

Fermentasi Chao Ikan Tembang (*Sardinella gibbosa*) Menggunakan Bakteri Asam Laktat Proteolitik

Fermentation of Chao Using Proteolytic Lactic Acid Bacteria

Agussalim Matti^{1,2}, Tyas Utami², Chusnul Hidayat², Endang Sutriswati Rahayu^{2*}

¹Jurusan Teknologi Pengolahan Hasil Perikanan, Politeknik Pertanian Negeri Pangkep, Jl. Poros Makassar-Parepare Km. 83 Mandalle, Pangkajene dan Kepulauan, Sulawesi Selatan 90651, Indonesia

²Departemen Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora No. 1 Bulaksumur, Yogyakarta 55281, Indonesia

*Penulis korespondensi: Endang Sutriswati Rahayu; *Email*: endangsrahaya@ugm.ac.id

Tanggal submisi: 18 Mei 2020; Tanggal revisi: 26 Juli 2020; Tanggal penerimaan: 27 Juli 2020

ABSTRAK

Chao merupakan produk fermentasi tradisional dari daerah Sulawesi Selatan dengan bahan baku ikan tembang, garam dan nasi yang difermentasi dengan ragi tape dan ragi tempe. Penelitian ini menggunakan bakteri asam laktat (BAL) proteolitik *Lactobacillus plantarum* Ags1-3 dan *P. acidilactici* Ags7-3 sebagai co-starter untuk mempelajari peranannya dan potensinya sebagai penghasil ACE inhibitor selama fermentasi chao ikan tembang. Penelitian ini terdiri dari tiga tahap yaitu fermentasi garam (20%) (A-B), fermentasi BAL (C-D), dan fermentasi campuran BAL dengan nasi terfermentasi (E-F). Sebagai kontrol adalah chao yang difermentasi tanpa penambahan inokulum BAL. Selama fermentasi diamati kadar garam, aktivitas air, populasi mikroorganisme, produksi asam dan perubahan pH serta kadar protein terlarut dan aktivitas inhibitor *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada fermentasi garam (A-B) terjadi kenaikan kadar garam pada ikan tembang dari 10,75% menjadi 16,48% dan tidak terjadi pertumbuhan mikroorganisme pada tahap ini. Pada tahap fermentasi BAL (C-D), terjadi kenaikan jumlah bakteri dan total BAL lebih dari 2 siklus log, namun pada kontrol, jumlah bakteri dan total BAL lebih rendah. BAL proteolitik mendegradasi protein menjadi komponen yang lebih sederhana yang ditandai dengan kenaikan yang nyata pada kadar protein terlarutnya dan tidak terjadi penurunan pH. Isolat BAL proteolitik berpotensi menghasilkan inhibitor ACE yang ditandai dengan aktivitas ACE-I mencapai 84-85%, sedang pada kontrol, aktivitas penghambatan ACE pada ikan yang difermentasi hanya 58%. Pada fermentasi campuran (E-F) terjadi peningkatan produksi asam dan penurunan pH yang nyata karena tersedianya sumber karbon yang berasal dari nasi terfermentasi. Fermentasi chao tanpa penambahan inokulum juga terjadi penurunan pH, namun nilai pHnya lebih tinggi. Fermentasi chao dengan penambahan inokulum BAL proteolitik berpotensi menghasilkan aktivitas penghambatan ACE dan dapat memperpendek waktu fermentasi.

Kata kunci: Inhibitor *Angiotensin Converting Enzyme*; fermentasi ikan; chao; bakteri asam laktat proteolitik; protein terlarut

ABSTRACT

A traditionally fermented fish from the South Sulawesi region, also known as *chao*, was prepared from *tembang* fish, salt, and fermented rice. This study employed *Lactobacillus plantarum* Ags 1-3 and *Pediococcus acidilactici* Ags 7-3 proteolytic lactic acid bacteria (LAB) as a co-starter to determine the role and potentials of producing ACE inhibitors during the fermentation process. Also, the experiment was comprised of fermentation three stages, termed salt (20%) (A-B), LAB (C-D), and mixed by the addition of fermented cooked rice with or without starter culture (E-F). While, the control was fish fermentation without the use of starter culture. Salt content, water activity, microorganism population, acid production, pH, soluble protein, and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACE-I), were major factors monitored. The result showed during salt fermentation, the saline content in fish increased significantly from approximately 10.75% - 16.48%, with no microbial growth detected. Subsequent salt removal and starter culture inoculation enhanced the bacteria load and LAB by two log cycles, although, without the use of starter culture, the LAB quantity observed a decline. Furthermore, proteolytic lactic acid bacteria appeared to have successfully disintegrated protein into lesser molecular weight and peptides. This situation was indicated by an improvement in soluble protein, without any reduction of pH values. Proteolytic LAB tends to produce ACE inhibitor, with an activity value extending between 84-85%, while without the use of starter culture, the estimate was barely 58%. Consequently, an increase in acid production and decrease in pH occurred during mixed fermentation, as a result of readily available carbon source from the rice. However, pH of *chao*, without starter culture showed a higher value. Therefore, *chao* fermentation using proteolytic lactic acid bacteria produced ACE-I, with the tendency to reduce the reaction time.

Keywords: Angiotensin converting enzyme inhibitor; *chao*; fish fermentation; proteolytic lactic acid bacteria; soluble protein

PENDAHULUAN

Chao adalah produk makanan tradisional fermentasi ikan dari daerah Sulawesi Selatan. Seperti pada umumnya produk fermentasi ikan tradisional, bahan baku pembuatan *chao* adalah ikan, garam dan nasi sebagai sumber karbohidrat (Matti and Kumalasari, 2017). Produk serupa juga terdapat di Kalimantan Selatan yaitu ronto, menggunakan bahan baku udang yang difermentasi menggunakan garam dengan perbandingan 7:1, dan difermentasi selama 2 hari, selanjutnya ditambah dengan nasi dan fermentasi dilanjutkan sampai 18 hari (Khairina dkk., 2017). Di daerah Cina Selatan terdapat produk yang disebut suanyu yang dibuat dari ikan air tawar utuh atau potongan ikan yang dicampur nasi atau sereal lain, garam dan bumbu yang difermentasi secara spontan (Wang dkk., 2017). Di Jepang terdapat produk fermentasi ikan dengan garam dan nasi yang disebut *aji-no-susu* (Kuda dkk., 2009), sedang di Thailand terdapat produk fermentasi ikan yang dikenal dengan naman *plaa-som* (Saithong dkk., 2010).

Seperti umumnya fermentasi makanan tradisional, fermentasi ikan diproduksi turun temurun dan berlangsung secara spontan melibatkan mikroorganisme yang berasal dari bahan baku yang digunakan. Oleh karenanya konsistensi dan kualitas produk yang dihasilkan bervariasi tergantung jenis dan kualitas ikan, kadar garam, sumber karbohidrat dan bahan lain yang digunakan serta kondisi dan cara fermentasinya. Pada

fermentasi *plaa-som*, garam yang ditambahkan hanya 4% dan nasinya 15% b/b dengan waktu fermentasi 3-5 hari (Saithong dkk., 2010). Pada fermentasi fermentasi *aji-no-susu* garam yang ditambahkan bervariasi 18-33% dan fermentasi berlangsung selama 3 hari sampai dua bulan, Selanjutnya dilakukan penghilangan garam, penambahan asam asetat, ditambah nasi dan difermentasi selama 6 minggu sampai satu tahun (Saithong dkk., 2010). Terkait dengan penggunaan garam, fermentasi ikan dapat dibagi menjadi dua kelompok yaitu konsentrasi garam tinggi (lebih dari 20% dari berat total) dan kadar garam rendah (3-8%) (Zang dkk., 2020). Beberapa produk fermentasi ikan tidak mengalami proses pemanasan setelah fermentasi sehingga aktivitas mikroorganisme masih berlanjut bila produk tidak disimpan dingin, seperti pada produk ronto dari Kalimantan Selatan (Khairina dkk., 2016). Meskipun banyak produk fermentasi ikan tradisional, namun tidak ada fermentasi ikan tradisional yang dilakukan dengan menambahkan nasi yang sudah difermentasi menggunakan ragi tempe dan ragi tape selama 48 jam seperti pada fermentasi *chao*.

BAL telah ditemukan mendominasi mikroorganisme di banyak produk fermentasi ikan seperti pada bekasam (Afriani dkk., 2018; Desniar dkk., 2013), *plaa-som* (2019), dan *chao* ikan *tembang* (Matti and Kumalasari, 2017). Peranan utama BAL adalah menghasilkan asam, terutama asam laktat dan menurunkan pH yang merupakan faktor utama pengawetan produk

fermentasi ikan tradisional (Rhee dkk., 2011). Beberapa BAL yang diisolasi dari fermentasi ikan ini mempunyai aktivitas anti mikrobia terhadap beberapa bakteri patogen (Desniar dkk., 2013; Sanpa dkk., 2019).

Selama fermentasi ikan tradisional *suanyu* ditemukan adanya aktivitas proteolitik, yang menghasilkan peptida rantai pendek dan asam amino bebas yang berkontribusi pada rasa umami produk *suanyu* (Wang dkk., 2017). proteolitik berperan penting pada fermentasi ikan yaitu menghidrolisis protein menjadi komponen peptida yang lebih sederhana dan asam amino. Wikandari dkk. (2012a) melaporkan bahwa proteolitik *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, dan *Pediococcus pentosaceus* yang diisolasi dari bekasam dapat meningkatkan kandungan peptida dan aktivitas ACE inhibitor ketika digunakan sebagai isolat tunggal pada fermentasi *bekasam-like product*. Dalam penelitian ini, proteolitik *L. plantarum* Ags1-3 dan *P. acidilactici* Ags7-3 yang diisolasi dari fermentasi chao, digunakan sebagai co-starter pada fermentasi chao ikan tembang untuk mengetahui peranan dan potensinya sebagai penghasil ACE inhibitor.

