

Pemanfaatan Kolagen Limbah Ikan Tuna dalam Meningkatkan Pertumbuhan *Bacillus Subtilis* sebagai Kandidat Probiotik

[Utilization of Collagen From Tuna Fish Waste to Enhance The Growth of *Bacillus Subtilis* as A Probiotic Candidate]

Suawa Natania Abigail Christy¹, Accoladea Wijaya¹, Angela Clarita Putri¹, Jennifer Claudia Suryadi¹, Cecilia Aileen Yap¹, Chelsea Valeria Simamora¹, Jennifer Patricia Tjhajadi¹, Celeste Abigail Thanos¹, Gisella Theodora¹, Michella Irawan², Veronica Tammy Soputro², Adrian Samuel Thenoch², Reinhard Pinontoan¹ dan Juandy Jo^{1,3*}

¹Program Studi Biologi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Pelita Harapan, Tangerang 15811, Banten

²P.T. Collabit Sukses Bersama, Bitung 95511, Sulawesi Utara

³Mochtar Riady Institute for Nanotechnology, Tangerang 15811, Banten

*Korespondensi penulis: juandy.jo@uph.edu

ABSTRACT

*Probiotics are a group of bacteria with health benefits, which are widely used in various nutritional products. Various efforts are made to effectively increase growth of probiotics, including adding supplemental nutrition, such as protein. In this study, a series of tests were conducted (optical density, colony forming unit, and pH test) to evaluate the effect of collagen hydrolysate supplementation, obtained from tuna waste, on the growth of *Bacillus subtilis* G8, a candidate of probiotic bacteria which have been isolated from the Japanese traditional food natto. The results demonstrated positive impacts of collagen hydrolysate supplementation on cell density and colony-forming units, as well as on the reduction of pH of bacterial growth medium. Concentration of 5% was observed as the most optimum concentration to support the bacterial growth, while the most acidic pH of bacterial growth medium is observed at 3% supplementation. In conclusion, supplementation of collagen hydrolysate derived from tuna waste supported the growth of *B. subtilis* G8 as well as reduced the pH of its growth media.*

Keywords: *Bacillus subtilis*; collagen hydrolysate; growth; probiotics; tuna waste.

ABSTRAK

Probiotik merupakan sekelompok bakteri yang memiliki manfaat kesehatan dan banyak digunakan dalam berbagai produk nutrisi. Beragam upaya telah dilakukan untuk secara efektif meningkatkan pertumbuhan probiotik, salah satunya melalui penambahan nutrisi tambahan seperti protein. Dalam penelitian ini, serangkaian uji dilakukan, meliputi uji kerapatan optik, unit pembentuk koloni (CFU), dan pengukuran pH, untuk mengevaluasi pengaruh suplementasi kolagen hidrolisat yang diperoleh dari limbah ikan tuna terhadap pertumbuhan *Bacillus subtilis* G8, yakni kandidat bakteri probiotik yang diisolasi dari makanan tradisional Jepang, *natto*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa suplementasi kolagen hidrolisat memberikan dampak positif terhadap kerapatan sel dan jumlah koloni, serta menyebabkan penurunan pH medium pertumbuhan bakteri. Konsentrasi 5% diketahui sebagai konsentrasi yang paling optimal dalam mendukung pertumbuhan bakteri, sedangkan pH terendah pada medium pertumbuhan tercatat pada konsentrasi suplementasi sebesar 3% ($5,51 \pm 0,55$). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa suplementasi kolagen hidrolisat yang berasal dari limbah ikan tuna mampu mendukung pertumbuhan *B. subtilis* G8 serta menurunkan pH media pertumbuhannya.

Kata kunci: *Bacillus subtilis*; hidrolisat kolagen; limbah ikan tuna; pertumbuhan; probiotik.

PENDAHULUAN

Probiotik merupakan kumpulan berbagai jenis bakteri yang memberikan kontribusi positif bagi kesehatan bila dikonsumsi dalam jumlah yang sesuai ketentuan (World Health Organization, 2001; Leñini *et al.*, 2023), seperti menekan pertumbuhan patogen, membantu produksi vitamin, serta meningkatkan respon imun (Binda *et al.*, 2020). Beberapa golongan probiotik, seperti *Bifidobacterium species*, *Lactiplantibacillus plantarum* serta *Bacillus subtilis* telah diidentifikasi sebagai probiotik yang memiliki peran penting dalam perkembangan mikrobiota pencernaan manusia sejak dilahirkan (Pantazi *et al.*, 2023).

