

Seleksi Bakteri Proteolitik dari Pangan Fermentasi Lokal Indonesia sebagai Sumber Protease untuk Produksi Kolagen

Evi Susanti, Shindy Tirta Ayu Paramitha, Nia Lutfiana, Suharti, dan Rini Retnosari,
Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Malang, Indonesia
email koresponding author: evi.susanti.fmipa@um.ac.id
ORCHID ID koresponding author: 56835607200

Abstrak

Indonesia memiliki berbagai makanan fermentasi berbasis bahan yang mengandung protein, diantaranya terasi dan tauco. Terasi dihasilkan melalui fermentasi udang dan tauco dari kedelai. Oleh karena itu dalam terasi dan tauco mengandung berbagai jenis mikroba termasuk berbagai jenis bakteri proteolitik. Bakteri proteolitik adalah bakteri yang dapat menghasilkan protease. Protease memiliki kemampuan sebagai biokatalis yang menghidrolisis ikatan peptida. Kemampuan ini dapat dimanfaatkan untuk proses produksi kolagen. Kajian ini menggunakan metoda studi literatur yang melakukan analisis deskriptif mengenai metoda seleksi bakteri proteolitik yang dapat menghasilkan protease selektif untuk produksi kolagen secara enzimatik. Hasil analisis menunjukkan bahwa perlakuan sekuensial yang terdiri dari seleksi bakteri proteolitik berdasarkan kemampuan tumbuh pada media selektif, pemurnian isolat, seleksi berdasarkan nilai indeks proteolitik isolat murni, seleksi berdasarkan sifat patogenitas, dan seleksi berdasarkan selektivitas ekstrak kasar protease yang dihasilkannya efektif untuk mendapatkan bakteri proteolitik yaitu TR₁₀ dari terasi Sidoarjo dan HTcUM_{7.1} dari tauco Surabaya khususnya dari sisik ikan Bandeng.

Kata-kata kunci: seleksi, bakteri proteolitik, tauco, terasi, kolagen

1. Pendahuluan

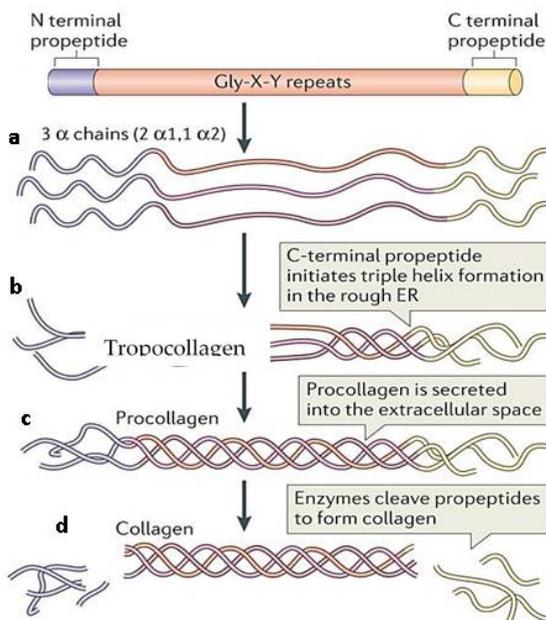
Kolagen merupakan protein utama penyusun jaringan ikat dengan sifat fisika berwarna putih, berserat, dan memiliki pH 5,5-6,6 [1,2]. Terdapat tiga jenis protein kolagen yang umum berdasarkan homologi struktur domain dan susunan molekul pada struktur supramolekul (susunan molekul kolagen pada jaringan ikat) yaitu tipe-I, tipe-II, dan tipe-III [3]. Kolagen tipe-I menyumbang hingga sekitar 90 % dari protein kolagen seluruh organisme. Sebagian besar kolagen tipe-I berada di kulit, tulang, tendon, dan ligamen [2].

Pembentukan struktur kolagen tipe-I dijelaskan pada Gambar 1. Rantai polipeptida penyusun kolagen terdiri atas residu asam amino Gly-X-Y yang berulang, sebagian besar X merupakan asam amino prolin dan Y merupakan asam amino hidroksiprolin, serta sebagian kecil X dan Y merupakan asam amino lainnya (Gambar 1a). Berat molekul masing-masing

rantai peptida adalah sekitar 100 kDa yang terdiri dari 1.052 residu asam amino. Dua rantai α_1 membentuk rantai peptida dimer (rantai β -peptida), kemudian bersama dengan satu rantai α_2 membentuk rantai peptida trimer (rantai γ -peptida). Pembentukan *triple helix* rantai γ -peptida ini disebut molekul tropokolagen yang terjadi di retikulum endoplasma (RE) kasar (Gambar 1b). Rantai γ -peptida yang disekresikan ke luar sel disebut prokolagen (Gambar 1c). Prokolagen mengalami pemutusan ikatan peptida di ujung terminal -N dan -C oleh enzim metaloproteinase menjadi kolagen (Gambar 1d) [2,3].

Gambar 2 menjelaskan bagaimana susunan molekul kolagen membentuk supramolekul jaringan ikat. Kolagen dirakit menjadi mikrofibril yang terjadi pada matriks ekstraseluler jaringan ikat (Gambar 2a). Hal ini dapat diamati melalui mikroskop elektron sebagai pita yang teratur, seperti yang ditunjukkan oleh daerah bergaris abu-abu. Mikrofibril pendek bergabung menjadi fibril melalui pertumbuhan longitudinal dan aksial (Gambar 2b) dan beberapa fibril bergabung membentuk serat kolagen (Gambar 2c). Untuk membentuk serat, *lysyl oxidase* mengkatalisis pembentukan ikatan silang kovalen intramolekuler dan intermolekuler antara molekul kolagen. Selanjutnya beberapa serat bergabung hingga membentuk jaringan, salah satunya dalam hal ini adalah tendon (Gambar 2c) [3].

