

Isolats Bakteri Indigenus Penghasil *Milk-Clotting Protease* untuk Fermentasi Keju (Isolates of Indigenous Bacteria Producing *Milk-Clotting Protease* for Cheese Fermentation)

Nanik Rahmani¹, Yana Nurita Sari², Nurheni Sri Palupi² & Yopi¹

¹Laboratorium Biokatalis dan Fermentasi, Bidang Bioproses Puslit Bioteknologi-LIPI, Jl. Raya Bogor Km. 46, Cibinong 169011, **E-mail:** rahmani_btk@yahoo.com

²Departemen Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pangan, Institut Pertanian Bogor

Memasukkan: Februari 2013, **Diterima:** April 2013

ABSTRACT

The aims of this research is to isolation of bacteria that potential to produce of milk clotting protease enzymes from fermented food that will be used as a substitute for rennet in cheese making. There are five food fermentations such as tauco, tempeh, red oncom, sticky tape, and pickled mustard greens that are used as a source for isolation of bacteria that could produce milk clotting protease. The results obtained four isolates proteolytic bacteria from two fermented food samples, three isolates bacteria from tauco (TCN 1, TCN 2, TCN 3) and one isolate from pickled mustard greens (DSN 1). Based on 16S rDNA, these isolates were identified as *Bacillus sp.* Bacterial isolate TCN 1 has a milk clotting activity of 29.17 U/mL, whereas bacteria isolates of TCN 2, TCN 3 and DSN 1 have activities of 70 U/mL achieved at the 24 hours incubation, respectively. The proteolytic activities of bacteria isolates TCN 1, TCN 2, TCN 3 and DSN 1 at the 24 hours fermentation process were 0.0117 U/mL, 0.0021 U/mL, 0.0150 U/mL, and 0.200 U/mL, respectively. The ratio of milk clotting protease activity and the proteolytic activity for bacteria isolates TCN 1, TCN 2, TCN 3 and DSN respectively were 5402, 175000, 7292, and 3333. This showed that the enzyme from bacterial isolates TCN 2 can be used as an alternative to rennin in cheese making.

Keywords: milk clotting protease, cheese, calf rennet, fermentation food

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi bakteri penghasil enzim *milk clotting protease* dari pangan fermentasi yang akan dimanfaatkan sebagai pengganti rennin dalam pembuatan keju. Ada lima pangan fermentasi yaitu tauco, tempe, oncom merah, tape ketan, dan asinan sawi yang digunakan sebagai sumber bakteri penghasil enzim *milk clotting protease*. Dari hasil isolasi diperoleh empat isolat bakteri proteolitik dari dua sampel pangan fermentasi, yakni tiga isolat bakteri dari tauco (TCN 1, TCN 2, TCN 3) dan satu isolat bakteri dari asinan sawi (DSN 1). Berdasarkan analisa 16S rDNA, keempat isolate tersebut diidentifikasi termasuk dalam kelompok *Bacillus sp.* Isolat bakteri TCN 1 memiliki aktivitas penggumpalan susu sebesar 29.17 U/mL sedangkan isolat bakteri TCN 2, TCN 3 dan DSN 1 memiliki aktivitas masing-masing 70 U/mL yang seluruhnya dicapai pada jam ke-24 inkubasi. Isolat bakteri TCN 1, TCN 2, TCN 3 dan DSN 1 memiliki aktivitas protease pada jam ke-24 berturut-turut sebesar 0.0117 U/mL, 0.0021 U/mL, 0.0150 U/mL, dan 0.200 U/mL. Rasio aktivitas penggumpalan susu terhadap protease untuk isolat bakteri TCN 1, TCN 2, TCN 3 dan DSN 1 secara berturut-turut adalah 5402, 175000, 7292, dan 3333. Dari keempat isolat yang diperoleh menunjukkan bahwa enzim dari isolat bakteri TCN 2 dapat digunakan sebagai alternatif pengganti renin dalam pembuatan keju.

Kata Kunci : protease penggumpal susu, keju, rennet anak sapi, produk pangan fermentasi

PENDAHULUAN

Penggumpalan susu merupakan tahap kunci dalam industri pembuatan keju dan enzim *milk-clotting protease* memainkan peran utama dalam proses tersebut. *Calf rennet* yang mengandung chymosin (EC 3.4.23.4) termasuk aspartate protease yang merupakan komponen enzim ut-

ma yang banyak digunakan dalam produksi keju sebagai reagen *milk-clotting* (Isam *et al.* 2009). Renet tidak hanya berfungsi sebagai penggumpal susu tetapi juga memainkan peran penting selama proses pematangan keju yang merupakan proses utama dan komplek dalam pembentukan cita rasa dan tekstur dari keju (Vioque *et al.* 2000, Sausa & Malcata 2002, Kumar *et al.* 2005). Beberapa studi

telah dilakukan berkaitan dengan enzim *milk clotting* yang berasal dari mikroorganisme untuk aplikasi dalam pembuatan keju (Poza *et al.* 2003; Dini *et al.* 2010).