METODA PENELITIAN

Bahan

Bahan utama pembuatan chao adalah ikan tembang (*Sardinilla gibbosa*) diperoleh dari nelayan di Kabupaten Pangkep, Sulawesi Selatan. Ikan tembang segar dikemas dalam *cool box* yang berisi es batu dan dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi, Pusat Studi Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Beras IR 64 dibeli dari pasar syawalan, ragi tempe (Raprima inokulum tempe), ragi tape (NKL) dan garam (Special Garam Krasak) diperoleh dari pasar tradisional di Yogyakarta. Isolat BAL yang digunakan adalah *L. plantarum* Ags1-3 dan *P. acidilactici* Ags7-3, strain lokal yang diisolasi dari chao ikan tembang (Matti dkk., 2019). NaCl, CaCO₃, HCl, NaOH, TCA, Bovine serum albumin (BSA), SDS dan methanol yang diperoleh dari Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Media yang digunakan untuk analisis mikrobiologis adalah *Plate Count Agar* (PCA), *De Man, Ragosa and Sharpe Broth* (MRSb), *Malt Extract Agar* (MEA) diperoleh dari Merck KgaA (Darmstadt, Jerman). Bahan yang digunakan untuk analisis aktivitas ACE inhibitor adalah Angiotensin Converting Enzyme (A6778-1UN,) dan substrat Hip-His-Leu (H1635-25MG) diperoleh dari Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Amerika Serikat).

Penyiapan Inokulum Bakteri Asam Laktat

Kultur stok BAL *L. plantarum* Ags1-3 dan *P. acidilactici* Ags7-3 masing-masing sebanyak 1% v/v

diinokulasikan ke dalam media 5 mL MRS cair dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Selanjutnya 1 mL kultur dipindahkan ke dalam 9 mL media MRS cair dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Kultur BAL umur 24 jam berisi 10⁸ cfu/mL siap digunakan sebagai inokulum.

Fermentasi Nasi

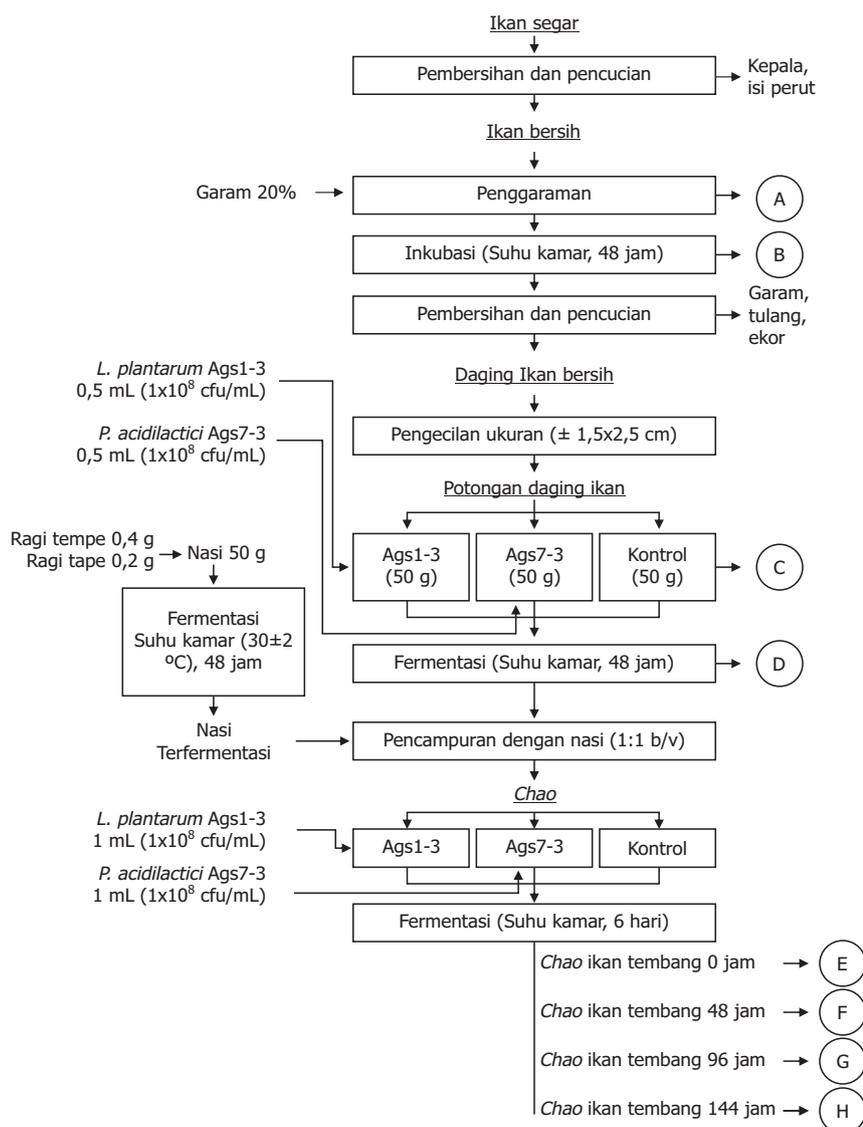
Nasi ditaburi ragi tape (NKL) 0,5% b/b dan ragi tempe (Raprima inokulum tempe) 1,0% b/b. Fermentasi dilakukan menggunakan wadah plastik *polipropilen* (PP) berbentuk kotak dan berukuran panjang 8 cm, lebar 8 cm, dan tinggi 7 cm. Wadah ditutup menggunakan penutup wadah plastik. Setelah wadah ditutup, nasi difermentasi pada suhu kamar (30±2 °C) selama 48 jam. Nasi terfermentasi siap dicampurkan ke dalam ikan tembang yang telah difermentasi garam selama 48 jam. Nasi terfermentasi dianalisis jumlah bakteri, yeast dan jamur. Pada nasi dan setelah fermentasi 48 jam dilakukan analisis pH, asam tertitrasi, total bakteri aerobik, BAL, yeast, dan jamur.

Pembuatan Chao

Proses pembuatan chao ikan tembang terdiri dari tiga tahap. Tahap pertama adalah fermentasi garam (A-B), proses penggaraman yaitu, ikan segar dibersihkan, dan dibuang kepala dan isi perutnya, selanjutnya dicuci dengan air mengalir, lalu ditiriskan. Ikan yang sudah bersih ditaburi dengan garam sebanyak 20% b/b. Penggaraman dilakukan dengan metode penggaraman kering menggunakan garam kristal pada wadah plastik PP. Wadah yang berbentuk kotak berukuran panjang 20 cm, lebar 15 cm, dan tinggi 9 cm. Wadah terlebih dahulu ditaburi garam secara merata, kemudian ikan disusun rapi selapis demi selapis. Setiap lapisan ikan ditaburi garam sampai lapisan ikan paling atas. Setelah pemberian garam, wadah ditutup menggunakan penutup wadah plastik. Setelah wadah ditutup, ikan diinkubasi pada suhu kamar (30±2 °C) selama 48 jam. Pengambilan sampel dilakukan saat ikan ditaburi garam (A) dan setelah fermentasi garam 48 jam (B). Tahap kedua adalah fermentasi BAL (C-D), proses fermentasi BAL yaitu, setelah fermentasi garam 48 jam, ikan dicuci untuk membersihkan sisa garam, dan dibuang tulang dan ekornya, ditiriskan dan dikecilkan ukurannya sehingga diperoleh daging ikan berukuran kecil (±1,5x2,5 cm). Daging ikan dibagi menjadi tiga bagian perlakuan pada wadah plastik PP berbentuk kubus dengan ukuran tinggi 8 cm dan diameter 10 cm. Daging pertama diinokulasi dengan kultur BAL *L. plantarum* Ags1-3 dan daging ikan kedua diinokulasi dengan *P. acidilactici* Ags7-3 masing-masing sebanyak 1% v/b atau 10⁸ CFU/g. Daging ketiga sebagai kontrol tidak dilakukan

inokulasi kultur BAL. Setelah inokulasi, wadah ditutup menggunakan penutup wadah. Selanjutnya semua ikan diinkubasi pada suhu kamar (30 ± 2 °C) selama 48 jam. Pengambilan sampel dilakukan pada ikan setelah diinokulasi dengan kultur BAL (C) dan setelah fermentasi 48 jam (D). Tahap ketiga adalah fermentasi campuran, prosesnya yaitu, semua perlakuan pada tahapan kedua ditambahkan dengan nasi terfermentasi (1:1 b/b) dan selanjutnya untuk perlakuan satu diinokulasi lagi dengan kultur BAL *L. plantarum* Ags1-3 dan perlakuan kedua diinokulasi dengan kedua *P. acidilactici* Ags7-3

masing-masing sebanyak 1% v/b, sedang untuk kontrol tidak diinokulasi dengan kultur BAL. Fermentasi chao dilakukan pada suhu kamar selama 6 hari (144 jam). Dilakukan pengambilan sampel setelah penambahan nasi terfermentasi dan penambahan kultur BAL (E), setelah fermentasi 48 jam (F), setelah fermentasi 96 jam (G), dan setelah fermentasi 144 jam (H). Diagram alir penelitian disajikan pada Gambar 1. Pada sampel A-H dilakukan analisis kadar garam, aktivitas air, pH, asam tertitrisi, total bakteri, BAL, yeast, jamur, protein terlarut, dan aktivitas ACE inhibitor.



Keterangan:

A= Ikan tembang setelah penambahan garam; B= setelah fermentasi garam 48 jam; C= setelah penambahan inokulum BAL atau tanpa inokulum; D= setelah inkubasi 48 jam suhu kamar; E= setelah penambahan nasi terfermentasi dan inokulum BAL atau tanpa inokulum, fermentasi 0 jam; F= fermentasi chao 48 jam; G= fermentasi chao 96 jam; dan H= fermentasi chao 144 jam.