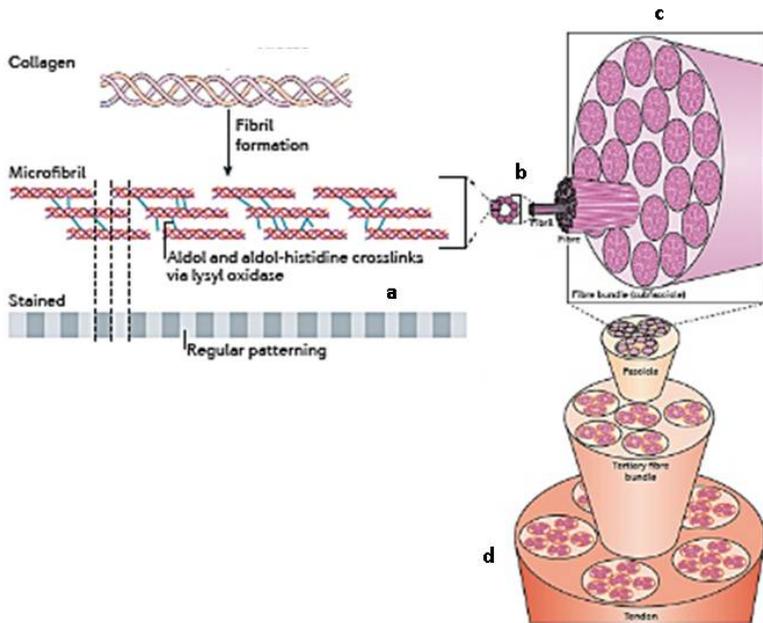
Gambar 1. Pembentukan Kolagen Tipe-I di Dalam Sel [3]



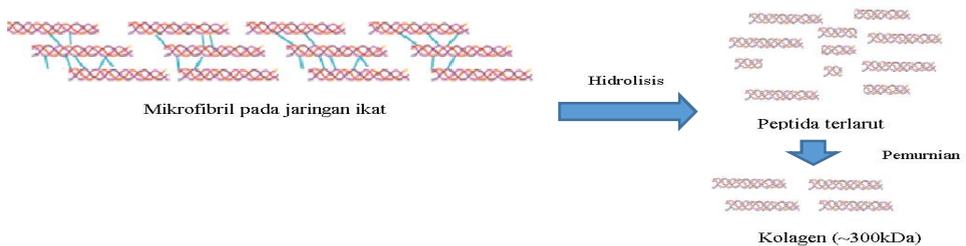
Most of X is Pro and Y is Hyp. A small portion, X and Y are other amino acids.

Isolasi kolagen dari jaringan ikat hewan dapat dilakukan secara kimiawi dan enzimatik. Prinsipnya ikatan peptida yang terdapat pada jaringan ikat dihidrolisis menjadi peptide-peptida larut diantaranya kolagen, selanjutnya pemurnian produk dengan cara

mengendapkan kolagen dengan garam NaCl. Ilustrasi tahapan isolasi kolagen ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 2. Pembentukan Kolagen Hingga Membentuk Jaringan Ikat [3].



Gambar 3. Ilustrasi Tahap Isolasi Kolagen dari Jaringan Ikat

Isolasi kolagen secara kimiawi melibatkan reaksi pemutusan ikatan peptida pada jaringan ikat oleh asam atau basa. Pemutusan ikatan peptida ini terjadi secara acak, jika proses terlalu lama akan dimungkinkan pemutusan ikatan peptida juga terjadi pada produk (kolagen) yang dihasilkan. Hidrolisis kolagen tersebut mengakibatkan struktur kolagen

berubah menjadi peptida yang lebih pendek. Akibatnya, rendemen yang dihasilkan rendah [4].

Isolasi kolagen secara enzimatik dilakukan dengan protease. Protease adalah enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis pemutusan ikatan peptida. Protease bersifat spesifik. Protease akan mengkatalisis reaksi pemutusan ikatan peptida pada sisi tertentu, sehingga tingkat kemurnian dan rendemen yang dihasilkan relatif tinggi dibandingkan menggunakan asam [5], disamping itu lebih ramah lingkungan karena protease merupakan protein dan kondisi reaksi berlangsung pada pH netral dan suhu ruang.

Enzim protease dapat diproduksi dari mikroba, hewan, maupun tumbuhan [6]. Tumbuhan merupakan sumber enzim protease terbesar (43,85 %), diikuti oleh bakteri (18,09 %), jamur (15,08 %), hewan (11,15 %), alga (7,42 %), dan virus (4,41 %) [7]. Walaupun demikian bakteri dianggap yang paling menguntungkan untuk produksi protease pada skala industri karena mudah diproduksi pada skala besar, biaya produksi yang relatif terjangkau, serta efisiensi waktu dan tempat [8]. Bakteri penghasil protease sering disebut sebagai bakteri proteolitik.

Bakteri proteolitik yang dapat digunakan sebagai sumber protease adalah dari golongan bakteri nonpatogen. Bakteri nonpatogen tidak menghasilkan metabolit yang bersifat toksik, sehingga metabolitnya, dalam hal ini protease, aman digunakan khususnya sebagai protease dalam produksi kolagen. Bakteri nonpatogen dapat diisolasi dari berbagai macam pangan tradisional berfermentasi yang kaya protein. Dalam suatu pangan fermentasi akan mengandung berbagai jenis bakteri proteolitik dan masing-masing bakteri akan menghasilkan protease yang unik dan memiliki spesifisitas yang khas. Sifat ini pada akhirnya akan mempengaruhi apakah protease tersebut dapat digunakan atau tidak untuk menghidrolisis ikatan peptida pada jaringan ikat yang digunakan sebagai bahan baku kolagen. Mengingat potensi ketermanfaatannya dan sarana prasarana laboratorium biokimia maupun mikrobiologi yang memiliki keterbatasan, maka tahapan seleksi yang sederhana dan efisien perlu dikembangkan untuk memperoleh bakteri proteolitik potensial yang dapat digunakan sebagai sumber protease untuk produksi kolagen. Berdasarkan hal tersebut maka pada tulisan ini akan disampaikan tahapan seleksi bakteri proteolitik yang efektif dan relatif sederhana berbasis kaidah-kaidah mikrobiologi dan potensi bakteri proteolitik dari pangan fermentasi lokal sebagai sumber protease yang dapat diaplikasikan untuk produksi kolagen.