Secara lebih khusus, *Bacillus subtilis* diketahui dapat menghasilkan efek antioksidan, antimikrobal dan *immuno-modulatory*. Bakteri ini merupakan bakteri Gram positif, aerobik atau anaerobik fakultatif, dapat membentuk spora, berbentuk batang, serta dapat diisolasi dari berbagai sumber, seperti tanah, makanan dan saluran pencernaan. *B. subtilis* merupakan salah satu bakteri probiotik yang banyak ditemukan dalam berbagai produk makanan dan minuman, serta preparat farmasi karena kemampuannya dalam membentuk endospora, sehingga mampu bertahan di dalam lingkungan yang

tidak bersahabat (Elshaghabee *et al.*, 2017).

B. subtilis strain G8 merupakan salah satu *B. subtilis* yang berpotensi dimanfaatkan dalam industri makanan fungsional. Strain ini merupakan salah satu koleksi bakteri dari laboratorium Program Studi Biologi Universitas Pelita Harapan yang diisolasi dari natto, makanan fermentasi tradisional Jepang (Lucy *et al.*, 2019). Hasil pengujian aktivitas fibrinolitik secara *in vitro* dan *whole-genome sequencing* (WGS) menunjukkan adanya aktivitas fibrinolitik yang signifikan dari *B. subtilis* G8 (Dikson *et al.*, 2022; Pinontoan *et al.*, 2021).

Beberapa produk berisikan probiotik dikombinasikan dengan senyawa-senyawa lain, seperti kolagen karena diketahui memiliki efek positif bagi kesehatan. Kolagen merupakan salah satu protein utama yang diproduksi oleh tubuh dan berperan sebagai komponen penyusun utama dari kulit, tendon dan tulang serta mendukung pertumbuhan sel (Bianchi *et al.*, 2022; Geahchan *et al.*, 2022). Salah satu penelitian menunjukkan adanya interaksi positif antara kolagen dan proses fermentasi susu yang dimediasi oleh probiotik (Szopa *et al.*, 2022). Selain diproduksi secara alami oleh tubuh, beberapa jenis kolagen juga dapat diperoleh dari organisme yang hidup di

laut, seperti dari ikan, spons dan ubur-ubur (Avila-Rodríguez, 2017).

Indonesia merupakan salah satu negara produsen boga bahari terbesar di dunia, seperti ikan tuna. Indonesia diketahui menyuplai hingga 19,1% dari pasokan tuna global, atau setara dengan sekitar 1,5 juta ton ikan (Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2024). Meskipun demikian, hanya bagian-bagian tertentu ikan tuna yang dikonsumsi sebagai makanan, sementara setengah bagian lainnya (seperti jeroan, kepala, kulit, tulang, sirip, atau ekor) dianggap sebagai produk sampingan (Najoan, 2019). Ironisnya, produk sampingan yang tidak dimanfaatkan ini dianggap sampah dan dibuang begitu saja sehingga meningkatkan jumlah limbah yang dihasilkan industri perikanan. Limbah tersebut akan menyebabkan permasalahan karena dapat melepaskan senyawa metana ke atmosfer. Selain itu, minimnya kesadaran dari oknum tertentu yang membuang limbah ikan ke laut dapat memicu berbagai permasalahan lingkungan, dimulai dari peningkatan keasaman laut dan kadar amonia, akumulasi alga atau plankton, penipisan oksigen di laut, yang akhirnya menyebabkan penurunan populasi kehidupan laut (Dinas Lingkungan Hidup Kabupaten Buleleng, 2022; Edwards *et al.*, 2024). Oleh karena itu, berbagai upaya pengurangan limbah

ikan perlu dilakukan. Salah satu caranya adalah dengan memroses produk sampingan ikan tuna secara efisien menjadi hidrolisat kolagen ikan yang dapat dimanfaatkan untuk berbagai kebutuhan.