Gambar 1. Diagram alir penelitian

Prosedur Analisis

Analisis kadar garam daging ikan dan chao dilakukan dengan menghaluskan 10 g sampel menggunakan mortar. Sebanyak 2 g sampel yang sudah dihaluskan ditambah air panas sambil diaduk untuk melarutkan garamnya. Larutan sampel diencerkan sampai volume 100 mL dalam labu takar, selanjutnya disaring menggunakan kertas saring. Sebanyak 10 mL filtrat ditambah indikator K_2CrO_4 5% sebanyak 2-3 tetes dan dititrasi menggunakan perak nitrat ($AgNO_3$) 0,1 N sampai warna berubah dari kuning menjadi merah bata. Kadar garam dihitung dengan Persamaan 1.

$$\text{Kadar garam} = \frac{V \times N \times 0.05855 \times fp}{m} \times 100\% \quad (1)$$

Dimana V adalah volume (mL), N adalah normalitas $AgSO_3$, fp adalah faktor pengenceran, dan m adalah berat sampel (mg).

Aktivitas air sampel diukur menggunakan aw meter (Pawkit) yang sudah dikalibrasi. Pengukuran pH dilakukan menggunakan pH meter (Eutech Instrumens) dan total asam menggunakan metoda titrasi (AOAC, 2000). Sampel sebanyak 20 g disuspensikan dengan 180 mL aquades dan dicampur menggunakan stomacher (Seward 400, England) selama 5 menit, selanjutnya ditera pHnya. pH meter dikalibrasi menggunakan buffer standar pH 4 dan pH 7. Analisis total asam dilakukan dengan cara titrasi sampel (10 mL suspensi) yang telah ditambah indikator phenolphthalein 1% dengan larutan NaOH 0,1 N sampai terjadi perubahan warna menjadi merah muda. Total asam tertitrasi dinyatakan sebagai persen asam laktat, dihitung dengan Persamaan 2.

$$\text{Total asam tertitrasi} = \frac{V \times N \times 9 \times fp}{v \text{ sampel}} \times 100\% \quad (2)$$

Dimana V adalah Volume NaOH yang digunakan (mL), N adalah normalitas NaOH, fp adalah faktor pengenceran, v sampel adalah volume sampel (mg).

Penghitungan jumlah total bakteri, BAL, total jamur dan yeast dilakukan dengan metoda *dilution* dan *plating*. Untuk penghitungan jumlah bakteri total dan BAL masing-masing digunakan media PCA, dan MRS agar dengan 0,5% (b/v) $CaCO_3$, dan inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C selama 48 jam. Sedang untuk enumerasi jamur dan yeast digunakan media MEA yang diberi chloramphenicol 100 ppm dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 48 jam.

Untuk analisis protein terlarut digunakan metoda Lowrey (AOAC, 2000). Kadar protein terlarut diukur

dengan peneraan absoransi pada panjang gelombang 600 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Vis 1280, Shimizu), dan dihitung menggunakan kurva standar bovine serum albumin. Analisis aktivitas ACE inhibitor berdasarkan metode (Cusman dan Cheung, 1971). Sebanyak 50 μ L ekstrak chao ditambahkan 50 μ L substrat (5 mM Hip-His-Leu di dalam 0,1M buffer sodium borat yang mengandung 0,3 M NaCl pada pH 8,3). Campuran diinkubasi pada suhu 37 °C selama 15 menit. Campuran ditambahkan 50 μ L larutan ACE dan direaksikan pada suhu 37 °C selama 45 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 250 μ L HCl 1 M. Asam hippurat yang dihasilkan selama reaksi diekstraksi dengan 1,5 mL etil asetat. Campuran dicentrifuge pada putaran 3500 rpm selama 15 menit. Sebanyak 0,2 mL lapisan atas dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan dievaporasi pada suhu 100 °C selama 30 menit. Asam hippurat yang dibebaskan dilarutkan dengan 3 mL aquadest. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 288 nm menggunakan spektrofotometer UV-vis. Aktivitas ACE inhibitor dihitung sebagai persentase penghambatan terhadap aktivitas ACE (Persamaan 3).

$$\text{Aktivitas ACE inhibitor} = \frac{A - B}{A - C} \times 100\% \quad (3)$$

Dimana A adalah absorbansi substrat dengan ACE, B adalah absorbansi substrat, ACE dan inhibitor, dan C adalah absorbansi substrat dengan H_2O .

Analisis data

Pada penelitian ini dilakukan tiga kali percobaan. Rancangan penelitiannya adalah rancangan acak kelompok (RAK) dengan 3 taraf percobaan yaitu dengan penambahan kultur BAL *L. plantarum* Ags 1-3, *P. acidilactici* Ags 7-3 dan kontrol tanpa penambahan inokulum. Data yang diperoleh dianalisis sidik ragam (ANOVA) pada $\alpha < 0,05$ untuk mengetahui pengaruh perlakuan. Perlakuan yang berpengaruh nyata ($\alpha < 0,05$), diuji lanjut dengan metoda beda nyata terkecil (BNT) Duncan menggunakan program SPSS.

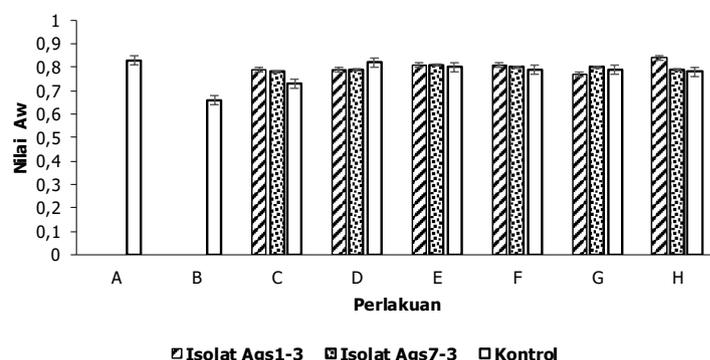
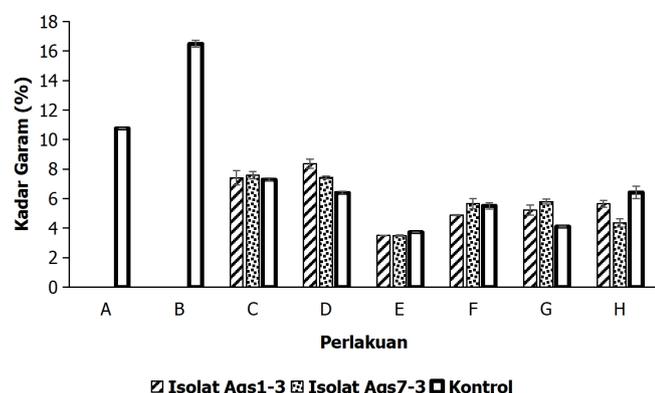
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini fermentasi chao ikan tembang dilakukan dalam tiga tahap fermentasi yaitu fermentasi garam, fermentasi BAL, dan fermentasi campuran. Pada masing masing tahap fermentasi diamati perubahan kadar garam, aktivitas air, populasi mikroorganismenya meliputi total bakteri, BAL, yeast dan jamur, penurunan pH dan produksi asam serta kadar protein terlarut dan aktivitas ACE-I.

Kadar Garam dan Aw pada Ikan dan Selama Fermentasi Chao

Pada tahap pertama ikan tembang yang telah dihilangkan kepala dan isi perut dan dicuci bersih ditaburi garam 20% dan diinkubasi selama 48 jam. Pada Gambar 2 terlihat bahwa setelah pemberian garam, kadar garam ikan tembang berada pada kisaran 10,75 ± 0,03 % (sampel A), dan setelah diinkubasi selama 48 jam terjadi peningkatan yang tajam pada kadar garam ikan tembang, yaitu mencapai 16,48 ± 0,19% (Gambar 2, sampel B). Selanjutnya pada fermentasi BAL (sampel C dan D) maupun fermentasi campuran (sampel E-H) kadar garamnya turun drastis pada kisaran 7% dan 6% karena pencucian dan penambahan nasi terfermentasi.

menyebabkan air bebas dalam daging ikan menurun yang ditandai dengan turunnya aw daging ikan dari 0,83 ± 0,02, menjadi 0,63 ± 0,01 (Gambar 2, sampel A dan B). Otot dan daging ikan mengalami mengkerutan, dan pengerasan, dan daging ikan menjadi agak keras, padat, kompak dan tidak kenyal (Matti and Kumalasari, 2017). Namun pada tahap fermentasi BAL karena adanya pencucian dan penghilangan garam terjadi penurunan kadar garam menjadi 7,41-7,58%. Pencucian menyebabkan kristal garam yang menempel di permukaan kulit ikan terbuang. Pencucian juga menyebabkan terjadinya penyerapan air ke dalam daging ikan sehingga mengencerkan konsentrasi kepekatan daging ikan dan NaCl terionisasi menjadi



Keterangan:

Fermentasi dilakukan 3 tahap: (i) penambahan garam: kondisi awal (A) dan setelah fermentasi garam 48 jam (B); (ii) pencucian ikan terfermentasi garam (C) yang dilanjutkan dengan penambahan inokulum BAL dan diinkubasi 48 jam suhu kamar (D); dan (iii) penambahan nasi terfermentasi dan inokulum BAL pada tahap 2 kemudian diinkubasi selama 0 jam (E); 48 jam (F), 96 jam (G); dan 144 jam (H).

Gambar 2. Kadar garam (1) dan aktivitas air (2) pada pembuatan chao ikan tembang

Garam diketahui mempunyai pengaruh yang besar terhadap mikroflora pada ikan. Konsentrasi garam tinggi menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk, sebaliknya menyokong pertumbuhan mikroorganismse halofilik atau halotoleran, dan garam juga menyokong flavor pada ikan yang difermentasi (Zang dkk., 2020).