2. Metoda Penelitian

Metoda penelitian yang digunakan pada ulasan ini adalah studi literatur sebagai dasar melakukan analisis deskriptif terhadap metoda seleksi bakteri proteolitik yang mampu menghasilkan protease selektif untuk produksi kolagen. Literatur rujukan utama menggunakan sampling terasi dan taucu sebagai sumber protease. Isolat bakteri proteolitik yang diperoleh dari terasi dikode sebagai TRn yang berarti isolat bakteri yang diisolasi dari terasi, dan HTcUMn dengan arti H adalah peneliti yang mengisolasi yaitu Hadiyan, Tc adalah taucu, UM adalah Universitas Negeri Malang dan n adalah nomor urutan untuk membedakan antar isolat bakteri satu dengan lainnya.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Tahapan Seleksi Bakteri Proteolitik sebagai Sumber Protease untuk Produksi Kolagen

Bakteri yang terdapat dalam pangan fermentasi lokal seperti terasi dan taucu tentu saja sangat beragam baik jenis maupun jumlahnya. Selanjutnya, bakteri proteolitik juga memiliki kemampuan menghasilkan berbagai jumlah dan jenis protease yang bersifat unik tergantung dari spesies, komposisi media dan kondisi pertumbuhan bakteri proteolitik tersebut. Maka, diperlukan tahapan seleksi yang efektif untuk memperoleh bakteri proteolitik yang dapat menghasilkan protease dengan aktivitas yang tinggi dan dapat digunakan untuk produksi kolagen. Mengingat kolagen yang dihasilkan selanjutnya digunakan sebagai suplemen fungsional maka juga diharapkan bakteri proteolitik yang dipilih tidak bersifat patogen. Berdasarkan hal tersebut maka beberapa metoda seleksi dapat dilakukan yaitu: seleksi bakteri proteolitik berdasarkan kemampuan tumbuh pada media selektif, pemurnian isolat, seleksi berdasarkan nilai indeks proteolitik isolat murni, seleksi berdasarkan sifat patogenitas, dan seleksi berdasarkan selektivitas ekstrak kasar protease yang dihasilkannya. Melalui tahapan tersebut diperoleh isolat bakteri proteolitik potensial menjadi sumber protease yang dapat digunakan untuk produksi kolagen.

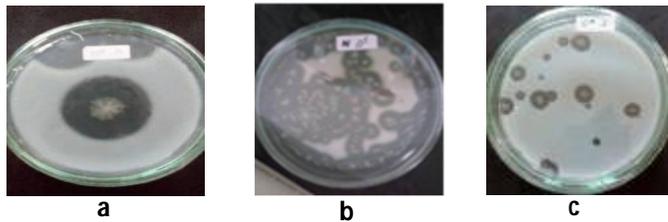
3.1.1. Seleksi bakteri proteolitik berdasarkan kemampuan tumbuh pada media selektif

Media selektif merupakan media yang dapat mencegah pertumbuhan mikroba yang tak diinginkan dengan menambah zat kimia tertentu, sehingga mikroba yang tumbuh hanya mikroba yang diinginkan saja [9]. Kemampuan bakteri proteolitik menghasilkan protease digunakan sebagai dasar seleksinya dari bakteri lainnya. Isolasi dan seleksi bakteri proteolitik dilakukan pada media selektif *Skim Milk Agar* (SMA) atau media Susu Skim Agar (SSA) sebagai sumber protein. Media ini mengandung nutrisi utama berupa laktosa sebagai sumber karbon dan kasein sebagai sumber nitrogen. Kasein merupakan protein susu yang terdiri dari fosfoprotein yang berikatan dengan kalsium membentuk misel kasein atau koloid berwarna putih [10]. Kadar kasein pada media ini cukup tinggi sehingga medium SMA berwarna putih kekuningan atau putih tulang. Bakteri proteolitik yang tumbuh pada media susu skim akan membentuk zona bening disekitar koloni, karena terjadi hidrolisis kasein oleh protease yang dihasilkan bakteri proteolitik tersebut [11], seperti ditunjukkan pada Gambar 4a. Umumnya pada tahap ini menghasilkan berbagai macam koloni, bahkan antar koloni satu dan lainnya menumpuk hingga sulit dipisahkan seperti Gambar 4b. Maka diperlukan tahap pengenceran sampel dan menginokulasikan masing-masing hasil pengenceran ke media selektif untuk mendapatkan koloni yang terpisah seperti Gambar 4c. Masing-masing koloni diduga masih belum murni maka dilanjutkan dengan tahap pemurnian isolat bakteri proteolitik

3.1.2. Pemurnian isolat bakteri proteolitik

Masing-masing koloni bakteri ditapiskan pada media SMA. Cara penapisan berselang-seling antara metoda sebar dan metoda goresan. Penapisan dengan metoda sebar dilakukan dengan mengencerkan sampel antara 10^4 dan 10^5 dalam larutan garam fisiologis,

sebanyak 100 μL di sebar merata ke media SMA. Penapisan dengan metode goresan dilakukan dengan langsung mencuplik koloni yang akan dimurnikan digoreskan ke media SSA baru membentuk empat kuadran seperti pada Gambar 5a. Banyaknya tahap pemurnian melalui penapisan sebar-goresan dilakukan hingga hasil pengecatan Gram setiap perpotongan kuadran (Gambar 5b) dan ujung goresan pada hasil pemurnian dengan metoda goresan menunjukkan warna dan morfologi sel yang seragam.

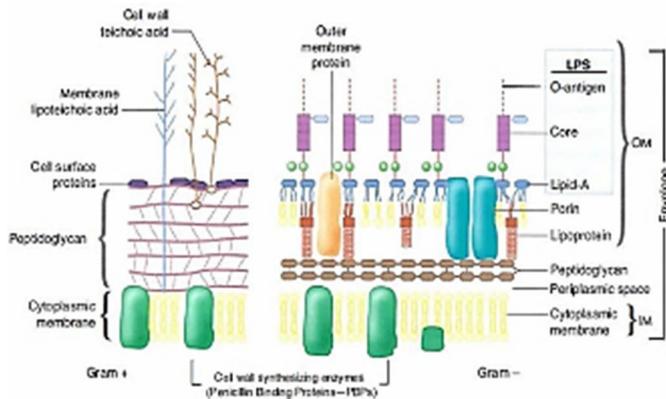


Gambar 4. Pertumbuhan Bakteri Proteolitik pada Medium SMA: (a) zona bening di sekitar koloni bakteri proteolitik, (b) zona bening antar isolat dalam sampel sebelum pengenceran, (c) zona bening antar isolat dalam sampel setelah pengenceran.



