

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM PROTEASE DAN UJI  
KEMAMPUAN ANTIBIOTIK MIKROBA DARI TAUCO**

**(Skripsi)**

**Oleh**

**AYU IMANI**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2018**

## **ABSTRACT**

### **ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEASE ENZYME AND ANTIBIOTIC ACTIVITIES MICROORGANISM FROM TAUCO**

**By**

**Ayu Imani**

Tauco is one of fermented foods that has protease producing bacteria potentially to be explored. This study was aimed to select isolates of proteolytic bacteria that produce high protease enzymes. Based on isolation results with spread plate method 15 candidates were obtained. After screening stage using streak plate method, based on the proteolytic index and its unit activity of the enzyme that measured by Kunitz method, three isolates were selected. The isolates were A.4.6, A.5.2 and A.5.8. The isolates showed the high enzyme activity and the highest activity was achieved by isolate A.5.2 that were 15336 U/mL and 14432 U/mg for its unit and specific activity, respectively. The three selected isolates also showed antibiotic activity with the highest inhibiting zone for isolate A.5.2 of 5.6 mm in diameter. Three selected isolates were motile and gram-negative.

**Keywords:** Proteolytic Bacteria, Protease Enzyme, Tauco Fermentation, Degradation of Protease.

## ABSTRAK

### ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM PROTEASE DAN UJI KEMAMPUAN ANTIBIOTIK MIKROBA DARI TAUCO

Oleh

Ayu Imani

Tauco merupakan salah satu pangan fermentasi yang mempunyai bakteri penghasil protease yang berpotensi untuk dieksplor. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui isolat bakteri proteolitik yang menghasilkan enzim protease tertinggi. Berdasarkan hasil isolasi dengan metode *spread plate* diperoleh 15 isolat kandidat. Setelah melalui tahap skrining dengan metode *streak plate* berdasarkan indeks proteolitik dan pengukuran aktivitas unit enzim dengan metode Kunitz terpilih tiga isolat yaitu isolat A.4.6, A.5.2 dan A.5.8. Tiga isolat terpilih menunjukkan aktivitas enzim yang tinggi dan aktivitas tertinggi pada isolat A.5.2 yaitu 15336 U/mL dan 14432 U/mg untuk aktivitas unit dan aktivitas spesifiknya berturut-turut. Tiga isolat terpilih juga menunjukkan aktivitas antibiotik dengan zona hambat tertinggi pada isolat A.5.2 yaitu sebesar 5,6 mm diameter. Tiga isolat terpilih bersifat motil dan berjenis gram negatif.

**Kata kunci:** *Bakteri Proteolitik, Enzim Protease, Fermentasi Tauco, Degradasi protein.*

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM PROTEASE DAN UJI  
KEMAMPUAN ANTIBIOTIK MIKROBA DARI TAUCO**

**Oleh**

**Ayu Imani**

**Skripsi**

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar  
SARJANA SAINS**

**Pada**

**Jurusan Kimia  
Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam  
Universitas Lampung**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2018**

Judul Skripsi : **ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM  
PROTEASE DAN UJI KEMAMPUAN ANTIBIOTIK  
MIKROBA DARI TAUCO**

Nama Mahasiswa : *Ayu Imani*

No. Pokok Mahasiswa : 1217011010

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Ketua Jurusan Kimia

Pembimbing

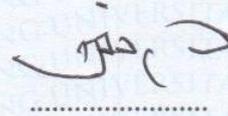
**Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T.**  
NIP 19740705 200003 1 001

**Mulyono, Ph.D.**  
NIP 19740611 200003 1 002

**MENGESAHKAN**

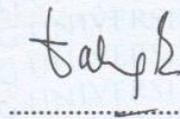
1. Tim Penguji

Ketua : **Mulyono, Ph.D.**



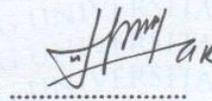
.....

Penguji  
Bukan Pembimbing : **Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.**



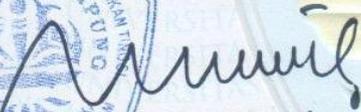
.....

Penguji  
Bukan Pembimbing : **Dr. Nurhasanah, M.Si.**



.....

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



**Prof. Warsito, S.Si., D.E.A., Ph.D.**  
NIP. 19710212 199512 1 001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **07 Juni 2018**

## **RIWAYAT HIDUP**

Penulis dilahirkan di Pajaresuk, pada 03 Agustus 1994, sebagai anak pertama dari lima bersaudara, putri dari Bapak Sanyono dan Ibu Agustina Kartika Wulandari.

Jenjang pendidikan diawali dari Taman Kanak-kanak di TK Dharma Wanita Gumukmas Pagelaran diselesaikan pada tahun 2000, Sekolah Dasar (SD) di SD Negeri 1 Pajaresuk diselesaikan pada tahun 2006. Sekolah Menengah Pertama (SMP) di SMP Negeri 1 Pringsewu diselesaikan pada tahun 2009, dan Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMA Negeri 1 Pringsewu diselesaikan pada tahun 2012. Tahun 2012, penulis terdaftar sebagai Mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung (Unila) melalui jalur SNMPTN (Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri).

Pada tahun 2017 Penulis melakukan Praktik Kerja Lapangan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Unila di Bandar Lampung. Selama menjadi mahasiswa penulis pernah menjadi asisten praktikum Kimia Dasar Jurusan Budidaya Perairan dan Perikanan (BDPI) serta Jurusan Teknologi Hasil Petanian (THP) tahun 2015, praktikum Biokimia Jurusan Teknologi Hasil Pertanian dan jurusan Biologi tahun 2016, praktikum Biokimia Jurusan Teknologi Hasil Pertanian tahun 2017, dan praktikum Teknik Penelitian dan Rekayasa Biokimia (TPRB) jurusan Kimia tahun

2017. Penulis juga terdaftar sebagai Kader Muda Himaki (KAMI) periode kepengurusan 2012/2013. Aktif sebagai anggota bidang Kaderisasi dan Pengembangan Organisasi (KPO) Himaki periode kepengurusan 2013/2014 dan periode kepengurusan 2014/2015. Penulis juga aktif dilembaga kemahasiswaan lain yaitu Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) FMIPA Unila sebagai Anggota Pengembangan Sumber Daya Mahasiswa (PSDM) tahun kepengurusan 2013/2014. Pada tahun 2016 penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Sukapura Kecamatan Sumberjaya Kabupaten Lampung Barat, pada bulan Januari sampai Maret 2016.

## *MOTTO*

Jika apa yang kamu ucapkan adalah doa, maka apa yang  
kamu pikirkan adalah doa.  
Tetaplah berpikir positif.

Dunia terus berputar, meskipun kita berlari dunia tidak pernah menunggu kita.  
Jadi, jangan hanya diam.

Allah tidak membebani seseorang itu melainkan sesuai dengan  
kesanggupannya.  
(Q.S. Al-Baqarah: 286)

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

*Dengan Rahmat Allah yang Maha Pengasih dan Penyayang  
Kupersembahkan Karya Sederhanaku ini*

*Kepada:*

*Allah SWT pemilik jiwa ragaku, yang telah menganugerahkan begitu banyak kebahagiaan dan pelajaran dalam hidupku serta Nabi Muhammad SAW sebagai suri tauladanku,*

*Kedua orang tuaku*

*Bapakku Sanyono dan Ibuku Agustina Kartika Wulandari*

*Tak akan pernah ada sesuatu yang bisa menggantikan kasih sayang, kesabaran, kebaikan dan keikhlasan kalian, semoga Allah membalas dengan sebaik-baiknya pembalasan.*

*Membahagiakan kalian adalah tujuan utamaku.*

*Adik-adikku yang kusayangi Sevy Dwi Anggraini, Amd., Sava Ramadhina Tiffany, Yusuf Syahrul Ramadhan dan Muhammad Bintang Saputra serta nenekku Sutinah Rasmadi, Amd.*

*Segenap Keluarga besarku yang selalu mendoakan keberhasilanku,*

*Guru-guru dan Dosen-Dosen yang selalu membagi ilmunya untukku*

*Sahabat- sahabat terbaik yang berjuang bersamaku*

*dan Almamater tercinta Universitas Lampung*

## SANWACANA

Segala puji hanya milik Allah SWT yang telah memberikan begitu banyak nikmat,

sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi dengan judul **”Isolasi dan Karakterisasi Enzim Protease dan Uji Kemampuan Antibiotik Mikroba dari Tauco”** sebagai syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Dalam pelaksanaan dan penulisan skripsi ini tidak lepas dari kesulitan dan rintangan. Namun, dengan kehendak Allah SWT maka skripsi ini terselesaikan. Penulis menyadari sepenuhnya bahwa terselesaikannya penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua yang sangat aku cintai dan sangat berjasa dalam hidupku, Bapak Sanyono dan Ibu Agustina Kartika Wulandari yang telah memberikan kasih sayang, perhatian, pengertian, semangat, motivasi, dukungan moril maupun materil, dan doa untuk keberhasilanku.
2. Bapak Mulyono, Ph.D., selaku pembimbing utama yang telah banyak memberikan ilmu pengetahuan, bimbingan, gagasan, bantuan, dukungan,

semangat, kritik dan saran kepada penulis dalam proses perencanaan dan pelaksanaan penelitian serta dalam penulisan skripsi ini.