Salah satu hal yang dapat dilakukan adalah menambahkan kolagen ke dalam medium untuk mendukung pertumbuhan probiotik. Namun, efek positif yang ditimbulkan dari penambahan hidrolisat kolagen dalam mendukung pertumbuhan bakteri probiotik masih belum diketahui dengan jelas, sehingga perlu dievaluasi lebih lanjut. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk menganalisis potensi pemanfaatan hidrolisat kolagen, sebagai produk sampingan dari ikan tuna, dalam mendukung pertumbuhan kandidat bakteri probiotik *B. subtilis* G8.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: medium *Nutrient Broth* (Merck, Jerman) dan *bacteriological agar* (Himedia, India).

Alat

Alat yang digunakan adalah spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific GENESYS 50, Amerika Serikat), inkubator (Mettler IN75, Jerman), *refrigerated centrifuge* (BioRad,

Amerika Serikat), pH meter (SI Analytics Lab 845, Jerman), dan *laminar air flow* (Esco LHS 4AG, Amerika Serikat).

Sampel

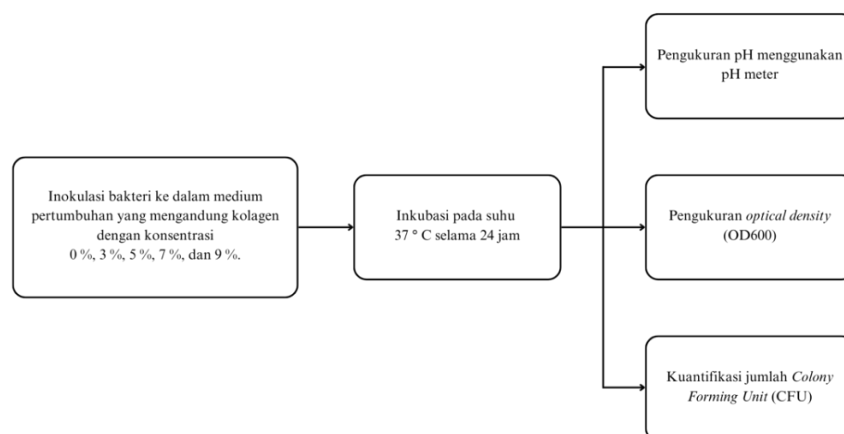
Sampel yang digunakan adalah isolat *Bacillus subtilis* G8, yang merupakan koleksi Program Studi Biologi yang diisolasi dari makanan tradisional Jepang natto (Lucy *et al.*, 2019). Hidrolisat kolagen murni dari sisa ikan tuna disediakan oleh P.T. Collabit Sukses Bersama (Bitung, Sulawesi Utara).

Kultur isolat *Bacillus subtilis*

Isolat bakteri *B. subtilis* G8 ditumbuhkan dalam media *nutrient broth* pada suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah waktu inkubasi selesai, dilakukan pengukuran *optical density* (OD) dari sel bakteri dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm.

Uji pertumbuhan bakteri

Isolat *B. subtilis* G8 diinokulasikan ke dalam media pertumbuhan yang telah disuplementasi hidrolisat kolagen dengan konsentrasi 3, 5, 7 atau 9 % (weight/volume). Sebagai pembanding/kontrol, medium tanpa suplementasi hidrolisat kolagen dipergunakan. Isolat bakteri ditumbuhkan selama 24 jam pada suhu 37 °C. Selanjutnya, dilakukan pengukuran OD pada panjang gelombang 600 nm (OD₆₀₀) menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan pH larutan menggunakan pH meter (**Gambar 1**). Kemudian, dilakukan dilusi bertingkat (10^{-9} – 10^{-10}) pada larutan untuk perhitungan *colony forming unit* (CFU). Pengulangan sebanyak tiga kali dilakukan untuk masing-masing pengujian.



Gambar 1. Alur penelitian pengujian penambahan berbagai konsentrasi hidrolisat kolagen. Parameter penilaian setelah *Bacillus subtilis* strain G8 ditumbuhkan pada suhu 37oC selama 24 jam meliputi pengukuran pH, pengukuran OD₆₀₀, serta kuantifikasi bakteri hidup dalam *colony-forming unit*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bacillus subtilis merupakan probiotik yang banyak digunakan dalam berbagai industri, seperti industri makanan, sehingga berbagai upaya dilakukan untuk meningkatkan produksi bakteri ini secara efektif (Mohamadzadeh & Abbaspour, 2022). Pada penelitian ini, dilakukan analisis kuantitatif untuk mengevaluasi pengaruh suplementasi hidrolisat kolagen terhadap pertumbuhan isolat *B. subtilis* G8. Salah satu metode evaluasi yang digunakan adalah pengukuran *optical density* pada panjang gelombang 600 nm (OD_{600}) yang merepresentasikan kepadatan bakteri ini dalam media pertumbuhannya. Hasil yang diperoleh dari pengukuran OD_{600} menunjukkan bahwa konsentrasi bakteri pada medium kultur yang