Dalam industri pembuatan keju secara tradisional banyak menggunakan renet dari anak sapi. Penggumpalan susu oleh renet dari anak sapi terjadi akibat pemecahan ikatan Phe105-Met106 pada ikatan κ -casein menghasilkan glikopeptida hidrofilik rantai pendek (106-169 residu) yang dilepas ke dalam *whey*. *Para- κ -casein* menjadi bermuatan positif pada pH netral dan menyebabkan penurunan ikatan diantara *micelle casein* yang menyebabkan agregasi (Green 1973).

Penggunaan renet yang berasal dari anak sapi berkaitan dengan masalah etika, sehingga diperlukan usaha mencari alternatif substitusi renet yang berasal dari mikroorganisme yaitu enzim *milk clotting protease* (Tubesha & Al-Delaimy, 2003; Cavalcanti *et al.* 2004).

Produksi enzim *milk clotting protease* telah dilaporkan dari beberapa mikroorganisme seperti *Penicillium oxalium* (Hashem 2000), *Nocardioopsis sp* (Cavalcanti *et al.* 2004), *Mucor circinelloides* (Sathya *et al.* 2009) dan *Bacillus amyloliquefaciens* D4 (He *et al.* 2011). Beberapa mikroba yang potensial menghasilkan enzim *milk clotting protease* dan potensial sebagai substitusi *calf rennet*, yaitu *Penicillium oxalicum* (Hashem, 2000) dan *Nocardioopsis sp* (Cavalcanti *et al.* 2004). Untuk saat ini produksi keju di dunia menggunakan sepertiga renet dari mikroba yang berasal dari mikroorganisme jenis kapang (Preetha & Boopathy, 1994).

Banyak peneliti telah memfokuskan untuk melakukan isolasi mikroorganisme dari lingkungan tertentu untuk mendapatkan enzim dengan aktivitas *milk clotting protease* yang tinggi dan aktivitas protease yang rendah atau perbandingan aktivitas *milk clotting protease* terhadap protease yang tinggi (He *et al.* 2011). Salah satu diantaranya isolasi enzim *milk clotting protease* dari

red kojic rice, salah satu makanan tradisional China (Zhang *et al.* 2011).

Penelitian isolasi mikroba penghasil protease dan karakternya sudah banyak dilakukan di Indonesia, sedang untuk isolasi protease jenis *milk clotting* sebagai pengganti renet masih sedikit (Nunuk *et al.* 2001). Untuk tujuan produksi keju diperlukan penggunaan renin yang memiliki aktivitas *milk clotting* tinggi (MCA) dan PA yang rendah untuk meminimalkan larutnya *curd* (Wu *et al.* 2008). Oleh karena itu, dalam penelitian ini dipaparkan satu usaha untuk mencari pengganti renet, dengan melakukan proses isolasi enzim *milk clotting protease* yang berasal dari produk pangan fermentasi yang banyak terdapat di Indonesia.

BAHAN DAN CARA KERJA

Sampel yang digunakan sebagai sumber isolat adalah produk pangan fermentasi antara lain sawi asin, oncom, tauco, tempe, dan tape ketan. Sampel dihancurkan hingga homogen, lalu diukur pH-nya. Masing-masing sampel ditimbang sebanyak 0.25 g dan disimpan pada suhu refrigerator. Untuk sawi asin, diambil juga sampel airnya untuk isolasi bakteri sebanyak 0.25 mL. Proses persiapan sampel dilakukan secara aseptis.

Media pertumbuhan bakteri menggunakan medium *Nutrient Broth* dan isolasi bakteri penghasil enzim penggumpal susu menggunakan *skim milk agar*. Sample dari 5 produk fermentasi sebanyak 0.25 g dan 0.25 mL sample cair produk fermentasi sawi, masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 2.5 mL medium *Nutrient Broth* untuk pertumbuhan bakteri. Inkubasi selama 24 jam pada suhu ruang menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm. Dari media pertumbuhan bakteri selanjutnya dibuat pengenceran bertingkat (10^{-1} - 10^{-5}) masing-masing sebanyak 1 mL dan di inoku-

lasikan kedalam media padat. Bakteri penghasil enzim *milk clotting protease* diskriming dengan menggunakan media *skim milk agar*. Isolat yang memberikan zona bening selanjutnya diukur indeks proteolitiknya dan selanjutnya diuji potensinya sebagai penghasil enzim *milk clotting protease*.

Identifikasi bakteri dilakukan secara molekuler dengan menganalisis sebagian gen 16S rDNANYA. Gen 16S rDNA diamplifikasi dengan menggunakan primer 9F (5'-AGRGTGGTTCAG-3') and 1492R (5'-ACGGYTA CCTTGTTAYGACTT-3'). Amplifikasi dilakukan dengan campuran reaksi yang mengandung DNA bakteri, primer 9F dan 1492R masing-masing 10 pmol 2 µl, larutan Go Taq (promega) 26 µl serta ddH₂O 20 µl. Adapun kondisi reaksi PCR ialah 95 °C, 2 menit (1 siklus); 95 °C, 30 detik, 65 °C, 1 menit, 72 °C, 2 menit (10 siklus); 95 °C, 30 detik, 55 °C, 1 menit, 72 °C, 2 menit (30 siklus) serta 72 °C, 2 menit (1 siklus). PCR produk disequensing di First Base Malaysia. Hasil sekuen selanjutnya dibandingkan dengan database di Gen Bank menggunakan BLAST algorithm.