3. Ibu Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S., selaku pembahas pertama yang telah memberikan kritik, saran dan arahan kepada penulis sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik dan selaku dosen Pembimbing Akademik (PA) atas kesediaannya untuk memberikan bimbingan, bantuan, nasehat dan informasi yang bermanfaat kepada penulis selama menempuh pendidikan di jurusan Kimia FMIPA Unila.
4. Ibu Dr. Nurhasanah, M.Si., selaku pembahas kedua yang telah memberikan semangat, kritik, saran dan bimbingan kepada penulis sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.
5. Bapak Prof. Warsito, D.E.A., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
6. Bapak Dr. Suropto Dwi Yuwono, M. T., selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah memberikan bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
7. Seluruh dosen dan staff administrasi di Jurusan Kimia FMIPA Unila yang telah membantu, mendidik, dan memberikan ilmu pengetahuan yang sangat berguna kepada penulis selama kuliah.
8. Nenekku Sutinah Rasmadi, Amd. yang telah memberikan banyak pelajaran dalam kehidupan dan terimakasih atas kasih sayang, perhatian dan semangat yang diberikan kepada penulis.
9. Adik-adikku Sevy Dwi Anggraini, A.md., Sava Ramadhina Tiffany, Yusuf Syahrul Ramadhan dan Muhammad Bintang Saputra yang selalu memberikan

perhatian, keceriaan, pengertian, doa, semangat, motivasi dan menantikan keberhasilanku.

10. Sahabatku Ayu Setianingrum, S.Si. terimakasih atas kebersamaanya dalam suka dan duka selama menuntut ilmu di perguruan tinggi hingga saat ini, terimakasih atas semangat, dukungan dan doa yang diberikan.
11. Akak Upinku Eka Hurwaningsih, S.Si, yang setia mendengarkan keluh kesah penulis dan terimakasih atas kebersamaanya baik dalam suka maupun duka.
12. Teman-teman “Julita Jempol Turah” Ana Maria Kristiani, S.Si., Eka Hurwaningsih, S.Si., Fifi Adriyanti, S.Si., Siti Nur Halimah, S.Si., Sukamto, S.Si., Rizal Rio Saputra, S.Si., dan Agung Setyo Wibowo, S.Si, terimakasih telah percaya kepada penulis sehingga penulis sampai di tahap akhir perkuliahan dan terimakasih telah menguatkan.
13. Rekan penelitianku Meta Fosfi Berliyana, S.Si. yang selalu sabar dan selalu bersama hingga penelitian usai, terimakasih telah berbagi ilmu, dan terimakasih untuk cerita yang telah terukir selama berada di laboratorium Biokimia.
14. Lelaki siap siaga Tri Marital, S.Si. dan Sofian Sumilat Rizki, S.Si., yang selalu ada dan selalu bisa memberikan bantuannya selama masa perkuliahan hingga saat ini.
15. Keluargaku Kimia angkatan 2012, Adi Setiawan, Aditian Sulung S, Agus Ardiansyah (Adam), Ajeng Wulandari, Ana Maria Kristiani, Apri Welda, Arif Nur Hidayat, Arya Irfansyah, Atma Istanami, Ayu Setianingrum, Deborah Jovita Simangunsong, Derry Vardela, Dewi Aniatul F, Diani Iska Miranti, Dwi Anggraini, Edi Suryadi, Eka Hurwaningsih, Elsa Zulha, Erlita

Aisyah, Febita Glyssenda, Feby Rinaldo Pratama Kusuma, Fenti Visiamah, Ferdinand Haryanto Simangunsong, Fifi Adriyanthi, Handri Sanjaya, Idah Purnama Sari, Indry Yani Saney, Intan Mailani, Ismi Khomsiah, Jean Pitaloka, Jenny Jessica Sidabalok, Khoirul Anwar, Maria Ulfa, Meta Fosfi Berliyana, Muhammad Rizal Robbani, Murni Fitria, Nila Amalin Nabillah, Putri Ramadhona, Radius Uly Artha, Riandra Pratama Usman, Rifki Husnul Khuluk, Rizal Rio Saputra, Rizky Putriana, Ruliana Juni Anita, Ruwaidah Muliana, Siti Aisah, Siti Nur Halimah, Sofian Sumilat Rizky, Sukamto, Susi Isnaini, Suwarda Dua Imatu Della, Syathira Assegaf, Tazkiya Nurul, Tiand Reno, Tiara Dewi Astuti, Tiurma Debora Simatupang, Tri Marital, Ulfatun Nurun, Wiwin Esti Sarwita, Yepi Triapriani, Yunsi 'U Nasy'ah, dan Zubaidi.

16. Terimakasih kepada Ajo dan Atu angkatan 2011, 2010, 2009, 2008, 2007, 2006 yang telah banyak memberikan pengarahan serta berbagi pengalaman di dunia perkuliahan.
17. Terimakasih untuk keluarga besar Himaki yang telah berbagi ilmu dalam berorganisasi yang dapat diterapkan di dunia perkuliahan maupun dunia kerja nantinya.
18. Terimakasih untuk seluruh asisten praktikum yang telah membagikan ilmunya.
19. Mulyono's *Research Group*, mbak Rani, mbak Aryanti, mbak Ajeng, mbak Ayay dan kak Aziz terimakasih telah berbagi ilmu dan pengalaman. Terimakasih Melia, Vyna, Tyas, Monica, Shelta dan Ryan atas kerjasamanya di Laboratorium Biokimia serta kepada Bidari dan Asrul yang telah membantu selama berjalannya penelitian.

20. Para penyayang bakteri dan jamur (2014) di Lab. Biokimia, Agung Cordova, Asrul, Luthfi, Rahma, Rica, Riza, Bunga, Bidari, Erika, Ayuning, Hesti, Diva, Leony atas kebersamaan, canda tawa, bantuan dan semangatnya. Semoga kalian selalu diberikan kelancaran dalam penelitiannya dan segala urusan dalam menyelesaikan studi.
21. Para penghuni Lab. Biokimia terdahulu (2012 dan 2013), mbk Arum, S.Farm, Putri Amalia, M.Si., Ana Febrilianti W., S.Si., Aprilia Isma D., S.Si., Uswatun Khasanah, S.Si, Rizky Putri Y., S.Si., Syathira Assegaf., S.Si., Fifi Adriyanthi., S.Si, Diani Iska M., S.Si., Mia Permatasari, S.Si., Sinta Dewi O, S.Si., Fathaniah Sejati, S.Si., Maya Retna S., S.Si., Khomsatun Khasanah, S.Si., Ezra Rhienzky, S.Si., Sri Wahyuni, C.S.Si. Terima kasih atas bantuan, canda, tawa, motivasi yang diberikan selama penelitian kepada penulis.
22. Sahabat-sahabatku "*Safers Squad*" Andina Zuhaera, S.T., Merita Rahma, S.A.N., Prima Windyaswari, S.P., Siti Maysaroh, S.Gz. dan Soffati Barrid Marzuqoh, S.T yang selalu mengingatkan dalam kebaikan.
23. Sahabat Genuips dan D'Spourz yang telah memberikan banyak cerita dan pengalaman sebelum menuju perguruan tinggi dan beberapa orang yang telah meminjamkan buku sebagai referensi.
24. Terimakasih untuk "JDC" Rio, Diaz, Eka, Sukamto dan Ana yang telah memberikan hiburan ketika bosan dan berbagi info terkini.
25. Rekan KKN Desa Sukapura Dwi Atwati, S.Sos., Selly Sitio, S.P., Wita Indrya, S.Ptk., Andre Monifa, S.H., Ahmad Sulaiman, S.A.N., dan Dwitia Agung Putra, S.H., terimakasih telah berbagi ilmu dalam bermasyarakat dan berbagi ilmu dari jurusan masing-masing.

26. Penghuni Asrama Sri Kasih, Lilis, Tesa, Nita, Ningrum, Tyas, Maya, Tika, Evi, Atika, Nuri, Yosi, Elsa, Melsa, Risna, Eni, Lala, Bela, Epoy, Jeje, dan Gendis yang membuat nyaman tinggal di Arama Sri Kasih.
27. Semua pihak yang telah membantu dan mendukung penulis dalam penyusunan skripsi ini.

Semoga segala bentuk bantuan dan dukungan yang diberikan mendapat balasan pahala dari Allah SWT.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih sangat jauh dari kata sempurna, namun penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan memiliki nilai guna khususnya rekan-rekan mahasiswa dan pembaca pada umumnya. Amin.