Penggaraman ikan dalam proses pengolahan chao bertujuan untuk menekan pertumbuhan bakteri pembusuk dan patogen pada daging ikan. Penambahan garam tinggi (20%) untuk mempercepat proses penetrasi garam ke dalam daging ikan sehingga bakteri pembusuk dan patogen tidak bisa tumbuh selama proses pengolahan. Selama fermentasi garam terjadi penetrasi garam ke dalam daging ikan sehingga kadar garam dalam daging ikan meningkat. Difusi larutan garam ke dalam daging ikan menyebabkan keluarnya cairan/molekul air dari dalam daging ikan. Hal ini

molekul-molekul penyusunnya. Oleh sebab itu, proses pencucian dapat menurunkan kadar garam dari 16% menjadi 7%. Namun, pencucian tidak menyebabkan kadar garam ikan berada di bawah batas toleransi pertumbuhan bakteri pembusuk dan patogen. Kadar garam cenderung menurun pada tahapan fermentasi campuran berakhir (E-H) sampai kurang dari 6%. Sejalan dengan hal ini terjadi kenaikan Aw pada kisaran 0,73-0,79% pada fermentasi BAL dan selanjutnya relatif konstant sampai akhir fermentasi campuran yaitu pada kisaran aw 0,80-0,84%. Produk sejenis dari Jepang, *aji-no-susu* mengandung garam 6,0-7,0% dan aktivitas air 0,88-0,90% (Kuda dkk., 2009), sedang produk rusip dengan kadar garam 14,76% mempunyai nilai aktivitas air pada kisaran 0,856 - 0,877 (Khairi dkk., 2014). Nilai Aw produk akhir fermentasi chao sudah aman karena berada di bawah Aw 0,9 sebagaimana

produk fermentasi ikan sejenis. Nilai aktivitas air penting dalam menentukan kualitas dan keamanan pangan karena dapat mempengaruhi umur simpan makanan. Aktivitas air juga dapat digunakan untuk memperkirakan mikroorganisme yang dapat tumbuh pada produk tersebut. Aktivitas air chao ikan tembang lebih rendah dari 0,85%, hal ini akan menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk dan produksi toksin oleh bakteri patogen. Penambahan garam menyebabkan tekanan osmosis produk meningkat. Peristiwa osmosis menyebabkan air bebas dalam daging ikan tertarik keluar sehingga menurunkan A_w produk chao.

Perubahan Populasi Mikroorganisme pada Ikan dan Fermentasi Chao

Penambahan garam menyebabkan tekanan osmosis meningkat. Peristiwa osmosis menyebabkan air bebas dalam daging ikan tertarik keluar sehingga menurunkan A_w . Penurunan A_w menyebabkan air bebas untuk kebutuhan mikroba tidak tersedia pada daging ikan. Selain menurunkan A_w , garam juga menarik air dalam sel mikroba sehingga terjadi plasmolisis sel. Desniar dkk., (2009) melaporkan bahwa semakin tinggi jumlah garam yang ditambahkan, semakin efektif sebagai bakteriosin terhadap bakteri pembusuk dan patogen sehingga menjaga mutu dan keamanan produk fermentasi. BAL merupakan bakteri yang berperan pada berbagai fermentasi ikan tradisional yang berlangsung secara spontan. BAL telah diisolasi dari berbagai produk fermentasi ikan seperti inasua (Mahulette dkk., 2016), fermentasi ikan tradisional dari Korea, Jepang, Filipina dan Thailand (Rhee dkk., 2011). Beberapa BAL pada fermentasi ikan secara spontan tersebut mempunyai aktivitas antimikrobia terhadap bakteri patogen (Desniar dkk., 2013; Sanpa dkk., 2019) sehingga berkontribusi terhadap keawetan dan keamanan produk fermentasi ikan tradisional.

Pada tahap penggaraman ini Gambar 3 (A-B), saat ikan segar ditaburi dengan garam 20%, terkandung 10^3 CFU/g BAL dan 10^4 CFU/g total bakteri yang kemungkinan berasal dari bahan baku ikan, sedang yeast dan jamur kurang dari 10^1 CFU/g. Setelah diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang terjadi penurunan BAL dan total bakteri masing-masing 1 siklus log menjadi 10^2 CFU/g dan 10^3 CFU/g (B). Hal ini kemungkinan berhubungan dengan kadar garam yang meningkat dan aktivitas air yang menurun pada ikan selama fermentasi garam. Pada fermentasi spontan, garam bersifat selektif terhadap pertumbuhan mikroorganisme. Pertumbuhan bakteri juga ditemukan semakin terhambat dengan semakin tingginya kadar garam pada fermentasi peda dan rusip secara spontan (Kusmarwati dkk., 2011; Rinto, 2010). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tidak terjadi

pertumbuhan mikroorganisme selama fermentasi garam 48 jam (A-B). Yeast juga tidak dapat tumbuh selama fermentasi ikan dengan garam *sukuti* dari Nepal (Thapa dkk., 2006).

Pada tahapan fermentasi BAL Gambar 3 (C-D), garam yang menempel di bagian kulit ikan dihilangkan, ikan dicuci, dipotong, dan diinokulasi dengan kultur starter BAL proteolitik sehingga terjadi kenaikan total BAL dan total bakteri berkisar 10^6 dan 10^7 CFU/g (C) dari sebelumnya 10^2 CFU/g dan 10^3 CFU/g (B). Setelah difermentasi selama 48 jam pada suhu kamar meningkat menjadi masing-masing 10^8 dan 10^9 CFU/g (D). Peningkatan total BAL dan total bakteri pada produk yang tidak diinokulasi dengan BAL juga meningkat, namun lebih rendah. Peningkatan ini berasal dari ikan setelah fermentasi garam dan pencucian. Hal ini menandakan bahwa pada fermentasi chao secara tradisional terdapat bakteri dan BAL proteolitik yang tahan garam. Pada kondisi ini (C-D) kadar garam ikan berkisar 7,4-7,6%, BAL maupun bakteri halofilik atau halotolerant lainnya yang ada pada ikan dapat tumbuh baik. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan (Saithong dkk., 2010), dimana penambahan inokulum BAL yang diisolasi dari plaa-som dapat meningkatkan pertumbuhan BAL. Pada tahap fermentasi ikan dengan BAL proteolitik ini, mikroorganisme menggunakan sumber nutrisi yang ada pada ikan. Ikan merupakan sumber protein, sehingga kultur BAL proteolitik maupun bakteri indigenous ikan tembang menggunakan protein sebagai sumber energi untuk pertumbuhan dan aktivitas metabolismenya. BAL proteolitik menghidrolisis protein ikan menjadi protein yang lebih sederhana, peptida dan asam amino bebas yang dapat digunakan sebagai sumber C dan N yang diperlukan untuk pertumbuhan dan aktivitas metabolismenya. Ikan juga mengandung komponen mineral yang diperlukan.

Pada tahapan fermentasi BAL ini (C-D), kondisi kadar garam 7,4-7,6% masih merupakan kondisi yang cocok bagi BAL dan bakteri halofilik atau halotolerant sehingga terjadi peningkatan Total BAL. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Saithong dkk., (2010) melaporkan bahwa penambahan inokulum BAL yang diisolasi dari plaa-som dapat meningkatkan total BAL produk akhir. Pada tahap fermentasi oleh BAL ini (D), mikroorganisme menggunakan sumber nutrisi yang ada pada ikan. Ikan merupakan sumber protein, sehingga kultur BAL proteolitik maupun bakteri indigenous pada ikan tembang menggunakan protein sebagai sumber energi untuk pertumbuhan dan aktivitas metabolismenya. Kultur starter BAL proteolitik yang digunakan pada penelitian ini diisolasi dari fermentasi tradisional chao secara tradisional (Matti dkk., 2019). Peneliti lain juga melaporkan adanya BAL proteolitik

pada fermentasi ikan secara spontan (Siddegowda dkk., 2017; Wikandari dkk., 2012). Dengan demikian inokulasi BAL *L. plantarum* Ags1-3 dan *P. acidilactici* Ags7-3 dapat meningkatkan total bakteri dan BAL serta yeast, tetapi tidak menyebabkan jamur tumbuh. Jamur tidak terdeteksi setelah fermentasi BAL 48 jam karena jamur tidak dapat bersaing memperebutkan nutrisi dengan bakteri yang mendominasi pada fermentasi 48 jam setelah ditambahkan BAL.

Pada tahapan fermentasi campuran Gambar 3 (E-H), daging ikan ditambahkan nasi terfermentasi, dengan perbandingan 1:1 (b/b) dan kultur starter *L. plantarum* Ags1-3 dan *P. acidilactici* Ags7-3. Untuk kontrol hanya ditambahkan nasi terfermentasi. Terjadi kenaikan kenaikan jumlah yeast sekitar dua siklus log, bahkan populasi jamur mencapai 10^5 CFU/g. Berbeda dengan fermentasi ikan tradisional lainnya yang ditambahkan nasi, pada fermentasi chao ini digunakan nasi yang telah difermentasi dengan ragi tape dan ragi tempe salam 48 jam. Selama fermentasi nasi, populasi yeast dan jamur yang pada awalnya sangat rendah dibawah batas pengujian meningkat menjadi 10^5 CFU/g setelah fermentasi 48 jam (Tabel 1). Mikroorganisme pada ragi tape dan tempe merombak makro molekul pada nasi, terutama karbohidrat menjadi gula sederhana yang siap digunakan oleh mikroorganisme pada fermentasi chao. Penambahan nasi yang telah difermentasi dengan ragi tempe dan ragi tape berfungsi sebagai sumber glukosa bagi mikroorganisme terutama BAL yang akan digunakan untuk nutrisi dan energinya serta menghasilkan asam laktat dan menurunkan pH. Terjadi peningkatan yang nyata pada populasi bakteri, BAL, dan yeast, sedangkan jamur cenderung stabil pada 48 jam fermentasi (F). Chao yang difermentasi dengan penambahan kultur starter memberikan aroma asam yang lebih kuat dibandingkan tanpa control. Hal ini mengindikasikan terjadinya degradasi gula menjadi asam laktat oleh BAL. Pada fermentasi lebih lanjut cenderung terjadi penurunan populasi mikroorganisme kecuali pada yeast (Gambar 2, sampel E-H). Hasil penelitian Saithong dkk., (2010) menunjukkan kecenderungan yang serupa yaitu terjadi kenaikan populasi BAL pada 24 jam fermentasi plaa-som dan selanjutnya menurun. Hal ini kemungkinan terkait dengan pH yang semakin rendah karena terbentuknya asam yang semakin besar.

