

**DAYA HIDROLISIS PROTEIN BEBERAPA SPESIES BAKTERI  
PROTEOLITIK DALAM DAGING YANG DIAWETKAN DENGAN METODE  
PERPADUAN FERMENTASI ENSILING DAUN SELADA DAN  
FERMENTASI BIJI KEPAYANG**

**Permata Ika Hidayati**

**Jurusan Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Kanjuruhan Malang**

**Email: [permatahidayati@gmail.com](mailto:permatahidayati@gmail.com)**

**ABSTRAK**

Pengawetan merupakan cara untuk mengawetkan produk pangan seperti daging dan produk olahannya, sehingga tidak mudah rusak dan terhindar dari pembusukan akibat cemaran oleh mikroba. Pengawetan dengan bahan pengawet alami yang menggunakan perpaduan antara fermentasi ensiling daun selada (*Lactuca sativa*) dan biji kepayang (*Pangium edule Reinw*) merupakan suatu cara pengawetan yang mudah, murah, aman, efisien, dan dapat mempertahankan kandungan protein yang ada di dalam daging. Daging awetan pada akhir batas masa simpan dapat mengalami pembusukan akibat kontaminasi oleh bakteri kontaminan dalam tubuh daging sehingga terjadi penurunan mutu. Penelitian ini bertujuan untuk: (1) menganalisis kemampuan hidrolisis protein isolat-isolat bakteri proteolitik yang berasal dari daging awetan, (2) untuk menganalisis penurunan nilai gizi daging awetan ditinjau dari penurunan kadar protein dengan variasi masa simpan, serta (3) untuk mengkarakterisasi dan mengidentifikasi terhadap spesies-spesies bakteri proteolitik yang berasal dari daging awetan. Dilakukan analisis kemampuan hidrolisis protein secara kualitatif terhadap enam isolat bakteri yang berasal dari daging yang di awetkan dengan cara menginokulasikannya pada medium Skim Milk Agar (SMA) dan menginkubasikannya pada 37<sup>0</sup>C 1x24 jam. Kemudian dilakukan pengujian kadar protein dalam tubuh daging awetan selama masa simpan 0, 7, 14, dan 21 hari. Selanjutnya dilakukan karakterisasi dan identifikasi spesies-spesies bakteri proteolitik yang berasal dari daging yang diawetkan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa: (1) terdapat enam isolat bakteri bersifat proteolitik yang berasal dari daging yang diawetkan; (2) kadar protein dalam daging awetan menurun selama waktu penyimpanan 0, 7, 14, dan 21 hari, (3) enam spesies-spesies bakteri proteolitik yang ditemukan dalam penelitian ini, ialah *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella ozaenae*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacter freundii*.

**Kata kunci:** fermentasi ensiling daun selada, fermentasi biji kepayang, bakteri proteolitik

**PROTEIN HYDROLISIS ACTIVITY OF SOME PROTEOLYTIC BACTERIA  
SPECIES IN PRESERVED MEAT WITH COMBINATION METHOD OF LETTUCE  
LEAF ENSILING AND KEPAYANG SEED FERMENTATION**

**Jurusan Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Kanjuruhan Malang**

**Email: [permatahidayati@gmail.com](mailto:permatahidayati@gmail.com)**

**ABSTRACT**

Preservation is away to preserve some food product such as meat and processed meat in order to avoid from spoiled of microorganism activity. Preservation with natural material by combination method of Lettuce leaf (*Lactuca sativa*) ensiling and kepayang seed (*Pangium edule reinw*) is an easy, cheap, savely, and efisien method that could maintain protein contents in meat. Preserved meat at the end of storage time could be spoiled by microorganism activity that can decrease the meat quality. This research was done to: (analyze the protein hydrolysis ability of proteolytic bacterias isolate from preserved meat; (2) to analyze the decrease of preserved meat nutrition value based on the protein content with storage time variation; (3) to characterize and identify the proteolytic bacteria species from preserved meat. The protein hydrolysis ability of six bacteria isolates from preserved meat

were analyzed by inoculate on Skim Milk Agar plate medium and incubated in 37°C during 1x24 hour. The protein content on preserved meat that stored during 0, 7, 14, and 21 days were analyze. Furthermore each proteolytic bacteria spesies were characterize and identify. The research result show that: (1) there are six proteolytic bacteria from preserved meat; (2) the preserved meat nutrition value based on the protein content were decrease as well as the storage time during 0, 7, 14, dan 21 days; (3) the six proteolytic bacteria spesies are: *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella ozaenae*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacter freundii*.

**Keywords:** lettuce leaf ensiling fermentation, kepayang seed fermentation, proteolytic bacteria

## PENDAHULUAN

Daging mudah mengalami kerusakan. Hal ini disebabkan antara lain akibat proses-proses kimiawi dengan bantuan enzim-enzim yang terdapat dalam daging, akibat aktivitas bakteri kontaminan. Kerusakan tersebut mengakibatkan penurunan mutu daging, sehingga merugikan para peternak dan pedagang daging. Sebagian besar bakteri pembusuk daging merupakan kelompok bakteri proteolitik yang mampu menghidrolisis protein dan kelompok bakteri lipolitik yang mampu menghidrolisis lemak. Bakteri dapat tumbuh dan berkembangbiak dalam daging, karena kadar air dalam tubuh daging berkisar antara 70-80%, sedangkan bakteri berkisar antara 56-80% (Adawyah, 2007). Selain itu daging terutama tersusun atas protein dan lemak, yang juga diperlukan oleh bakteri sebagai nutrisi.