Gambar 5. Penapisan dengan Metode Gores: (a) pembagian daerah kuadran, (b) daerah pengambilan sampel untuk mendeteksi kemurnian bakteri dengan pengecatan Gram

Kemurnian bakteri diketahui dari hasil pengecatan Gram. Pengecatan Gram adalah pewarnaan pada sel bakteri yang hasilnya dapat diamati di bawah mikroskop. Ada dua hasil pewarnaan yaitu ungu dan merah tergantung pada komposisi dinding sel bakteri. Berdasarkan dinding selnya ada 2 jenis bakteri yaitu bakteri Gram positif dan Gram negatif. Bakteri Gram positif memiliki peptidoglikan tebal (30 lapisan) dan susunannya kompak, sehingga pada pengecatan Gram akan berwarna ungu. Bakteri Gram negatif memiliki peptidoglikan tipis (1-2 lapisan) dan susunan dinding selnya tidak kompak, sehingga akan berwarna merah [12]. Susunan peptidoglikan bakteri Gram positif dan Gram negatif ditampilkan pada Gambar 6.



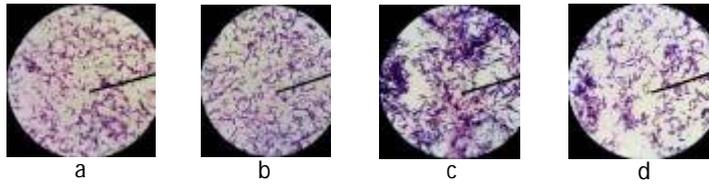
Gambar 6. Susunan Peptidoglikan Gram Positif dan Gram Negatif [13]

Tahapan pengecatan Gram yaitu preparat yang telah diberi goresan koloni tunggal bakteri digenangi larutan Gram A (kristal violet) dan didiamkan selama 1 menit, dibilas dengan akuades. Selanjutnya, preparat digenangi larutan Gram B (lugol) dan didiamkan selama 2 menit, dibilas dengan akuades. Berikutnya preparat digenangi Gram C (alkohol 96 %) dan didiamkan selama 15 detik, dibilas dengan akuades. Terakhir, preparat digenangi Gram D (safranin) dan didiamkan selama 30 detik, dibilas dengan akuades. Tabel 1 menunjukkan perubahan morfologi mikroskopis masing-masing tahap pengecatan Gram. Hasil pengecatan Gram pada isolat yang telah murni seperti ditunjukkan Gambar 7 [14].

Tabel 1. Ringkasan Perubahan Morfologi Pada Tahapan Pengecatan Gram.

| Larutan Pewarna | Zat | Perubahan Morfologi Mikroskopis | |
|-----------------------|-----|--|---|
| | | Gram Positif | Gram Negatif |
| Kristal Violet | | Sel berwarna ungu. | Sel berwarna ungu. |
| Lugol | | Kompleks kristal violet-lugol terbentuk di dalam sel, sel tetap berwarna ungu. | Kompleks kristal violet-lugol terbentuk di dalam sel, sel tetap berwarna ungu. |
| Alkohol 96 % | | Dinding sel mengalami dehidrasi, pori-pori menciut, daya rembes dinding sel dan membran menurun, kristal violet-lugol tidak dapat keluar sel, sel tetap berwarna ungu. | Lipid terekstrak dari dinding sel, pori-pori mengembang, kompleks kristal violet-lugol keluar dari sel, sel menjadi tak berwarna. |
| Safranin | | Sel tak terpengaruh, sel tetap berwarna ungu. | Sel menyerap zat pewarna safranin, warna sel menjadi merah. |

Sumber : [12]



Gambar 7. Keseragaman Hasil Pengecatan Gram Pada Isolat TR_{9.2} [14]: (a) perpotongan kuadran 1 dan 2, (b) perpotongan kuadran 2 dan 3, (c) per-potongan kuadran 3 dan 4, (d) kuadran 4

3.1.3. Seleksi berdasarkan nilai indeks proteolitik isolat murni

Setelah diperoleh isolat bakteri proteolitik murni maka untuk mengetahui isolat mana yang potensial dilakukan seleksi berdasarkan nilai indeks proteolitiknya (IP). Indeks proteolitik merupakan perbandingan diameter zona bening dengan diameter koloni yang dihasilkan oleh koloni tunggal. Sebanyak satu ose koloni tunggal biakan murni diambil dan diencerkan pada pengenceran 10^0 sampai 10^{-5} . Sebanyak 100 μL hasil pengenceran 10^{-5} diinokulasi dengan metode sebar pada media susu skim agar, diinkubasi pada suhu kamar, dan diukur IP pada hari ke-2 [14]. Isolat potensial sebagai bakteri proteolitik jika memiliki nilai indeks ≥ 3 [15]. Nilai indeks proteolitik dipengaruhi oleh jumlah protease yang dihasilkan dan atau nilai turn over protease yang dihasilkan. Semakin besar jumlah protease yang dihasilkan dan atau semakin tinggi nilai "turn over" akan semakin besar nilai indeks proteolitik yang dihasilkan.

3.1.4. Seleksi berdasarkan sifat patogenitas

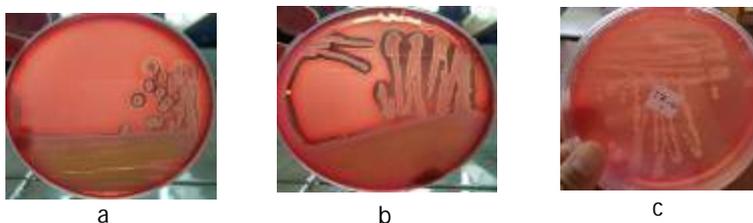
Seleksi berdasarkan sifat patogenesis bertujuan untuk memperoleh isolat bakteri yang tidak pathogen. Seleksi dilakukan melalui uji hemolitik. Isolat bakteri yang diuji diinokulasi pada medium agar darah. Kemampuan bakteri melisis (memecah) dinding sel darah merah mengindikasikan adanya sifat patogen. Ada 3 macam hasil uji hemolitik yaitu hemolitik- α , hemolitik- β , dan hemolitik- γ , seperti ditunjukkan pada Gambar 8.