Populasi yeast mengalami peningkatan saat ikan ditambahkan dengan nasi terfermentasi (E), walaupun peningkatannya tidak drastis, tetapi terus meningkat sampai proses fermentasi chao berakhir (F-H). Yeast dapat menggunakan glukosa dari nasi sebagai nutrisi sehingga mengalami peningkatan, hal ini ditandai oleh adanya dorongan udara saat tutup wadah dibuka yang menunjukkan adanya produksi karbondioksida yang

diduga dihasilkan oleh yeast. Diduga yeast juga akan menghasilkan alkohol jika fermentasi terus berlanjut.

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa inokulasi BAL proteolitik pada produk chao ikan tembang tidak berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap total bakteri, total BAL, total jamur, dan total yeast. Artinya total bakteri antara produk yang diinokulasi isolat dengan *L. plantarum* Ags1-3 dan *P. acidilactici* Ags7-3 tidak berbeda dengan produk yang tidak diinokulasi BAL.

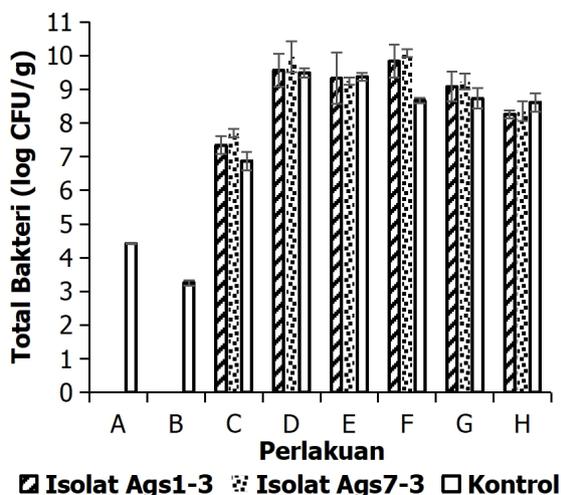
Tabel 1. Fermentasi nasi menggunakan ragi tempe dan ragi tape

	Nasi	Nasi ditambah ragi tempe dan ragi tape (48 jam suhu kamar)
pH	6,51 ± 0,01	5,43 ± 0,02
Asam tertitiasi (%)	0,08 ± 0,01	1,15 ± 0,01
Total bakteri (log CFU/g)	2,86 ± 0,13	5,20 ± 0,05
BAL (logCFU/g)	1,53 ± 0,05	4,40 ± 0,07
Yeast (log CFU/g)	< 300	5,24 ± 0,05
Jamur (log CFU/g)	< 200	5,15 ± 0,03

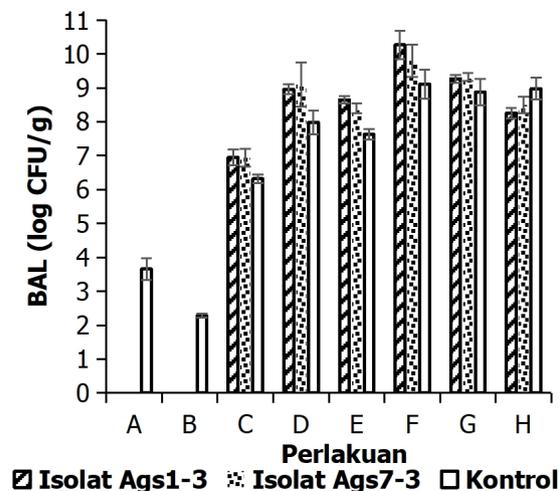
pH dan Produksi Asam

Perubahan pH dan produksi asam selama fermentasi chao dengan atau tanpa penambahan kultur starter BAL proteolitik disajikan pada Gambar 4. Pada fermentasi garam 48 jam terjadi sedikit sekali produksi asam (sampel A-B), maupun pada fermentasi BAL (C-D). Produksi asam meningkat tajam setelah fermentasi campuran selama 48 jam yaitu setelah ditambahkan nasi terfermentasi, dengan atau tanpa penambahan kultur starter. Fermentasi campuran lebih lanjut sampai dengan 144 jam masih terjadi kenaikan asam tertitiasi namun tidak terlalu tinggi. Produksi asam menyebabkan penurunan pH, tampak bahwa pH selama fermentasi chao sejalan dengan produksi asamnya. pH sampel cenderung tetap selama fermentasi garam, terjadi sedikit peningkatan pH pada fermentasi bakteri asam laktat, dan pH turun drastis sampai dibawah 4,6 setelah fermentasi campuran 48 jam.

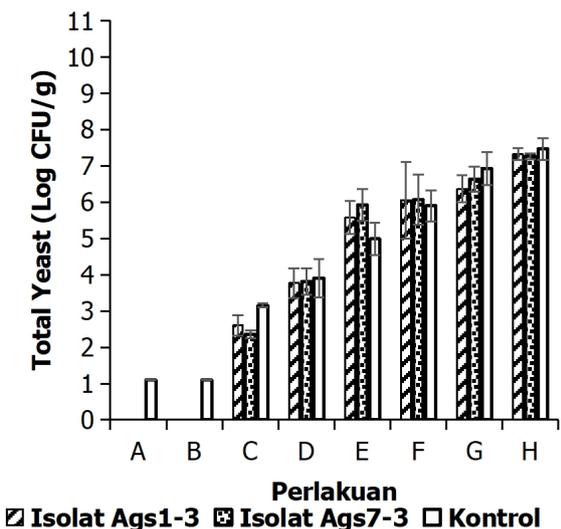
1.



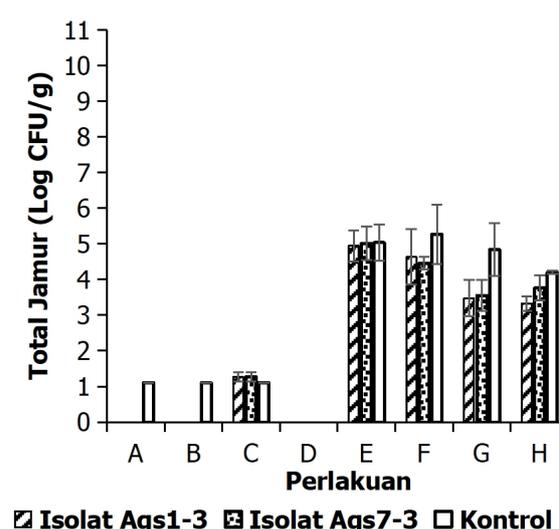
2.



3.



4.



Keterangan:

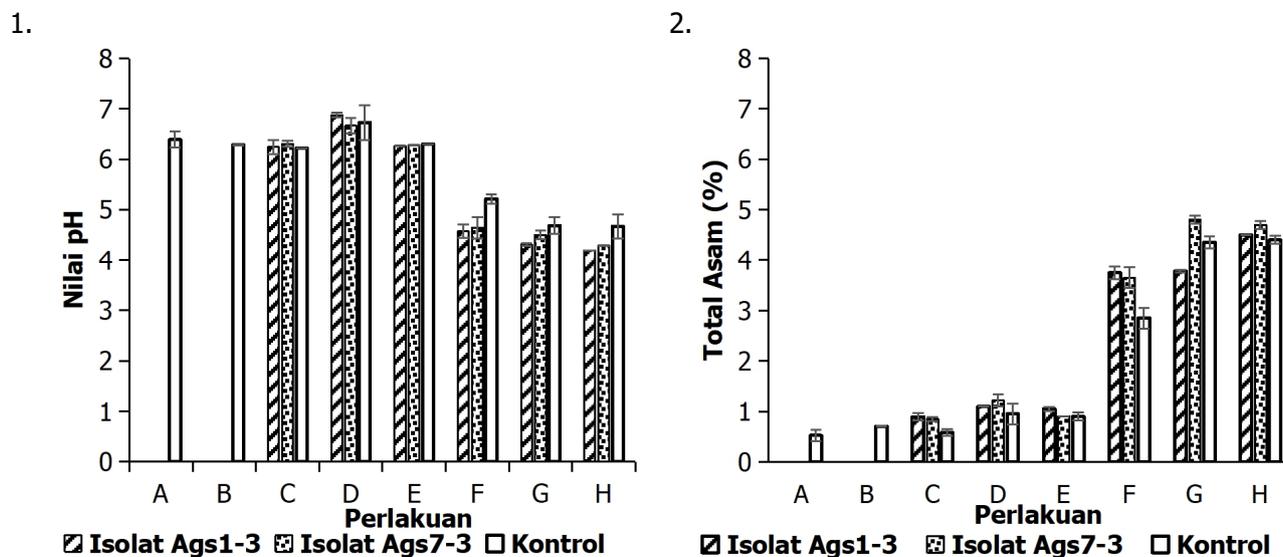
Fermentasi chao ikan tembang dilakukan 3 tahap: (i) penambahan garam: kondisi awal (A) dan setelah fermentasi garam 48 jam (B); (ii) pencucian ikan terfermentasi garam (C) yang dilanjutkan dengan penambahan inokulum BAL dan diinkubasi 48 jam suhu kamar (D); dan (iii) penambahan nasi terfermentasi dan inokulum BAL pada tahap 2 kemudian diinkubasi selama 0 jam (E); 48 jam (F), 96 jam (G); dan 144 jam (H).