Bandar Lampung, Agustus 2018  
Penulis

**Ayu Imani**

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>i</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>iii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>iv</b>
<b>I. PENDAHULUAN</b>	
A. Latar Belakang.....	1
B. Tujuan Penelitian .....	4
C. Manfaat Penelitian .....	4
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
A. Makanan Fermentasi.....	5
B. Fermentasi.....	6
C. Tauco.....	8
D. Bakteri.....	9
1. Fase Pertumbuhan Mikroorganisme .....	9
2. Kurva Standar Pertumbuhan .....	11
3. Identifikasi Bakteri.....	11
E. <i>Bacillus</i> .....	12
F. Jamur .....	13
G. Enzim.....	15
H. Enzim Protease .....	16
I. Metode Kunitz.....	18
J. Antibiotik.....	19
K. Penggolongan Antibiotik.....	20
<b>III. METODE PENELITIAN</b>	
A. Waktu dan tempat penelitian .....	24
B. Alat dan Bahan.....	24
1. Alat-alat yang digunakan.....	24
2. Bahan-bahan yang digunakan.....	24
C. Prosedur Penelitian .....	25
1. Tahap Persiapan.....	25

2. Isolasi Mikroba dari Tauco.....	27
3. Penyimpanan Mikroba Hasil Isolasi.....	28
4. Seleksi Berdasarkan Indeks Proteolitik.....	28
5. Seleksi Uji Kuantitatif Berdasarkan Aktivitas Protease.....	28
6. Uji Tingkat Kekeruhan ( <i>Optical Density</i> ).....	29
7. Uji Aktivitas Enzim Protease dari Isolat Terpilih.....	30
8. Identifikasi Bakteri.....	31
9. Identifikasi Jamur.....	32
10. Uji Antibiotik.....	32
D. Diagram Alir Prosedur Penelitian.....	34
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
A. Isolat Bakteri Proteolitik.....	35
B. Isolate Kandidat Bakteri Proteolitik.....	38
C. Delapan Isolat Terpilih Berdasarkan Aktivitas Enzim Protease.....	40
D. Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Proteolitik.....	44
E. Hubungan Aktivitas Enzim Protease dan Pertumbuhan Sel dari Isolat Terpilih.....	45
F. Aktivitas Spesifik Enzim Protease dari Tiga Isolat Terpilih.....	49
G. Hasil Uji Antibiotik.....	54
H. Karakteristik Bakteri Proteolitik Tiga Isolat Terpilih.....	57
<b>V. KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
A. Kesimpulan.....	60
B. Saran.....	61
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>62</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>67</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Data hasil isolasi bakteri proteolitik dari tauco .....	36
2. Data indeks zona bening lima belas isolat kandidat hasil skrining .....	39
3. Data pengamatan indeks zona bening dari sembilan isolat terpilih .....	40
4. Data absorbansi larutan standar tirosin .....	41
5. Data Absorbansi Larutan Standar BSA.....	50
6. Data indeks zona hambat uji antibiotik isolat A.4.6, A.5.2 dan A.5.8....	55

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Fase Pertumbuhan Bakteri .....	10
2. Biakan Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> .....	11
3. Struktur sekunder <i>beta-sheet</i> dan <i>alpha helix</i> protein.....	13
4. Isolat hasil skrining dengan metode <i>Streak Plate</i> .....	37
5. Isolat bakteri proteolitik terpilih dalam medium agar miring .....	38
6. Kurva standar tirosin .....	41
7. Grafik aktivitas enzim protease dari delapan isolat terpilih .....	42
8. Grafik aktivitas enzim protease dari lima isolat terpilih .....	43
9. Grafik rata-rata aktivitas unit (AU) enzim protease dari lima isolat terpilih dan rata-rata indeks proteolitiknya .....	43
10. Kurva perbandingan pertumbuhan sel isolat A.4.6, A.5.2 dan A.5.8 ....	44
11. Aktivitas enzim protease isolat A.4.6, A.5.2 dan A.5.8 .....	46
12. Kurva hubungan aktivitas unit (AU) enzim protease dan jumlah sel dari isolat A.4.6.....	48
13. Kurva hubungan aktivitas unit (AU) enzim protease dan jumlah sel dari isolat A.5.2 .....	48
14. Kurva hubungan aktivitas unit (AU) enzim protease dan jumlah sel dari isolat A.5.8 .....	48
15. Kurva standar BSA .....	50

16. Kurva hubungan AU dan AS dari isolat A.4.6 .....	52
17. Kurva hubungan AU dan AS dari isolat A.5.2 .....	53
18. Kurva hubungan AU dan AS dari isolat A.5.8 .....	54
19. Hasil uji antibiotik kultur isolat A.4.6, A.5.2 dan A.5.8 terhadap <i>E.coli</i> .....	56
20. Hasil uji motilitas isolat A.4.6, A.5.2 dan A.5.8 .....	58
21. Hasil pewarnaan gram isolat A.4.6, A.5.2 dan A.5.8 .....	59

## I. PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Indonesia memiliki potensi makanan fermentasi yang sangat bervariasi dan dapat dimanfaatkan pengembangannya ke arah makanan fungsional yaitu makanan yang memiliki fungsi primer, sekunder dan tersier. Makanan fungsional saat ini menjadi penting bagi tubuh manusia, hal ini dikarenakan makanan fungsional tidak hanya memiliki fungsi primer, yaitu mencukupi kebutuhan dasar manusia yaitu karbohidrat, protein, lemak, vitamin dan mineral, namun memiliki fungsi sekunder yaitu makanan tersebut dapat diterima oleh indrawi manusia, memiliki penampakan dan cita rasa yang baik. Makanan fungsional juga memiliki fungsi tersier yaitu sebagai pencegahan atau meminimalkan terjadinya suatu penyakit dengan kandungan senyawa yang ada di dalamnya. Berdasarkan fungsi tersier dari makanan fermentasi sebagai makanan fungsional diharapkan dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh secara alami dan mengurangi ketergantungan terhadap antibiotik (Winarno, 1980).

Beberapa jenis makanan Indonesia yang memiliki potensi sebagai makanan fungsional adalah dadih, tempe, tauco, kecap dan oncom. Salah satu bahan baku yang paling banyak digunakan dalam pembuatan makanan fermentasi adalah

kedelai. Kedelai dapat dimanfaatkan untuk produksi tempe, tauco, kecap, dan oncom (Pawiroharsono, 2007).

Kedelai merupakan salah satu anggota tanaman kacang-kacangan yang telah banyak dimanfaatkan sebagai pangan maupun pakan. Jenis tanaman kacang-kacangan pada umumnya terkenal sebagai sumber protein nabati yang sangat penting bagi manusia (Budianto, 2009). Tauco merupakan bahan makanan yang berbentuk pasta, berwarna kekuningan sampai coklat dan mempunyai rasa spesifik, dibuat dari campuran kedelai dan tepung beras ketan. Kandungan nutrisi dalam 100 gram tauco seperti protein 12%, lipid 4,1%, karbohidrat 10,7%, serat 3,8%, kalsium 1,22 mg, zat besi 5,1 mg dan seng 3,12 mg (Kwon *and* Song, 1996).

Pembuatan tauco dilakukan melalui dua tahap fermentasi, yaitu fermentasi kedelai yang dilakukan oleh kapang (*mold fermentation*) serta fermentasi yang dilakukan oleh khamir dan bakteri dalam larutan garam (*brine fermentation*) (Rahayu, 2014). Proses fermentasi pada kedelai sehingga menjadi tauco disebabkan karena adanya proses dekomposisi protein oleh enzim protease, hanya mikroorganisme yang memiliki sistem enzim yang kompleks saja yang dapat mendekomposisi protein menjadi senyawa-senyawa sederhana. Pemecahan protein juga akan menghasilkan alkohol, CO<sub>2</sub>, hidrogen, metana, amonia, dan komponen-komponen yang berbau busuk, seperti indol, skatol, hidrogen sulfida dan kadaverin.

Menurut Fardiaz (2002) dekomposisi protein oleh mikroorganisme disebut juga dengan proses putrefaksi yang menggunakan enzim protease untuk menghidrolisis ikatan peptida di protein dan melepas asam amino (Volk dan Wheeler, 1993).

Beberapa bakteri penghasil protease antara lain genus *Bacillus* (*Lactobacillus*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, *B. polymixa*), *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces* dan *Staphylococcus*. Selain bakteri, fungi juga menghasilkan enzim protease, yakni dari genus *Acremonium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Sacharomyces*, *Fusarium*, *Mucor* dan *Rhizopus* (Rao *et al.*, 1998).

Protease merupakan enzim yang sangat kompleks dan mempunyai peranan yang sangat penting dalam metabolisme sel dan keteraturan dalam sel (Ward, 1983).

Penelitian yang telah dilakukan oleh Nuritasari, Y (2012) telah berhasil mengisolasi bakteri penghasil protease dari beberapa makanan fermentasi dan diperoleh aktivitas tertinggi dari beberapa isolat. Berdasarkan fungsi dari enzim protease, enzim protease dihasilkan oleh mikroba proteolitik, diduga mikroba tersebut juga mempunyai aktivitas antibiotik, seperti pada penelitian yang telah dilakukan oleh Supartono *et al.* (2008) yang menguji aktivitas antibiotik dari mikroba proteolitik *Bacillus subtilis* BAC4.