Sehubungan dengan kerusakan yang sering terjadi pada daging, maka masyarakat berusaha mengawetkan daging dengan berbagai cara, antara lain: dikeringkan, didinginkan, diasap, dibuat menjadi dendeng daging. Disamping itu adapula cara pengawetan dengan bahan organik, yaitu metode perpaduan fermentasi ensiling daun selada dan fermentasi biji kepayang. Larutan fermentasi ensiling daun selada (*Lactuca sativa*) dapat menghasilkan asam laktat yang berasal dari proses biokimia yang dilakukan oleh kelompok bakteri asam laktat, selain itu spesies-spesies bakteri asam laktat juga juga dapat menghasilkan senyawa antibakteri, yaitu bakteriosin (Hartanti, 2012). Bakteriosin dapat menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk dalam tubuh daging. Biji kepayang (*Pangium edule Reinw*) dapat menghasilkan senyawa-senyawa antibakteri, yaitu: tanin, saponin, dan flavonoid. Senyawa-senyawa antibakteri tersebut dapat merusak struktur dinding sel dan membran sel, sehingga sifat semipermeabilitas membran sel, yang mengakibatkan penghambatan pertumbuhan bakteri pembusuk. Adanya kemampuan mengendalikan pertumbuhan bakteri pembusuk pada daging melalui metode perpaduan fermentasi ensiling daun selada dan fermentasi biji kepayang tersebut, maka cara pengawetan daging ini dapat digunakan untuk memperpanjang daya tahan simpan daging.

Daging yang diawetkan dengan metode perpaduan fermentasi ensiling daun selada dan fermentasi biji kepayang mempunyai batas waktu simpan dimana daging masih layak dikonsumsi ditinjau berdasarkan kualitas mikrobiologi, kandungan gizi, dan nilai hasil uji

organoleptik. Batas waktu simpan yang telah diawetkan tersebut maksimal 14 hari. Jenis daging yang diawetkan dalam penelitian yang telah dilakukan ialah daging sapi dan kambing; pada masa simpan selama 21 hari. Kedua jenis daging tersebut tidak layak dikonsumsi dan mulai membusuk. Apabila batas waktu simpan telah terlampaui, maka senyawa-senyawa antibakteri dalam bahan pengawet mulai mengalami penurunan daya hambat pertumbuhan bakteri-bakteri pembusuk daging. Spesies-spesies bakteri pembusuk dapat diisolasi dari daging yang telah melewati batas waktu simpan. Diantara spesies-spesies bakteri pembusuk daging ada kemungkinan bersifat proteolitik sehingga dapat menghidrolisis protein. Sehubungan dengan hal tersebut perlu dilakukan penelitian spesies-spesies bakteri yang bersifat proteolitik dan analisis kemampuan hidrolisis protein oleh spesies-spesies bakteri proteolitik yang berasal dari daging yang diawetkan tersebut.

Tujuan penelitian ini, ialah untuk: (1) menganalisis kemampuan hidrolisis protein isolat-isolat bakteri proteolitik yang berasal dari daging awetan, (2) untuk menganalisis penurunan nilai gizi daging awetan ditinjau dari penurunan kadar protein dengan variasi masa simpan, serta (3) untuk mengkarakterisasi dan identifikasi terhadap spesies-spesies bakteri proteolitik yang berasal dari daging awetan.

## **MATERI DAN METODE**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: (1) alat-alat untuk keperluan sterilisasi: otoklaf; (2) alat-alat untuk pembuatan medium: kompor gas, timbangan analitik digital Sartorius, gelas ukur Pyrex ukuran 10 ml, 100 ml, dan 500 ml, labu Erlenmeyer Pyrex ukuran 500 ml, 1000 ml, gelas piala Pyrex ukuran 2000 ml, tabung reaksi, rak tabung reaksi, kaca pengaduk, *micropipette*, (3) alat untuk pengujian kadar protein dengan spektrofotometer; dan (4) alat untuk inokulasi dan inkubasi: cawan petri, jarum inokulasi ujung lurus, lampu spiritus, *laminar air flow*, inkubator, vortex merk Sibata.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini, meliputi: sampel daging sapi dan kambing, medium Skim Milk Agar (SMA), medium miring Nutrien Agar (NA) aluminium foil, kertas pembungkus, kertas label, tali kasur, plastik, kertas hisap, kapas, korek api, tissue.

### **Metode**

Penentuan isolat bakteri yang bersifat proteolitik secara kualitatif dilakukan dengan cara menggoreskan inokulum dari tiap isolat bakteri pada medium penguji, yaitu: *Skim Milk Agar* lalu biakan diinkubasikan pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 1x24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh pada permukaan medium diamati. Apabila terdapat zona jernih disekitar koloni bakteri, berarti bakteri mampu menghidrolisis protein atau bersifat proteolitik.