Gambar 3. Populasi total bakteri (1), BAL (2), yeast (3), dan jamur (4) mikroorganisme ikan dan selama proses pembuatan chao ikan tembang

BAL merupakan bakteri yang dominan pada fermentasi ikan dan terutama berperan dalam memfermentasi karbohidrat yang tersedia menghasilkan asam organik, sehingga pHnya turun. Oleh karenanya pada fermentasi ikan dengan penambahan garam dan sumber karbon seperti nasi, atau biji-bijian lain, maupun gula aren pada fermentasi ronto, suanyu dan plaa-som segera terjadi kenaikan asam asam tertitrasi akibat dari fermentasi karbohidrat atau gula oleh BAL yang menyebabkan terjadinya penurunan pH (Kusmarwati

dkk., 2011; Sanpa dkk., 2019; Wang dkk., 2017). Namun pada penelitian ini pH relatif tetap selama fermentasi garam karena kadar garam yang tinggi (16,48%) menghambat pertumbuhan mikroorganisme termasuk BAL, sehingga tidak terjadi aktivitas metabolisme (A-B).

Pada tahap (C-D) nilai pH cenderung mengalami sedikit peningkatan karena pada tahap ini ditambahkan kultur starter BAL tanpa ada penambahan sumber karbon. Oleh karena terjadi degradasi protein oleh kultur stater maupun BAL *indigenous* menghasilkan komponen yang



Keterangan:

Fermentasi dilakukan 3 tahap: (i) penambahan garam: kondisi awal (A) dan setelah fermentasi garam 48 jam (B); (ii) pencucian ikan terfermentasi garam (C) yang dilanjutkan dengan penambahan inokulum BAL dan diinkubasi 48 jam suhu kamar (D); dan (iii) penambahan nasi terfermentasi dan inokulum BAL pada tahap 2 kemudian diinkubasi selama 0 jam (E); 48 jam (F), 96 jam (G); dan 144 jam (H).

Gambar 4. pH (1) dan produksi asam (2) pada pembuatan chao ikan tembang

lebih sederhana sehingga pH cenderung sedikit naik. Inokulum yang ditambahkan pada tahap fermentasi ikan (C-D) hanya menggunakan protein ikan sebagai nutrisi sehingga metabolit yang dihasilkan hanya merupakan peptida dan asam amino tanpa adanya sumber glukosa yang bisa dimetabolisme menjadi asam laktat. Pada kondisi kadar garam sekitar 7% dan aw relatif rendah ($< 0,80$) ini memberikan efek perlindungan terhadap pertumbuhan bakteri pembusuk maupun patogen. Kondisi ini tidak berlangsung lama karena dengan penambahan nasi terfermentasi dengan atau tanpa kultur starter (E), terjadi degradasi karbohidrat dan gula-gula yang ada pada nasi terfermentasi sehingga dalam fermentasi 48 jam (F) terjadi kenaikan produksi asam yang nyata dan penurunan pH sampai dibawah 4,6 pada fermentasi dengan penambahan kultur starter BAL. Fermentasi chao tanpa penambahan kultur starter menghasilkan penurunan pH sampai 4,6-4,7 setelah fermentasi 144 jam. Pada tahap fermentasi campuran/ chao (E-H) inokulum dapat menggunakan karbohidrat dan protein sebagai nutrisi sehingga metabolit yang dihasilkan selain peptida dan asam amino, juga menghasilkan asam laktat yang diiringi dengan penurunan pH. Nilai pH produk fermentasi ikan dapat digunakan sebagai indikator keberhasilan proses fermentasi. Lambatnya penurunan pH memungkinkan bakteri pembusuk dan patogen tumbuh and menyebabkan kerusakan produk. Nilai pH beberapa produk fermentasi ikan sejenis chao yang telah dilaporkan, antara lain *aji-no-susu* dari

Jepang yang difermentasi menggunakan ikan makrel dan nasi berkisar antara pH 4,15-4,32 (Kuda dkk., 2009), *Suan-yu* dari China yang diolah dari campuran ikan mas dan nasi memiliki nilai pH 4,53 (Wang dkk., 2017). Nilai pH tersebut tidak jauh berbeda dengan nilai pH akhir produk chao, baik yang diinokulasi dengan BAL maupun yang berkisar antara $\pm 4,6$ -4,7 dan 4,69. Begitu juga dengan kadar asam tertitrasi tidak ditarget. Kadar asam tertitrasi akhir produk chao yang diinokulasi BAL, yaitu 3,75% dan 3,65%. Nilai tersebut lebih rendah dibandingkan dengan kadar asam laktat *rusip* ikan teri yang difermentasi dengan *Streptococcus sp*, *Lactococcus sp*, dan *Leuconostoc sp*, yaitu sekitar 5,04% (Koesoemawardani dkk., 2013). Namun, nilai total asam tertitrasi produk chao lebih tinggi dibandingkan produk fermentasi *pa-som* 1,3-1,4 % (Marui dkk., 2014).

Penambahan *L. plantarum* Ags-13 dan *P. acidilactici* Ags7-3 dapat mempercepat penurunan pH sehingga dapat mempersingkat waktu fermentasi chao ikan tembang. Penambahan BAL proteolitik dapat memperpendek waktu fermentasi didukung oleh data pH dan produksi asam laktat. Pada data tersebut terlihat bahwa produksi asam laktat dan penurunan pH optimal pada fermentasi 48 jam (F) dan sudah stabil pada fermentasi 96 dan 144 jam (G dan H). Sedangkan produksi asam laktat dan penurunan pH pada produk yang tidak ditambahkan BAL baru optimum fermentasi 96 jam dan stabil pada fermentasi 144 jam. Nilai pH dan asam laktat merupakan indikator utama

keberhasilan suatu fermentasi. Penurunan pH yang lambat memungkinkan bakteri pembusuk dan patogen dapat tumbuh dan merusak produk. Hasil penelitian Saithong dkk., (2010) menunjukkan penggunaan kultur campuran *L. plantarum* IFRPD P15 dan *L. reuteri* IFRPD P17 pada fermentasi *plaa-som* memungkinkan waktu fermentasi yang lebih pendek.

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa inokulasi BAL tidak berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap nilai pH dan total asam laktat produk chao ikan tembang. Artinya nilai pH dan total asam laktat tertitrisasi antara produk yang diinokulasi isolat *L. plantarum* Ags1-3 dan *P. acidilactici* Ags7-3 tidak berbeda dengan produk yang tidak diinokulasi BAL.

Protein Terlarut dan Aktivitas ACE-I

Pada Gambar 5 (sampel C-D) terlihat bahwa kenaikan kadar protein terlarut tertinggi terjadi pada fermentasi BAL menggunakan kultur starter *L. plantarum* Ags-13 dan *P. acidilactici* Ags7-3. Pada tahap ini BAL proteolitik tersebut mendegradasi protein ikan menjadi peptida peptide sederhana dan asam amino bebas untuk mendapatkan nutrisi dan sumber energinya. BAL memerlukan sumber asam amino eksogenus atau peptida yang disediakan melalui hidrolisis protein oleh enzim proteolitik (Savijoki dkk., 2006). Pada fermentasi chao tanpa penambahan kultur starter juga terjadi kenaikan kadar protein terlarut meskipun tidak setinggi fermentasi dengan kultur starter. Hal ini menunjukkan mikroorganisme indigenous pada ikan juga berperan pada degradasi protein. Peningkatan kadar protein terlarut sejalan dengan aktivitas penghambatan ACE. Diduga hasil hidrolisis protein ikan menjadi komponen yang lebih sederhana dan larut ini menghasilkan komponen peptida yang mempunyai aktivitas ACE. Aktivitas penghambatan ACE pada chao dengan penambahan kultur BAL adalah 83-85%, sedang pada fermentasi chao secara spontan tanpa penambahan inokulum, aktivitas penghambatan ACE yang dihasilkan 58,02%.

Protein terlarut pada perlakuan penambahan inokulum lebih tinggi dari pada tanpa inokulum, tetapi aktivitas ACE inhibitorynya ketiganya sama setelah akhir (H). Aktivitas ACE inhibitor produk inokulasi mulai menurun pada fermentasi 96-144 jam (G-H) yang diduga disebabkan oleh tidak adanya lagi produksi peptida yang didukung oleh berkurangnya total BAL dan jamur pada waktu fermentasi tersebut. Selain itu, juga diduga disebabkan adanya hidrolisis peptida lebih lanjut sehingga aktivitas biologisnya berkurang, sedangkan aktivitas ACE inhibitor produk kontrol masih berlanjut sampai akhir fermentasi yang diproduksi oleh mikroorganisme indigenous. Oleh karena itu, aktivitas

ACE inhibitor produk inokulasi dan kontrol memiliki nilai sama di akhir fermentasi. Untuk mempertahankan aktivitas ACE inhibitor pada produk inokulasi, maka proses fermentasi sebaiknya dihentikan pada fermentasi 48 jam.