disuplementasi oleh hidrolisat kolagen (3, 5, 7, serta 9%) setidaknya menghasilkan nilai absorbansi dua kali lipat lebih tinggi daripada konsentrasi bakteri pada medium tanpa suplementasi hidrolisat kolagen (kontrol). Bakteri yang disuplementasi dengan hidrolisat kolagen 9% menunjukkan hasil OD_{600} tertinggi, yaitu $0,67 \pm 0,15$. Hasil pengamatan juga menunjukkan nilai OD_{600} antara penambahan dengan berbagai konsentasi hidrolisat kolagen tidak berbeda jauh dan masih di dalam rentang variasi. Hasil ini mengindikasikan adanya pengaruh positif suplementasi hidrolisat kolagen terhadap peningkatan pertumbuhan kandidat probiotik *B. subtilis* G8. Hasil pengukuran OD_{600} dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Hasil perhitungan rerata *optical density* 600 nm (OD_{600}) pada masing-masing perlakuan

Perlakuan	Rerata $OD_{600} \pm SE$
NB	$0,23 \pm 0,06$
NB + 3% hidrolisat kolagen	$0,58 \pm 0,08$
NB + 5% hidrolisat kolagen	$0,61 \pm 0,09$
NB + 7% hidrolisat kolagen	$0,57 \pm 0,09$
NB + 9% hidrolisat kolagen	$0,67 \pm 0,15$

Keterangan: Medium *nutrient broth* (NB) adalah medium yang digunakan untuk menumbuhkan isolat bakteri; sedangkan 3, 5, 7 dan 9% merupakan konsentrasi hidrolisat kolagen yang ditambahkan ke dalam media NB. Kontrol adalah media NB tanpa penambahan hidrolisat kolagen. Nilai OD_{600} merupakan nilai rata-rata dari hasil pengujian spektrofotometer dengan pengulangan sebanyak tiga kali. SE, *standard error*.

Selanjutnya, dilakukan perhitungan *colony-forming unit* (CFU) yang merepresentasikan jumlah sel bakteri yang hidup (Wendel, 2022). Perhitungan CFU

akan menunjukkan jumlah bakteri hidup yang lebih akurat dibandingkan pengukuran OD_{600} yang notabene mengukur refraksi cahaya atau kekeruhan

media pertumbuhan (Hazan *et al.*, 2012). Perhitungan CFU menunjukkan adanya peningkatan jumlah koloni bakteri *B. subtilis* G8 yang ditumbuhkan dalam medium kultur NB dengan suplementasi hidrolisat kolagen. **Tabel 2** menunjukkan nilai CFU tertinggi diperoleh pada kultur bakteri yang disuplementasi hidrolisat kolagen 5% dengan rerata $7,87 \times 10^{11}$

CFU/mL, sementara pertumbuhan bakteri terendah didapatkan pada kultur bakteri tanpa suplementasi hidrolisat kolagen ($3,10 \times 10^{11}$ CFU/mL). Hasil ini menunjukkan bahwa konsentrasi 5% merupakan konsentrasi yang paling optimum dalam meningkatkan kepadatan sel bakteri.

Tabel 2. Rerata hasil perhitungan *colony-forming unit* (CFU) pada masing-masing perlakuan

Perlakuan	CFU		
	10^{-9}	10^{-10}	Rerata
NB	$1,6 \times 10^{11}$	$0,8 \times 10^{12}$	$3,10 \times 10^{11}$
NB + 3% hidrolisat kolagen	$2,6 \times 10^{11}$	$1,2 \times 10^{12}$	$5,07 \times 10^{11}$
NB + 5% hidrolisat kolagen	$3,6 \times 10^{11}$	$2,0 \times 10^{12}$	$7,87 \times 10^{11}$
NB + 7% hidrolisat kolagen	$3,0 \times 10^{11}$	$1,2 \times 10^{12}$	$6,07 \times 10^{11}$
NB + 9% hidrolisat kolagen	$5,6 \times 10^{11}$	$1,0 \times 10^{12}$	$5,93 \times 10^{11}$