Pengukuran kadar protein dalam daging awetan dengan cara spektrofotometri dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut: (1) diambil 5 g daging dan diencerkan

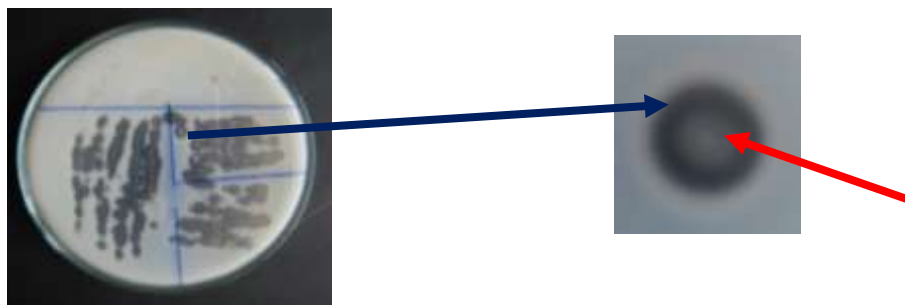
sampai 100 ml dengan aquades dalam labu takar; (2) dari larutan di atas, diambil 5 ml dan ditambahkan 10 ml larutan *amido Black* dalam tabung sentrifuge 15 ml dan digojog. Didiamkan selama 10 menit dan kemudian disentrifuge dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit. 3 ml supernatan diambil dan diencerkan menjadi 200 ml dalam labu ukur dan membaca *Optical Density* (OD) dengan spektrofotometer *Spectronic 20* pada panjang gelombang 615 nm; (3) dibuat blanko dengan mengganti 5 ml larutan contoh dengan 5 ml aquades. Standarisasi spektrofotometer pada OD nol dengan aquades dan membaca OD blanko (dengan kuvet). Harga OD terkoreksi (OD - OD blanko) dipakai untuk menentukan kadar protein dengan membaca pada kurva standar.

Penentuan karakterisasi dan identifikasi masing-masing isolat bakteri proteolitik dikarakterisasi berdasarkan morfologi koloni, pengamatan mikroskopis, dan fisiologi, kemudian dilakukan identifikasi sampai tingkat spesies. Beberapa karakter isolat yang dideskripsi untuk menentukan spesies bakteri ialah: Pertama, dilakukan deskripsi atau karakterisasi morfologi koloni bakteri yang meliputi warna koloni, bentuk koloni, tepian koloni, elevasi koloni, diameter koloni, sifat koloni suram/mengkilat, dan bentuk pertumbuhan koloni pada medium miring. Kedua, karakterisasi sitologi bakteri yang meliputi sifat Gram, bentuk sel, ukuran sel, kemampuan membentuk spora, ada tidaknya kapsula, kemampuan gerak bakteri, dan tipe respirasi. Ketiga, karakterisasi sifat-sifat fisiologi bakteri menggunakan perangkat media identifikasi dari *Microbac<sup>TM</sup> GNB 12A/B/E,24E Identification Kits* yang meliputi uji reaksi lisin dekarboksilase, ornitin dekarboksilase, produksi H<sub>2</sub>S, fermentasi glukosa, manitol, xilosa, β-galaktosidase (ONPG), produksi indol, tipe respirasi, hidrolisis urease, reaksi Voges-Proskauer (VP), penggunaan sitrat, triptofan deaminase (TDA), pencairan gelatin, penghambatan malonat, fermentasi inositol, sorbitol, rhamnosa, sukrosa, laktosa, arabinosa, adonitol, rafinosa, salisin, dan dihidroksilase arginin.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Penentuan spesies-spesies bakteri yang bersifat proteolitik**

Bakteri-bakteri pembusuk daging telah berhasil diisolasi sebanyak enam isolat dari daging sapi dan daging kambing yang telah diawetkan dan disimpan selama 21 hari. Isolat-isolat bakteri tersebut diuji untuk menentukan isolat yang bersifat proteolitik. Hasil pengujian dinyatakan positif proteolitik, apabila koloni bakteri yang digoreskan pada medium *Skim Milk Agar* (SMA) membentuk zona jernih disekitar koloni (lihat Gambar 1)



**Gambar 1. Hasil Uji Kemampuan Hidrolisis Protein Secara Kualitatif terhadap Bakteri dengan menggunakan Medium Skim Milk Agar (SMA)**

Keterangan:

- = Daerah jernih disekitar koloni bakteri yang ditumbuhkan pada medium Skim Milk Agar, menunjukkan bahwa bakteri bersifat proteolitik, yaitu mampu menghidrolisis protein
- = Koloni bakteri yang bersifat proteolitik yang ditumbuhkan pada medium lempeng Skim Milk Agar (SMA)

**Tabel 1. Hasil Penentuan Isolat-Isolat Bakteri Proteolitik yang Berasal dari Daging yang Diawetkan dan Disimpan Selama 21 hari**

Kode Isolat Bakteri	Kemampuan Hidrolisis Protein (Proteolitik)
A	+
B	+
C	+
D	+
E	+
F	+

**Keterangan:** + = mempunyai kemampuan hidrolisis

Berdasarkan Tabel 1 terbukti bahwa isolat-isolat bakteri memiliki sifat proteolitik berdasarkan adanya bagian medium SMA yang nampak jernih di sekitar koloni bakteri.

