

Isolation of Protein and Lactic Acid Bacteria from Modified Dali Ni Horbo Traditional Food as Probiotic Candidates

Isolasi Protein dan Bakteri Asam Laktat dari Pangan Tradisional Dali Ni Horbo yang Dimodifikasi sebagai Kandidat Probiotik

Balqis Natasya ^a, Lasminar Meha ^a, Asyrun Lubis ^b, Razoki Lubis ^b, Finna Piska ^{b*}

^aBachelor of Clinical Pharmacy, Faculty of Health Sciences, Universitas Prima Indonesia, Medan, Indonesia.

^bDepartment of Clinical Pharmacy, Faculty of Health Sciences, Universitas Prima Indonesia, Medan, Indonesia.

^cPUI Phyto Degenerative & Lifestyle Medicine, Universitas Prima Indonesia. Indonesia.

*Corresponding author: finnapiska@unprimdn.ac.id

Abstrak

Background: *Dali ni horbo* is a traditional North Sumatran food made from buffalo milk that has potential as a source of protein and lactic acid bacteria (LAB). Its high nutritional content and fermentation process make it a promising candidate for functional food development with probiotic properties. **Objective:** This study aimed to isolate and characterize proteins and LAB from *dali ni horbo* produced using different treatments, namely pure buffalo milk, the addition of pineapple juice, and the addition of citrus juice. **Methods:** Protein isolation was carried out using the ammonium sulfate precipitation method, while LAB were isolated on MRS agar supplemented with CaCO₃. Protein characterization was performed using biuret, ninhydrin, and xanthoprotein tests. LAB characterization included Gram staining, catalase test, and bile salt tolerance test. **Results:** The results showed that the protein isolate obtained using pineapple as a coagulant had the highest yield (2.3321 g) compared to citrus (1.8516 g). All protein isolates tested positive for biuret, ninhydrin, and xanthoprotein, indicating the presence of peptide bonds, amino acids, and aromatic groups. A total of 18 LAB isolates were obtained, all of which were Gram-positive, rod-shaped, catalase-negative, and tolerant to bile salts. **Conclusion:** *Dali ni horbo* has strong potential as a source of protein and probiotic candidates, indicating its applicability as a functional food to support health.

Kata kunci : Bile salt tolerance, *Dali ni horbo*, lactic acid bacteria, protein extract, probiotics

Abstrak

Latar belakang: *Dali ni horbo* merupakan pangan tradisional khas Sumatera Utara berbasis susu kerbau yang berpotensi sebagai sumber protein dan bakteri asam laktat (BAL). Kandungan nutrisi yang tinggi serta proses fermentasi menjadikan produk ini berpotensi dikembangkan sebagai pangan fungsional berbasis probiotik. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi protein serta BAL dari *dali ni horbo* yang dibuat dengan variasi perlakuan, yaitu susu kerbau murni, penambahan perasan nanas, dan penambahan perasan jeruk. **Metode:** Isolasi protein dilakukan menggunakan metode presipitasi amonium sulfat, sedangkan isolasi BAL menggunakan media MRS agar yang diperkaya CaCO₃. Karakterisasi protein dilakukan melalui uji biuret, ninhidrin, dan xantoprotein. Karakterisasi BAL meliputi pewarnaan Gram, uji katalase, serta uji toleransi terhadap garam empedu. **Hasil:** Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat protein dari perlakuan koagulan nanas memiliki berat tertinggi (2,3321 g) dibandingkan jeruk nipis (1,8516 g). Seluruh isolat protein menunjukkan hasil positif pada uji biuret, ninhidrin, dan xantoprotein yang mengindikasikan adanya ikatan peptida, asam amino, dan gugus aromatik. Isolasi BAL menghasilkan 18 isolat murni dengan karakteristik Gram positif, berbentuk batang, katalase negatif, serta mampu tumbuh pada media yang mengandung garam empedu. **Kesimpulan:** *Dali ni horbo* berpotensi sebagai sumber protein dan kandidat probiotik lokal, sehingga dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai pangan fungsional yang mendukung kesehatan.

Kata Kunci: Toleransi garam empedu, *Dali ni horbo*, bakteri asam laktat, ekstrak protein, probiotik.



Copyright © 2020 The author(s). You are free to : **Share** (copy and redistribute the material in any medium or format) and **Adapt** (remix, transform, and build upon the material) under the following terms: **Attribution** — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; **NonCommercial** — You may not use the material for commercial purposes; **ShareAlike** — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original. Content from this work may be used under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International \(CC BY-NC-SA 4.0\) License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Article History:

Received: 07/12/2025,
Revised: 16/02/2026,
Accepted: 16/02/2026,
Available Online: 18/03/2026,



<https://doi.org/10.36490/journal-jps.com.v9i1.1367>

Pendahuluan

Dali ni horbo merupakan makanan tradisional khas masyarakat Batak Toba yang dihasilkan dari fermentasi susu kerbau secara konvensional dengan penambahan bahan asam alami seperti nanas atau jeruk nipis. Produk ini memiliki karakteristik menyerupai keju segar dengan tekstur padat dan cita rasa khas. Secara tradisional, dali ni horbo tidak hanya berfungsi sebagai sumber pangan, tetapi juga memiliki nilai budaya dan ekonomi bagi masyarakat lokal [1,2].

Susu kerbau sebagai bahan baku utama diketahui memiliki kandungan nutrisi yang lebih tinggi dibandingkan susu sapi, terutama dalam hal protein, lemak, dan total padatan. Kandungan protein susu kerbau berkisar antara 3,8–4,5%, sedangkan lemaknya dapat mencapai 6–8%, lebih tinggi dibandingkan susu sapi yang rata-rata mengandung protein sekitar 3,2–3,4% dan lemak 3–4% [3]. Kandungan nutrisi yang tinggi ini menjadikan susu kerbau sebagai sumber potensial dalam pengembangan pangan fungsional berbasis protein hewani.