Keterangan: NB merupakan medium *nutrient broth* yang digunakan untuk menumbuhkan isolat bakteri; 3, 5, 7 dan 9% merupakan konsentrasi hidrolisat kolagen yang digunakan dalam perlakuan atau ditambahkan dalam media NB. Hidrolisat kolagen tidak ditambahkan pada kontrol (hanya NB). 10^{-9} dan 10^{-10} adalah faktor dilusi yang digunakan untuk perhitungan CFU. Nilai yang tercantum pada hasil untuk masing-masing faktor dilusi merupakan hasil perhitungan CFU dengan pengulangan sebanyak tiga kali. CFU, *colony-forming unit*.

Selain melakukan pengukuran OD₆₀₀ dan perhitungan CFU, observasi perbedaan pH larutan medium yang diberi perlakuan dibandingkan dengan kontrol juga dilakukan untuk melihat pengaruh suplementasi hidrolisat kolagen terhadap pH larutan medium. Bila dibandingkan dengan kontrol, suplementasi hidrolisat kolagen berdampak pada penurunan pH

medium menjadi lebih asam. Meskipun demikian, tidak dijumpai perbedaan pH yang substansial diantara keempat perlakuan konsentrasi hidrolisat kolagen yang ditambahkan ke dalam medium. **Tabel 3** menunjukkan bahwa pH yang paling asam diamati pada larutan medium kultur yang disuplementasi hidrolisat kolagen dengan konsentrasi 3%.

Tabel 3. Rerata hasil pengukuran pH pada masing-masing perlakuan

Perlakuan	Rata-rata pH $\pm$ SE
NB	6,93 $\pm$ 0,72
NB + 3 % hidrolisat kolagen	5,51 $\pm$ 0,55
NB + 5 % hidrolisat kolagen	5,95 $\pm$ 0,45
NB + 7 % hidrolisat kolagen	5,55 $\pm$ 0,47
NB + 9 % hidrolisat kolagen	5,83 $\pm$ 0,35

Keterangan: NB merupakan medium *nutrient broth* yang digunakan untuk menumbuhkan isolat bakteri; 3, 5, 7 dan 9% merupakan konsentrasi hidrolisat kolagen yang digunakan dalam perlakuan atau ditambahkan dalam media NB. Sedangkan hidrolisat kolagen tidak ditambahkan pada kontrol. Nilai yang tercantum pada data pengukuran pH merupakan nilai rata-rata dari hasil perhitungan pH dengan pengulangan sebanyak tiga kali. SE, *standard error*.

Hasil yang diperoleh dari hasil pengukuran OD₆₀₀, perhitungan CFU, serta pengukuran pH menunjukkan adanya pengaruh positif dari suplementasi hidrolisat kolagen terhadap pertumbuhan kandidat bakteri probiotik *B. subtilis* G8 di media NB. Berdasarkan hasil yang diperoleh, suplementasi hidrolisat kolagen dengan konsentrasi 5% diduga memiliki pengaruh paling optimum dalam meningkatkan pertumbuhan sel bakteri. Hasil ini sesuai dengan penelitian Szopa *et al.* (2022) yang mengevaluasi pengaruh suplementasi kolagen terhadap proses fermentasi susu. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa penambahan kolagen berdampak positif terhadap proses fermentasi susu serta efek yang paling optimum diamati pada kultur bakteri yang disuplementasi dengan 5% kolagen. Penelitian Szopa *et al.* (2022) juga menunjukkan bahwa produksi asam laktat tertinggi (mengakibatkan penurunan pH

terbesar) diamati pada larutan yang disuplementasi hidrolisat kolagen dengan konsentrasi 3%, dimana hasil tersebut sejalan dengan hasil penelitian ini.