## 2. Pengukuran Penurunan Kadar Protein dalam Daging Sapi

**Tabel 2. Kadar Protein Daging Sapi yang Diawetkan dengan Variasi Masa Simpan**

Lama Waktu Penyimpanan (Hari)	Kadar Protein Daging Sapi (%) pada			$\Sigma$ (%)	Rerata (%)
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
Kontrol	18,742	18,789	18,789	56,320	18,773
0	18,441	18,963	18,963	56,367	18,789
7	17,553	17,866	18,057	53,476	17,825
14	16,131	15,918	15,934	47,983	15,994
21	13,819	14,991	14,672	43,482	14,494

Tabel 2 menunjukkan bahwa kadar protein pada 0 hari, yaitu 18,789%. Pada perlakuan pemberian pengawetan dengan lama waktu penyimpanan 7 dan 14 hari menghasilkan kadar protein lebih rendah dari 0 hari. Kadar protein terus menurun pada perlakuan pengawetan daging sapi dengan lama waktu penyimpanan 14 hari yaitu 15,994%. Berdasarkan hasil penghitungan kadar protein tersebut, perlakuan pengawetan daging dengan lama waktu penyimpanan 0 hari, 7, dan 14 hari masih memenuhi kelayakan konsumsi karena kadar protein lebih tinggi dari batas minimal kadar protein daging sapi berdasarkan ketentuan dari FAO (1972), yaitu 14,8%.

Pada perlakuan pengawetan daging dengan lama waktu penyimpanan 21 hari menghasilkan kadar protein terendah, yaitu 14,494%. Berdasarkan hasil penghitungan kadar protein tersebut, perlakuan pengawetan daging dengan lama waktu penyimpanan 21 hari tidak memenuhi kelayakan konsumsi karena kadar protein lebih rendah dari batas minimal kadar protein daging berdasarkan ketentuan dari FAO (1972), yaitu 14,8%.

**Tabel 3. Kadar Protein Daging Kambing yang Diawetkan dengan Variasi Pengawetan dengan Variasi Masa Simpan**

Lama Waktu Penyimpanan (hari)	Kadar Protein Daging Kambing (%) pada			$\Sigma$ (%)	Rerata (%)
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
Kontrol	18,953	18,751	18,742	56,446	18,815
0	18,963	18,441	18,432	55,836	18,612
7	18,057	17,562	17,553	53,172	17,724
14	15,918	16,131	16,131	48,180	16,060
21	14,846	13,805	13,819	42,470	14,157

Tabel 3 menunjukkan bahwa kadar protein pada 0 hari, menghasilkan kadar protein, yaitu 18,612%. Pada perlakuan pemberian pengawetan dengan lama waktu penyimpanan 7 dan 14 hari menghasilkan kadar protein lebih rendah dari kontrol. Kadar protein terus menurun pada perlakuan pengawetan daging kambing dengan lama waktu penyimpanan 14 hari yaitu 16,060%. Berdasarkan hasil penghitungan kadar protein tersebut, perlakuan pengawetan daging kambing dengan lama waktu penyimpanan 0 hari, 7, dan 14 hari masih memenuhi kelayakan konsumsi karena kadar protein lebih tinggi dari batas minimal kadar protein daging berdasarkan ketentuan dari FAO (1972), yaitu 14,800%.

Pada perlakuan pengawetan daging dengan lama waktu penyimpanan 21 hari menghasilkan kadar protein terendah, yaitu 14,157%. Berdasarkan hasil penghitungan kadar protein tersebut, perlakuan pengawetan daging dengan lama waktu penyimpanan 21 hari tidak memenuhi kelayakan konsumsi karena kadar protein lebih rendah dari batas minimal kadar protein daging berdasarkan ketentuan dari FAO (1972), yaitu 14,800%.

Analisis data hasil terhadap pengaruh perlakuan pengawetan dengan perpaduan fermentasi ensiling daun selada dan biji kepayang dengan variasi masa simpan terhadap mutu daging sapi ditinjau berdasarkan kandungan gizi meliputi kadar protein dapat dilihat pada Tabel 4 berikut ini:

**Tabel 4. Analisis Sidik Ragam Pengaruh Pengawetan dengan Variasi Masa Simpan terhadap Uji Kandungan Gizi Meliputi Kadar Protein pada Daging Sapi**

	JK	db	KT	F	Sig. 0,05
Antar Kelompok	42.493	4	10.623	98.814	.000
Dalam Kelompok	075	10	.108		
Total	43.568	14			

$F_{hitung}$  faktor pengawetan dengan variasi masa simpan pada taraf signifikan 5% lebih besar dari  $F_{tabel}$  yaitu:  $98,814 \geq 3,36$ , dengan demikian hipotesis diterima, yang berarti ada