Protein susu tidak hanya berfungsi sebagai sumber nutrisi, tetapi juga memiliki potensi sebagai prekursor peptida bioaktif. Melalui proses fermentasi atau hidrolisis enzimatis, protein dapat dipecah menjadi peptida-peptida kecil yang memiliki aktivitas biologis tertentu. Salah satu aktivitas yang banyak dikaji adalah kemampuan sebagai inhibitor *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE), yang berperan penting dalam sistem regulasi tekanan darah [4]. Inhibisi ACE dapat menghambat konversi angiotensin I menjadi angiotensin II, sehingga membantu menurunkan tekanan darah dan berpotensi dalam pencegahan hipertensi [5]. Hal ini menjadikan produk fermentasi susu sebagai kandidat pangan fungsional yang mendukung kesehatan kardiovaskular.

Selain itu, proses fermentasi pada produk susu umumnya melibatkan bakteri asam laktat (BAL), yang memiliki peran penting dalam meningkatkan kualitas nutrisi, keamanan, serta sifat fungsional pangan. BAL diketahui mampu menghasilkan senyawa antimikroba, seperti asam organik, bakteriosin, dan hidrogen peroksida, yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen [6]. Di sisi lain, BAL juga berpotensi sebagai probiotik karena kemampuannya dalam menjaga keseimbangan mikrobiota usus, meningkatkan sistem imun, serta memberikan efek kesehatan lainnya bagi inang.

Penggunaan bahan asam alami seperti nanas dan jeruk nipis dalam pembuatan dali ni horbo tidak hanya berfungsi sebagai koagulan, tetapi juga berpotensi memengaruhi komposisi protein dan aktivitas mikroba selama proses fermentasi. Nanas mengandung enzim bromelain yang dapat membantu hidrolisis protein, sedangkan jeruk nipis mengandung asam sitrat yang dapat menurunkan pH dan mempercepat proses koagulasi. Variasi perlakuan ini diduga akan menghasilkan karakteristik protein, peptida bioaktif, dan populasi BAL yang berbeda.

Meskipun dali ni horbo telah lama dikonsumsi oleh masyarakat lokal, kajian ilmiah yang mengintegrasikan potensi protein, peptida bioaktif, dan bakteri asam laktat dari produk ini masih terbatas. Padahal, pendekatan tersebut penting dalam mendukung pengembangan dali ni horbo sebagai pangan fungsional berbasis probiotik yang memiliki nilai tambah ilmiah dan komersial.

Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi protein serta bakteri asam laktat dari dali ni horbo yang dibuat dengan tiga perlakuan berbeda, yaitu susu kerbau tanpa penambahan, susu dengan penambahan nanas, dan susu dengan penambahan jeruk nipis. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan dasar ilmiah dalam pengembangan dali ni horbo sebagai pangan fungsional yang berpotensi mendukung kesehatan, khususnya terkait aktivitas antihipertensi dan probiotik.

Metode Penelitian

Bahan dan Peralatan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi plat tetes, pH meter, magnetic stirrer, hot plate, sentrifugasi, autoklaf (HMC Hirayama), inkubator (Labnet), timbangan analitik (Shimazu), spektrofotometri, biological safety cabinet (Biobace), mikroskop. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi susu kerbau segar, Dali ni horbo, amonium sulfat, buffer fosfat pH 7, aquades, NaOH, CuSO₄, ninhidrin, HNO₃, pekat, etanol 95%, perasan buah nanas, dan perasan jeruk nipis media MRS broth dan MRS agar, kalsium karbonat (CaCO₃), aquadest steril, asam klorida (HCL), alkohol 70%, garam empedu (bile salt), hidrogen peroksida (H₂O₂).

Pembuatan Dali Ni Horbo

Dali Ni Horbo (susu murni)

Dali Ni Horbo dari bahan dasar susu murni segar di ambil sebanyak 500 mL disaring terlebih dahulu untuk menghilangkan partikel asing, kemudian dimasukkan ke dalam panci bersih. Selanjutnya, susu dipanaskan pada suhu rendah sambil diaduk hingga membentuk gumpalan. Selanjutnya dipindahkan ke wadah tertutup dan di fermentasi pada suhu ruang selama 48 jam hingga terbentuk Dali Ni Horbo [7].

Dali Ni Horbo dengan penambahan perasan nanas

Pembuatan Dali Ni Horbo dengan penambahan nanas dilakukan menggunakan susu kerbau segar sebagai bahan baku utama sebanyak 500 mL. Susu yang telah disaring dimasukkan ke dalam panci, kemudian ditambahkan perasan buah nanas segar sebanyak 2 sendok makan, campuran diaduk hingga homogen dan selanjutnya dipanaskan pada suhu rendah sambil diaduk perlahan hingga ditandai dengan terbentuknya gumpalan. Selanjutnya dipindahkan ke wadah tertutup dan di fermentasi pada suhu ruang selama 48 jam hingga terbentuk Dali Ni Horbo.

Dali Ni Horbo dengan penambahan perasan jeruk

Pembuatan Dali Ni Horbo dengan penambahan jeruk dilakukan menggunakan susu kerbau segar sebagai bahan baku utama sebanyak 500 mL. Susu yang telah disaring dimasukkan ke dalam panci, kemudian ditambahkan perasan jeruk sebanyak 2 sendok makan, campuran diaduk hingga homogen dan selanjutnya dipanaskan pada suhu rendah sambil diaduk perlahan hingga ditandai dengan terbentuknya gumpalan. Selanjutnya dipindahkan ke wadah tertutup dan di fermentasi pada suhu ruang selama 48 jam hingga terbentuk Dali Ni Horbo.