Hemolitik- α ditandai dengan pembentukan zona hijau pada *blood agar* yang mengindikasikan bahwa bakteri tersebut hanya mampu merusak dinding sel darah merah tanpa melisisnya, menandakan bersifat patogen lemah. Hemolitik- β ditandai terbentuknya zona bening pada *blood agar* yang mengindikasikan isolat bakteri mampu melisis sel darah merah dan diartikan bersifat patogen kuat. Hemolitik- γ ditandai dengan tidak terbentuknya zona bening sekitar bakteri, hal tersebut diartikan bahwa isolat bakteri tidak mampu melisis sel darah merah dan diartikan bersifat non pathogen [16].

3.1.5. Seleksi berdasarkan selektifitas ekstrak kasar protease yang dihasilkannya.

Bakteri menghasilkan berbagai jenis protease. Masing-masing protease tersebut umumnya memiliki sisi pemutusan yang berbeda seperti pada tripsin, kemotripsin dan elastase. Jenis dan banyaknya protease yang dihasilkan suatu bakteri dipengaruhi oleh jenis bakteri tersebut, komposisi medium dan kondisi pertumbuhannya. Isolat HTcUM₆ dapat

menghasilkan ekstrak kasar protein dalam medium pepton sebesar 0.347 ± 0.077 U/mL, sedangkan dalam media limbah tahu hanya 0.167 ± 0.013 U/mL. Ekstrak kasar protease yang dihasilkan dalam medium pepton tidak dapat menghasilkan protein terlarut (kolagen) saat dikontakkan dengan sisik ikan, sedangkan ekstrak kasar protease yang dihasilkan dalam medium limbah tahu walaupun aktivitas proteasenya lebih rendah tetapi dapat menghasilkan protein terlarut (kolagen) saat dikontakkan dengan sisik ikan[17]. Berdasarkan fakta tersebut, maka diduga tidak semua bakteri proteolitik dapat menghasilkan protease yang dapat digunakan untuk produksi kolagen. Maka seleksi lanjutan bakteri proteolitik berdasarkan selektifitas protease yang dihasilkannya menjadi parameter yang penting untuk ketermanfaatannya lebih lanjut.



Gambar 8. Hasil Uji Hemolitik: (a) hemolitik- α , (b) hemolitik- β , dan (c) hemolitik- γ

Pada kasus ini protease yang dihasilkan diharapkan dapat digunakan pada proses produksi kolagen dari sisik ikan Bandeng. Maka prosedur untuk melihat selektifitas proteasenya berdasarkan ketermanfaatan tersebut dapat dilakukan secara sederhana dengan cara mengkontakkan ekstrak kasar protease dengan sisik ikan Bandeng dalam buffer pH asam, pada suhu kamar selama 48 jam. Peningkatan protein terlarut menunjukkan protease tersebut memiliki kemampuan menghidrolisis ikatan peptida pada jaringan sisik ikan. Sebaliknya, ekstrak kasar protease yang tidak menghasilkan protein terlarut setelah proses hidrolisis menandakan jenis protease yang terdapat dalam ekstrak kasar tersebut tidak memiliki spesifisitas pada sisik ikan Bandeng. Pada tahap selektifitas ini digunakan campuran sisik ikan dengan buffer dan ekstrak kasar dengan buffer sebagai kontrol. Kenaikan protein terlarut dihitung dengan rumus sebagai jumlah protein terlarut adalah jumlah protein terlarut hasil hidrolisis dikurangi jumlah protein dalam sisik ikan dikurangi jumlah protein dalam enzim. Metoda ini belum dapat membuktikan dengan tepat bahwa protein terlarut yang dihasilkan adalah kolagen. Secara teoritis hidrolisis ikatan peptide pada jaringan ikat akan menghasilkan beberapa produk diantaranya kolagen yang merupakan penyusun utamanya. Identifikasi adanya kolagen dapat dilakukan dengan menganalisis profil protein terlarut yang dihasilkan menggunakan SDS-PAGE. Pita pada ukuran sekitar 300 kDa menunjukkan adanya kolagen.

3.2. Pangan Fermentasi Lokal sebagai Sumber Bakteri Proteolitik

Indonesia memiliki berbagai pangan fermentasi lokal yang khas, diantaranya digunakan sebagai penyedap masakan yaitu terasi dan tauco. Bahan baku keduanya

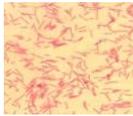
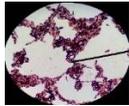
mengandung kadar protein yang tinggi, terasi berasal dari udang atau ikan, dan tauco berasal dari kacang kedelai.

Terasi adalah suatu jenis penyedap makanan berbentuk pasta, berbau khas hasil fermentasi udang, ikan, atau campuran keduanya dengan garam atau bahan tambahan lain [18]. Asam amino-asam amino yang terbentuk selama proses fermentasi adalah hasil degradasi protein ikan atau udang oleh aktivitas protease yang dihasilkan bakteri proteolitik yang terdapat dalam proses tersebut [19]. Hampir semua negara di Asia Selatan dan Tenggara yaitu India, Filipina, Indonesia, Malaysia, Myanmar, dan Thailand memiliki produk ini [18]. Terasi dibuat dengan cara pencucian dan sortasi udang, penjemuran, penambahan garam, pemeraman (fermentasi), penghalusan/penumbukan, pencetakan, serta pengemasan [20]. Terasi diduga mengandung bakteri proteolitik, karena protein yang berasal dari bahan baku (udang) menjadi media pertumbuhan bakteri proteolitik, yang diindikasikan dengan perubahan bau yang menunjukkan terjadinya degradasi protein selama proses fermentasi. Terasi mengandung 30 g protein per 100 g terasi [21]. Terasi sebagai salah satu produk pangan tradisional berfermentasi yang kaya protein dapat menjadi sumber bakteri proteolitik. Enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri tersebut diduga dapat digunakan untuk mengisolasi kolagen.