Pada tahap penggaraman, protein terlarut ikan mengalami peningkatan sekitar 50% setelah inkubasi 48 jam (A-B), yang menunjukkan bahwa inkubasi garam dapat meningkatkan kadar protein ikan. Protein terlarut mengalami penurunan drastis setelah dicuci, dibersihkan, dikecilkan ukurannya, dan ditambahkan BAL proteolitik (C). Pada tahap fermentasi BAL proteolitik (C-D), protein terlarut kembali mengalami peningkatan yang tajam setelah difermentasi 48 jam (6,89-9,64 menjadi 25,15-28,12%). Hal ini menunjukkan bahwa terjadi hidrolisis protein menjadi peptida dan asam amino yang larut, baik dari BAL proteolitik yang diinokulasikan maupun *indigenous* ikan. Pada tahap fermentasi chao (E-F), protein terlarut juga mengalami peningkatan setelah difermentasi 48 jam, yang diduga dihasilkan oleh hidrolisis bersama-sama BAL proteolitik yang diinokulasikan, indigenous, jamur, dan lingkungan fermentasi. Sejalan dengan perubahan protein terlarut tersebut, aktivitas ACE inhibitor juga mengalami perubahan yang sama, yaitu meningkat tajam saat ikan diinkubasi dengan garam selama 48 jam (B), difermentasi dengan BAL proteolitik selama 48 jam (D), dan fermentasi campuran (F).

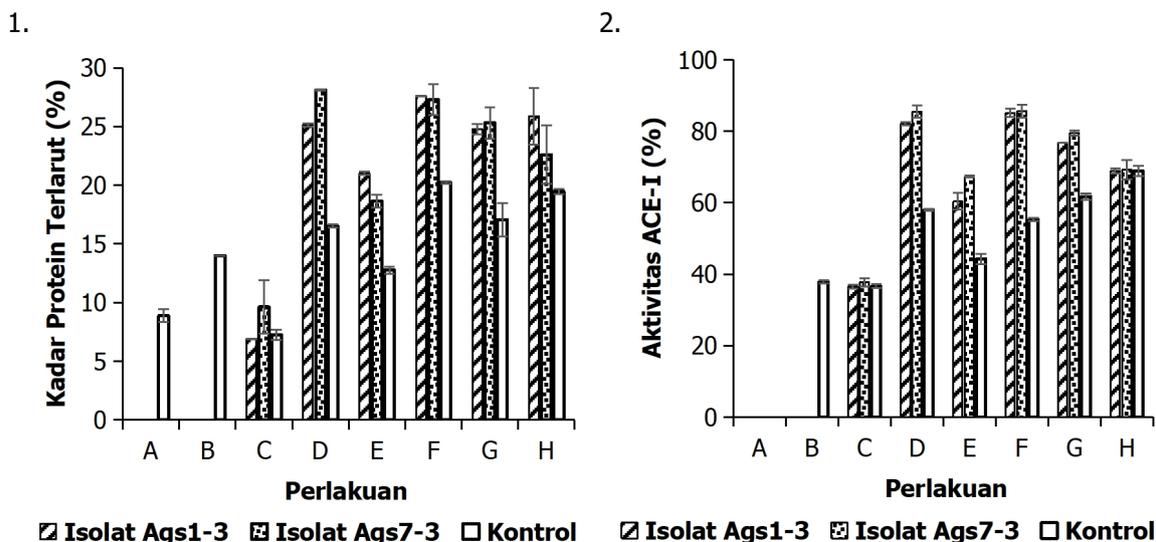
Tahapan fermentasi ikan merupakan tahapan yang memberikan persentasi protein terlarut tertinggi pada kedua produk inokulasi, yaitu masing-masing 25,15% dan 28,12% untuk inokulum *L. plantarum* Ags1-3 dan *Pediococcus acidilactici* Ags7-3. Sedangkan persentasi protein terlarut pada kedua produk inokulasi pada tahapan fermentasi chao (campuran), yaitu masing-masing 27,61% dan 21,23% untuk inokulum *L. plantarum* Ags1-3 dan *P. acidilactici* Ags7-3. Walaupun persentasi protein terlarut pada kedua tahapan tersebut tidak jauh berbeda, tetapi pada tahapan fermentasi ikan, yang berperan menghidrolisis protein hanya BAL proteolitik yang ditambahkan dan *indigenous* ikan. Sedangkan pada tahapan fermentasi chao, yang berperan menghidrolisis, selain BAL proteolitik yang ditambahkan dan *indigenous*, juga terdapat peran jamur proteolitik yang berasal dari ragi yang digunakan saat fermentasi nasi. Hal yang sama juga terjadi pada aktivitas ACE inhibitor, *L. plantarum* Ags1-3 dan *P. acidilactici* Ags7-3 menghasilkan aktivitas ACE inhibitor tertinggi pada tahapan fermentasi ikan.

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa inokulasi BAL proteolitik berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap protein terlarut dan aktivitas ACE inhibitor chao ikan tembang. Artinya aktivitas ACE inhibitor antara

produk yang diinokulasi isolat *L. plantarum* Ags1-3 dan *P. acidilactici* Ags7-3 tidak sama dengan aktivitas protein terlarut dan ACE inhibitor produk yang tidak diinokulasi BAL. Hasil uji lanjut menunjukkan bahwa protein terlarut dan aktivitas ACE inhibitor yang dihasilkan oleh produk

indigenus pada fermentasi bakasang juga berpotensi menghasilkan inhibitor ACE.

Terbentuknya peptida penghambat ACE dipengaruhi oleh susunan residu asam amino pada protein ikan dan aktivitas proteolitik mikroorganisme pada



Keterangan:

Fermentasi dilakukan 3 tahap: (i) penambahan garam: kondisi awal (A) dan setelah fermentasi garam 48 jam (B); (ii) pencucian ikan terfermentasi garam (C) yang dilanjutkan dengan penambahan inokulum BAL dan diinkubasi 48 jam suhu kamar (D); dan (iii) penambahan nasi terfermentasi dan inokulum BAL pada tahap 2 kemudian diinkubasi selama 0 jam (E); 48 jam (F), 96 jam (G); dan 144 jam (H).

Gambar 5. Protein terlarut (1) dan aktivitas ACE-I (2) pada pembuatan chao ikan tembang

kontrol nyata ($p < 0,05$) lebih kecil dibandingkan dengan kedua produk inokulasi.

Wang dkk. (2017) melaporkan bahwa aktivitas proteolitik selama fermentasi ikan tradisional *suanyu* menghasilkan sejumlah besar peptida pendek dan asam amino bebas yang berkontribusi pada aroma dan rasa suanyu. Adanya aktivitas proteolitik oleh bakteri pada fermentasi ikan berkontribusi pada terbentuknya peptida-peptida sederhana yang berpotensi sebagai inhibitor ACE. Penggunaan kultur starter BAL proteolitik yang diisolasi dari bekasam pada fermentasi *bekasam-like product* juga telah dilaporkan dapat meningkatkan kadar peptida dan memberikan aktivitas penghambatan ACE (Wikandari dkk., 2012). Pada penelitian Wikandari dkk. (2012) ini, ikan disterilisasi dulu sebelum diinokulasi dengan kultur starter dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas inhibitor ACE yang berasal dari kultur starter. Sedang pada fermentasi chao ini, aktivitas proteolitik berasal dari kultur starter BAL maupun bakteri proteolitik indigenus yang ada pada ikan. (Wenno dkk., 2016) melaporkan bahwa bakasang ikan tuna dari pulau Banda mempunyai aktivitas penghambatan ACE sebesar 68,80%. Hal ini menunjukkan bahwa mikroorganisme

fermentasi ikan. Pada fermentasi chao ini, terbentuknya komponen inhibitor ACE terutama terjadi pada waktu fermentasi BAL, dimana sumber energi yang tersedia terutama adalah protein, sehingga bakteri proteolitik menghidrolisis protein ikan menjadi peptida yang sederhana. Berdasarkan pola aktivitas penghambatan ACE selama fermentasi chao, dan pH chao yang sudah dibawah 4,6 maka fermentasi campuran kultur starter BAL dan nasi terfermentasi bisa dihentikan pada fermentasi 48 jam, sehingga memperpendek waktunya.

Penggunaan kultur starter BAL proteolitik pada fermentasi chao ini meningkatkan kadar protein terlarut, meningkatkan produksi asam dan mempercepat penurunan pHnya dan berpotensi sebagai sumber ACE-I. ACE inhibitor yang terbentuk dalam chao ikan tembang selama fermentasi menunjukkan bahwa BAL proteolitik yang diinokulasikan dapat mendegradasi protein ikan menjadi peptida dan asam amino yang kemungkinan memiliki sifat biologis menghambat ACE. Namun demikian, sifat penghambatan dalam produk tersebut belum bisa diklaim mampu menghambat aktivitas ACE di dalam tubuh karena produk ini masih mengalami pengolahan lebih lanjut untuk siap dikonsumsi. Selain

itu, peptida aktif yang terbentuk dalam chao juga belum diuji stabilitasnya terhadap hidrolisis enzim-enzim peptidase dalam pencernaan, seperti pepsin, tripsin, dan kimotripsin. Terkait dengan aktivitas penghambatan ACE pada fermentasi chao, masih perlu diteliti lebih lanjut terkait dengan derajat hidrolisis dan peptida yang terbentuk serta aktivitas proteolitik selama fermentasi chao untuk mendapatkan gambaran yang lebih komprehensif potensi chao sebagai penghasil inhibitor ACE.

Secara umum penambahan BAL proteolitik *L. plantarum* Ags1-3 dan *P. acidilaciti* Ags7-3 dilakukan dua kali bertujuan untuk mengetahui peranan kedua BAL tersebut selama proses fermentasi chao ikan tembang. Penambahan kedua BAL proteolitik tersebut pada tahap fermentasi ikan bertujuan untuk mempelajari peranan keduanya selama fermentasi ikan yang hanya mengandung protein tanpa sumber karbohidrat. Sedangkan penambahan BAL proteolitik pada fermentasi campuran bertujuan untuk mengetahui peranan kedua bakteri tersebut dalam fermentasi campuran bahan sumber protein dan karbohidrat yang telah difermentasi dengan ragi tape dan ragi tempe.