Isolasi Protein

Isolasi protein dilakukan pada sampel Dali ni horbo yang telah dimodifikasi dengan penambahan buah, yaitu susu+nanas (SN) dan susu+jeruk (SJ). Sampel susu murni (SM) tidak digunakan untuk isolasi protein karena pada penelitian ini SM digunakan sebagai sumber isolasi bakteri asam laktat (BAL) pada tahap sebelumnya. Oleh karena itu, isolasi protein difokuskan pada sampel yang telah dimodifikasi (SN dan SJ) untuk mengevaluasi karakteristik protein setelah proses modifikasi bahan. Isolasi protein dilakukan melalui tahap ekstraksi dan presipitasi protein [8].

Sebanyak 100 g sampel Dali ni horbo dari masing-masing perlakuan (SN dan SJ) dimasukkan ke dalam beaker glass berkapasitas 1000 mL. Ke dalam setiap sampel ditambahkan 500 mL buffer fosfat pH 7. Campuran kemudian dihomogenkan menggunakan magnetic stirrer pada suhu 40°C selama 60 menit untuk melarutkan protein. Setelah proses pelarutan selesai, campuran dipindahkan ke dalam tabung falcon dan disentrifugasi pada kecepatan 4.000 rpm selama 40 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang mengandung protein terlarut dipisahkan dari endapan padat dan disimpan pada suhu dingin untuk tahap presipitasi protein. Presipitasi protein dilakukan menggunakan metode salting out dengan amonium sulfat [8].

Sebanyak 100 mL supernatan dimasukkan ke dalam beaker glass 200 mL, kemudian ditempatkan di dalam beaker glass berkapasitas 1000 mL yang berisi es batu untuk menjaga suhu tetap rendah dan mencegah terjadinya denaturasi protein. Amonium sulfat ditambahkan secara bertahap hingga mencapai tingkat kejenuhan 100%. Penambahan dilakukan sambil diaduk menggunakan magnetic stirrer pada suhu 0°C hingga amonium sulfat larut sempurna. Setelah proses presipitasi selesai, larutan dipindahkan ke dalam tabung

falcon dan disentrifugasi pada kecepatan 4.000 rpm selama 40 menit pada suhu 4°C. Endapan protein yang terbentuk dipisahkan dari supernatan dan dikumpulkan sebagai isolat protein kasar [8].

Endapan protein hasil presipitasi kemudian dibilas menggunakan buffer fosfat dingin untuk menghilangkan sisa amonium sulfat dengan proses sentrifugasi ulang pada kecepatan 4.000 rpm selama 40 menit pada suhu 4°C. Tahap ini dilakukan untuk memperoleh isolat protein yang lebih murni dan stabil sebelum dilakukan proses karakterisasi [8].

Karakterisasi Protein

Uji Biuret

Uji biuret dilakukan menggunakan metode plat tetes, isolat protein diteteskan ke permukaan plat tetes. Selanjutnya ditambahkan 5 tetes larutan NaOH dan 1 tetes larutan CuSO₄, kemudian diaduk menggunakan batang pengaduk hingga homogen. Perubahan warna isolat menjadi ungu menunjukkan hasil positif terhadap uji biuret [9].

Uji Ninhidrin

Uji ninhidrin dilakukan dengan memasukkan masing-masing isolat protein ke dalam tabung reaksi. Ke dalam setiap tabung ditambahkan 5 tetes larutan ninhidrin dan diaduk hingga homogen. Selanjutnya, campuran dipanaskan di atas hot plate menggunakan media air dalam beaker glass pada suhu 100°C. Pemanasan dilakukan hingga terjadi perubahan warna larutan menjadi ungu, yang menunjukkan adanya asam amino bebas dalam isolat protein [10].

Uji Xantoprotein

Uji xantoprotein dilakukan dengan memasukkan masing-masing isolat protein ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, ke dalam setiap tabung ditambahkan 1–3 tetes HNO₃ pekat, kemudian campuran dipanaskan selama 1 menit. Setelah pemanasan, larutan didinginkan di bawah aliran air. Setelah dingin, larutan ditambahkan NaOH secara perlahan dan hati-hati hingga terjadi perubahan warna menjadi kuning, yang menunjukkan adanya gugus aromatik pada struktur protein [11].

Isolasi dan Pemurnian BAL

Isolasi bakteri asam laktat (BAL) probiotik dari Dali ni Horbo diawali dengan pengambilan sampel Dali Ni Horbo. Sampel kemudian diambil sebanyak satu sendok spatula dan dilarutkan dalam media MRS broth, selanjutnya dihomogenkan hingga tercampur merata. Suspensi sampel diinkubasi pada suhu 30–37°C selama 24–48 jam. Setelah inkubasi, isolasi bakteri dilakukan melalui pengenceran bertingkat dengan perbandingan 1:9. Disiapkan tujuh tabung reaksi yang masing-masing berisi 9 ml larutan NaCl steril. Sebanyak 1 ml suspensi sampel dimasukkan ke dalam tabung pertama dan dihomogenkan, kemudian 1 ml dari tabung tersebut dipindahkan ke tabung berikutnya hingga diperoleh pengenceran 10⁻⁷ [12].

Selanjutnya, sebanyak 0,1 ml dari pengenceran 10⁻⁵ hingga 10⁻⁷ diinokulasikan ke dalam media MRSA yang mengandung CaCO₃ menggunakan metode sebar (*spread plate*). Media kemudian diinkubasi selama 24–48 jam. Koloni bakteri yang tumbuh diamati dan dipilih berdasarkan karakteristik morfologi, yaitu berbentuk bulat, cembung, serta menghasilkan zona bening di sekitarnya. Koloni terpilih kemudian dipindahkan ke media padat baru untuk proses pemurnian. Pemurnian dilakukan dengan metode goresan berbentuk T menggunakan jarum ose, dan diulangi hingga pemurnian kedua. Selanjutnya, kultur diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam untuk memperoleh isolat bakteri asam laktat yang murni [12].

Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan dengan mengambil koloni bakteri dari media padat, kemudian dibuat preparat ulas pada kaca objek menggunakan jarum ose steril. Preparat tersebut difiksasi dengan pemanasan di atas api bunsen sebanyak 2–3 kali hingga bakteri melekat pada permukaan kaca. Selanjutnya, kaca objek ditetesi larutan kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Setelah itu, larutan iodine ditambahkan dan didiamkan selama 1 menit, lalu kembali dibilas dan dikeringkan. Proses dekolorisasi dilakukan dengan meneteskan alkohol 96% hingga warna ungu memudar, kemudian segera dibilas dan dikeringkan. Pewarnaan penutup dilakukan dengan safranin selama 30 detik, diikuti pembilasan dan pengeringan. Preparat yang telah siap diamati menggunakan mikroskop dengan minyak imersi pada perbesaran 100×. Bakteri asam laktat umumnya menunjukkan bentuk batang dan berwarna ungu, yang mengindikasikan sifat Gram positif [13].

Uji katalase

Uji katalase dilakukan dengan memilih satu koloni bakteri yang tumbuh pada media agar menggunakan jarum inokulum steril, kemudian diletakkan pada kaca objek mikroskop yang telah dibersihkan dengan alkohol. Selanjutnya, ditambahkan dua tetes larutan hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% dan diamati terjadinya reaksi. Munculnya gelembung sebagai akibat pembentukan gas oksigen menunjukkan hasil katalase positif. Sebaliknya, tidak terbentuknya gelembung dan tidak adanya pelepasan gas oksigen menunjukkan hasil katalase negatif. Bakteri asam laktat termasuk dalam kelompok bakteri katalase negatif [14].

Uji Toleransi Garam Empedu

Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam tabung yang berisi 7 mL larutan NaCl 0,8%. Kekeruhan suspensi bakteri kemudian diukur dengan menentukan nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm hingga diperoleh nilai absorbansi (A) sebesar 0,1. Selanjutnya, suspensi bakteri dengan absorbansi 0,1 dipipet sebanyak 0,1 mL dan dimasukkan ke dalam masing-masing tabung yang berisi media MRS Broth serta MRS Broth yang ditambahkan bile salt, kemudian dihomogenkan. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Setelah inkubasi, masing-masing suspensi diambil sebanyak 0,1 mL dan diinokulasikan ke media padat menggunakan metode spread plate. Media kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 24–48 jam [15].

Hasil dan Pembahasan

Isolasi Protein

Isolasi protein dilakukan pada dua jenis Dali ni horbo yang diproduksi menggunakan koagulan berbeda, yaitu susu nanas (SN) dan susu jeruk nipis (SJ). Tahap isolasi diawali dengan proses ekstraksi menggunakan buffer fosfat pH 7 untuk melarutkan fraksi protein dari matriks sampel. Selanjutnya dilakukan presipitasi protein menggunakan amonium sulfat hingga mencapai tingkat kejenuhan tinggi untuk mengendapkan protein dari larutan [16].

Hasil isolasi menunjukkan adanya perbedaan jumlah isolat protein yang dihasilkan dari kedua perlakuan koagulan. Isolat protein dari Dali ni horbo dengan koagulan nanas memiliki berat sebesar 2,3321 g, sedangkan isolat protein dari perlakuan jeruk nipis sebesar 1,8516 g. Hasil ini menunjukkan bahwa penggunaan koagulan nanas menghasilkan jumlah isolat protein yang lebih besar dibandingkan dengan koagulan jeruk nipis. Perbedaan jumlah isolat protein tersebut kemungkinan dipengaruhi oleh mekanisme koagulasi protein yang berbeda pada masing-masing bahan koagulan. Nanas diketahui mengandung enzim proteolitik bromelain yang mampu memecah ikatan peptida pada protein sehingga menghasilkan fragmen peptida dengan ukuran lebih kecil. Secara umum, proses hidrolisis protein dapat meningkatkan kelarutan peptida dalam larutan. Namun demikian, pada kondisi tertentu fragmen peptida yang terbentuk dapat mengalami asosiasi kembali melalui interaksi hidrofobik antar residu asam amino, sehingga membentuk agregat protein yang lebih mudah mengalami pengendapan selama proses presipitasi dengan amonium sulfat.

Selain enzim bromelain, nanas juga mengandung berbagai komponen lain seperti pektin, gula, serta polisakarida yang berpotensi berinteraksi dengan protein selama proses koagulasi. Interaksi antara protein dan polisakarida tersebut dapat membentuk kompleks makromolekul yang ikut terendapkan pada tahap presipitasi. Hal ini memungkinkan berat isolat yang diperoleh tidak hanya berasal dari protein murni, tetapi juga dari komponen matriks lain yang ikut terpresipitasi bersama protein. Berbeda dengan nanas, mekanisme koagulasi pada jeruk nipis terjadi terutama melalui penurunan pH akibat kandungan asam sitrat. Penurunan pH menyebabkan protein susu mendekati titik isoelektriknya, yaitu kondisi ketika muatan bersih protein menjadi mendekati nol sehingga gaya tolak-menolak antar molekul protein menurun dan terjadi agregasi protein [17].

Mekanisme pengasaman ini tidak melibatkan aktivitas enzim proteolitik sehingga proses koagulasi berlangsung lebih sederhana. Hal tersebut dapat menyebabkan jumlah protein yang mengendap relatif lebih sedikit dibandingkan dengan perlakuan koagulan nanas. Pada tahap presipitasi, penggunaan amonium sulfat didasarkan pada prinsip salting out, yaitu penurunan kelarutan protein akibat meningkatnya kekuatan ionik dalam larutan. Ion garam akan bersaing dengan molekul protein dalam berinteraksi dengan molekul air, sehingga lapisan hidrasi protein berkurang dan interaksi antar molekul protein meningkat. Kondisi ini

mendorong terjadinya agregasi dan pengendapan protein dari larutan. Oleh karena itu, kondisi awal protein setelah proses koagulasi sangat mempengaruhi efisiensi proses presipitasi yang dilakukan [17].