Produksi enzim dilakukan dengan metode fermentasi cair. Isolat bakteri dikulturkan pada media *Nutrient Broth* yang telah ditambahkan substrat kasein lalu diinkubasi menggunakan *shaker incubator* pada 150 rpm, suhu ruang selama 5 hari dan dilakukan *sampling* setiap 24 jam. Hasil *sampling* kemudian diukur pertumbuhannya menggunakan spektrofotometer pada λ 660 nm. Hasil *sampling* tersebut disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit, kemudian diambil supernatannya sebagai ekstrak enzim kasar untuk dianalisa aktivitas *milk clotting protease* (*Milk clotting activity* : MCA), aktivitas proteolitiknya (*Proteolytic activity* : PA) serta rasio aktivitas *milk clotting protease* terhadap protease (MCA/PA).

Aktivitas penggumpalan susu ditentukan berdasarkan uji visual dari pembentukan gumpalan susu pertama kali akibat penambahan enzim yang dinotasikan dalam *Soxhlet Unit* (SU). Satu SU didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menggumpalkan 1 mL campuran yang mengandung 0.1 g susu skim dan 0.001 g CaCl₂ dalam 40 menit pada suhu 35°C (Arima *et al.* 1970). Sebanyak 0.5 mL enzim ditambahkan ke dalam 5 mL susu skim (10 g susu skim/100 mL 0.01 M CaCl₂) yang telah diinkubasi pada suhu 40°C selama 5 menit. Campuran tersebut diaduk hingga terbentuk gumpalan. Pengukuran aktivitas enzim *milk-clotting* menggunakan persamaan berikut ini: (MCA) = $\frac{2400 \times 5 \times D}{T \times 0,5}$

$$T \times 0,5$$

Keterangan:

MCA= aktivitas enzim *milk-clotting* (SU)

T = waktu pertama kali terbentuk gumpalan susu (detik)

D = faktor pengenceran

Aktivitas protease ditentukan melalui metode standar Lowry yang dimodifikasi (Meloan & Pomeranz 1973). Sebanyak 0.2 ml substrat kasein dengan konsentrasi 0.1% direaksikan dengan 0.1 mL larutan enzim kasar, kemudian dicampur dan diinkubasi di *shaker incubator* selama 20 menit pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi selama 20 menit, larutan reaksi tersebut ditambah 0.24 mL 0.4 M TCA, dicampur dan diinkubasi pada *shaker incubator* selama 20 menit pada suhu 37°C. Setelah disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 10.000 rpm, 0.1 mL supernatan diambil dan disimpan pada tabung reaksi baru. Kemudian ditambahkan 0,5 mL 0.4 M Na₂CO₃ dan 0.1 mL fenol folin, dihomogenkan dengan vorteks dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Larutan reaksi diukur absorbansinya pada λ 660 nm dan diukur aktivitas proteasenya dengan menggunakan rumus dibawah ini. Satu unit (U) aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat mengkatalisis reaksi

pelepasan 1 µmol tirosin per menit

$$\text{Aktivitas protease (PA)} = X \times \text{FP} \times \frac{1}{V} \times T$$

Keterangan :

- PA = *Protease activity* (U/mL)
- X = Konsentrasi enzim (mg/mL)
- FP = Faktor pengenceran
- V = Volume enzim yang dianalisis (mL)
- T = waktu inkubasi (menit)

Perhitungan rasio aktivitas penggumpalan susu terhadap protease menggunakan rumus perhitungan pada persamaan berikut ini (Arima *et al.* 1967) :

$$R = \frac{\text{MCA}}{\text{PA}}$$

Keterangan :

- R : Rasio aktivitas penggumpalan susu terhadap protease
- MCA : *Milk Clotting Activity* ; Aktivitas penggumpalan susu (SU/mL)
- PA : *Protease Activity* ; Aktivitas protease (U/mL)

HASIL

Isolasi Bakteri dari Pangan Fermentasi

Isolasi dilakukan terhadap lima sampel pangan fermentasi yaitu tauco, tempe, oncom merah, tape ketan, dan asinan sawi (Gambar 1).

Analisis sebagian gen 16S rDNA Bakteri

Amplifikasi daerah sebagian gen 16S rDNA menghasilkan produk sekitar 1500 bp (Gambar 3). Analisis homologi untuk masing-masing isolat bisa dilihat pada Tabel 3.

Pengukuran Aktivitas Enzim dan Seleksi Isolat Bakteri

Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri

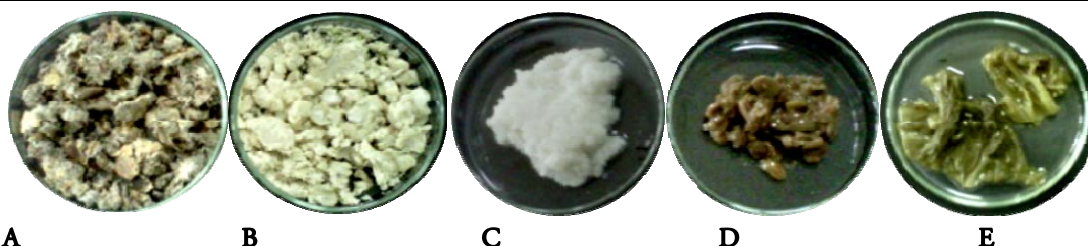
Hasil pengukuran pertumbuhan sel pada λ 660 nm ditunjukkan pada Gambar 4. Empat isolat bakteri memiliki profil pertumbuhan yang sama dengan pertumbuhan sel tertinggi pada jam ke-24.