Pengaruh positif dari suplementasi kolagen dalam pertumbuhan kandidat probiotik *B. subtilis* G8 diduga dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi yang merangsang produksi produk-produk tertentu yang dapat mendukung pertumbuhan bakteri tersebut. Nutrisi merupakan salah satu kebutuhan utama bakteri untuk tumbuh dan berfungsi dengan optimal (Kumar & Pundir, 2021). Keberadaan hidrolisat kolagen dalam larutan media akan berfungsi sebagai sumber nitrogen tambahan, salah satu nutrisi makro esensial bagi pertumbuhan bakteri, dalam bentuk peptida kecil. Keberadaan peptida kecil kemudian memicu *B. subtilis* untuk memproduksi *short-chain fatty acids* (SCFA), seperti asetat, propionat, dan butirat. Ketiga produk ini merupakan

SCFA penting untuk menunjang pertumbuhan bakteri, khususnya bakteri-bakteri probiotik yang tinggal di usus (Mei *et al.*, 2020; Kumar & Pundir, 2021; Fusco *et al.*, 2023). Dengan adanya peningkatan sumber nitrogen, sel bakteri terpicu untuk menghasilkan lebih banyak SCFA yang menyebabkan melimpahnya nutrisi penunjang pertumbuhan dan kondisi lingkungan yang lebih ideal untuk bermultiplikasi.

Satu hal yang menarik untuk dikaji lebih lanjut adalah membandingkan efek dari suplementasi kolagen terhadap suplementasi protein total. Walaupun suplementasi kolagen memberikan dampak positif untuk pertumbuhan bakteri benefisial dalam penelitian ini dan penelitian lainnya (Baek *et al.*, 2023), kolagen hanya mengandung 19 asam amino (Gauza-Włodarczyk *et al.* 2017) sehingga mungkin dapat menjadi keterbatasan dalam menggunakan hidrolisat kolagen dalam menunjang pertumbuhan bakteri ketika dibandingkan dengan suplementasi protein total. Namun, suplementasi protein total dalam jangka waktu lama dilaporkan dapat mengurangi pertumbuhan bakteri baik dalam usus manusia (Moreno-Pérez *et al.* 2018). Oleh karena itu, penelitian lebih lanjut dibutuhkan untuk menjawab pertanyaan ini.

Selain nutrisi, pH merupakan faktor penting lain yang memengaruhi pertumbuhan bakteri. Adanya penurunan pH larutan medium menunjukkan adanya pengaruh suplementasi hidrolisat kolagen terhadap aktivitas *B. subtilis*. Penurunan pH ini kemungkinan besar disebabkan adanya produksi asam laktat dan/atau SCFA oleh *B. subtilis* (Fritze & Claus, 1995; Foucher & Tubben, 2023).

Sebagai bakteri probiotik yang mampu membentuk spora, *B. subtilis* memiliki toleransi yang tinggi terhadap pH yang rendah serta memiliki kemampuan adhesi pada protein matriks, seperti *fibronectin* dan kolagen (Leñini *et al.*, 2023). Kemampuan ini menyebabkan *B. subtilis* mampu bertahan hidup lain lebih baik pada kondisi asam. Disisi lain, penurunan pH dapat menciptakan kondisi lingkungan yang kurang baik bagi golongan bakteri lain, misalnya golongan bakteri patogen, seperti *Listeria monocytogenes* yang tumbuh optimal pada pH yang cenderung netral. Akibatnya, bakteri-bakteri lain yang lebih sensitif dan tidak resisten terhadap perubahan pH lingkungan tidak dapat berkompetisi dan akan tereleminasi oleh pH asam, sementara *B. subtilis* yang memiliki toleransi lebih tinggi terhadap pH asam dapat tetap hidup. Hal ini menyebabkan *B. subtilis* dapat mengkolonisasi dan memanfaatkan nutrisi

dalam larutan media sehingga berimplikasi pada peningkatan pertumbuhannya. Oleh karena itu, kemampuan bakteri *B. subtilis* dalam menoleransi pH asam menjadi salah satu karakteristik unik yang dapat dimaksimalkan untuk meningkatkan fungsinya sebagai bakteri probiotik, terutama dengan adanya suplementasi hidrolisat kolagen yang diberikan dalam larutan medium (Setiani *et al.*, 2019; Kumar & Pundir, 2021).

KESIMPULAN

Suplementasi hidrolisat kolagen yang berasal dari sisa ikan tuna memberikan dampak positif dalam meningkatkan densitas sel *B. subtilis* G8. Suplementasi hidrolisat kolagen ke dalam media pertumbuhan juga menyebabkan penurunan pH larutan. Konsentrasi hidrolisat kolagen yang paling optimal dalam penelitian ini adalah 5%.

