdasarkan pada nilai rata-rata DP pati talas yang memenuhi syarat untuk pembentukan RS yaitu antara 19-29. Jenis kultur starter BAL yang diragamkan yaitu kultur tunggal *L. plantarum* D-240, kultur tunggal *L. mesenteroides* SU-LS67, dan kultur campuran *L. plantarum* D-240 dan *L. mesenteroides* SU-LS 67 rasio (1:1). Waktu fermentasi yang diragamkan dalam fermentasi talas

adalah 0–24 jam. Setelah 24 jam fermentasi talas, nilai pH talas hasil fermentasi baik pada kultur tunggal *L. plantarum* D-240 maupun *L. mesenteroides* SU-LS 67 serta kultur campuran keduanya terus menunjukkan penurunan dari kisaran pH 5,70–5,85 menjadi 3,68–4,65 (Tabel 2).

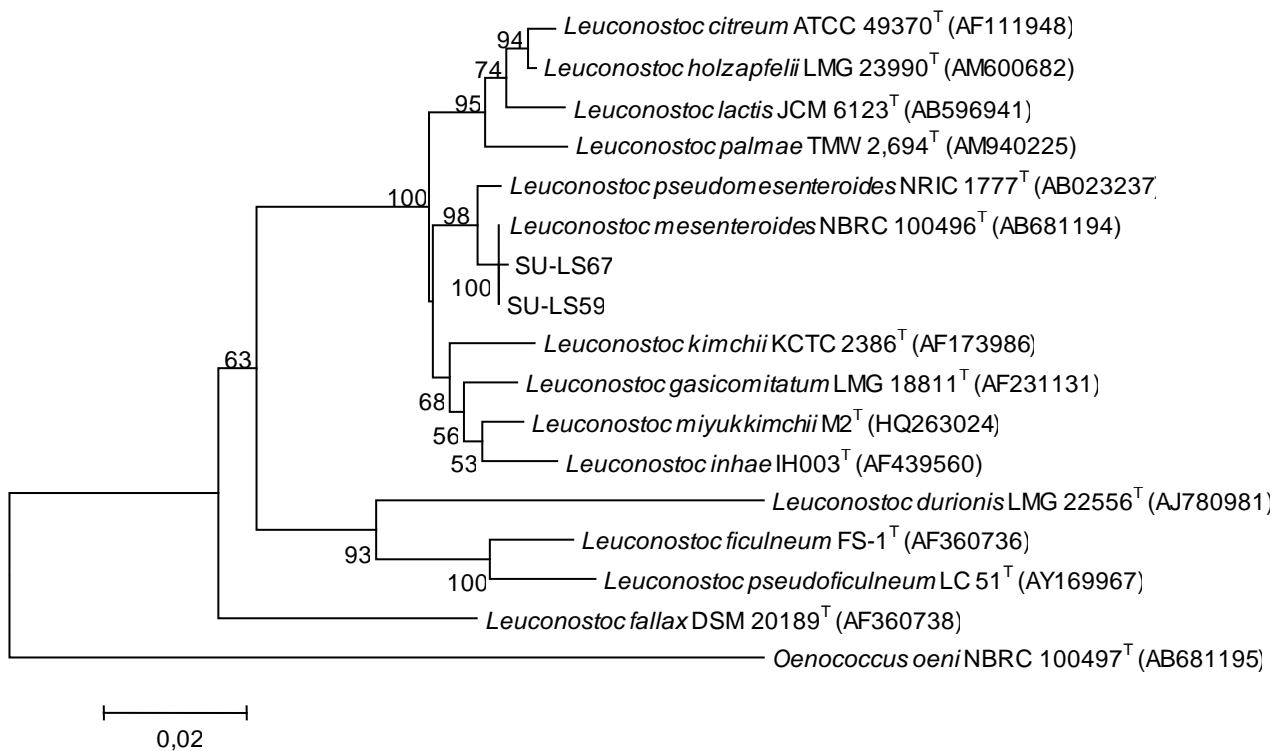
Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin lama waktu fermentasi maka semakin tinggi tingkat keasaman pada irisan talas yang difermentasi. Penurunan pH secara signifikan dari 5,77 menjadi 3,68 pada irisan talas yang difermentasi 24 jam dengan kultur tunggal *L. mesenteroides* SU-LS 67 mengindikasikan bahwa kultur tersebut memproduksi asam laktat dalam jumlah yang lebih besar jika dibandingkan dengan kultur tunggal *L. plantarum*. Penurunan nilai pH yang terjadi pada kultur campuran BAL (dari 5,85 menjadi 3,74) lebih didominasi oleh aktivitas metabolisme *L. Mesenteroides* SU-LS 67 dalam melakukan fermentasi asam laktat terhadap irisan talas. Widaningrum *et al.* (2013) dan Jenie *et al.* (2012) juga melaporkan bahwa fermentasi *L. plantarum* kik pada irisan pisang menyebabkan terjadinya penurunan pH karena dihasilkannya 50-80% asam laktat. Selama fermentasi 24 jam pada irisan talas telah terjadi peningkatan jumlah total koloni *L. plantarum* D-240 dan *L. mesenteroides* SU-LS 67 baik pada kultur tunggal maupun kultur campuran (Tabel 3).