Aktivitas Enzim Penggumpal Susu

Data aktivitas *milk clotting protease* dari keempat isolat bakteri bisa dilihat pada Gambar 5. Pembentukan gumpalan susu oleh aktivitas enzim *milk clotting protease* bisa dilihat pada Gambar 6. Tiga isolat bakteri dari produk fermentasi tauco memiliki aktivitas penggumpalan susu lebih tinggi dibanding isolat bakteri DSN dari produk fermentasi sawi, meskipun proses penggumpalan susu optimum diperoleh setelah 24 jam.

Tabel 1. Ciri morfologi 4 bakteri hasil isolasi dari 5 produk fermentasi

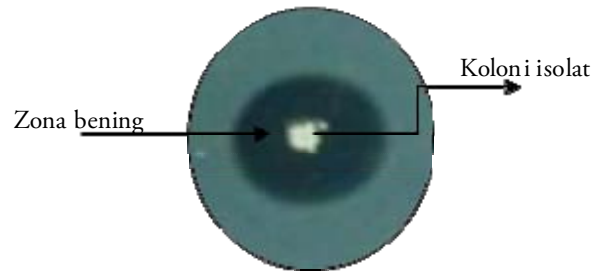
No.	Isolat Bakteri	Sumber	Ciri Koloni
1	TCN 1	Tauco	bentuk bulat, ukuran <i>medium</i> , berwarna putih <i>opaque</i> , tepian <i>entire</i>
2	TCN 2	Tauco	bentuk tidak beraturan, ukuran <i>large</i> , berwarna putih <i>opaque</i> , tepian <i>undulate</i>
3	TCN 3	Tauco	bentuk tidak beraturan, ukuran <i>large</i> , berwarna translusens, tepian <i>undulate</i>
4	DSN 1	Asinan sawi	bentuk bulat, ukuran <i>large</i> , berwarna putih <i>opaque</i> , tepian <i>undulate</i>



Gambar 1. Sampel pangan fermentasi yang digunakan sebagai sumber isolat: oncom merah (a), tempe (b), tape ketan (c), tauco (d), asinan sawi (e)

Aktivitas protease dan rasio aktivitas penggumpalan susu

Hasil uji aktivitas proteolitik terhadap 4 isolat bakteri menunjukkan hasil yang berbeda dengan profil aktivitas penggumpalan susu. Satu isolat bakteri produk fermentasi tauco yaitu TCN2 menunjukkan aktivitas proteolitik paling kecil dibanding 3 isolat bakteri lainnya. Aktivitas tertinggi diperoleh oleh isolat bakteri TCN1 dengan aktivitas sekitar 0.02 U/mL (Gambar 7). Isolat yang telah diuji aktivitas penggumpalan susu dan proteasenya kemudian dihitung rasio aktivitas penggumpalannya terhadap protease. Hasil perhitungan rasio enzim penggumpal susu terhadap protease dari keempat isolat bakteri dapat dilihat pada Tabel 4. Tabel 4 menunjukkan bahwa isolat bakteri TCN2 memiliki rasio



Gambar 2. Contoh zona bening dari isolat bakteri TCN 2 pada medium *skim milk agar*

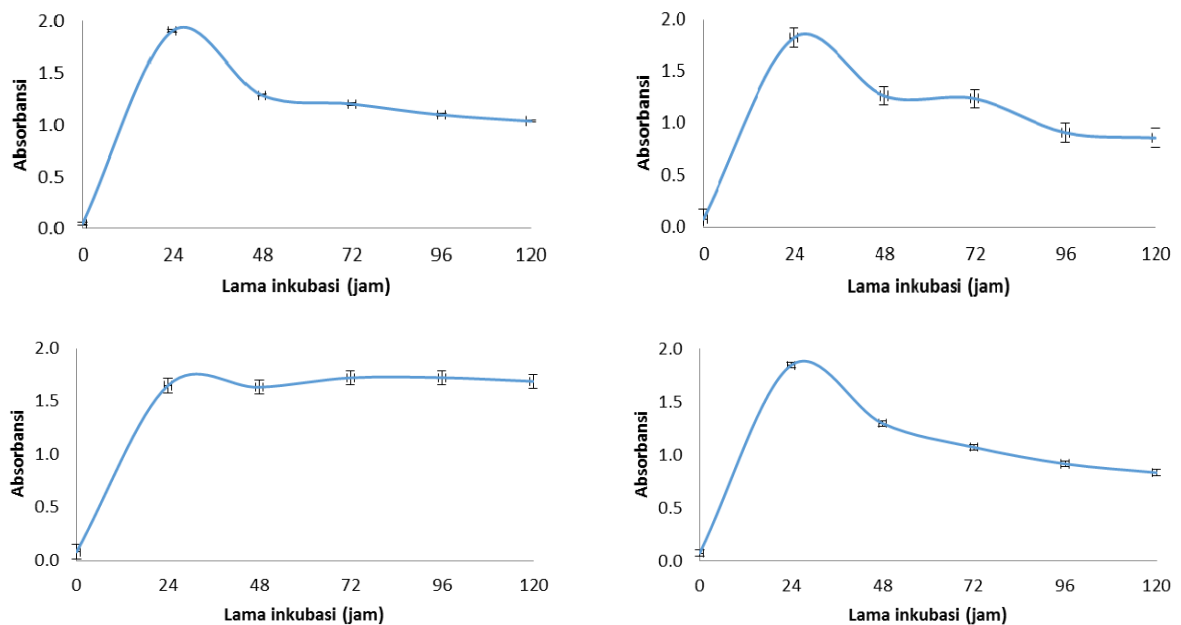
penggumpalan susu tertinggi dibanding 3 isolat bakteri lainnya.