Terasi dari Samarinda mengandung bakteri penghasil protease *Bacillus subtilis* [11]. *Bacillus subtilis* merupakan bakteri Gram Gram positif yang bersifat non patogenik dan memproduksi protease secara ekstraselular [22]. Hal ini menunjukkan bahwa dalam terasi terdapat bakteri proteolitik. Isolasi bakteri proteolitik dari terasi Sidoarjo diperoleh 18 isolat murni bakteri proteolitik, tetapi hanya tiga isolat yang memiliki nilai indeks proteolitik yang tinggi yaitu TR_{4.1.1}, TR₁₀, and TR_{15.1} berturut-turut 2.96 ± 0.06 ; 3.10 ± 0.10 dan 3.71 ± 0.48 . Ketiganya merupakan gram negatif tetapi susunan selnya yang berbeda. Isolat TR_{4.1.1} merupakan basilus tunggal, TR₁₀ merupakan basilus rantai sedangkan TR_{15.1} merupakan basilus berantai yang panjang [23]. Ringkasan tahap pemurnian hingga seleksi berdasarkan nilai indeks proteolitik ditunjukkan pada Tabel 2 dan Tabel 3. Isolat TR₁₀ and TR_{15.1} menghasilkan aktivitas protease yang tinggi, tetapi hanya TR₁₀ yang menghasilkan protein terlarut pada uji selektifitas terhadap sisik ikan Bandeng seperti ditunjukkan pada Tabel 4. Disamping itu, TR-10 menunjukkan sifat nonpathogen (Gambar 8c).

Kacang kedelai sebagai bahan baku tauco memiliki kandungan protein yang cukup tinggi, yaitu sebesar 35 % berat kering, bahkan dapat mencapai 40-44 % pada kacang kedelai varietas unggul [24]. Kacang kedelai mengandung protein sebesar 34,9 gram dari 100 g kacang kedelai kering yang diuji [25]. Pangan fermentasi sejenis tauco adalah thua nao dan meju. Fermentasi kacang kedelai pada tauco, thua nao, dan meju secara umum hampir sama, kedelai yang telah dibersihkan dan dikukus kemudian di fermentasi. Kacang kedelai pada proses fermentasi thua nao dan meju dibungkus daun pisang sedangkan pada tauco dibiarkan di ruang terbuka. Proses dan lingkungan fermentasi yang berbeda tersebut maka diduga tauco mengandung bakteri proteolitik yang berbeda dengan yang dijumpai pada thua nao dan meju.

Tabel 2. Ringkasan Pemurnian Bakteri Proteolitik dari Terasi Sidoarjo dan Nilai Indeks Proteolitiknya

| Isolat | ΣPurification | | Purification result | Type of cells | Pure isolat | Proteolytic index value | Colony |
|--------|---------------|----------------|---|--|-------------|-------------------------|---|
| | Steak Methods | Spread Methods | | | | | |
| TR 4.1 | 8 times | 4 times |  | Single Bacilli, Gram-Negative Bacteria | TR4.1.1 | 2.96 ±0.06 |  |
| TR10 | 3 times | |  | Chain Bacilli, Gram -Negative Bacteria | TR10 | 3.10±0.10 |  |
| TR15 | 11 times | 3 times |  | Long-chain Bacilli, Gram-Negative Bacteria | TR15.1 | 3.71±0.48 |  |

Tabel 3. Aktivitas Protease Isolat TR_{4.1.1}, TR₁₀ and TR_{15.1}

| No. | Isolate | Protease Activity (U/mL) |
|-----|---------------------|--------------------------|
| 1. | TR _{4.1.1} | 0 |
| 2. | TR ₁₀ | 0.22 ± 0.05 |
| 3. | TR _{15.1} | 1.07 ± 0.14 |

Table 4. The Ability of Crude Extract of Protease of TR_{4.1.1}, TR₁₀, and TR_{15.1} Isolates to Extract the Collagen of Milkfish Scales

| Isolates | Treatment | Total Protein (µg) | | The Difference in Total protein (µg) = A-(B+C) |
|---------------------|---|--------------------|--------|--|
| | | 1 | 2 | |
| TR _{4.1.1} | Crude extract of protease + milky fish scales (A) | 364,9 | 342,6 | -25,39 ± 1,12 |
| | Crude extract of protease (B) | 367,0 | 341,49 | |
| | Distilled water + milky fish scales (C) | 25,53 | 26.50 | |
| TR ₁₀ | Crude extract of protease + milky fish scales (A) | 921.8 | 910,4 | 179.9 ± 1.15 |
| | Crude extract of protease (B) | 739.6 | 730,5 | |
| | Distilled water + milky fish scales (C) | 0 | 0 | |
| TR _{15.1} | Crude extract of protease + milky fish scales (A) | 387,3 | 388,3 | 19,14±2,66 |
| | Crude extract of protease (B) | 328,8 | 329.8 | |
| | Distilled water + milky fish scales (C) | 44,68 | 39,36 | |