Penambahan kedua BAL proteolitik tersebut pada tahapan fermentasi ikan (C-D) menunjukkan bahwa keduanya dapat meningkatkan persentase protein terlarut dan aktivitas ACE inhibitor, tetapi keduanya tidak dapat memproduksi asam laktat dan menurunkan pH. Peningkatan protein terlarut dan aktivitas ACE inhibitor diduga disebabkan oleh hidrolisis protein daging ikan menjadi peptida sederhana dan asam amino yang mudah larut dan memiliki sifat biologis menghambat ACE. Kedua BAL proteolitik tersebut tidak dapat memproduksi asam laktat dan menurunkan pH disebabkan oleh tidak adanya sumber glukosa pada ikan yang bisa dimetabolisme menjadi asam laktat dan menurunkan pH. Penambahan BAL proteolitik pada tahapan ini, juga dapat meningkatkan total bakteri, total BAL, dan yeast, tetapi menekan pertumbuhan jamur.

Penambahan kedua BAL proteolitik tersebut pada tahapan fermentasi campuran (E-H) menunjukkan bahwa keduanya dapat meningkatkan persentase protein terlarut dan aktivitas ACE inhibitor, serta dapat memproduksi asam laktat dan menurunkan pH. Namun demikian, dalam tahapan ini fermentasi campuran ini terdapat jamur proteolitik yang berasal dari ragi tempe yang digunakan pada fermentasi nasi. Oleh sebab itu, peningkatan protein terlarut dan aktivitas ACE inhibitor pada tahapan ini diduga dihasilkan bersama-sama oleh BAL proteolitik yang ditambahkan, jamur, indigenous, dan lingkungan. Begitu juga dengan peningkatan produksi asam laktat dan penurunan pH pada tahapan ini diduga disebabkan oleh BAL yang ditambahkan, jamur dari ragi tape, mikroorganisme indigenous, dan mikroorganisme

lingkungan. Penambahan BAL proteolitik juga pada tahapan ini dapat meningkatkan total bakteri, total BAL, total yeast serta tidak menyebabkan total jamur menurun terutama pada fermentasi 48 jam.

KESIMPULAN

Fermentasi garam menurunkan aktivitas air dan menekan pertumbuhan bakteri, yeast maupun jamur. Pencucian dan penghilangan garam memungkinkan bakteri, termasuk BAL dan yeast tumbuh. Peranan BAL proteolitik *L. plantarum* Ags1-3 dan *Pediococcus acidilaciti* Ags7-3 pada tahapan fermentasi BAL (C-D) dapat meningkatkan protein terlarut dan aktivitas ACE inhibitor, tetapi keduanya tidak dapat memproduksi asam laktat dan menurunkan pH. Kedua BAL proteolitik tersebut bersama-sama dengan jamur, mikroorganisme indigenous dan lingkungan pada tahapan fermentasi campuran (E-H) berperan meningkatkan protein terlarut dan aktivitas ACE inhibitor, serta dapat memproduksi asam laktat dan menurunkan pH. Inokulasi BAL proteolitik *L. plantarum* Ags1-3 dan *P. acidilaciti* Ags7-3 dapat mempersingkat waktu fermentasi chao menjadi 48 jam. BAL proteolitik *L. plantarum* Ags1-3 dan *P. acidilaciti* Ags7-3 berpotensi digunakan sebagai penghasil ACE inhibitor pada fermentasi pangan berprotein.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian didukung oleh Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia melalui Program Hibah Disertasi Doktor 2018 [No. 3/E/KPT/2018, 2018], untuk itu diucapkan terima kasih.

KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak ada konflik kepentingan terkait dengan naskah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Afriani, Arnim, Marlida, Y., & Yuherman. (2018). Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria Proteases from Bekasam for use as a Beef Tenderizer. *Paki. J. Nutr.*, 17(8), 361–367. <https://doi.org/10.3923/pjn.2018.361.367>
- Desniar, Poernomo, D., & Wijatur, W. (2009). Pengaruh konsentrasi garam pada peda ikan kembung (*Rastrelliger sp.*) dengan fermentasi spontan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 12(1), 73–87.
- Desniar, Rusmana, I., Suwanto, A., & Mubarik, R. (2013). Characterization of lactic acid bacteria isolated from an Indonesian fermented fish (bekasam) and their

- antimicrobial activity against pathogenic bacteria. *Emir. J. Food Agric*, 25(6), 489–494. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v25i6.12478>
- Khairi, I. N. mohd, Huda, N., Abdullah, W. N. W., & Al-Kharki, A. F. M. (2014). Protein Quality of Fish Fermented Product: Budu and Rusip. *Asia Pacific Journal of Sustainable Agriculture, Food and Energy*, 2(2), 17–22.
- Khairina, R., Cahyanto, M. N., Utami, T., & Rahardjo, S. (2016). Physical, Chemical, and Microbiological Characteristics of Ronto During Storage. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 19(3), 348. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v19i3.15112>
- Khairina, R., Utami, T., Raharjo, S., & Cahyanto, M. N. (2017). Changes in sensory, physicochemical and microbiological properties of ronto during fermentation. *Pakistan Journal of Nutrition*, 16(8), 629–637. <https://doi.org/10.3923/pjn.2017.629.637>
- Koesoemawardani, D., Rizal, S., & Tauhid, M. (2013). Perubahan sifat mikrobiologi dan kimiawi rusip selama fermentasi. *Agritech*, 33(3), 265–272.
- Kuda, T., Tanibe, R., Mori, M., Take, H., Michihata, T., Yano, T., Takahashi, H., & Kimura, B. (2009). Microbial and chemical properties of aji-no-susu, a traditional fermented fish with rice product in the Noto Peninsula, Japan. *Fisheries Science*, 75(6), 1499–1506. <https://doi.org/10.1007/s12562-009-0175-0>
- Kusmarwati, A., Heruwati, E. S., Utami, T., & Rahayu, E. S. (2011). Pengaruh penambahan pediococcus f-11 sebagai kultur starter terhadap kualitas rusip teri (*Stolephorus sp.*). *Jurnal Pascapanen Dan Bioteknologi Kelautan Dan Perikanan*, 6(1), 13–25. <https://doi.org/10.15578/jpbkp.v6i1.84>
- Mahulette, F., Rachmania Mubarik, N., & Suwanto, A. (2016). Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Inasua. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 1(2), 71–76. <https://doi.org/https://journal.ugm.ac.id/jtbb/article/view/16380/16376>
- Marui, J., Boulom, S., Panthavee, W., Momma, M., Kusumoto, K.-I., Nakahara, K., & Saito, M. (2014). Culture-independent analysis of the bacterial community during fermentation of pa-som, a traditional fermented fish product in Laos. *Fish Sci*, 80, 1109–1115. <https://doi.org/10.1007/s12562-014-0780-4>
- Matti, A., & Kumalasari, T. (2017). Karakteristik Ikan Tembang (*Sardinella gibbosa*) sebagai Bahan Baku Pembuatan Produk Fermentasi Chao. *Jurnal Galung Tropika*, 6(2), 72–80. Retrieved from http://jurnalpertanianumpar.com/index.php/jgt/article/download/215/pdf_6
- Matti, A., Utami, T., Hidayat, C., & Rahayu, E. S. (2019). Isolation, Screening, and Identification of Proteolytic Lactic Acid Bacteria from Indigenous Chao Product. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 28(7), 781–793. <https://doi.org/10.1080/10498850.2019.1639872>
- Rhee, S. J., Lee, J. E., & Lee, C. H. (2011). Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S5>
- Rinto. (2010). Perubahan kandungan mikroflora akibat penambahan starter *Pediococcus acidilactici* F-11 dan garam selama fermentasi peda. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 13(1), 35–47.
- Saithong, P., Panthavee, W., Boonyaratanakornkit, M., & Sikkhamondhol, C. (2010). Use of a starter culture of lactic acid bacteria in pla-som, a Thai fermented fish. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(5), 553–557. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.06.004>
- Sanpa, S., Sanpa, S., & Suttajit, M. (2019). Lactic acid bacteria isolates from Pla-som, their antimicrobial activities and fermentation properties in Pla-som. *Journal of Food Health and Bioenvironmental Science*, 12(1), 36–43.
- Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(4), 394–406. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0427-1>
- Siddegowda, G. S., Bhaskar, N., & Gopal, S. (2017). Fermentative Properties of Proteolytic *Pediococcus* Strains Isolated from Salt Fermented Fish Hydrolysate Prepared Using Freshwater Fish Rohu (*Labeo rohita*) Fermentative Properties of Proteolytic *Pediococcus* Strains Isolated from Salt Fermented Fish Hydr. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 26(3), 341–355. <https://doi.org/10.1080/10498850.2016.1185754>
- Thapa, N., Pal, J., & Tamang, J. P. (2006). Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.009>
- Wang, W., Xia, W., Gao, P., Xu, Y., & Jiang, Q. (2017). Proteolysis during fermentation of Suanyu as a traditional fermented fish product of China. *International Journal of Food Properties*, 20(1), S166–S176. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1293089>
- Wenno, M. R., Suprayitno, E., Aulanni'Am, A., & Hardoko. (2016). The physicochemical characteristics and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity of skipjack tuna (*katsuwonus pelamis*) "bakasang." *Jurnal Teknologi*, 78(4–2), 119–124. <https://doi.org/10.11113/jt.v78.8191>
- Wikandari, P. R., Marsono, Y., & Rahayu, S. (2012). Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Proteolitik pada

- Bekasam. *Jurnal Natur Indonesia*, 14(2), 120–125. <https://doi.org/10.31258/jnat.14.1.120-125>
- Wikandari, P. R., Suparmo, Marsono, Y., & Rahayu, E. S. (2012). Potensi Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Bekasam sebagai Penghasil Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor pada Fermentasi Bekasam-Like Product. *Agritech*, 32(3), 258–264.
- Zang, J., Xu, Y., Xia, W., & Regenstein, J. M. (2020). Quality, functionality, and microbiology of fermented fish: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(7), 1228–1242. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1565491>