Karakterisasi Protein

Tabel 1. Hasil Uji Kualitatif Protein

Sampel	Uji Biuret	Uji Ninhidrin	Uji Xantoprotein
Supernatan SJ	Ungu (+)	Ungu (+)	-
Supernatan SN	Ungu (+)	Ungu (+)	-
Isolat Protein SJ	Ungu Pekat (+)	Ungu Pekat (+)	Kuning (+)
Isolat Protein SN	Ungu Pekat (+)	Ungu Pekat (+)	Kuning (+)

Keterangan :

Uji Biuret: warna ungu menunjukkan ikatan peptida positif

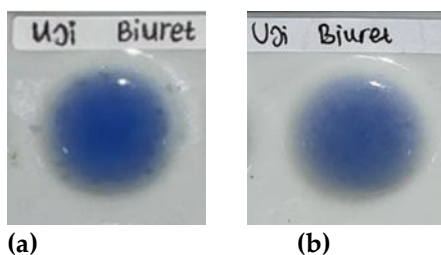
Uji Ninhidrin: warna ungu menunjukkan asam amino positif

Uji Xantoprotein: warna kuning menunjukkan asam amino aromatik positif

Hasil karakterisasi protein menunjukkan bahwa seluruh isolat memberikan hasil positif pada uji Biuret, uji Ninhidrin, dan uji Xantoprotein.

Uji Biuret

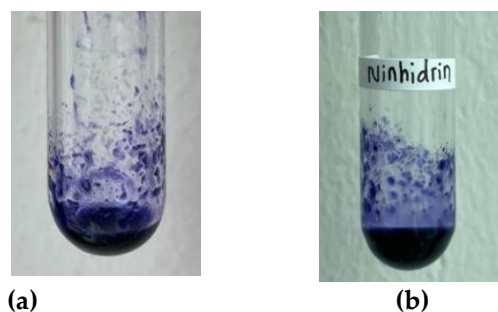
Reaksi positif pada uji Biuret yang ditandai dengan terbentuknya warna ungu menunjukkan adanya ikatan peptida dalam struktur protein. Intensitas warna yang lebih kuat pada isolat dibandingkan dengan supernatan menunjukkan bahwa fraksi isolat memiliki konsentrasi protein yang lebih tinggi.



Gambar 1. Hasil Uji Biuret pada Isolat Protein. (a) Isolat protein dari perlakuan susu dengan koagulan jeruk nipis (SJ) menunjukkan warna ungu pekat. (b) Isolat protein dari perlakuan susu dengan koagulan nanas (SN) juga menunjukkan warna ungu pekat.

Uji Ninhidrin

Uji Ninhidrin menunjukkan perubahan warna menjadi ungu hingga ungu pekat pada isolat protein, yang mengindikasikan keberadaan asam amino bebas maupun peptida dengan ukuran molekul kecil. Senyawa tersebut dapat terbentuk selama proses fermentasi maupun akibat hidrolisis protein oleh aktivitas enzim proteolitik. Intensitas warna yang lebih kuat pada isolat dibandingkan dengan supernatan menunjukkan bahwa fraksi isolat kemungkinan mengandung peptida dalam jumlah yang lebih besar. Berikut gambar karakterisasi uji ninhidrin:



Gambar 2. Hasil Uji Ninhidrin pada Isolat Protein. (a) Isolat protein dari perlakuan susu dengan koagulan jeruk nipis (SJ) menunjukkan warna ungu pekat. (b) Isolat protein dari perlakuan susu dengan koagulan nanas (SN) juga menunjukkan warna ungu pekat.

Uji Xantoprotein

Hasil positif pada uji Xantoprotein yang ditandai dengan terbentuknya warna kuning menunjukkan adanya asam amino aromatik, seperti tirosin, triptofan, dan fenilalanin. Keberadaan asam amino aromatik ini penting karena residu tersebut sering ditemukan pada berbagai peptida bioaktif yang memiliki aktivitas biologis tertentu.



(b)

(b)

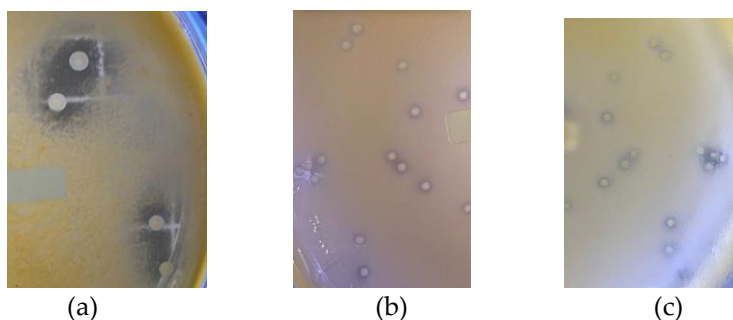
Gambar 3. Hasil Uji Xantoprotein pada Isolat Protein. (a) Isolat protein dari perlakuan susu dengan koagulan jeruk nipis (SJ) menunjukkan warna kuning. (b) Isolat protein dari perlakuan susu dengan koagulan nanas (SN) juga menunjukkan warna kuning.