Berdasarkan pemaparan di atas saya tertarik untuk mengisolasi mikroba proteolitik dari tauco. Pada penelitian ini telah dilakukan isolasi mikroba dari tauco dan setelah diperoleh isolat mikroba dilakukan identifikasi pada mikroba tersebut. Isolat mikroba kemudian diuji aktivitas proteasenya dan dan uji antibiotiknya.

## **B. Tujuan Penelitian**

Tujuan dilakukan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mendapatkan isolat mikroba proteolitik dari makanan fermentasi tradisional Indonesia (Tauco)
2. Menguji aktivitas enzim protease dari isolat mikroba.
3. Menguji aktivitas antibiotik dari isolat mikroba.

## **C. Manfaat Penelitian**

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui jenis isolat mikroba proteolitik hasil isolasi dari tauco.
2. Mengetahui aktivitas enzim protease yang dihasilkan.
3. Mengetahui kemampuan mikroba sebagai antibiotik.

## **II. TINJAUAN PUSTAKA**

### **A. Makanan Fermentasi**

Indonesia merupakan negara multi pulau dan multi etnis. Keberagaman kondisi lingkungan dan budaya secara tidak langsung mempengaruhi karakteristik produk pangan masyarakatnya dan kondisi tersebut melahirkan banyak produk pangan tradisional khas daerah. Ada banyak jenis pangan tradisional dan salah satunya adalah dari jenis pangan fermentasi (Hosono, 1989).

Pada awalnya tujuan fermentasi pangan adalah untuk mengawetkan pangan yang bersifat musiman dan mudah rusak. Sejalan dengan perkembangan alternatif pengawetan pangan maka pengembangan produk pangan fermentasi saat ini lebih karena tekstur, aroma dan rasanya yang unik. Dampak positif dari produk fermentasi terhadap kesehatan konsumen juga menjadi alasan pengembangan produk fermentasi sekarang ini. Pemecahan komponen yang kompleks menjadi komponen komponen yang lebih sederhana menyebabkan produk fermentasi lebih mudah dicerna daripada produk pangan asalnya. Pada beberapa produk fermentasi, dilaporkan pula adanya peningkatan kandungan beberapa vitamin, antioksidan, dan senyawa lain yang bermanfaat bagi kesehatan. Selain itu, ketika produk diproduksi sebagai produk probiotik, maka keberadaan “mikroba baik” yang dapat mencapai usus dalam keadaan hidup dapat membantu menjaga

kesehatan saluran cerna dan tergantung dari jenis bakterinya, juga dapat mencegah munculnya penyakit-penyakit degeneratif (Buckle *et al.*, 2007)

## **B. Fermentasi**

Fermentasi berasal dari kata *fervere* (Latin), yang berarti mendidih, menggambarkan aksi ragi pada ekstrak buah selama pembuatan minuman beralkohol. Pengertian fermentasi agak berbeda antara ahli mikrobiologi dan ahli biokimia. Pengertian fermentasi menurut ahli biokimia yaitu proses yang menghasilkan energi dengan perombakan senyawa organik. Ahli mikrobiologi industri memperluas pengertian fermentasi menjadi segala proses untuk menghasilkan suatu produk dari kultur mikroorganisme (Yuniati, 2015).

Fermentasi juga dapat diartikan sebagai suatu desimilasi senyawa-senyawa organik yang disebabkan oleh aktivitas mikroorganisme. Desimilasi merupakan reaksi kimia yang membebaskan energi melalui perombakan nutrient. Pada proses disimilasi, senyawa substrat yang merupakan sumber energi diubah menjadi senyawa yang lebih sederhana atau tingkat energinya lebih rendah. Reaksi disimilasi merupakan aktivitas katabolik sel (Kuswanto, 2004).

Proses fermentasi memanfaatkan aktivitas suatu mikroba tertentu atau campuran beberapa spesies mikroba. Mikroba yang banyak digunakan dalam proses fermentasi antara lain khamir, kapang dan bakteri (Steinkraus, 1985). Kemajuan dalam bidang teknologi fermentasi telah memungkinkan manusia untuk memproduksi berbagai produk yang tidak dapat atau sulit diproduksi melalui proses kimia. Teknologi fermentasi merupakan salah satu upaya manusia dalam

memanfaatkan bahan-bahan yang harganya relative murah menjadi produk yang bernilai ekonomi tinggi dan berguna bagi kesejahteraan hidup manusia (Yuniati, 2015). Secara umum ada empat kelompok fermentasi yang penting secara ekonomi .

1. Fermentasi yang memproduksi sel mikroba (*biomass*)

Produk komersial dari biomass dapat dibedakan menjadi produksi *yeast* untuk industri roti, dan produksi sel mikroba untuk digunakan sebagai makanan manusia dan hewan.

2. Fermentasi yang menghasilkan enzim dan mikroba

Secara komersial, enzim dapat diproduksi oleh tanaman, hewan, dan mikroba, namun enzim yang diproduksi oleh mikroba memiliki beberapa keunggulan yaitu, mampu dihasilkan dalam jumlah besar dan mudah untuk meningkatkan produktivitas bila dibandingkan dengan tanaman atau hewan.

3. Fermentasi yang menghasilkan metabolit

Metabolit dapat dibedakan menjadi metabolit primer dan metabolit sekunder. Produk metabolisme primer yang dianggap penting contohnya etanol, asam sitrat, polisakarida, aseton, butanol, dan vitamin. Sedangkan metabolit sekunder yang dihasilkan mikroba contohnya antibiotik, pemacu pertumbuhan, inhibitor enzim, dan lain-lain.

4. Proses Transformasi

Sel mikroba dapat digunakan untuk mengubah suatu senyawa menjadi senyawa lain yang masih memiliki kemiripan struktur namun memiliki nilai komersial yang lebih tinggi. Proses transformasi dengan menggunakan mikroba ini lebih baik bila dibandingkan dengan proses kimia, berkaitan

dengan penggunaan reagen kimia yang lebih sedikit. Selain itu proses dapat berlangsung pada suhu rendah tanpa membutuhkan katalis logam berat yang berpotensi menimbulkan potensi (Ganjar dkk, 2006).

### C. Tauco

Tauco merupakan salah satu jenis makanan hasil fermentasi kedelai di Indonesia, khususnya di Jawa Barat. Tauco berbentuk pasta (semi padat) dengan warna mulai dari kuning sampai kecoklatan, dibuat dari kedelai kuning dan umumnya digunakan sebagai bumbu atau penyedap masakan. Pembuatan tauco, dilakukan melalui dua tahap fermentasi, yaitu fermentasi kedelai yang dilakukan oleh kapang (*mold fermentation*) dan fermentasi yang dilakukan oleh khamir dan bakteri dalam larutan garam (*brine fermentation*) (Yuniati, 2015).

Komposisi tauco secara umum adalah sebagai berikut : protein 10,4 %, lemak 4,9 %, karbohidrat 24,1 %, kadar air 56-65 %, kadar garam 17,8 %, kadar abu 7,4 %, total gula 9,2 %, pH 4,9 dan keasaman sebagai asam laktat 0,9 %. Pada tauco terdapat 17 jenis asam amino bebas, dengan asam glutamat sebagai asam amino terbanyak. Asam-asam amino tersebut adalah arginin, prolin, leusin, asam glutamat, asam aspartat, lisin, sistein, histidin, metionin, glisin, isoleusin, fenilalanin, serin, treonin, triptofan, tirosin dan valin, sedangkan jenis asam organik yang terdapat dalam tauco adalah asam laktat (terbanyak), asam suksinat, asam asetat dan asam fosfat (Hidayat dkk, 2006).

## D. Bakteri

Bakteri merupakan organisme bersel tunggal yang hidup bebas tanpa klorofil dan memiliki DNA maupun RNA. Sebagian besar bakteri berukuran kecil, yaitu hanya beberapa micron saja (Gupte, 1990). Beberapa kelompok memiliki flagella dan dapat bergerak aktif. Bakteri memiliki berat jenis  $1.05 - 1.1 \text{ g cm}^{-3}$  dan berat sekitar  $10^{-12} \text{ g}$ . Ukuran aktual tergantung dari laju pertumbuhan, media tumbuh, dan sebagainya. Ada tiga bentuk dasar bakteri, yaitu bentuk bulat atau kokus, bentuk batang silindris, bentuk lengkung atau vibril. Bentuk bakteri dipengaruhi oleh umur dan syarat pertumbuhan tertentu (Hidayat dkk, 2006).