Bakteri proteolitik dijumpai pada berbagai pangan fermentasi kedelai. Bakteri proteolitik dari *thua nao* (pangan fermentasi kacang kedelai hitam dari Thailand) adalah *Bacillus subtilis* [26]. Bakteri proteolitik dari *meju* (pangan fermentasi kacang kedelai dari korea) adalah *Bacillus amyloliquefaciens* [27]. Isolasi bakteri proteolitik dari tauco Surabaya menghasilkan 11 isolat bakteri proteolitik. Seleksi berdasarkan nilai indeks proteolitik diperoleh delapan isolat bakteri proteolitik yang potensial yaitu empat isolat hasil pemurnian tahap satu yaitu HTcUM₂, HTcUM_{6.2.1}, HTcUM_{6.2.2}, dan HTcUM₁₀ dengan nilai indeks proteolitik 2.67, 2.75., 2.40 dan 3.00, dan empat isolat potensial dari pemurnian tahap dua yaitu HTcUM_{6.1.1}, HTcUM_{7.1}, HTcUM₈, dan HTcUM_{9.1} dengan nilai indeks proteolitik 2.70, 2.40, 3.30 dan 2.30 [28]. Berdasarkan seleksi tersebut maka isolat yang potensial adalah HTcUM₈, HTcUM₁₀, HTcUM_{6.2.1}, dan HTcUM_{6.1.1}, tetapi berdasarkan patogenitas keempat isolat tersebut termasuk bakteri pathogen sehingga tidak tepat dipilih sebagai isolat bakteri proteolitik untuk produksi kolagen, dikhawatirkan produk toksiknya mengkontaminasi kolagen yang dihasilkan. Berdasarkan seleksi patogenitas hanya HTcUM_{7.1} yang tidak pathogen dari kedelapan isolat tersebut. Maka isolat bakteri HTcUM_{7.1} merupakan isolat terseleksi untuk dikembangkan sebagai bakteri proteolitik untuk produksi kolagen. Hasil ini juga didukung dengan seleksi berdasarkan protease selektif yang dihasilkan. Ekstrak kasar protease dari isolat HTcUM_{7.1} menghasilkan protease dengan aktivitas spesifik tertinggi diantara isolat lainnya yaitu sebesar 6.044±3.390 U/g, dan dapat menghasilkan protein terlarut terlarut tertinggi sebesar 0.1015±0.040 mg/mL saat dikontakkan dengan sisik ikan Bandeng (Tabel 4).

Tabel 4. Aktivitas Spesifik dan Hasil Uji Selektifitas Ekstrak Kasar Protease Isolat Bakteri Proteolitik dari Tauco Surabaya Terhadap Sisik Ikan Bandeng

| No | Isolate | Specific activity of protease (U/mg) | Dissolve protein (mg/mL) |
|----|------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| 1 | HTcUM _{7.1} | 6.044±3.390 | 0.1015±0.040 |
| 2 | HTcUM _{6.2.2} | 1.718±0.451 | 0.0825±0.004 |
| 3 | HTcUM _{6.1.1} | 1.516±0.487 | 0.0125±0.012 |
| 4 | HTcUM ₂ | 1.211±0.004 | 0.0315±0.001 |
| 5 | HTcUM _{9.1} | 0.427±0.053 | 0.0425±0.007 |
| 6 | HTcUM ₁₀ | 0.311±1.099 | 0.0930±0.044 |

Bakteri proteolitik untuk diaplikasikan sebagai sumber protease dalam produksi kolagen selain memiliki aktivitas protease yang tinggi, juga memiliki mampu menghasilkan protease selektif dengan sumber bahan baku kolagen dan tidak pathogen. Berdasarkan hal tersebut maka metoda seleksi bakteri proteolitik untuk diaplikasikan pada produksi kolagen tidak dapat dilakukan hanya melalui satu metoda saja, melainkan beberapa metoda yang dilakukan secara sekuensial untuk memperoleh bakteri proteolitik yang mampu menghasilkan protease selektif yang aman digunakan pada proses produksi kolagen secara enzimatis.

4. Kesimpulan

Pangan fermentasi Indonesia seperti tauco dan terasi memiliki berbagai bakteri proteolitik. Protease yang dihasilkan oleh suatu bakteri proteolitik juga beragam tergantung dari spesies, komposisi medium dan kondisi pertumbuhannya. Masing-masing protease memiliki spesifisitas yang khas pada substrat tertentu. Bakteri proteolitik yang dapat digunakan sebagai sumber protease untuk dapat diaplikasikan pada produksi kolagen memiliki syarat tertentu diantaranya mampu menghasilkan protease dengan aktivitas yang tinggi, nonpatogen dan memiliki selektifitas terhadap sumber kolagen yang digunakan. Berdasarkan hal tersebut maka beberapa metoda seleksi dapat dilakukan secara sekuensial yaitu seleksi bakteri proteolitik berdasarkan kemampuan tumbuh pada media selektif, pemurnian isolat, seleksi berdasarkan nilai indeks proteolitik isolat murni, seleksi berdasarkan sifat patogenitas, dan seleksi berdasarkan selektifitas ekstrak kasar protease yang dihasilkannya. Seleksi yang dilakukan secara sekuensial berhasil memperoleh TR₁₀ dari terasi Sidoarjo dan HTcUM_{7.1} dari tauco Surabaya yang berpotensi menjadi sumber protease untuk produksi kolagen dari sisik Ikan Bandeng.

5. Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ketua LP2M dan Dekan FMIPA Universitas Negeri Malang atas kesempatannya mengembangkan topik riset “eksplorasi bakteri proteolitik dari pangan fermentasi lokal sebagai sumber protease untuk produksi kolagen” melalui pendanaan PNBPU UM 2018 dan sebagai Penulis pada Book Chapter MIPA 2018.

6. Conflict of Interest

The authors ensure that no contractual relation of proprietary considerations exist that would affect the publication of information in the submitted manuscript. There is no conflict of interest of any sort.

Referensi

- [1] Hartati, I., & Kurniasari, L. 2010. Kajian produksi kolagen dari limbah sisik ikan secara ekstraksi enzimatis. *Momentum*, 6(1): 33-35.
- [2] Yang, H., & Shu, Z. 2014. The extraction of collagen protein from pigskin. *J Chem Pharma Res*, 6(2): 683-687.
- [3] Mouw, Janna K., Ou, G., & Weaver, Valerie M. 2014. Extracellular Matrix Assembly: A Multiscale Deconstruction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15: 771-785.
- [4] Ulfah, Maria. 2011. Pengaruh Konsentrasi Larutan Asam Asetat dan Lama Waktu Perendaman Terhadap Sifat-sifat Gelatin Ceker Ayam. *Agritech*, 31 (3): 161-167.
- [5] Adhi, Noorman. 2016. *Perbandingan Produksi Kolagen dari Sisik dan Tulang Ikan Gurami (Osphronemus gouramy) secara Kimia dan Enzimatis*. Artikel Tugas Akhir. Bandung : Universitas Pasundan.