SARAN

Penelitian lanjutan perlu dilakukan dengan jumlah sampel dan konsentrasi yang diperbesar agar data dapat dievaluasi secara statistik dengan baik. Uji perbandingan dengan kolagen yang didapatkan dari limbah ikan lain (misal ikan air tawar) juga dapat dilakukan untuk menilai kelebihan kolagen limbah ikan tuna. Selain itu, uji lanjutan perlu dilakukan untuk mengkonfirmasi pengaruh

suplementasi kolagen dibandingkan suplementasi protein total. Penelitian lanjutan juga diperlukan untuk mengkaji efek suplementasi hidrolisat kolagen terhadap bakteri probiotik lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Pelita Harapan (P-13-FaST/VII/2023).

DAFTAR PUSTAKA

- Avila-Rodríguez, M. I., Rodríguez-Barroso, L. G., & Sánchez, M. L. (2017). Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 17(1), 20–26. <https://doi.org/10.1111/jocd.12450>
- Baek, G. H., Yoo, K. M., Kim, S. Y., Lee, D. H., Chung, H. Y., Jung, S. C., Park, S. K., & Kim, J. S. (2023). Collagen peptide exerts an anti-obesity effect by influencing the Firmicutes/Bacteroidetes ratio in the gut. *Nutrients*, 15, 2610. <https://doi.org/10.3390/nu15112610>
- Bianchi, F. M., Angelinetta, C., Rizzi, G., Praticò, A., & Villa, R. (2022). Evaluation of the efficacy of a hydrolyzed collagen supplement for improving skin moisturization, smoothness, and wrinkles. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 15(3), 48–52.
- Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M. E., Tremblay, A., & Ouwehand, A. C. (2020). Criteria to qualify microorganisms as "probiotic" in foods and dietary supplements. *Frontiers in Microbiology*, 11, Article 1662.

- <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01662>
- Dikson, D., Victor, H., Jong, D., Sanjaya, A., Samantha, A., Jo, J., & Pinontoan, R. (2022). Whole-genome analysis of *Bacillus subtilis* G8 isolated from natto. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(3).
<https://doi.org/10.13057/biodiv/d230313>
- Dinas Lingkungan Hidup Kabupaten Buleleng. (2022). *Pengasaman laut serta dampaknya terhadap ekosistem laut*. Pemerintah Kabupaten Buleleng.
https://dlh.bulelengkab.go.id/informasi/detail/artikel/85_pengasaman-laut-seerta-dampaknya-terhadap-ekosistem-laut
- Edwards, T. M., Puglis, H. J., Kent, D. B., Durán, J. L., Bradshaw, L. M., & Farag, A. M. (2024). Ammonia and aquatic ecosystems: A review of global sources, biogeochemical cycling, and effects on fish. *Science of The Total Environment*, 907, 167911.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167911>
- Elshagabee, F. M. F., Rokana, N., Gulhane, R. D., Sharma, C., & Panwar, H. (2017). *Bacillus* as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 8, Article 1490.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01490>
- Foucher, C. D., & Tubben, R. E. (2023). *Lactic acidosis*. StatPearls Publishing.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470202/>
- Fritze, D., & Claus, D. (1995). Spore-forming, lactic acid producing bacteria of the genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. In B. J. B. Wood & W. H. Holzapfel (Eds.), *The genera of lactic acid bacteria: The lactic acid bacteria* (Vol. 2, pp. 359–370). Springer.
https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0_11
- Fusco, W., Lorenzo, M. B., Cintoni, M., Porcari, S., Rinninella, E., Kaitsas, F., ... & Ianaro, G. (2023). Short-chain fatty-acid-producing bacteria: Key components of the human gut microbiota. *Nutrients*, 15(9), 2211.
<https://doi.org/10.3390/nu15092211>
- Gauza-Włodarczyk, M., Kubisz, L., & Włodarczyk, D. (2017). Amino acid composition in determination of collagen origin and assessment of physical factors effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104(Pt A), 987–991.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.013>
- Geahchan, S., Baharlouei, P., & Rahman, A. (2022). Marine collagen: A promising biomaterial for wound healing, skin anti-aging, and bone regeneration. *Marine Drugs*, 20(1), 61–77.
<https://doi.org/10.3390/md20010061>
- Hazan, R., Que, Y. A., Maura, D., & Rahme, L. G. (2012). A method for high-throughput determination of viable bacterial cell counts in 96-well plates. *BMC Microbiology*, 12, Article 259.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-259>
- Kementerian Kelautan dan Perikanan. (2024). *Hari Tuna Sedunia, KKP akan tingkatan kualitas dan jangkauan pasar tuna Indonesia*.
<https://kkp.go.id/news/news-detail/hari-tuna-sedunia-kkp-akan-tingkatan-kualitas-dan-jangkauan-pasar-tuna-indonesia.html>