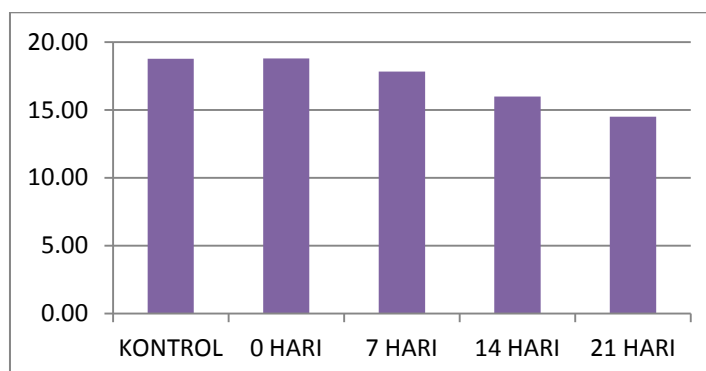
pengaruh perlakuan pengawetan dengan variasi masa simpan terhadap mutu daging ditinjau berdasarkan kadar protein. Berdasarkan hasil penelitian ini telah terbukti bahwa faktor pengawetan dengan variasi masa simpan memberikan pengaruh yang nyata pada taraf signifikansi 5% terhadap kadar protein pada daging yang diawetkan, sehingga perlu dilanjutkan dengan uji Duncan 5%.

Untuk mengetahui perlakuan pengawetan dengan variasi masa simpan dapat dilakukan uji Duncan 5%. Adapun hasilnya dapat dilihat pada Tabel 5 berikut:

**Tabel 5. Ringkasan Hasil Uji Duncan 5% Pengaruh Lama Waktu Penyimpanan terhadap Hasil Uji Kadar Protein Daging Sapi**

Lama Waktu Penyimpanan (Hari)	Rerata (%)	Notasi beda
Kontrol	18,770	a
0	18,790	a
7	17,830	b
14	15,990	c
21	14,490	d

Keterangan: Nilai yang didampingi notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama berarti berbeda nyata



**Gambar 2. Pengaruh Perlakuan Pengawetan dengan Variasi Masa Simpan terhadap Kadar Protein Daging Sapi**

Berdasarkan Tabel 5 ringkasan hasil uji Duncan 5% dan Gambar 2 terbukti bahwa ada pengaruh keempat variasi masa simpan yang diujikan dalam daging sapi yang diawetkan terhadap perlakuan pengawetan dengan kadar protein ditunjukkan dengan adanya perlakuan pengawetan dengan notasi. Pada Tabel 5 dapat dilihat bahwa kadar protein tertinggi terdapat pada lama waktu penyimpanan selama 0 hari, lalu diikuti 7 hari, dan 14 hari dengan 18,790 (notasi a), 17,830, dan 15,990 (notasi b dan c), diikuti lama waktu penyimpanan selama 21 hari dengan 14,490 (notasi d). Hal ini berarti lama waktu penyimpanan selama 0 hari lebih baik daripada lama waktu penyimpanan selama 7 hari, lama waktu penyimpanan selama 7 hari lebih baik daripada lama waktu penyimpanan selama 14 hari, dan lama waktu penyimpanan selama 14 hari lebih baik daripada lama waktu penyimpanan selama 21 hari.

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa lama waktu penyimpanan selama 0 hari, 7 hari, dan 14 hari menghasilkan kadar protein lebih tinggi dibandingkan dengan lama waktu penyimpanan selama 21 hari. Pada lama waktu penyimpanan selama 21 hari ternyata menunjukkan kadar protein terendah. Hal ini membuktikan bahwa semakin lama daging sapi yang diawetkan dan disimpan akan semakin menurun kadar proteinnya.

Analisis data hasil terhadap pengaruh perlakuan pengawetan dengan perpaduan fermentasi ensiling daun selada dan biji kepayang dengan variasi masa simpan terhadap mutu daging kambing ditinjau berdasarkan kandungan gizi meliputi kadar protein dapat dilihat pada tabel 6 berikut ini:

**Tabel 6. Analisis Sidik Ragam Pengaruh Pengawetan dengan Variasi Masa Simpan terhadap Kadar Protein pada Daging Kambing**

	JK	db	KT	F	Sig. 0,05
Antar Kelompok	46.078	4	1519	102.595	.000
Dalam Kelompok	123	10	.112		
Total	47.200	14			

$F_{hitung}$  faktor pengawetan dengan variasi masa simpan pada taraf signifikan 5% lebih besar dari  $F_{tabel}$  yaitu:  $102,595 \geq 3,36$ , dengan demikian hipotesis diterima, yang berarti ada pengaruh perlakuan pengawetan dengan variasi masa simpan terhadap mutu daging ditinjau berdasarkan kadar protein. Berdasarkan hasil penelitian ini telah terbukti bahwa faktor pengawetan dengan variasi masa simpan memberikan pengaruh yang nyata pada taraf signifikan 5% terhadap kadar protein pada daging kambing yang diawetkan, sehingga perlu dilanjutkan dengan uji Duncan 5%.