- [6] Rathakrishnan, Nagrajan. 2013. Optimization of the Production of Protease by *Bacillus cereus* with Response Surface Methodology Using Grounut Shell. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Science*, 3 (2): 200-209.
- [7] Mahajan, R. T. & Shamnkant, B. B. 2010. Biological Aspects of Proteolytic Enzymes: A Review. *Journal of Pharmacy Research*, 3 (9): 2048-2068.
- [8] Rohishoh, Nur. 2012. *Produksi dan Pemurnian Enzim Pektinase (Poligalakturonase) dari Bakteri Pseudomonas stutzeri*. Skripsi. Surabaya: Universitas Airlangga.
- [9] Thomas, M., Mardiah., Mustafa & Santoso, Abdi. 2011. *Teknik Isolasi dan Kultur*, (Online), ([http://openwetware.org/images/4/4b/Kuliah_7_tambahan MEDIA KULTUR.pdf](http://openwetware.org/images/4/4b/Kuliah_7_tambahan_MEDIA_KULTUR.pdf)) Akhdiya, A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil. *Buletin Plasma Nutfah*, 9 (2): 38-44.
- [10] Bhat, Mohd Y., Dar, Tanveer A., & Singh, Laishram R. 2016. *Casein Proteins: Structural and Functional Aspects*, (Online)
- [11] Soeka, Y. S. & Sulistiani. 2014. Karakterisasi Protease *Bacillus subtilis*A1 Inacc B398 yang Diisolasi dari Terasi Samarinda [Characterization of Protease *Bacillus subtilis* A1 Inacc B398 Isolated from Shrimp Paste Samarinda]. *Berita Biologi*, 13 (2): 203–212.
- [12] Pelczar, M. J. Jr., & Chan, E. C. S. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Terjemahan Hadioetomo. 2010. Jakarta: UI-Press.
- [13] Acharya, Tankeshwar. 2015. *Gram Staining: Principle, Procedure and Results*, (Online), (<http://microbeonline.com/gram-staining-principle-procedure-results>), diakses 11 Juni 2017.
- [14] Chusniyah, Naharotul. 2016. *Isolasi Bakteri Penghasil Protease dari Terasi Sidoarjo untuk Isolasi Kolagen dari Sisik Ikan Bandeng*. Skripsi tidak diterbitkan. Malang: FMIPA UM.
- [15] Akhdiya, A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil. *Buletin Plasma Nutfah*, 9 (2): 38-44.
- [16] Hawaz, Estifanos. 2014. Isolation and Identification of Probiotic Lactic Acid Bacteria Curd and *In Vitro* Evaluation of Its Growth Inhibition Activities Againsts Pathogenic Bacteria. *African Journal of Microbiology Research* 8(13): 1419-1425
- [17] Fatma, F. 2017. *Seleksi dan Pemurnian Bakteri Proteolitik Isolat HTcUM₃₋₉ dari Taucu Pasar Besar Kota Malang untuk Isolasi Kolagen dari Sisik Ikan Bandeng*. Skripsi, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Malang.
- [18] Anggo, Apri D., Swastawati, Fronthea, Ma'ruf, Widodo F., Rianingsih, Laras. 2014. Mutu Organoleptik dan Kimiawi Terasi Udang Rebon dengan Kadar Garam Berbeda dan Lama Fermentasi. *JPHPI*, 17 (1).
- [19] Peralta, E. M., Hideo, H., Daisuke, W., Hisashi, M. 2005. Antioxidative Activity of Philippine Salt Fermented Shrimp and Variation of Its Constituents During Fermentation. *Journal of Oleo Science*, 54 (10): 553-558.
- [20] Ma'ruf, M., Sukarti, K., Purnamasari, E., & Sulistianto, E. 2013. Penerapan Produksi Bersih pada Industri Pengolahan Terasi Skala Rumah Tangga di Dusun Selangan Laut Pesisir Bontang. *Jurnal Ilmu Perikanan Tropis*, 18 (2).
- [21] Soedarmo, P., Sediaoetama, A. 1977. *Ilmu Gizi*. Jakarta: Dian Rakyat.
- [22] Nurkhasanah. 2015. *Uji Protease Bakteri Bacillus subtilis untuk Isolasi Kolagen dari sisik ikan Gabus (Channa striana)*. Skripsi tidak diterbitkan. Malang: Universitas Brawijaya.

- [23] Susanti, E., Suharti, Naharotul Chusniyah, and Shindy Tirta Ayu Paramitha, 2018a, *Isolation and Screening of Proteolytic Bacteria of Sidoarjo Shrimp Paste as Protease Source to Extract the Collagen Protein of Milkfish (Chanos chanos) Scales*. Disajikan pada The 2nd International Conference on Natural Resources and Life Sciences di Ubaya Surabaya, 23-24 Agustus 2018
- [24] Koswara, S. 1992. *Teknologi Pengolahan Kedelai Menjadikan Makanan Bermutu*. Pustaka Sinar Harapan. Jakarta
- [25] Suprpti, L., 2003. *Pembuatan Tempe*, Penerbit Kanisius, Yogyakarta
- [26] Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote, E., & Lumyong, S. 2002. Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *Science Asia*, 28(4): 241-245.
- [27] Cho, S. J., Oh, S. H., Pridmore, R. D., Juillerat, M. a., & Lee, C. H. 2003. Purification and Characterization of Proteases from *Bacillus amyloliquefaciens* Isolated from Traditional Soybean Fermentation Starter. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7664–7670.
- [28] Susanti, E., Suharti, Hadiyan Rahman Ramadhan, Fira Fatma, 2017, Isolasi dan Seleksi Bakteri Proteolitik Potensial dari Tauco Surabaya, *Prosiding Seminar Nasional Kimia dan Pembelajarannya (SNKP) 2017*.
- [29] Susanti, E., Nia Lutfiana, Suharti, Rini Retnosari, 2018b, *Screening of Proteolytic Bacteria from Tauco Surabaya Based on Pathogenicity and Selectivity of Its Protease on Milky Fish (Chanos chanos) Scales For Healthy and Halal Collagen Production*, disajikan pada The 13th Joint Chemistry Conference, di Semarang, Indonesia, 7-8 September 2018.