Kombinasi keberadaan peptida berukuran kecil serta residu asam amino aromatik tersebut dapat menjadi indikasi awal terbentuknya peptida bioaktif, termasuk peptida yang berpotensi berperan sebagai inhibitor *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE). Peptida inhibitor ACE yang berasal dari protein susu umumnya memiliki ukuran molekul kecil, bersifat relatif hidrofobik, dan mengandung residu asam amino tertentu seperti prolin, fenilalanin, atau tirosin yang berperan dalam interaksi dengan sisi aktif enzim ACE. Meskipun demikian, hasil uji kualitatif pada penelitian ini masih bersifat indikatif dan belum dapat secara langsung membuktikan aktivitas penghambatan ACE. Oleh karena itu, penelitian lanjutan diperlukan untuk mengonfirmasi potensi bioaktivitas tersebut, misalnya melalui uji aktivitas ACE inhibitor secara *in vitro*, pemurnian fraksi peptida aktif, serta identifikasi struktur peptida menggunakan teknik analisis seperti kromatografi dan spektrometri massa. Dengan demikian, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa Dali ni horbo tidak hanya berperan sebagai sumber nutrisi protein, tetapi juga memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai pangan fungsional yang mengandung senyawa bioaktif yang dapat mendukung pencegahan penyakit degeneratif, khususnya hipertensi [18].

Isolasi dan Pemurnian BAL

Tabel 2. Morfologi Koloni Isolat BAL

Kode	Asal Isolat	Bentuk	Bentuk permukaan	Warna	Bau
SM 1	Susu Murni	Bulatan Kecil	Cembung	Putih	Bau asam
SM 2	Susu Murni	Bulatan Kecil	Cembung	Putih	Bau asam
SM 3	Susu Murni	Bulatan Kecil	Cembung	Putih	Bau asam
SM 4	Susu Murni	Bulatan Kecil	Cembung	Putih	Bau asam
SM 5	Susu Murni	Bulatan Kecil	Cembung	Putih	Bau asam
SM 6	Susu Murni	Bulatan Kecil	Cembung	Putih	Bau asam
SM 7	Susu Murni	Bulatan Kecil	Cembung	Putih	Bau asam
SM 8	Susu Murni	Bulatan Kecil	Cembung	Putih	Bau asam
SM 9	Susu Murni	Bulatan Kecil	Cembung	Putih	Bau asam
SM 10	Susu Murni	Bulatan Kecil	Cembung	Putih	Bau asam
SN 1	Susu + Nanas	Bulatan Kecil	Cembung	Putih	Bau asam
SN 2	Susu + Nanas	Bulatan Kecil	Cembung	Putih	Bau asam
SN 3	Susu + Nanas	Bulatan Kecil	Cembung	Putih	Bau asam
SN 4	Susu + Nanas	Bulatan Kecil	Cembung	Putih	Bau asam
SN 5	Susu + Nanas	Bulatan Kecil	Cembung	Putih	Bau asam
SJ 1	Susu + Jeruk	Bulatan Kecil	Cembung	Putih	Bau asam
SJ 2	Susu + Jeruk	Bulatan Kecil	Cembung	Putih	Bau asam
SJ 3	Susu + Jeruk	Bulatan Kecil	Cembung	Putih	Bau asam



Gambar 4. Hasil isolasi BAL (a) Isolat BAL pada susu murni (SM) (b) isolat BAL dari perlakuan susu dengan koagulan nanas (SN) (c) isolat BAL dari perlakuan susu dengan koagulan jeruk nipis (SJ).

Berdasarkan hasil isolasi mikroorganisme dari susu murni serta susu yang dikombinasikan dengan buah nanas dan jeruk menunjukkan karakteristik morfologi koloni yang relatif seragam, yaitu berbentuk bulat kecil, memiliki permukaan cembung, berwarna putih, dan serta memiliki bau asam khas fermentasi. Bau asam tersebut merupakan ciri umum aktivitas bakteri asam laktat yang menghasilkan asam laktat sebagai produk utama metabolisme selama proses fermentasi.

Keseragaman karakter ini mengindikasikan bahwa mikroorganisme yang tumbuh kemungkinan berasal dari kelompok yang sama atau setidaknya memiliki kesamaan fenotipik. Karakteristik koloni tersebut umumnya dijumpai pada bakteri asam laktat (BAL), yang secara alami banyak ditemukan pada susu dan produk fermentasinya, mengingat kandungan laktosa dan protein dalam susu sangat mendukung pertumbuhan bakteri tersebut.

Adanya bau khas pada seluruh isolat juga menguatkan dugaan adanya aktivitas metabolik mikroorganisme, terutama dalam menghasilkan senyawa volatil sebagai hasil fermentasi. Penambahan buah nanas dan jeruk ke dalam susu tidak menimbulkan perbedaan morfologi koloni yang signifikan dibandingkan dengan susu murni, yang menunjukkan bahwa perubahan kondisi lingkungan, seperti penurunan pH akibat asam organik dari buah, masih berada dalam batas toleransi mikroorganisme yang tumbuh.

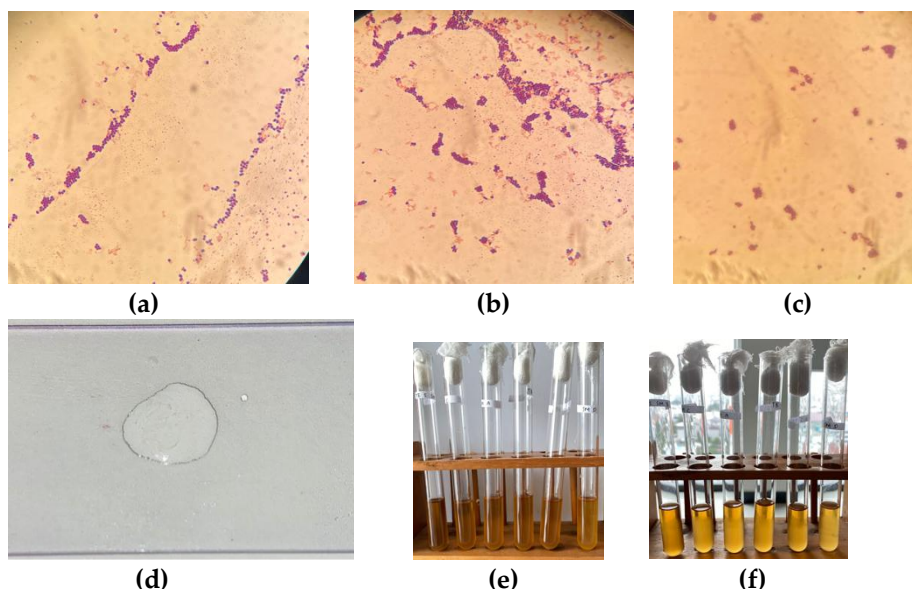
Bakteri asam laktat diketahui memiliki kemampuan adaptasi yang baik terhadap kondisi asam, sehingga tetap mampu berkembang meskipun terdapat senyawa asam tambahan. Keseragaman morfologi koloni pada seluruh perlakuan juga mengindikasikan adanya mikroorganisme dominan dengan daya kompetitif yang tinggi terhadap variasi substrat. Meskipun demikian, identifikasi berdasarkan morfologi koloni saja belum cukup untuk memastikan jenis dan spesies mikroorganisme secara pasti, sehingga diperlukan pengujian lanjutan seperti pewarnaan Gram, uji biokimia, dan identifikasi molekuler[19].