### 1. Fase pertumbuhan mikroorganisme

Ada empat macam fase pertumbuhan mikroorganisme yaitu fase lag, fase log (fase eksponensial), fase stasioner, dan fase kematian:

#### a. Fase lambat (*lag phase*)

Fase lambat mengikuti inokulasi media nutrient, dan dapat merupakan periode adaptasi. Bila suatu biakan dipindahkan dari suatu lingkungan yang lain, maka mikroba itu perlu mengorganisasi kembali konstituen mikro dan makromolekulnya. Selama fase ini massa sel mungkin saja bertambah tanpa diikuti oleh pertumbuhan jumlah sel.

#### b. Fase Eksponensial (*log phase*)

Fase eksponensial merupakan fase pertumbuhan sel, ini merupakan periode pertumbuhan yang stabil atau keadaan pertumbuhan yang tenang dan laju pertumbuhan spesifiknya tetap. Komposisi kimia total cairan fermentasinya

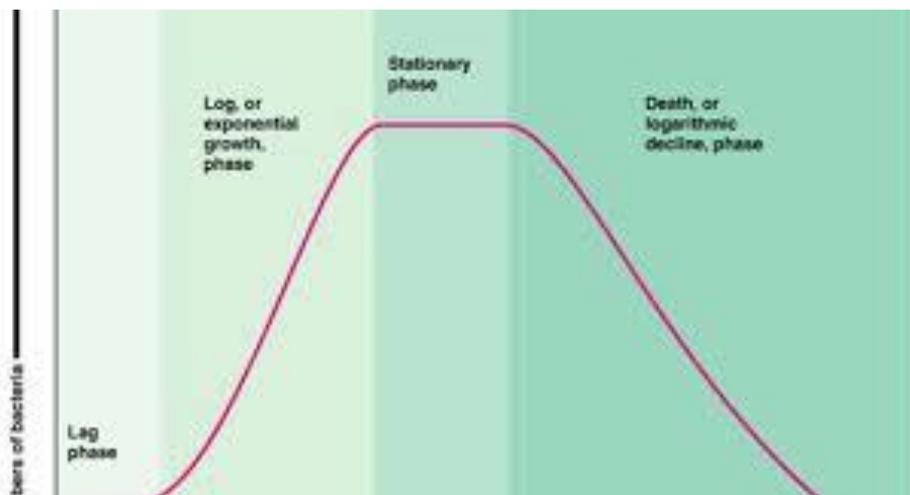
sedang berubah, sebab nutrien-nutrien sedang dikonsumsi mikroba dan produk-produk metabolit sedang diproduksi.

c. Fase Seimbang (*stationary phase*)

Fase seimbang ini terjadi bila semua sel telah mencapai kesetimbangan dengan sel-sel yang mati. Pada penginkubasian lebih lanjut, beberapa hal mungkin dapat terjadi. Meskipun pertumbuhan bersihnya telah berhenti, di sana masih mungkin terjadi metabolisme dan mengakumulasikan produk-produk dalam sel atau cairan fermentasi. Massa total sel mungkin tetap tetapi jumlah sel yang hidup mungkin menurun (Supartono dkk., 2008).

d. Fase Kematian

Jumlah sel yang mati telah meningkat dan lebih banyak dari jumlah sel yang hidup, faktor penyebabnya adalah ketidaktersediaan nutrisi dan akumulasi produk buangan yang bersifat toksik (Pratiwi, 2007).



**Gambar 1.** Fase pertumbuhan mikroorganismenya (Pratiwi, 2007)

## 2. Kurva Standar Pertumbuhan

Pertumbuhan ialah pertambahan teratur semua komponen suatu mikroorganisme. Pertumbuhan jasad renik dapat diukur berdasarkan konsentrasi sel (jumlah sel per-satuan isi biakan) atau densitas sel (berat kering dari sel-sel per-satuan sel biakan). Menghitung densitas sel dapat dilihat dari nilai absorbansi suatu biakan.

Setiap bakteri memiliki kurva standar pertumbuhan bakteri. Metode perhitungan jumlah sel yang digunakan dalam pembuatan kurva standar dapat dilakukan dengan dua metode yaitu dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) dan yang kedua dengan menggunakan spektrofotometer untuk melihat tingkat kekeruhan (*Optical Density*) yang terbaca melalui nilai absorbansi yang dihasilkan. Panjang gelombang yang digunakan adalah 600 nm. Panjang gelombang 600 nm digunakan untuk melihat tingkat kekeruhan larutan yang berwarna kuning sampai coklat (Febriyansari, 2014).

Kurva standar pertumbuhan merupakan suatu kurva untuk menghitung jumlah sel bakteri secara tidak langsung, yaitu dengan mengresikan nilai absorbansi dan jumlah koloni ke dalam persamaan garis kurva standar  $y = ax + b$ , diketahui  $y =$  jumlah koloni dan  $x$  besarnya nilai absorbansi (Torotora, G.J. 2001).

## 3. Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan cara mengamati morfologi sel, pewarnaan gram dan melakukan uji biokimia. Bentuk bakteri dibedakan menjadi

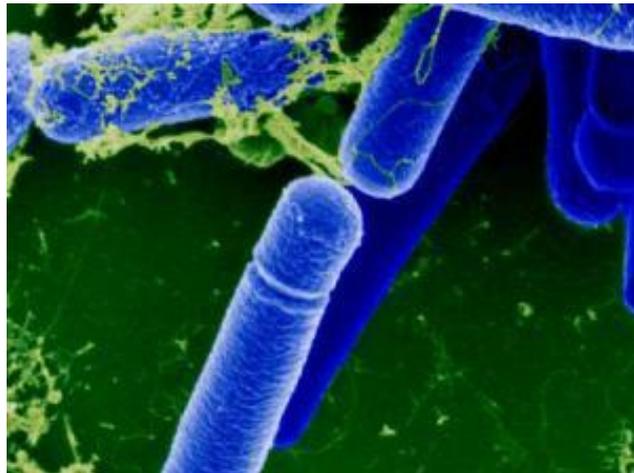
tiga yaitu bentuk bulat (kokus), bentuk batang (basil) dan bentuk spiral (Pelczar dan Chan, 1998).

1. Basil berbentuk serupa tongkat pendek silindris. Sebagian besar bakteri berbentuk basil. basil dapat bergandeng-gandeng panjang, bergandeng dua-dua atau terlepas satu sama lain.
2. Kokus merupakan bakteri dengan bentuk menyerupai bola-bola kecil. Golongan ini tidak sebanyak golongan basil.
3. Bakteri spiral memiliki bentuk yang bengkok atau berbengkok-bengkok menyerupai spiral. Bakteri golongan ini merupakan golongan yang jumlahnya paling sedikit (Dwidjoseputro, 2005).

#### ***E. Bacillus***

*Bacillus* merupakan bakteri gram positif, berbentuk batang, beberapa spesies bersifat aerob obligat dan bersifat anaerobik fakultatif, dan memiliki endospore sebagai struktur bertahan saat kondisi lingkungan tidak mendukung seperti pada (Backman *et al.*, 1994). *Bacillus subtilis* berbentuk batang lurus gram positif berukuran 1,5 x 4,5  $\mu\text{m}$ , sendiri-sendiri atau tersusun dalam bentuk rantai.

*Bacillus subtilis* merupakan jenis kelompok bakteri yang mampu mensekresikan antibiotik dalam jumlah besar ke luar dari sel (Gupte, 1990). Gambar *Bacillus subtilis* ditunjukkan pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Biakan bakteri *Bacillus subtilis* (Gupte, 1990)

Menurut Fardiaz (1992) bentuk spora (endospora) *Bacillus* bervariasi bergantung pada spesiesnya. Sporanya berbentuk oval atau silinder dan lebarnya tidak melebihi dari sel induknya (Schelege and Schmidt, 1994). Endospora ada yang lebih kecil dan ada juga yang lebih besar dari pada diameter sel induknya.

## **F. Jamur**

Istilah jamur berasal dari bahasa Yunani, yaitu fungus (*mushroom*) yang berarti tumbuh dengan subur. Istilah ini selanjutnya ditujukan kepada jamur yang memiliki tubuh buah serta tumbuh atau muncul di atas tanah atau pepohonan (Tjitrosoepomo, 1991). Organisme yang disebut jamur bersifat heterotrof, dinding sel spora mengandung kitin, tidak berplastid, tidak berfotosintesis, tidak bersifat fagotrof, umumnya memiliki hifa yang berdinding yang dapat berinti banyak (*multinukleat*), atau berinti tunggal (*mononukleat*), dan memperoleh nutrisi dengan cara absorpsi (Gandjar *et al.*, 1999).

Jamur mempunyai dua karakter yang sangat mirip dengan tumbuhan yaitu dinding sel yang sedikit keras dan organ reproduksi yang disebut spora. Dinding sel jamur terdiri atas selulosa dan kitin sebagai komponen yang dominan. Spora jamur terutama spora yang diproduksi secara seksual berbeda dari spora tumbuhan tinggi secara penampakan (bentuk) dan metode produksinya (Alexopoulos *and* Mims, 1979).