Jumlah total koloni BAL kultur campuran lebih tinggi jika dibandingkan dengan kultur tunggal baik *L. plantarum* D-240 maupun *L. mesenteroides* SU-LS 67. Hal ini sesuai dengan penelitian Jenie *et al.* (2012), Widaningrum *et al.* (2013), dan Nurhayati *et al.* (2014) yang melakukan fermentasi kultur campuran BAL pada irisan pisang tanduk dan pisang uli. Penggunaan kultur campuran menghasilkan pertumbuhan eksponensial tercapai pada jam ke-12 yang ditandai dengan jumlah total koloni BAL sebesar 9,14 Log CFU/mL dan pertumbuhan mulai melambat pada jam ke-24 (9,50 Log CFU/mL) karena telah memasuki fase stasioner.

Tabel 2. Pengaruh waktu fermentasi dan jenis starter terhadap pH irisan talas

Waktu (Jam)	pH		
	<i>L. plantarum</i> D-240	<i>L. mesenteroides</i> SU-LS 67	Kultur Campuran*
0	5,70±0,01 ^a	5,77±0,02 ^a	5,85±0,02 ^a
6	5,17±0,04 ^b	4,96±0,05 ^c	4,99±0,03 ^c
12	4,92±0,01 ^d	4,36±0,03 ^e	4,43±0,04 ^e
18	4,76±0,02 ^f	3,71±0,02 ^g	3,79±0,03 ^g
24	4,65±0,03 ⁿ	3,68±0,02 ^l	3,74±0,01 ^l

Keterangan: Huruf yang sama pada kolom dan baris menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata dengan taraf nyata 95%, ($\alpha=5\%$), setelah dilakukan uji statistik dengan BNT pada SPSS 17.0; * *L. plantarum* D-240 + *L. mesenteroides* SU-LS 67



Gambar 2. Pohon filogenetik sekuen 16S rDNA strain SU-LS59 dan SU-LS67 menggunakan metode Neighbor Joining dengan 100 kali ulangan dan *Oenococcus oeni* NBRC 100497^T (AB681-195) sebagai outgroup

Kultur tunggal *L. mesenteroides* SU-LS 67 menunjukkan tingkat pertumbuhan yang lebih tinggi daripada kultur tunggal *L. plantarum* D-240. Kultur tunggal *L. mesenteroides* SU-LS 67 mencapai pertumbuhan eksponensial pada jam ke-18 dengan jumlah total koloni BAL 9,27 Log CFU/mL. Sementara itu kultur tunggal *L. plantarum* D-240 mencapai fase eksponensial pada jam ke-24 dengan jumlah total koloni BAL 9,28 Log CFU/mL.

Tabel 3. Pengaruh waktu fermentasi dan jenis starter terhadap jumlah total koloni BAL pada irisan talas

Waktu (Jam)	Total Koloni BAL (Log CFU/mL)		
	<i>L. plantarum</i> D-240	<i>L. mesenteroides</i> SU-LS 67	Kultur Campuran*
0	6,68±0,28 ^a	6,60±0,15 ^a	6,88±0,22 ^d
6	7,98±0,27 ^c	7,84±0,24 ^c	7,98±0,20 ^c
12	8,34±0,18 ^d	8,85±0,19 ^e	9,14±0,12 ^f
18	8,99±0,13 ^e	9,27±0,15 ^f	9,38±0,14 ^g
24	9,28±0,21 ^f	9,40±0,11 ^g	9,50±0,10 ^g