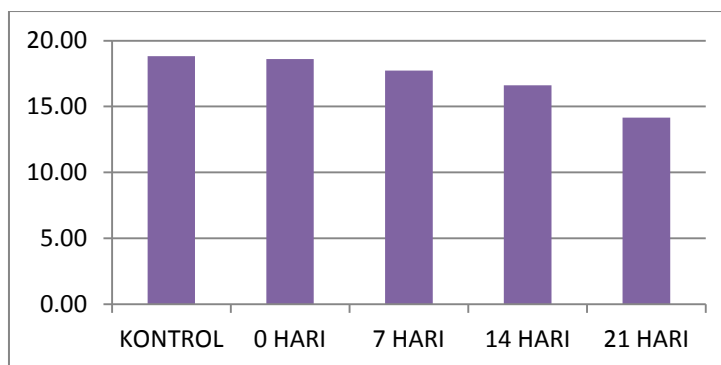
Untuk mengetahui perlakuan pengawetan dengan lama waktu penyimpanan dapat dilakukan uji Duncan 5%. Adapun hasilnya dapat dilihat pada Tabel 7 berikut:

**Tabel 7. Ringkasan Hasil Uji Duncan 5% Pengaruh Lama Waktu Penyimpanan terhadap Hasil Uji Kadar Protein Daging Kambing**

Lama Waktu Penyimpanan (Hari)	Rerata (%)	Notasi Beda
Kontrol	18,820	a
0	18,610	a
7	17,720	b
14	16,060	c
21	14,120	d

Keterangan: Nilai yang didampingi notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama berarti berbeda nyata





**Gambar 3. Pengaruh Perlakuan Pengawetan dengan Variasi Masa Simpan terhadap Kadar Protein Daging Kambing**

Berdasarkan Tabel 7 ringkasan hasil uji Duncan 5% dan Gambar 3 terbukti bahwa ada pengaruh keempat variasi masa simpan yang diujikan dalam daging yang diawetkan terhadap perlakuan pengawetan dengan kadar protein ditunjukkan dengan adanya perlakuan pengawetan dengan notasi. Pada Tabel 7 dapat dilihat bahwa kadar protein tertinggi terdapat pada lama waktu penyimpanan selama 0 hari dengan 18,790 (notasi a), lalu diikuti 7 hari, dan 14 hari, 17,830, dan 15,990 (notasi b dan c), kemudian diikuti dengan lama waktu penyimpanan selama 21 hari terendah 14,490 (notasi d).

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa lama waktu penyimpanan selama 0 hari, 7 hari, dan 14 hari menghasilkan kadar protein lebih tinggi dibandingkan dengan lama waktu penyimpanan selama 21 hari. Pada lama waktu penyimpanan selama 21 hari ternyata menunjukkan kadar protein terendah. Semakin lama daging awetan disimpan maka kadar protein semakin menurun. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa semakin lama waktu penyimpanan maka daya awet dari pengawet daging dengan fermentasi ensiling daun selada dan fermentasi biji kepayang semakin berkurang karena tidak adanya penambahan bahan pengawet pada daging awetan. Kemampuan bahan pengawetan dalam tubuh daging awetan mengalami penurunan dan tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk sehingga jumlah bakteri pembusuk semakin meningkat. Protein semakin banyak terurai oleh bakteri pembusuk sehingga dapat menyebabkan perubahan aroma dan rasa daging awetan. Aroma daging menjadi asam tengik dan berbau ammonia, sedangkan rasa daging awetan menjadi asam tengik dan pahit sehingga tidak disukai oleh konsumen.

Hasil penelitian ini juga mengkarakterisasi dan mengidentifikasi enam isolat bakteri proteolitik indigen. Sebelum dilakukan identifikasi keenam isolat bakteri proteolitik indigen, maka terlebih dahulu dilakukan deskripsi ciri-ciri morfologi dan mikroskopisnya. Data hasil identifikasi spesies-spesies bakteri yang bersifat lipolitik dan proteolitik yang berasal dari daging kembang lelaki dan daging mujair hasil fermentasi meliputi deskripsi morfologi koloni, sitologi, dan fisiologi. Deskripsi ciri morfologi koloni bakteri meliputi bentuk koloni, warna koloni, tepi koloni, elevasi koloni, mengkilat atau suramnya koloni, diameter koloni,

tipe pertumbuhan pada medium miring dan kepekatan koloni. Adapun Data hasil deskripsi ciri morfologi koloni spesies-spesies bakteri yang berasal dari daging sapi dan daging kambing hasil fermentasi yang bersifat proteolitik disajikan pada tabel 8 sebagai berikut:

**Tabel 8. Data Deskripsi Hasil Pengamatan Morfologi Keenam Isolat Bakteri Proteolitik**

Ciri Morfologi	Jenis-Jenis Bakteri Dengan Kode					
	A	B	C	D	E	F
Warna Koloni	Putih kekuningan	Putih kekuningan bening	Kuning agak Putih bening	Kuning keruh	Kuning putih keruh	Putih
Bentuk Koloni	Tak beraturan dan menyebar	Bentuk L	Bundar	Bundar	Bentuk L	Bentuk L
Tepian Koloni	Berlekuk-lekuk	Siliat	Berlekuk-lekuk Tumbuh kedalam medium	Licin	Licin	Licin
Elevasi Koloni	Data Hasilr	Cembung		Timbul	Timbul	Cembung
Mengkilat/Suram	Mengkilat	Mengkilat	Suram	Mengkilat	Mengkilat	Suram
Kepekatan Koloni	Tidak pekat	Tidak pekat	Tidak pekat	Tidak pekat	Tidak pekat	Tidak pekat
Diameter koloni (mm)	1,5-2,05	1,35-1,55	2-3	0,9-1,2	1,05-1,1	1,6-1,75