Banyak jamur yang sudah dikenal peranannya, yaitu jamur yang tumbuh di roti, buah, keju, ragi dalam pembuatan bir, dan yang merusak tekstil yang lembab, serta beberapa jenis cendawan yang dibudidayakan. Beberapa jenis memproduksi antibiotik yang digunakan dalam terapi melawan berbagai infeksi bakteri (Tortora, 2001). Diantara semua organisme, jamur adalah organisme yang paling banyak menghasilkan enzim yang bersifat degradatif yang menyerang secara langsung seluruh material organik. Adanya enzim yang bersifat degradatif ini menjadikan jamur bagian yang sangat penting dalam mendaur ulang sampah-sampah alam, dan sebagai dekomposer dalam siklus biogeokimia (Mc-Kane, 1996). Semua unsur kimia di alam akan beredar melalui jalur tertentu dari lingkungan ke organisme atau makhluk hidup dan kembali lagi ke lingkungan. Semua bahan kimia dapat beredar berulang-ulang melewati ekosistem secara tak terbatas. Jika suatu organisme itu mati, maka bahan organik yang terdapat pada tubuh organisme tersebut akan dirombak menjadi komponen abiotik dan dikembalikan lagi ke dalam lingkungan. Peredaran bahan abiotik dari lingkungan melalui komponen biotik dan kembali lagi ke lingkungan dikenal sebagai siklus biogeokimia (Odum, 1993).

Tubuh buah suatu jenis jamur dapat berbeda dengan jenis jamur lainnya yang ditunjukkan dengan adanya perbedaan tudung (*pileus*), tangkai (*stipe*), dan lamella (*gills*) serta cawan (*volva*). Adanya perbedaan ukuran, warna, serta bentuk dari pileus dan stipe merupakan ciri penting dalam melakukan identifikasi suatu jenis jamur (Smith and Webber, 1988). Menurut Alexopoulos dan Mims (1979), beberapa karakteristik umum dari jamur yaitu jamur merupakan organisme yang tidak memiliki klorofil sehingga cara hidupnya sebagai parasit atau saprofit. Tubuh terdiri dari benang yang bercabang-cabang disebut hifa, kumpulan hifa disebut miselium, berkembang biak secara aseksual dan seksual.

### **G. Enzim**

Enzim adalah biomolekul berupa protein berbentuk bulat (globular), yang terdiri atas satu rantai polipeptida atau lebih dari satu rantai polipeptida (Wirahadikusumah, 1989). Molekul enzim biasanya berbentuk bulat (globular), sebagian terdiri atas satu rantai polipeptida dan sebagian lain terdiri dari lebih dari satu polipeptida (Wirahadikusumah, 1989) dan umumnya mempunyai berat molekul yang beraneka ragam berkisar 104–107 kDa (Dryer, 1993). Enzim berfungsi sebagai katalis atau senyawa yang dapat mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi. Dengan adanya enzim, molekul awal yang disebut substrat akan dipercepat perubahannya menjadi molekul lain yang disebut produk. Suatu enzim dapat mempercepat laju reaksi kira-kira  $10^8$  sampai  $10^{11}$  kali lebih cepat dibandingkan dengan reaksi yang tidak dikatalisis (Poedjiadi, 1994). Keunggulan enzim sebagai biokatalisator antara lain memiliki spesifitas tinggi, mempercepat reaksi kimia tanpa membentuk produk samping, produktivitas tinggi dan dapat

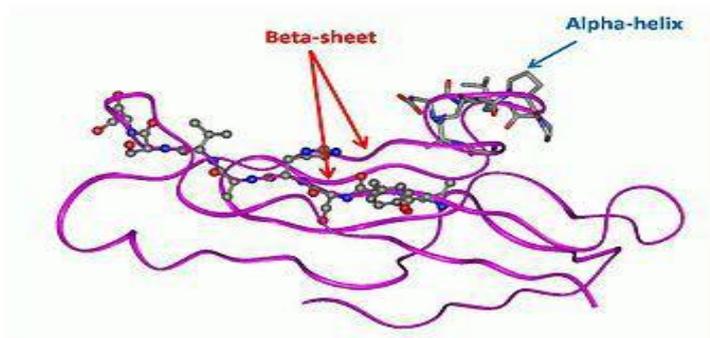
menghasilkan produk akhir yang tidak terkontaminasi sehingga mengurangi biaya purifikasi dan efek kerusakan lingkungan (Chaplin *and* Bucke, 1990).

Enzim bekerja sangat spesifik dalam kerja katalitiknya, sehingga enzim dikatakan mempunyai sifat sangat khas karena hanya bekerja pada substrat tertentu dan bentuk reaksi tertentu. Kespesifikan ini disebabkan oleh bentuknya yang unik dan adanya gugus-gugus polar atau nonpolar dalam struktur enzim (Fessenden dan Fessenden, 1992). Salah satu fungsi yang paling menonjol dari protein adalah aktivitas enzim. Enzim mempunyai fungsi khusus antara lain yaitu :

- 1) menurunkan energi aktivasi
- 2) mempercepat reaksi pada suhu dan tekanan tetap tanpa mengubah besarnya tetapan seimbangannya,
- 3) mengendalikan reaksi (Page, 1997).

## **H. Enzim Protease**

Protease disebut juga peptidase atau proteinase, merupakan enzim golongan hidrolase yang memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana, seperti menjadi oligopeptida pendek atau asam amino, dengan reaksi hidrolisis pada ikatan peptida. Enzim ini diperlukan oleh semua makhluk hidup karena bersifat esensial dalam metabolisme protein. Protein ini memiliki banyak struktur sekunder *beta-sheet* dan *alpha-helix* yang sangat pendek (Yunita, 2012).



**Gambar 3.** Struktur sekunder *beta-sheet* dan *alpha-helix* protein (Yunita, 2012)

Enzim protease dapat dihasilkan dari berbagai sumber, yaitu bakteri, jamur, virus, tumbuhan, hewan dan manusia. Protease yang dihasilkan dari berbagai bakteri kebanyakan bersifat basa dan netral, sedangkan protease yang dihasilkan oleh berbagai jamur dapat bersifat asam, netral, dan basa (Rao *et al.*, 1998). Salah satu sumber penghasil enzim protease yang banyak diteliti adalah bakteri. Pemilihan bakteri sebagai sumber enzim protease disebabkan beberapa alasan yaitu:

- a. bakteri lebih mudah tumbuh dengan kecepatan yang lebih cepat dibandingkan makhluk hidup lainnya.
- b. skala produksi enzim mudah ditingkatkan.
- c. biaya produksi enzim relatif rendah.
- d. kondisi produksi tidak tergantung pada musim dan waktu proses produksi enzim lebih pendek (Poernomo, 2004).

Untuk memproduksi enzim protease dari bakteri, diperlukan proses pencarian, isolasi dan identifikasi galur unggul, yaitu galur yang menghasilkan enzim protease dalam jumlah dan aktivitas yang lebih tinggi. Selain itu, kondisi produksi juga perlu dikontrol dengan mengoptimasi berbagai faktor yang

mempengaruhi laju pertumbuhan dan laju produksi enzim, seperti suhu, pH, komposisi medium (penambahan surfaktan dan logam), dan kondisi aerasi (transfer oksigen) (Palmer, 1995).

Untuk menguji suatu biakan bakteri menghasilkan enzim protease ekstraseluler, maka bakteri tersebut harus ditumbuhkan pada medium padat yang mengandung kasein yaitu Skim Milk Agar (Fardiaz, 1992). Kasein adalah salah satu jenis protein. Hidrolisis kasein digunakan untuk memperlihatkan aktivitas hidrolitik protease yang memutuskan ikatan peptida CO-NH. Hidrolisis protein ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekeliling pertumbuhan bakteri (Susanti, 2003). Pengujian secara kualitatif bakteri penghasil enzim protease ekstraseluler dilakukan dengan cara mengamati zona bening yang berada disekitar koloni bakteri, kemudian membagi diameter zona bening dengan diameter koloni bakteri. Hasil bagi diameter tersebut dinyatakan sebagai aktifitas protease secara relatif. Besar-kecil diameter zona menunjukkan konsentrasi dan aktivitas enzim yang dihasilkan (Palmer, 1995). Bakteri penghasil enzim protease ekstraseluler disebut juga sebagai bakteri proteolitik.