PEMBAHASAN

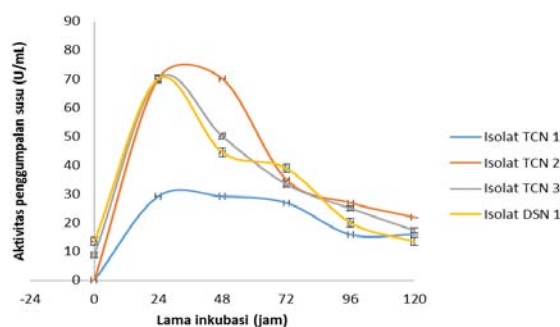
Medium isolasi untuk memperoleh koloni tunggal menggunakan medium selektif susu skim agar yang umum digunakan untuk memperoleh

Tabel 2. Indeks Protease 4 bakteri hasil isolasi dari 5 produk fermentasi

No.	Isolat Bakteri	Diameter isolate bakteri (cm)	Diameter zona bening (cm)	Indeks Protease
1	TCN 1	0.40	1.30	3.25
2	TCN 2	0.40	1.60	4.00
3	TCN 3	0.40	1.20	3.00
4	DSN 1	0.40	1.40	3.50



Gambar 3. Profil pertumbuhan isolat bakteri TCN 1 (a), TCN 2 (b), TCN 3 (c), dan DSN 1 (d) selama 5 hari masa fermentasi pada 150 rpm dan suhu ruang. Konsentrasi sel diukur pada abs. 660 nm.



Gambar 4. Aktivitas enzim penggumpal susu isolat bakteri

bakteri penghasil protease (Nunuk *et al.* 2001) termasuk enzim *milk clotting protease*. Koloni bakteri akan membentuk zona bening sebagai hasil perubahan kasein menjadi senyawa nitrogen yang larut (Hidayat *et al.* 2006). Dari kelima sampel produk fermentasi diperoleh 38 isolat bakteri dan setelah analisa lebih lanjut dipilih 4 isolat bakteri positif dengan ciri koloni berbeda. Tiga isolat bakteri tersebut merupakan hasil isolasi dari produk tauco dan 1 isolat bakteri dari produk asinan sawi, yang kemungkinan merupakan bakteri yang berperan dalam proses fermentasi bahan pangan itu sendiri. Proses fermentasi tauco ada dua tahap, yaitu fermentasi oleh kapang dan fermentasi dalam larutan garam oleh bakteri asam laktat dan khamir. Bakteri dominan yang tumbuh selama fermentasi garam pada pembuatan tauco adalah *Lactobacillus delbrueckii* (Nurwitri *et al.* 2007). Pada pangan fermentasi berbasis sayuran seperti asinan sawi, proses fermentasi umumnya dilakukan dalam larutan garam dan fermentasi berlangsung secara spontan dengan memanfaatkan mikroba-mikroba yang telah ada pada sayuran itu sendiri. Beberapa jenis bakteri yang berperan dalam fermentasi sayuran antara lain *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis* dan *Pediococcus cerevisiae* (Nurwitri *et al.* 2007). Empat isolat bakteri hasil isolasi dari produk tauco dan sawi dalam penelitian ini diprediksi memiliki



Gambar 5. Pembentukan gumpalan susu pertama oleh aktivitas enzim isolat bakteri

kedekatan dengan jenis bakteri asam laktat. Identifikasi molekuler untuk melihat jenis bakteri sedang dalam proses saat ini.

Indeks protease adalah perbandingan diameter zona bening koloni dengan diameter koloni isolat. Semakin besar zona bening yang dihasilkan berarti semakin besar pula kemampuan isolat tersebut untuk menghasilkan enzim protease (Yusmarini *et al.* 2009). Pada penelitian ini, isolat yang memiliki indeks protease paling tinggi adalah isolat bakteri TCN 2 sebesar 4.

Empat isolat bakteri (TCN1, TCN2, TCN3 dan DSN1) yang diuji menggunakan analisa 16S rDNA diidentifikasi termasuk dalam kelompok *Bacillus sp.* Berdasarkan analisis menggunakan BLAST, keempat isolate tersebut memiliki sekuen homologi 99% : isolate TCN1 dengan *Bacillus cereus*, ATCC 14579; isolate TCN2 dengan *Bacillus amyloliquefaciens*, NBRC 15535, isolate TCN3 dengan *Bacillus subtilis*, NRRL B-23049 dan isolate DSN1 dengan *Bacillus amyloliquefaciens*, NBRC 15535.