Keterangan: Huruf yang sama pada kolom dan baris menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata ($\alpha=5\%$), setelah dilakukan uji statistik dengan BNT pada SPSS 17.0; **L. plantarum* D-240 + *L. mesenteroides* SU-LS 67

Fase adaptasi kultur tunggal *L. plantarum* D-240 relatif lebih lambat daripada kultur tunggal *L. mesenteroides* SU-LS 67. Hal ini mengindikasikan bahwa kultur tunggal *L. mesenteroides* SU-LS 67 bekerja lebih dominan dalam proses fermentasi talas sehingga memiliki jumlah total BAL (Log CFU/mL) tidak berbeda nyata ($P<0,05$) dengan kultur campuran. Persiapan kultur dilakukan pada media MRSB, sehingga pada saat diinokulasi pada irisan talas kultur BAL membutuhkan waktu adaptasi kurang dari 6 jam. Fase adaptasi bergantung pada kecepatan penyesuaian dengan lingkungan, jika nutrisi yang tersedia dan kondisi lingkungan yang baru sangat berbeda, diperlukan waktu penyesuaian untuk mensintesis enzim-enzim yang dibutuhkan untuk metabolisme. Fase eksponensial pada kultur campuran sudah tercapai pada jam ke-12 yang dilanjutkan fase stasioner pada jam ke-18 sampai jam ke-24. Sementara itu pada kultur tunggal *L. plantarum* atau *L. mesenteroides* fase eksponensial berlangsung mulai dari jam ke-6 sampai jam ke-18 dan dilanjutkan fase stasioner mulai dari jam ke-18 sampai jam ke-24.

Nilai rata-rata DP pada fermentasi talas dengan kultur tunggal *L. plantarum* D-240 maupun *L. mesenteroides* SU-LS 67 menunjukkan bahwa nilai DP optimum untuk pembentukan RS berhasil dicapai pada jam ke-24. Selama 24 jam, kultur tunggal *L. plantarum* D-240 atau *L. mesenteroides*

SU-LS 67 mampu menghidrolisis amilosa dan amilopektin pada talas hingga mencapai nilai rata-rata DP masing-masing sebesar 24,67 dan 22,95 (Tabel 4). Hasil analisis statistika menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan nyata ($P<0,05$) antara nilai rata-rata DP dari fermentasi talas dengan kultur tunggal *L. plantarum* D-240 maupun *L. mesenteroides* SU-LS 67. Hal tersebut membuktikan bahwa kultur tunggal baik *L. plantarum* D-240 maupun *L. mesenteroides* SU-LS 67 dapat dimanfaatkan untuk fermentasi talas dengan waktu optimum 24 jam guna menghasilkan irisan talas dengan DP 19-29 sebagai bahan baku RS.

Tabel 4. Pengaruh waktu fermentasi dan jenis starter terhadap derajat polimerisasi irisan talas

Waktu (Jam)	Rata-rata Nilai DP		
	<i>L. plantarum</i> D-240	<i>L. mesenteroides</i> SU-LS 67	Kultur Campuran*
0	162,77±0,22 ^a	13904±0,12 ^b	112,02±0,24 ^c
6	56,54±0,07 ^d	48,69±0,71 ^e	46,83±0,72 ^e
12	45,62±0,49 ^e	37,52±0,36 ^f	33,37±0,37 ^g
18	34,37±0,44 ^g	31,27±0,09 ^h	27,13±0,17 ⁱ
24	24,67±0,17 ^j	22,95±0,29 ^j	20,81±0,24 ^k

Keterangan: Huruf yang sama pada kolom dan baris menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata dengan taraf nyata 95 %, ($\alpha=5\%$), setelah dilakukan uji statistik dengan BNT pada SPSS 17.0; **L. plantarum* D-240 + *L. mesenteroides* SU-LS 67

Penggunaan kultur campuran *L. plantarum* D-240 dan *L. mesenteroides* SU-LS 67 merupakan perlakuan terbaik dalam fermentasi talas karena mampu menghasilkan rata-rata nilai DP pada irisan talas sebesar 27,13 dalam waktu yang lebih singkat daripada kultur tunggal yaitu pada jam ke-18 (Tabel 4). Jenie *et al.* (2012) melaporkan bahwa kultur campuran BAL *L. plantarum* kik dan *L. fermentum* selama fermentasi 24 jam dapat menghidrolisis pati menjadi amilosa rantai pendek sebagai bahan baku pati resisten. Dengan demikian kultur campuran *L. plantarum* D-240 dan *L. mesenteroides* SU-LS 67 dalam penelitian ini memiliki kemampuan lebih baik dalam mempersingkat waktu fermentasi jika dibandingkan dengan kultur campuran pada penelitian Jenie *et al.* (2012).