- Kumar, R., & Pundir, S. (2021). Bacterial cell, classification and required essential contents for growth. *Asian Journal of Pharmacy and Technology*, 11(2), 181–187. <https://doi.org/10.52711/2231-5713.2021.00030>
- Leñini, C., Rodriguez, A. F., Goñi, A. J., Rateni, L., Nakamura, A., & Grau, R. R. (2023). Probiotic properties of *Bacillus subtilis* DG101 isolated from the traditional Japanese fermented food natto. *Frontiers in Microbiology*, 14, Article 1253480. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1253480>
- Lucy, J., Raharjo, P. F., Elvina, Florencia, L., Susanti, A. I., & Pinontoan, R. (2019). Clot lysis activity of *Bacillus subtilis* G8 isolated from Japanese fermented natto soybeans. *Applied in Food Biotechnology*, 6, 101–109. <https://doi.org/10.22037/afb.v6i2.22479>
- Mei, F. F., Duan, Z. W., Chen, M. X., Lu, J. F., Zhao, M. H., Li, L. H., Shen, X. R., Xia, G. H., & Chen, S. J. (2020). Effect of a high-collagen peptide diet on the gut microbiota and short-chain fatty acid metabolism. *Journal of Functional Foods*, 75(3), Article 104278. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104278>
- Mohamadzadeh, M., & Abbaspour, S. (2024). Probiotic applications of *Bacillus subtilis*. In H. Razafindralambo (Ed.), *Bacillus subtilis – Functionalities and emerging applications* (pp. xx–xx). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.1007134>
- Moreno-Pérez, D., Bressa, C., Bailén, M., Hamed-Bousdar, S., Naclerio, F., Carmona, M., Pérez, M., González-Soltero, R., Montalvo-Lominchar, M. G., Carabaña, C., & Larrosa, M. (2018). Effect of a protein supplement on the gut microbiota of endurance athletes: A randomized, controlled, double-blind pilot study. *Nutrients*, 10, 337. <https://doi.org/10.3390/nu10030337>
- Najoan, M. (2019). *Limbah ikan sebagai pakan ternak*. Fakultas Ilmu Budaya UNSRAT. <https://repo.unsrat.ac.id/4981/1/3.%20Limbah%20Ikan%20Sebagai%20pakan%20Ternak%20%28sebagai%20Editor%29.pdf>
- Pantazi, A. C., Balasa, A. L., Mihai, C. M., Chisnoiu, T., Lupu, V. V., Kassim, M. A. K., ... & Cambrea, S. C. (2023). Development of gut microbiota in the first 1000 days after birth and potential interventions. *Nutrients*, 15(16), 3647. <https://doi.org/10.3390/nu15163647>
- Pinontoan, R., Elvina, Sanjaya, A., & Jo, J. (2021). Fibrinolytic characteristics of *Bacillus subtilis* G8 isolated from natto. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 40(3), 144–149. <https://doi.org/10.12938/bmfh.2020-071>
- Setiani, B. E., Pramono, Y. B., & Purwitasari, L. (2019). Review on pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, the detection and the sequencing gene methods isolated from meat products. *Journal of Applied Food Technology*, 6(2), 44–51. <https://doi.org/10.17728/jaft.6460>
- Szopa, K., Znamirska-Piotrowska, A., Szajnar, K., & Pawlos, M. (2022). Effect of collagen types, bacterial strains, and storage duration on the quality of probiotic fermented sheep's milk. *Molecules*, 27(9), Article 3028. <https://doi.org/10.3390/molecules27093028>
- World Health Organization Expert Consultation. (2001). *Evaluation of*

health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization.
<https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/y63>