Karakteristik BAL

Tabel 3. Karakteristik BAL

Kode Isolat	Asal Isolat	Pewarnaan Gram	Uji Katalase	Uji Toleransi Garam Berdasarkan Kekeruhan	
				MRS Broth	MRS Broth + Bile Salt
SM 1	Susu Murni	Ungu	-	+	+
SM 2	Susu Murni	Ungu	-	+	+
SM 3	Susu Murni	Ungu	-	+	+
SM 4	Susu Murni	Ungu	-	+	+
SM 5	Susu Murni	Ungu	-	+	+
SM 6	Susu Murni	Ungu	-	+	+
SM 7	Susu Murni	Ungu	-	+	+
SN 1	Susu + Nanas	Ungu	-	+	+
SN 2	Susu + Nanas	Ungu	-	+	+
SN 3	Susu + Nanas	Ungu	-	+	+
SJ 1	Susu + Jeruk	Ungu	-	+	+

Keterangan: (-) = Negatif (+) = tumbuh (ada kekeruhan)



Gambar 5. Hasil uji karakteristik. (a) Uji Pewarnaan Gram pada susu murni (SM). (b) Uji Pewarnaan Gram dari perlakuan susu dengan koagulan nanas (SN). (c) Uji Pewarnaan Gram dari perlakuan susu dengan koagulan jeruk nipis (SJ). (d) Uji Katalase. (e) uji toleransi garam pada MRS Broth. (f) Uji toleransi garam pada MRS Broth + Bile Salt.

Berdasarkan hasil karakterisasi yang disajikan pada tabel 3, isolat bakteri yang diperoleh menunjukkan karakteristik yang mendukung sebagai bakteri asam laktat (BAL). Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa isolat berwarna ungu yang mengindikasikan bahwa bakteri tersebut termasuk dalam kelompok Gram positif, yang merupakan salah satu ciri umum bakteri asam laktat karena memiliki dinding sel tebal yang tersusun dari peptidoglikan sehingga mampu mempertahankan warna kristal violet pada proses pewarnaan Gram [20]. Pada uji katalase, seluruh isolat menunjukkan hasil negatif yang ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung setelah penambahan hidrogen peroksida, yang menunjukkan bahwa isolat tidak menghasilkan enzim katalase, suatu karakteristik yang umum dimiliki oleh bakteri asam laktat yang bersifat anaerob fakultatif atau mikroaerofilik. Selanjutnya, hasil uji toleransi garam empedu menunjukkan bahwa seluruh isolat mampu tumbuh pada media MRS Broth sebagai kontrol maupun pada media MRS Broth yang ditambahkan bile salt yang ditandai dengan adanya kekeruhan pada media, sehingga menunjukkan bahwa isolat memiliki kemampuan untuk bertahan pada kondisi yang mengandung garam empedu [20].

Kemampuan bakteri untuk tumbuh pada media yang mengandung *bile salt* merupakan salah satu indikator penting dalam seleksi bakteri probiotik, karena mikroorganisme probiotik harus mampu bertahan pada kondisi lingkungan saluran pencernaan yang mengandung garam empedu. Secara keseluruhan, hasil pewarnaan Gram, uji katalase, dan uji toleransi garam empedu menunjukkan bahwa isolat yang diperoleh memiliki karakteristik fisiologis yang sesuai dengan kelompok bakteri asam laktat dan berpotensi bertahan pada kondisi lingkungan saluran pencernaan [20].

Kesimpulan

Penelitian ini berhasil mengisolasi protein dari Dali ni horbo, di mana penggunaan koagulan nanas menghasilkan rendemen protein (2,3321 g) yang lebih tinggi dibandingkan jeruk nipis (1,8516 g). Isolat protein yang diperoleh positif mengandung ikatan peptida, asam amino bebas, dan asam amino aromatik. Selain itu, berhasil diisolasi 18 isolat bakteri yang memiliki karakteristik dasar BAL, yaitu Gram positif (dominan), katalase negatif, dan toleran terhadap garam empedu, sehingga berpotensi sebagai kandidat probiotik. Hasil ini mengindikasikan bahwa Dali ni horbo berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai pangan fungsional kaya protein dan probiotik.

Konflik Kepentingan

Seluruh penulis menyatakan bahwa penelitian ini dilakukan secara independen tanpa adanya konflik kepentingan, baik finansial maupun nonfinansial, yang dapat memengaruhi proses maupun hasil penelitian.