Pada penelitian ini tidak dilakukan analisis mikrostruktur, akan tetapi penelitian Wronkowska *et al.* (2006) dapat menjelaskan bahwa fermentasi bahan pangan berpati oleh BAL selama 24 jam menunjukkan perubahan mikrostruktur pati yaitu pem-

bentukan struktur globular dan lamellar. Hidrolisis parsial amilosa rantai panjang oleh enzim amilase dapat menurunkan nilai DP amilosa sehingga dihasilkan polisakarida rantai pendek (Vishnu *et al.*, 2006). Sementara itu pelepasan cabang (*debranching*) amilopektin oleh pululanase menghasilkan polimer glukosa rantai lurus yang merupakan polisakarida dengan DP lebih kecil (Vatanasuchart *et al.*, 2010). Semakin banyak polisakarida rantai pendek (DP 19-29) yang terbentuk meningkatkan kadar RS yang dapat dihasilkan melalui proses retrogradasi (Soto *et al.*, 2007; Sugiyono *et al.*, 2009; Zaragoza *et al.*, 2010; Faridah *et al.*, 2013).

KESIMPULAN

Dari 41 isolat BAL yang diseleksi telah diperoleh tiga isolat dengan aktivitas ekstrak kasar amilase, pulunase serta jumlah total koloni BAL tertinggi yaitu isolat *L. plantarum* D-240, SU-LS 59 dan SU-LS 67. Hasil identifikasi dengan metode sekuensing PCR dan analisis filogenetik *Neighbor Joining* menunjukkan bahwa strain SU-LS59 dan SU-LS67 teridentifikasi sebagai *L. mesenteroides* dengan nilai *bootstrap* 100%. Kultur campuran *L. plantarum* D-240 dan *L. mesenteroides* SU-LS 67 dengan rasio 1:1 merupakan perlakuan terbaik dalam fermentasi talas karena menghasilkan nilai DP yang memenuhi syarat (27,13) dengan waktu fermentasi yang lebih singkat (18 jam).

UCAPAN TERIMA KASIH

Kegiatan penelitian ini didanai oleh Program Beasiswa Pascasarjana Kementerian Ristek dan mendapatkan bantuan bahan kimia dari DIPA PN Pusat Penelitian Biologi LIPI 2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Alariya SS, Sethi S, Gupta S, Lal GB. 2013. Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil. *Arch Appl Sci Res* 5: 15-24.
- Ammor S, C Rachman C, Chaillou S, Prevost H, Dousset X, Zagorec M, Dufour E, Chevallier I. 2005. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausage. *Food Microbiol* 22: 373-382. DOI: 10.1016/j.fm.2004.11.005.
- Asha R, Niyonzima FN, Sunil SM. 2013. Purification and properties of pullulanase from *Bacillus halodurans*. *Int Res J Biol Sci* 2: 35-43.
- Bhanwar S, Ganguli A. 2014. α -amylase and β -galactosidase production on potato starch waste by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* isolated from pickled yam. *J Sci Ind Res* 73: 324-330.
- Dziuba B. 2011. Identification of selected *Leuconostoc* species with the use of FTIR spectroscopy and artificial neural networks. *Acta Sci Pol Technol Aliment* 10: 275-28.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Calorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350-356. DOI: 10.1021/ac60111a017.
- Efron B. 1979. Bootstrap methods: another look at the jackknife. *Ann Statist* 7: 1-26.
- Faridah DN, Rahayu WP, Apriyadi MS. 2013. Modifikasi pati Garut (*Marantha Arundinacea*) dengan perlakuan hidrolisis asam dan siklus pemanasan-pendinginan untuk menghasilkan pati resisten tipe 3. *J Teknol Industri Pertanian* 23: 61-69.
- Jenie BSL, Reski PP, Kusnandar F. 2012. Fermentasi kultur campuran bakteri asam laktat dan pemanasan otoklaf dalam meningkatkan kadar pati resisten dan sifat fungsional tepung pisang tanduk (*Musa paradisiaca formatypica*). *J Penelitian Pasca-panen pertanian* 9: 18-26.
- Kim JH, Sunako M, Ono H, Murooka Y, Fukusaki E, Yamashita. 2008. Characterization of gene encoding amylopullulanase from plant-originated lactic acid bacterium, *Lactobacillus plantarum* L137. *J Biosci Bioeng* 106: 449-459. DOI: 10.1263/bb.106.449.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426-428. DOI: 10.1021/ac60147a030.
- Moradi M, Shariati P, Tabandeh F, Yakhchali B, Khaniki GB. 2014. Screening and isolation of powerful amyolytic bacterial strains. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 3: 758-768.
- Nikolova D, Evstatieva Y, Georgieva R, Danova S, Savov V, Ilieva S, Dalev P. 2009. Molecular taxonomic characterisation of probiotic strain *Lactobacillus* sp. 50 P1. *Biotechnol Biotec* 23: 779-782. DOI: 10.1080/13102818.2009.10818539.
- Nurhayati, Jenie BSL, Widowati S, Kusumaningrum HD. 2014. Komposisi kimia dan kristalinitas tepung pisang termodifikasi secara fermentasi