### **I. Metode Kunitz**

Analisis aktivitas dilakukan menurut metode Kunitz (Soedigdo, 1998) menggunakan substrat kasein. Pengukuran didasarkan pada jumlah peptida yang terlarut dalam TCA (asam trikloroasetat). Prosedur pengujian adalah sebagai berikut :

1 mL larutan kasein dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambah 1

mL larutan enzim. Kemudian diinkubasi pada 35<sup>o</sup>C selama 30 menit. Setelah 30 menit, tabung reaksi dikeluarkan lalu ditambah 3 mL larutan TCA , larutan diaduk dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar agar pengendapan sempurna. Endapan yang terbentuk dipisahkan dengan sentrifugasi. Absorpsi filtrat diukur pada panjang gelombang 280 nm. Pada pengujian aktivitas untuk uji stabilitas termal, 1mL kasein dan 1mL larutan enzim diinkubasi pada suhu 50<sup>o</sup>C selama 60 menit yang merupakan suhu dan waktu inkubasi optimum yang diperoleh pada karakterisasi enzim protease. Kontrol dibuat dengan menambahkan larutan TCA sebelum enzim lalu diinkubasi. Aktivitas enzim dihitung berdasarkan jumlah asam amino (peptida sederhana) yang terbentuk dengan menggunakan kurva standar tirosin. Aktivitas 1 unit tirosin ditetapkan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menguraikan 1 $\mu$ mol tirosin dari kasein di dalam 1 mL volume reaksi per menit.

## **J. Antibiotik**

Antibiotik adalah zat-zat kimia yang dihasilkan oleh fungi dan bakteri, yang memiliki khasiat mematikan atau menghambat pertumbuhan kuman, sedangkan toksisitasnya bagi manusia relatif kecil. Turunan zat-zat ini, yang dibuat secara semi-sintesis, juga termasuk kelompok ini, begitu pula senyawa sintesis dengan khasiat antibakteri (Tjay dan Rahardja, 2007).

## K. Penggolongan Antibiotik

1. Berdasarkan mekanisme kerjanya terhadap bakteri, antibiotik dikelompokkan sebagai berikut :
  - a. Inhibitor sintesis dinding sel bakteri memiliki efek bakterisid dengan cara memecah enzim dinding sel dan menghambat enzim dalam sintesis dinding sel. Contohnya antara lain golongan  $\beta$ -Laktam seperti penisilin, sefalosporin, karbapenem, monobaktam, dan inhibitor sintesis dinding sel lainnya seperti *vancomycin*, *basitrasin*, *fosfomysin*, dan *daptomysin*.
  - b. Inhibitor sintesis protein bakteri memiliki efek bakterisid atau bakteriostatik dengan cara mengganggu sintesis protein tanpa mengganggu sel-sel normal dan menghambat tahap-tahap sintesis protein. Obat-obat yang aktivitasnya menginhibitor sintesis protein bakteri seperti aminoglikosida, makrolida, tetrasiklin, streptogamin, klindamisin, oksazolidinon dan kloramfenikol.
  - c. Mengubah permeabilitas membran sel memiliki efek bakteriostatik dan bakteriostatik dengan menghilangkan permeabilitas membran dan oleh karena hilangnya substansi seluler menyebabkan sel menjadi lisis. Obat-obat yang memiliki aktivitas ini antara lain polimiksin, amfoterisin B, gramisidin, nistatin dan kolistin.
  - d. Menghambat sintesis folat mekanisme kerja ini terdapat pada obat-obat seperti sulfonamida dan trimetoprim. Bakteri tidak dapat mengabsorpsi asam folat, tetapi harus membuat asam folat dari PABA (asam para amino benzoat), dan glutamat.

- e. Mengganggu sintesis DNA mekanisme kerja ini terdapat pada obat-obat seperti metronidasol, kinolon, novobiosin. Obat-obat ini menghambat asam deoksiribonukleat (DNA) girase sehingga menghambat sintesis DNA. DNA girase adalah enzim yang terdapat pada bakteri yang menyebabkan terbukanya dan terbentuknya superheliks pada DNA sehingga menghambat replikasi DNA (Stringer, 2006).

## 2. Penggolongan Berdasarkan Spektrum Kerjanya

### a. Spektrum luas (aktivitas luas)

Antibiotik yang bersifat aktif bekerja terhadap banyak jenis mikroba yaitu bakteri gram positif dan gram negatif. Contoh antibiotik dalam kelompok ini adalah sulfonamid, ampisilin, sefalosporin, kloramfenikol, tetrasiklin, dan rifampisin.

### b. Spektrum sempit (aktivitas sempit)

Antibiotik yang bersifat aktif bekerja hanya terhadap beberapa jenis mikroba saja, bakteri gram positif atau gram negatif saja. Contohnya eritromisin, klindamisin, kanamisin, hanya bekerja terhadap mikroba gram-positif. Sedang streptomisin, gentamisin, hanya bekerja terhadap kuman gram-negatif.

## 3. Penggolongan Berdasarkan Struktur Kimia Antibiotik

- a. Golongan  $\beta$ -Laktam, antara lain golongan sefalosporin (sefaleksin, sefazolin, sefuroksim, sefadroksil, seftazidim), golongan monosiklik, dan golongan penisilin (penisilin, amoksisilin). Penisilin adalah suatu agen antibakterial alami yang dihasilkan dari jamur jenis *Penicillium chrysognum*.

- b. Antibiotik golongan aminoglikosida, aminoglikosida dihasilkan oleh jenis-jenis fungi *Streptomyces* dan *Micromonospora*. Spektrum kerjanya luas dan meliputi terutama banyak bacilli gram-negatif. Obat ini juga aktif terhadap *gonococci* dan sejumlah kuman gram-positif. Aktifitasnya adalah bakterisid, berdasarkan dayanya untuk menembus dinding bakteri dan mengikat diri pada ribosom di dalam sel. Contohnya streptomisin, gentamisin, amikasin, neomisin, dan paranomisin.
- c. Antibiotik golongan tetrasiklin, khasiatnya bersifat bakteriostatik, hanya melalui injeksi intravena dapat dicapai kadar plasma yang bakterisid lemah. Mekanisme kerjanya berdasarkan diganggunya sintesa protein kuman. Spektrum antibakterinya luas dan meliputi banyak kokus gram positif dan gram negatif serta kebanyakan bacilli. Tidak efektif *Pseudomonas* dan *Proteus*, tetapi aktif terhadap mikroba khusus *Chlamydia trachomatis* (penyebab penyakit mata trachoma dan penyakit kelamin), dan beberapa protozoa (amuba) lainnya. Contohnya tetrasiklin, doksisisiklin, dan monosiklin.
- d. Antibiotik golongan makrolida, bekerja bakteriostatik terhadap terutama bakteri gram-positif dan spectrum kerjanya mirip Penisilin-G. Mekanisme kerjanya melalui pengikatan reversibel pada ribosom kuman, sehingga sintesa proteinnya dirintangi. Bila digunakan terlalu lama atau sering dapat menyebabkan resistensi. Absorbinya tidak teratur, agak sering menimbulkan efek samping lambung-usus, dan waktu paruhnya singkat, maka perlu ditakarkan sampai 4 x sehari.
- e. Antibiotik golongan linkomisin, dihasilkan oleh *Streptomyces lincolnensis*. Khasiatnya bakteriostatik dengan spektrum kerja lebih sempit dari pada

makrolida, terutama terhadap kuman gram positif dan anaerob. Berhubung efek sampingnya hebat kini hanya digunakan bila terdapat resistensi terhadap antibiotika lain. Contohnya linkomisin.

- f. Antibiotik golongan kuinolon, senyawa-senyawa kuinolon berkhasiat bakterisid pada fase pertumbuhan kuman, berdasarkan inhibisi terhadap enzim DNA-*gyrase* kuman, sehingga sintesis DNAnyanya dihindarkan. Golongan ini hanya dapat digunakan pada infeksi saluran kemih (ISK) tanpa komplikasi.
- g. Antibiotik golongan kloramfenikol, kloramfenikol mempunyai spektrum luas. Berkhasiat bakteriostatik terhadap hampir semua kuman gram positif dan sejumlah kuman gram negatif. Mekanisme kerjanya berdasarkan perintangan sintesa polipeptida kuman. Contohnya kloramfenikol (Tjay & Rahardja, 2007).

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober 2017 – April 2018, bertempat di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

#### **B. Alat dan Bahan**

##### **1. Alat-alat yang digunakan**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas, pipet tetes, mikropipet, *autoclave* (model S-90N), *laminar air flow* (CURMA model 9005-FL), *sentrifuse*, incubator, vortex, pipet mikro, pembakar spritus, mikroskop cahaya, oven, *paper disc*, kaca preparat, kertas, kertas saring, kasa, kapas, rak tabung, *spreader* dan jarum ose.

##### **2. Bahan-bahan yang digunakan**

Sedangkan bahan-bahan yang digunakan adalah akuades, *Nutrient Agar* (NA) NaCl, *yeast extract*, agar, kasein, dekstrosa, susu skim cair (*Greenfields*), *Trichloroacetic acid* (TCA), buffer fosfat, alkohol dan tauco.