Kurva pertumbuhan pada Gambar 3 ditunjukkan bahwa pada jam ke-0 belum terlihat adanya kekeruhan pada medium yang berisi inokulum. Pada tahap ini terjadi fase adaptasi. Pada pengamatan ini, terlihat bahwa semua isolat bakteri memiliki kekeruhan inokulum yang paling tinggi pada jam ke-24. Pada tahap ini isolate bakteri sudah mencapai fase log sehingga untuk pemanenan enzim dilakukan pada jam ke-24. Penurunan jumlah sel ini mulai terjadi setelah inkubasi jam ke-24 hingga jam ke-120. Profil per-

tumbuhan 4 isolat bakteri tidak berbeda.

Penggumpalan susu merupakan prinsip dasar pada pembuatan keju. Dalam pembuatan keju, renet biasanya ditambahkan ke dalam susu setelah penambahan kultur starter. Proses penggumpalan susu oleh renin terjadi melalui dua tahap. Tahap pertama merupakan perubahan *kappa*-kasein menjadi *para*-kasein oleh enzim dan tahap kedua *para*-kasein digumpalkan oleh proses pemanasan dengan adanya ion kalsium. Renin bekerja pada substrat *kappa*-kasein yang berfungsi sebagai koloid yang merupakan lapisan luar kasein, sehingga dengan menghidrolisis *kappa*-kasein, kasein lebih mudah tergumpalkan secara sempurna dengan syarat ion kalsium tersedia dalam larutan tersebut (Winarno 2010). Dalam penggunaannya, renin dapat digunakan dalam dua bentuk yakni renet cair dan renet dalam bentuk padatan seperti bubuk atau pelet. Bentuk renet yang ditambahkan dapat mempengaruhi aktivitas enzim penggumpal susu. Renet dalam bentuk cair memiliki aktivitas penggumpalan susu sebesar 9600 U/mL (Thakur *et al.* 1990) sedangkan dalam bentuk padatan memiliki aktivitas 6200 U/mg (Nerud *et al.* 1989). Enzim penggumpal susu dari mikroba memiliki aktivitas penggumpalan susu yang berbeda tergantung bentuk penggunaannya. Enzim penggumpal susu dari *Mucor pusillus var. Lindt* dalam bentuk cair memiliki aktivitas penggumpalan susu sebesar 800 U/mL sedangkan dalam bentuk padatan memiliki aktivitas 100 U/mg (Winarno 2010). Hal ini menunjukkan bahwa proses pembuatan dan pemurnian enzim mempengaruhi aktivitas enzim tersebut.

Gambar 4 ditunjukkan bahwa keempat isolat bakteri memiliki aktivitas penggumpalan susu yang paling tinggi pada waktu inkubasi jam ke-24. Beberapa penelitian melaporkan bahwa waktu fermentasi optimum untuk beberapa

mikroba penghasil enzim penggumpal susu antara 1-8 hari; 1 hari untuk *Bacillus subtilis* (Shieh *et al.* 2009), 4 hari untuk *Mucor miehei* (Escobar & Barnett, 1990), 3 hari untuk *Mucor pusillus* (Arima *et al.* 1970), 3 hari untuk *Amylomyces rouxii* (Yu & Chou, 2005), 3-4 hari untuk *Mucor baciliformis* (Areces *et al.* 1992), dan 8 hari untuk *Penicillium oxalicum* (Hashem 1999). Mulai pada jam ke-48 aktivitas penggumpalan susu mulai menurun hingga jam ke-120. Hal ini disebabkan oleh penurunan jumlah substrat sehingga pembentukan kompleks enzim-substrat juga ikut menurun. Pada gambar 4 ditunjukkan bahwa isolat bakteri TCN 1 memiliki aktivitas penggumpalan susu sebesar 29.17 U/mL, sedangkan isolat bakteri TCN 2, TCN 3 dan DSN 1 memiliki aktivitas masing-masing 70 U/mL. Isolat bakteri TCN 2, TCN 3 dan DSN 1 memiliki aktivitas yang paling tinggi, artinya semakin tinggi aktivitas penggumpalannya semakin singkat waktu yang dibutuhkan enzim tersebut untuk menggumpalkan susu hingga *whey* terpisah.

Isolat bakteri yang mampu menggumpalkan susu selanjutnya diuji aktivitas proteasenya. Pengukuran aktivitas protease ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam memecah protein menjadi peptida dan asam amino. Kemampuan protease dalam memecah protein akan mempengaruhi flavor atau citarasa akibat terbentuknya peptida dan asam amino tersebut. Pada pengukuran aktivitas ini diharapkan isolat bakteri terpilih memiliki aktivitas protease yang rendah, hal ini dikarenakan aktivitas protease (aspartat protease) yang tinggi dapat menimbulkan citarasa yang pahit pada produk keju yang akan dihasilkan (Channe & Shewale, 1998).