Referensi

- [1] Yasmin N, Sianturi N, Fachrial E. Aktivitas probiotik isolat DNH 16 yang diisolasi dari dali ni horbo. *Jurnal Kimia Saintek Dan Pendidikan* 2022;6:66–71.
- [2] Hasibuan IL, Gea I. Pengenalan "Dali" Kuliner Khas Batak Dalam Menu Favorit Wisatawan Dalam Konteks Peningkatan Value Pendapatan Masyarakat. *Jurnal Pendidikan Sosial Dan Humaniora* 2023;2:12341–5.
- [3] Yusnina Maisyaroh, Mastiur Napitupulu, Anto J. Hadi, Adi Antoni. Pengembangan Pangan Lokal Dali Horbo sebagai Makanan Pendamping untuk Mengatasi Balita Stunting di Kabupaten Tapanuli Utara. *Media Publikasi Promosi Kesehatan Indonesia (MPPKI)* 2023;6:2074–80. <https://doi.org/10.56338/mppki.v6i10.4210>.
- [4] Anam C, Hamidah E, Kusumawati DE, Istiqomah I, Qibtiyah M, Amiroh A. Isolasi protein kacang tunggak termodifikasi melalui jenis dan konsentrasi bahan kimia. *Agrointek : Jurnal Teknologi Industri Pertanian* 2024;18:419–28. <https://doi.org/10.21107/agrointek.v18i2.16837>.
- [5] Kurniaty I, Febriyanti Y, Septian R, Kunci : K, Kelor B. Isolasi Protein Biji Kelor (*Moringa Oleifera*) Menggunakan Proses Hidrolisis 2018;17:1–6.
- [6] Sunaryanto R, Marwoto B. Isolasi, Identifikasi, Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Dari Dadih Susu Kerbau. *Jurnal Sains Dan Teknologi Indonesia* 2013;14:228–33. <https://doi.org/10.29122/jsti.v14i3.931>.
- [7] Purnomo D, Apridamayanti P, Sari R. Potensi antibakteri dari susu fermentasi dengan starter *Lactobacillus casei* terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Cerebellum* 2021;6:31. <https://doi.org/10.26418/jc.v6i2.45301>.
- [8] Djenar NS, Suryadi J. Isolasi dan Pemurnian Protein dari Lembaga Jagung (Corn Germ) Menggunakan Metode Presipitasi dan Dialisis. *KOVALEN: Jurnal Riset Kimia* 2022;8:60–6. <https://doi.org/10.22487/kovalen.2022.v8.i1.15790>.
- [9] Крыжановский СА, Мирошкина ИА, Ионова ЕО. Роль Сигма-1 Рецепторов В Регуляции Деятельности Сердца. Часть 2. Роль Сигма-1 Рецепторов В Кардиопротекции. *Физиология Человека* 2021;47:124–34. <https://doi.org/10.31857/s013116462104007x>.
- [10] Priatni HL, Kurniasari N, Wiryani AS. Sains Indonesiana: Jurnal Ilmiah Nusantara Identifikasi Asam Amino Dan Protein Pada Bahan Makanan Dengan Menggunakan Uji Ninhidrin Dan Uji Biuret. *Sains Indonesiana: Jurnal Ilmiah Nusantara* 2020;1:2023.
- [11] Panjaitan RS, Djohansah V, Septiyani A, Ardian KD, Asriyanti LS. Qualitative and Quantitative Identification of Carbohydrate and Protein Content in Packaged Chocolate Beverages. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Research* 2023;3:9–19. <https://doi.org/10.31869/ijpr.v3i1.4572>.
- [12] Zakiyah Zahra Nur Amaliah, Saiful Bahri, Puteri Amelia. Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Dari Limbah Cair Rendaman Kacang Kedelai. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia* 2018;5:253–7.
- [13] Rachmawati I, Setyaningsih R. Uji Antibakteri Bakteri Asam Laktat asal Asinan Sawi terhadap Bakteri Patogen. *Bioteknologi* 2005;2:43–8. <https://doi.org/10.13057/biotek/c020202>.
- [14] Kedokteran J, Doi P, Made S, Sanjaya R, Suardana IW, Gram P. Machine Translated by Google Uji Potensi Probiotik untuk Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Sapi Labi Lambung Lagi Asam Rendah dan Sodium Deoxycholate Machine Translated by Google 2019;2:3–6.
- [15] Torshizi MAK, Rahimi S, Mojangi N, Esmaeilkhani S, Grimes JL. Screening of indigenous strains of lactic acid bacteria for development of a probiotic for poultry. *Asian-Australas J Anim Sci* 2008;21:1495–500. <https://doi.org/10.5713/ajas.2008.80081>.
- [16] Shaikh FMR, Uzgare AS. Efficient protein purification: from basics to advanced analytical techniques—a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry Research* 2026;13:133–46.
- [17] Pardosi U. Pengaruh Jenis Koagulan yang Berbeda terhadap Uji Organoleptik Dadih Susu Kerbau. *Jas* 2024;9:7–10. <https://doi.org/10.32938/ja.v9i1.5858>.
- [18] Yadiyal Chalid S, Nurbayti S, Fajar Pratama A. Karakterisasi dan Uji Aktivitas Protein Susu Kerbau (*Bubalus bubalis*) Fermentasi sebagai Angiotension Converting Enzyme (ACE) Inhibitor (Characterization and Angiotension Converting Enzyme ACE-inhibitory activity of Fermented Buffalo Milk (*Bubalus bubalis*). *Jl Ir H Djuanda No 95 Ciputat* 2018;16:214–24.
- [19] Risna YK, Harimurti S, Wihandoyo, Widodo. Screening for probiotic of lactic acid bacteria isolated from the digestive tract of a native aceh duck (*Anas platyrhynchos*). *Biodiversitas* 2020;21:3001–7. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210717>.
- [20] Okfrianti Y, Darwis, Pravita A. Bakteri Asam Laktat *Lactobacillus Plantarum* C410LI dan *Lactobacillus* Artikel history. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Kesehatan* 2018;6:49–58.