- spontan dan siklus pemanasan bertekanan-pendinginan. *Agritech* 34: 146-150.
- Pokhrel B, Wanjare P, Singh S, Purushotham B, Kumara SW. 2013. Isolation, screening and characterization of promising alfa-amylase producing bacteria from sewage enriched soil. *Int J Adv Biotechnol Res* 4: 286-290.
- Rahmawati W, Kusumastuti YA, Aryanti N. 2012. Karakterisasi pati talas (*Colocasia esculenta* (L) *Schoot*) sebagai alternatif sumber pati di Indonesia. *J Teknol Kimia Industri* 1: 347-351.
- Reddy G, Altaf MD, Naveena BJ, Venkateshwar M, Kumar EV. 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation-A review. *Biotechnol Adv* 26: 22-34. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.07.004.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- Sajilata MG, Rekha SS, Puspha RK. 2006. Resistant starch a review. *Compr Rev Food Sci F* 5: 1-17. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2006.tb00076.x.
- Soto RAG, Escobedo RM, Sanchez HH, Rivera MS, Bello-Perez LA. 2007. The influence of time and storage temperature on resistant starch formation from autoclaved debranched banana starch. *Food Res Int* 40: 304-310. DOI: 10.1016/j.foodres.2006.04.001.
- Sugiyono, Pratiwi R, Faridah DN. 2009. Modifikasi pati Garut dengan perlakuan siklus pemanasan suhu tinggi-pendinginan untuk menghasilkan pati resisten tipe III. *J Teknol Industri Pangan* 20: 17-24.
- Sujaya N, Ramona Y, Widarini NP, Suarini NP, Dwipayanti NMU, Nociaanitri KA, Nursini NW. 2008. Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat dari susu kuda Sumbawa. *J Veteriner* 9: 52-59.
- Sulistiani, Abinawanto, Sukara E, Salamah A, Dinoto A, Mangunwardoyo W. 2014. Identification of lactic acid bacteria in sayur asin from Central Java (Indonesia) based on 16S rDNA sequence. *Int Food Res J* 21: 527-532.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739. DOI: 10.1093/molbev/msr121.
- Vatanasuchart N, Tungrakul P, Wongkrajang K, Naivikul O. 2010. Properties of pullulanase debranched cassava starch and type III resistant starch. *Kasetsart J (Nat Sci)* 44: 131-141.
- Vishnu C, Naveena BJ, Altaf MD, Venkateshwar M, Reddy G. 2006. Amylopullulanase—A novel enzyme of *L. amylophilus* GV6 in direct fermentation of starch to L(+) lactic acid. *Enzyme Microb Tech* 38: 545-550. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.07.010.
- Widaningrum, Jenie BSL, Nur Richana, Suliantari. 2013. Penambahan tepung pisang uli modifikasi kaya pati resisten pada pembuatan yoghurt sinbiotik. *J Penelitian Pascapanen Pertanian* 10: 38-47.
- Wronkowska M, Smietana MS, Krupa U, Biedrzycka E. 2006. *In vitro* fermentation of new modified starch preparations—changes of microstructure and bacterial end-products. *J Enzyme Microb Tech* 40: 93-99. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.10.039.
- Zaragoza EF, Riquelme-Navarrete MJ, Sanchez-Zapata E, Perez-Alvarez JA. 2010. Resistant starch as functional ingredient: A review. *Food Res Int* 43: 931-942. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.02.004.