Keterangan:

Koloni yang diamati adalah koloni yang ditumbuhkan pada medium NA pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 1 x 24 jam

Ciri-ciri mikroskopis meliputi ciri sitologi meliputi sifat Gram, bentuk sel, ukuran sel, kapsula, endospora, dan gerak. Adapun data hasil ciri mikroskopis spesies-spesies bakteri yang berasal dari daging sapi dan daging kambing hasil fermentasi yang bersifat proteolitik disajikan pada tabel 9 sebagai berikut:

**Tabel 9. Data Deskripsi Hasil Pengamatan Keenam Isolat Bakteri Proteolitik Berdasarkan pada Ciri Sitologi**

Karakterisasi Isolat		Jenis Isolat Bakteri Dengan Kode					
		A	B	C	D	E	F
Ukuran Sel (µm)	Diameter	0,8	1	0,75	1	1	0,8
	Panjang	1	1,5	1,5	2,5	3,5	1,5
Gerak		Tidak motil	Motil	Tidak motil	Motil	Motil	Tidak motil
Gram		Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif
Kapsula		Ada	Tidak ada	Ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
Spora		Ada	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada

Keterangan:

Gram (+) = positif; Gram (-) = negatif; kapsula (+) = memiliki kapsula; kapsula (-) = tidak memiliki kapsula; endospora (+) = mampu membentuk spora, endospora (-) = tidak mampu membentuk spora; gerak (+) = motil, gerak (-) = non motil

Adapun ciri-ciri fisiologi menggunakan alat Microbact™ GNB 12A/B/E, 24E, meliputi: tipe respirasi, uji reaksi lisin dekarboksilase, ornitin dekarboksilase, produksi H<sub>2</sub>S, fermentasi glukosa, manitol, xilosa, β-galaktosidase (ONPG), produksi indol, hidrolisis urease, reaksi Voges-Proskauer (VP), penggunaan sitrat, triptofan deaminase (TDA), pencairan gelatin, penghambatan malonat, fermentasi inositol, sorbitol, rhamnosa, sukrosa, laktosa, arabinosa, adonitol, rafinosa, salisin, dan dihidroksilase arginin. Adapun Data hasil ciri fisiologi spesies-spesies bakteri yang berasal dari daging sapi dan daging kambing hasil fermentasi yang bersifat proteolitik disajikan pada tabel 10 sebagai berikut:

**Tabel 10. Data Deskripsi Hasil Pengamatan Keenam Isolat Bakteri Proteolitik Berdasarkan pada Karakter Fisiologi**

Microbact™ GNB 12A/B/E, 24E	A	B	C	D	E	F
1 Oxidase	-	-	-	-	-	-
2 Motility	-	+	-	+	+	-
3 Nitrate	-	+	+	+	-	+
4 Lysine	-	+	-	-	-	+
5 Ornithine	-	-	-	-	-	-
6 H <sub>2</sub> S	-	+	-	-	-	+
7 Glucose	+	+	+	+	+	+
8 Mannitol	+	-	+	+	+	+
9 Xyclose	+	+	+	+	-	+
10 ONPG	-	+	+	-	-	+
11 Indole	-	+	-	-	-	-
12 Urease	-	+	-	-	-	+
13 V-P	-	-	-	+	-	-
14 Citrate	-	-	-	-	-	-
15 TDA	-	+	-	-	-	+
Nama Spesies	<i>Klebsiella rhinoscleromati s</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Klebsiella ozaenae</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Citrobacter freundii</i>

Keterangan:

Positif = Isolat bakteri bereaksi positif terhadap reagen

Negatif = Isolat bakteri bereaksi negatif terhadap reagen

Hasil identifikasi tiap-tiap spesies bakteri proteolitik menunjukkan bahwa terdapat enam spesies bakteri proteolitik kontaminan dalam tubuh daging awetan yang disimpan selama 21 hari, yaitu *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella ozaenae*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacter freundii*. Spesies-spesies bakteri proteolitik yang ditemukan dalam tubuh daging awetan merupakan bakteri kontaminan dalam daging yang mampu menghidrolisis protein menjadi asam amino dan amonia. Spesies *Klebsiella rhinoscleromatis* kemungkinan mempunyai enzim protease yang berperan sebagai biokatalisator dalam penguraian protein menjadi asam amino. *Proteus vulgaris* juga terbukti bersifat proteolitik. Holt (2000) menyatakan bahwa spesies *Proteus vulgaris* mempunyai enzim protease yang berperan sebagai biokatalisator dalam penguraian protein menjadi asam amino. Spesies *Proteus vulgaris* bersifat patogen pada usus manusia dan berbagai hewan, dan

juga dapat ditemukan hidup pada pupuk kandang dari kotoran hewan, tanah, dan air tercemar (Kenneth, 2009; Breed, 1957).