Aktivitas protease masing-masing isolat bakteri dapat dilihat pada Gambar 6. Hasil pengukuran aktivitas protease pada keempat isolat bakteri menunjukkan bahwa isolat bakteri TCN

1, TCN 3, dan DSN 1 memiliki aktivitas protease paling tinggi pada jam ke-48 yakni berturut-turut 0.0117 U/mL, 0.0150 U/mL, 0.0200 U/mL, sedangkan isolat bakteri TCN 2 memiliki aktivitas protease paling tinggi pada jam ke-96 yakni sebesar 0.0021 U/mL. Aktivitas protease ini tergolong sangat rendah. Hal ini sesuai dengan harapan bahwa isolat yang diinginkan memiliki aktivitas protease yang rendah sehingga tidak menimbulkan cita rasa yang pahit pada keju yang dihasilkan.

Rasio aktivitas penggumpalan susu terhadap protease merupakan faktor yang menentukan apakah bakteri tersebut dapat digunakan sebagai penghasil alternatif enzim penggumpal susu. Isolat bakteri yang terpilih merupakan isolat bakteri yang memiliki aktivitas penggumpalan tinggi dengan aktivitas protease rendah sehingga menghasilkan rasio yang tinggi. Isolat yang telah diuji aktivitas penggumpalan susu dan proteasenya kemudian dihitung rasio aktivitas penggumpalannya terhadap protease. Aktivitas enzim yang dipilih adalah aktivitas enzim pada jam ke-24 karena pada waktu tersebut semua isolat bakteri menunjukkan aktivitas penggumpalan susu yang paling tinggi dengan aktivitas protease yang rendah.

Hasil perhitungan rasio enzim penggumpal susu terhadap protease pada Tabel 4 menunjukkan bahwa isolat bakteri TCN 2 memiliki nilai

yang paling tinggi sebesar 175000. Pada penelitian ini, isolat bakteri TCN 2 merupakan isolat terpilih yang dapat dijadikan alternatif untuk produksi enzim penggumpal susu pada fermentasi keju. Isolat bakteri TCN 2 memiliki rasio aktivitas penggumpalan yang lebih tinggi dibandingkan beberapa enzim penghasil penggumpal susu dari bakteri lain (Tabel 5). Selain itu, ketiga isolat bakteri lainnya juga memiliki rasio penggumpalan susu terhadap protease yang juga lebih tinggi dibandingkan beberapa sumber lain. Hal ini menunjukkan bahwa isolat bakteri lainnya seperti TCN 1, TCN 3, dan DSN 1 juga memiliki potensi untuk menjadi alternatif pengganti renin dalam pembuatan keju.

KESIMPULAN

Pada penelitian ini diperoleh empat isolat bakteri proteolitik potensial sebagai penghasil enzim *milk clotting protease* dari dua sampel pangan fermentasi, yakni tiga isolat bakteri dari tauco (TCN 1, TCN 2, TCN 3) dan satu isolat bakteri dari asinan sawi (DSN 1). Keempat bakteri tersebut diidentifikasi secara molekuler menggunakan analisa 16S rDNA diidentifikasi sebagai *Bacillus sp.* Isolat bakteri TCN 1 memiliki aktivitas penggumpalan susu sebesar 29.17 U/mL sedangkan isolat bakteri TCN 2, TCN 3 dan DSN

Tabel 5. Perbandingan rasio aktivitas penggumpalan susu terhadap protease isolat bakteri TCN 2 dengan beberapa enzim penggumpal susu dari mikroba lain

Sumber enzim	Aktivitas penggumpalan susu (U/mL)	Aktivitas protease (U/mL)	Rasio
Isolat bakteri TCN 2	70	0.0004	175000
<i>Aspergillus niger</i> MC4 (Channe & Shewale, 1998)	400	0.01	40000
<i>Mucor</i> renin	511	0.11	4650
<i>B. Subtilis</i> natto (Shieh <i>et al.</i> 2009)	685	0.23	2981
Pfizer mikrobial renin	750	0.29	2590
<i>Thermomucor indiciae-seudaticae</i> N31 (Dini <i>et al.</i> 2010)	56	0.6	93

1 memiliki aktivitas masing-masing sebesar 70.00 U/mL yang seluruhnya dicapai pada jam ke-24 masa inkubasi. Isolat bakteri TCN 1, TCN 2, TCN 3 dan DSN 1 memiliki aktivitas protease pada jam ke-24 berturut-turut sebesar 0.0117 U/mL, 0.0021 U/mL, 0.0150 U/mL, dan 0.200 U/mL.

Rasio aktivitas penggumpalan susu terhadap protease untuk isolat bakteri TCN 1, TCN 2, TCN 3 dan DSN 1 secara berturut-turut adalah 5402, 175000, 7292, dan 3333. Hasil tersebut menunjukkan bahwa enzim dari isolat bakteri TCN 2 dapat digunakan sebagai alternatif pengganti renin dalam pembuatan keju.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh dana DIPA MEAT-PRO Puslit Bioteknologi LIPI tahun 2012.