Melalui penelitian ini diketahui juga bahwa *Klebsiella ozaenae* memiliki sifat proteolitik. Berdasarkan Juven (1981), Nilius (1996), dan Aguskriono (2011), Spesies *Klebsiella ozaenae* mempunyai enzim protease. Indonesian center of Biodiversity and Biotechnology (2003), Qian (2009), Denter (1994) dan Rodarte (1994) mengemukakan bahwa spesies *Enterobacter agglomerans* juga bersifat proteolitik; spesies *Enterobacter agglomerans* juga mempunyai enzim protease. Hasil penelitian ini juga membuktikan bahwa *Bacillus subtilis* bersifat proteolitik. Fogarty (1983), dan (Norris, 1971) juga mengemukakan bahwa spesies *Bacillus subtilis* memiliki enzim protease yang dapat menguradaging protein menjadi asam amino. Juven (1981), Denter (1994), dan wallen (2007) mengemukakan bahwa *Citrobacter freundii* memiliki sifat proteolitik. Spesies *Citrobacter ferundii* mempunyai enzim protease.

Adanya spesies-spesies bakteri proteolitik dalam daging yang diawetkan dan disimpan membuktikan bahwa upaya pengawetan daging mempunyai batas waktu simpan. Apabila batas waktu simpan telah terlampaui maka daging tidak dapat dikonsumsi karena selain tidak layak dikonsumsi berdasarkan kualitas mikrobiologi dan kandungan gizi yang menurun, aroma dan rasa juga telah berubah. Di samping itu juga ada kemungkinan terkontaminasi oleh racun-racun yang dapat dihasilkan oleh bakteri pembusuk. Amonia yang dihasilkan oleh bakteri proteolitik selain menurunkan mutu daging juga dapat menyebabkan gangguan kesehatan. Spesies-spesies bakteri pembusuk yang bersifat proteolitik juga dapat bersifat patogen.

## **KESIMPULAN DAN SARAN**

Kesimpulan hasil penelitian dapat dikemukakan sebagai berikut: (1) terdapat enam isolat bakteri bersifat proteolitik yang berasal dari daging yang diawetkan; (2) kadar protein dalam daging awetan menurun selama waktu penyimpanan 0, 7, 14, dan 21 hari, (3) enam spesies-spesies bakteri proteolitik yang ditemukan dalam penelitian ini, ialah *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella ozaenae*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacter freundii*. Saran-saran hasil penelitian dapat dikemukakan sebagai berikut: (1) penelitian dapat dilanjutkan dengan menggunakan berbagai spesies daging lainnya yang biasa dikonsumsi oleh masyarakat, sehingga teknik pengawetan ini dapat diterapkan secara lebih luas dengan menggunakan berbagai spesies daging yang tersebar di perairan Indonesia yang biasa dikonsumsi masyarakat; (2) Penyimpanan daging yang diawetkan dengan metode perpaduan fermentasi ensiling daun selada dan biji kepayang sebaiknya tidak lebih dari 14 hari agar tetap layak untuk dikonsumsi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adawyah, R, 2006. Pengolahan dan Pengawetan Daging. Penerbit Bumi Aksara. Jakarta
- Aguskrisno. 2011. Pemanfaatan Bakteri rhizopus oryzae dalam Industri Tempe. <http://aguskrisnoblog.wordpress.com>
- Breed, R. S, Murry E. G. D dan Smith N. R. 1957. Bergey's Manual of Determinate Bacteriology Seventh Edition. Baltimore: The Wilkins Company
- Denter. 1994. Formation of B-vitamins by bacteria during the soaking process of soybeans for tempe fermentation. International Journal of Food Microbiology. Jerman
- Desroiser. 1988. Teknologi Pengawetan Pangan. Terjemahan Mchji Muljohardjo. UI Press. Jakarta
- Fogarty, W. M. 1983. Microbial Enzymes and Biotechnology. New York: Elsevier Science Publishing CO.INC
- Hardjanto. 1999. Pengaruh Nutrisi dan Lama fermentasi terhadap Produksi Biogum dari Enterobacter sp dan Erwina sp. Skripsi tidak diterbitkan. Fakultas Teknik pertanian. IPB. Bogor
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. Dan williams, S. T. 2000. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 10<sup>th</sup> edition. USA: Williams and wilkins company
- Indonesian Center for Biodiversity and Biotchnology. 2003. List of Culture. First Editoin. Bogor. Indonesia
- Juven. 1981. Changes in refrigerated Milk Caused by Enterobacteriaceae. International Journal of dairy Science. Vol 64. Issue 9
- Kaplan. 1976. Methods in Enzymology. Academic Press Inc. London
- Kenneth. 2009. Today University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology Bacillus Coagulans. (on line), (<http://www.textbookofbacteriology.net/>, diakses tanggal 7 Mei 2010).
- Muchtadi. 2010. Pengaruh Pengolahan terhadap Nilai Gizi Pangan. Alfabeta. Bandung
- Syamsir. 2008. Proses Pembusukan Daging. <http://id.shvoong.com/exact-science>
- Qian. 2009. Screening for Lipase-producing Enterobacter agglomerans for Biodiesel Catalyzation. African Journal of Biotechnology Vol. 8 (7), pp. 1273-1279. Available online at <http://www.academicjournals.org/AJB>. ISSN 1684-5315 © 2009 Academic Journals
- Rodarte. 2011. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases and lipases. International journal Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 62, n. 3, p. 597-635
- Wallen. 2007. Isolation of lipase producing *Citrobacter* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. J.Hazard Mater. 149: 720-724.