DAFTAR PUSTAKA

Areces LB, Bonino MB, Parry MA, Fraile ER, Fernandez-Lahore HM. & Cascone O. 1992. Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Mucor bacilliformis*. *Appl Biochem Biotechnol* 37:283–294

Arima K, Iwasaki S & Tamura G. 1967. Milk clotting enzyme from microorganisms. 1. Screening tests and identification of the potent fungus. *Agric Boil Chem* 31:540–545

Arima K, Yu J. & Iwasaki S. 1970. *Milk-clotting enzyme from Mucor pusillus var. Lindt*. In: Perlmann G, Lorand L (eds) *Methods in enzymology*, vol 19. Academic, New York, pp 446–459

Cavalcanti MTH, Teixeira MFS, Lima FJL. & Porto ALF. 2004. Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardia-opsis* sp. *Bioresour Technol*. 93:29–35

Channe PS. & Shewale JG. 1998. Influence of culture conditions on the formation of milk-clotting protease by *Aspergillus niger* MC4. *World J Microb Biot* 14(1):11–15

Dini CB, Gomes E, Boscolo M. & Silva R. 2010. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31. *Food Chemistry* 120: 87-93

Green ML. 1973. Studies on the mechanism of clotting of milk. *Neth Milk Dairy J* 27:278–285

Hashem, A. M. 1999. Optimization of milk-clotting enzyme productivity by *Penicillium oxalicum*. *Bioresour. Technol*. 70: 203-207.

Hashem, A.M. 2000. Purification and properties of a milk-clotting enzymes produced by *Penicillium oxalicum*. *Bioresour. Technol*. 75:219-222.

He, X., Weibing Z., Fazheng R., Bozhong G & Huiyuan G. 2011. Screening fermentation parameters of the milk-clotting enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* D4 from the Tibetan Plateau in China. *Ann Microbiol*. Publish online 15 May 2011.

Hidayat N, Padaga MC. & Suhartini S. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta

Isam AMA, Isao M, Elfadil EB, & Nobuhiro M. 2009. Characterization of partially purified milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* Fresen seeds. *Food Chem* 116:395-400

Kumar, S., Sharma, N.S., Saharan, M.R., & Singh, R. 2005. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochemistry*, 40, 1701-1705.

Meloan CE & Pomeranz Y. 1973. *Food Analysis Laboratory Experiments*. New York : The AVI Publishing Company

- Neelakantan S, Mohanty AK. & Kaushik JK. 1999. Production and use of microbial enzymes for dairy processing. *Curr Sci* 77:43–148
- Nerud F, Misurcova Z. & Musilek V. 1989. Production of milk-clotting enzymes by *Basidiomycetes*. *Folia microbial* 34: 310-315
- Nunuk W, Baity H, & Suminar S.A. 2001. Karakter protease ekstraseluler bakteri isolat P.1 yang diisolasi dari tuak lontar. *Jurnal Biologi Indonesia* Vol. III, No.1 : 80-89.
- Nurwitri CC, Rahayu WP, Kusumaningrum HD. & Nurjanah S. 2007. *Prinsip Fermentasi Pangan*. E-Learning Mikrobiologi Pangan. Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, IPB.
- Poza M., M. Prieto-Alcedo, C. Sieiro & T.G. Villa. 2004. Cloning and expression of clt genes encoding milk clotting proteases from *Myxococcus xanthus* 422. *Applied and environmental microbiology*, p. 6337-6341.
- Preetha S. & Boopathy R. 1994. Influence of culture conditions on the production of milk-clotting enzyme from Rhizomucor. *World J Microbiol* 10(5):527–530
- Sathya R., B.V Pradeep, J. Angayarkanni & M. Palaniswamy. 2009. Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agro-industrial waste. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14:788-794.
- Shieh CJ, Phan Thi LA, & Shih IL. 2009. Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis* natto. *Biochem Eng J* 43 (1):85–91
- Sousa, M. J. & F. X. Malcata. 2002. Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. *Lait* 82: 151-170.
- Thakur MS, NG Karanth & Krishna Nand. 1990. Production of fungal rennet by *Mucor miehei* using solid state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 32:409-413.
- Tubesha ZA, & Al-Delaimy KS. 2003. Rennin-like milk coagulant enzyme produced by a local isolate of *Mucor*. *Int J Dairy Sci* 56:237–241
- Vioque M, Gomez R, Sanchez E, Mata X, Tejada I., & Fernandez Saguero J. 2000. Chemical and microbiological characteristics of ewe's milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *J Agric Food Chem* 48:451-6
- Winarno FG. 2010. *Enzim Pangan*. Bogor : Mbrio Press
- Wu J., Hongbing C., & Weiping C. 2008. Fermentation parameter and partial biochemical characterization of milk clotting enzyme from Chinese distiller's yeast. *Annals of Microbiology*, 58 (4) 717-722.
- Yu PJ. & Chou CC. 2005. Factors affecting the growth and production of milk-clotting enzymes by *Amylomyces rouxii* in rice liquid medium. *Food Technol Biotechnol* 43(3):283–288
- Yusmarini, Indarti R, Utami T, & Marsono Y. 2009. Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat proteolitik dari susu kedelai yang terfermentasi spontan. *Jurnal Natur Indonesia* 12(1):28-33
- Zhang Z., Chenzhong W., Zhengying Y., Junfeng Z., Fengxia L., Gongming Y., Wenjun L & Zhaoxin L. 2011. Isolation and identification of a fungal strain QY229 producing milk-clotting enzyme. *Eur Food Res Technol*, 232: 861-866.