## C. Prosedur Penelitian

### 1. Tahap Persiapan

Seluruh alat gelas yang digunakan dicuci, dikeringkan dan disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

Sterilisasi ini bertujuan untuk menghilangkan mikroba dan pengotor.

a. Pembuatan Medium Padat *Skim Milk Agar* (SMA) (*Medium Agar Plate*)

Medium ini disiapkan dengan cara menimbang 1,5 gram agar, 0,5 gram kasein, 0,25 gram *yeast extract*, 0,1 gram *dextrose*. 15 mL susu skim cair dilarutkan dalam 100 mL aquades, dipanaskan, lalu disterilisasi dengan *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm. kemudian di tuang ke dalam cawan petri dan dibiarkan sampai mengeras.

b. Pembuatan Medium Kultur Cair

Medium ini disiapkan dengan cara menimbang 0,5 gram kasein, 0,25 gram *yeast extract*, 0,1 gram *dextrose*. 15 mL susu skim cair, dilarutkan dalam 100 mL aquades, dipanaskan sampai homogen, lalu disterilisasi dengan *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Medium yang telah disterilisasi kemudian didinginkan.

c. Pembuatan Medium Penyimpanan

Medium disiapkan dengan cara menimbang 1,5 gram agar, 0,5 gram kasein, 0,25 gram *yeast extract*, 0,1 gram dekstrosa dan menuangkan 15 mL susu skim cair, lalu dilarutkan dalam 100 mL aquades dan dipanaskan. Setelah larut kemudian dituang ke beberapa tabung reaksi sebanyak 5 mL lalu ditutup dengan sumbat, tabung yang telah berisi medium SMA lalu disterilisasi dengan *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

Medium yang telah disterilisasi diberi label nama (jenis media) dan diletakan miring sampai mengeras. Medium ini dapat digunakan setelah disimpan selama tiga hari.

d. Pembuatan Pereaksi Kunitz (Kunitz, 1950)

Larutan kasein dibuat dengan melarutkan 1 gram kasein dalam 100 mL buffer fosfat pH 7 pada penangas air mendidih. Larutan TCA dibuat dengan melarutkan 5 gram TCA dalam 100 mL air suling.

e. Pembuatan Pereaksi Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

Pengukuran kadar protein dengan metode lowry menggunakan 4 macam pereaksi, yaitu pereaksi A, pereaksi B, pereaksi C, dan pereaksi D. Pereaksi A dapat dibuat dengan cara melarutkan 2 gram  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dengan 100 mL NaOH 0,1N. Pereaksi B dapat dibuat dengan cara menambahkan 5 mL  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1% (w/v) ke dalam 5 mL larutan Na-K-tartarat 1% (w/v). Pereaksi C dapat dibuat dengan cara menambahkan 2 mL pereaksi B dengan 100 mL pereaksi A. Pereaksi D dapat dibuat dengan cara mengencerkan reagen Folin-Ciocalteu dengan akuades 1:1.

f. Pembuatan Medium Uji Motilitas

Medium ini disiapkan dengan cara menimbang 1 gram agar, 0,5 gram kasein, 0,25 gram *yeast extract*, 0,1 gram *dextrose*. 15 mL susu skim cair. dilarutkan dalam 100 mL aquades, dipanaskan. Setelah larut kemudian dituang ke beberapa tabung reaksi sebanyak 7 mL lalu ditutup dengan sumbat, tabung yang telah berisi medium SMA lalu disterilisasi dengan *autoclave* selama 15 menit dengan suhu  $121^\circ\text{C}$  dan tekanan 1 atm. Medium yang telah disterilisasi diletakan tegak sampai mengeras.

g. Pembuatan Medium Uji Antibiotik

Pembuatan medium ini digunakan untuk uji antibiotik dengan menggunakan medium *Nutrient Agar (NA)*. Medium dibuat dengan cara menimbang 2,8 gram NA yang dilarutkan dalam 100 mL akuades sembari dipanaskan, lalu disterilisasi dengan *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Medium yang telah disterilisasi kemudian diletakkan di cawan petri hingga mengeras

h. Pembuatan Kertas Cakram

Kertas cakram dibuat dari kertas saring *Whatman*, yang dipotong berbentuk lingkaran dengan diameter 5 mm.

## 2. Isolasi Mikroba dari Tauco

Isolasi dilakukan dengan menggunakan medium padat SMA dengan pengenceran bertingkat dengan *Spread Plate Method*. Sampel berupa tauco diambil bagian biji kedelainya lalu dihaluskan, kemudian diencerkan sampai 6 kali dengan cara kedelai yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 0,5 gram, disuspensikan ke dalam 10 mL air salin (suspensi  $10^1$ ), dari suspensi  $10^1$  diambil 1 mL dan disuspensikan ke 9 mL air salin (suspensi  $10^{-1}$ ), dari suspensi  $10^{-1}$  diambil 1 mL kemudian disuspensikan ke 9 mL air salin (suspensi  $10^{-2}$ ), dari suspensi  $10^{-2}$  diambil 1 mL kemudian disuspensikan ke 9 mL air salin (suspensi  $10^{-3}$ ), dari suspensi  $10^{-3}$  diambil 1 mL kemudian disuspensikan ke 9 mL air salin (suspensi  $10^{-4}$ ), dari suspensi  $10^{-4}$  diambil 1 mL kemudian disuspensikan ke 9 mL air salin (suspensi  $10^{-5}$ ), dari suspensi  $10^{-5}$  diambil 1 mL kemudian disuspensikan ke 9 mL air salin (suspensi  $10^{-6}$ ). Masing-masing pengenceran kemudian diambil sebanyak 200  $\mu$ L lalu diletakkan pada medium padat SMA lalu diratakan dengan *spreader*,

lalu diinkubasi selama 24 jam untuk mengetahui koloni mikroba yang menunjukkan aktivitas protease secara kualitatif yang ditunjukkan dengan adanya zona bening. Koloni mikroba yang menunjukkan adanya aktivitas protease dengan diameter zona bening yang paling luas yang kemudian dipilih untuk perlakuan ke tahap berikutnya, dilanjutkan dengan pemilihan koloni tunggal melalui pengenceran dengan metode *Streak Plate* dengan medium yang sama.

### **3. Penyimpanan Mikroba Hasil Isolasi**

Setelah didapatkan koloni tunggal dari metode *Streak Plate*, dilakukan penyimpanan dengan cara menanamkan bakteri pada agar miring. Setelah ditanam pada media agar miring disimpan di inkubator.

### **4. Seleksi Berdasarkan Indeks Proteolitik**

Masing-masing isolat yang diperoleh dan telah disimpan dalam agar miring, diambil dengan ose lurus lalu ditusukan pada bagian tengah medium *agar plate*. Cawan yang berisi media *agar plate* dan telah ditanamkan isolat pada bagian tengah diberi nama sesuai dengan isolat yang ditanam, lalu diinkubasi selama 48 jam. Pengamatan dilakukan dengan interval waktu 12 jam setelah inkubasi selama 24 jam. Setiap pengamatan diukur diameter isolat dan diameter zona bening untuk mengetahui indeks proteolitik (hasil dari diameter zona bening dibagi dengan diameter isolat) dari masing-masing isolat. Beberapa isolat dengan indeks proteolitik terbesar yang kemudian dilakukan pengujian berikutnya.

### **5. Seleksi Uji Kuantitatif Berdasarkan Aktivitas Protease**

Aktivitas protease diukur dari medium kultur yang diinokulasi dengan starter. Starter disiapkan dengan menginokulasi 30 mL medium cair dengan 3 ose biakan

isolat mikroba yang diperoleh, biakan tersebut diinokulasi pada suhu 32° C dan digoyang di atas *shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 18 jam (*over night*). Sebanyak 2% starter diinokulasikan ke dalam 50 ml medium yang sama, diinkubasikan selama 24 jam di atas *shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Kultur diambil sebanyak 2 mL lalu disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan larutan enzim dari partikel substrat, kemudian disimpan pada lemari pendingin sebelum di lakukan uji aktivitas protease dengan metode *Kunitz*.

1 mL larutan kasein dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambah 1 mL larutan enzim. Kemudian diinkubasi pada 35° C selama 30 menit. Setelah 30 menit, tabung reaksi dikeluarkan lalu ditambah 3 mL larutan TCA , larutan diaduk dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar agar pengendapan sempurna. Endapan yang terbentuk dipisahkan dengan sentrifugasi. Kontrol dibuat dengan menambahkan larutan TCA sebelum enzim lalu diinkubasi. Absorpsi filtrat diukur pada panjang gelombang 280 nm. Isolat dengan aktivitas protease tertinggi dipilih untuk uji selanjutnya.

#### **6. Uji Tingkat Kekeruhan (*Optical Density*) Isolat Terpilih**

Tingkat kekeruhan diukur dari medium kultur yang diinokulasi dengan starter. Starter disiapkan dengan menginokulasi 50 mL medium cair dengan 5 ose biakan isolat mikroba yang diperoleh, biakan tersebut diinokulasi pada suhu 32° C dan digoyang di atas *shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 18 jam (*over night*). Sebanyak 2% starter diinokulasikan ke dalam 100 ml medium yang sama, diinkubasikan selama 5 hari di atas *shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Kultur

diambil sebanyak 2 mL (setiap interval waktu 12 jam) lalu disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan larutan enzim dari partikel substrat. Larutan enzim diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

## 7. Uji Aktivitas Enzim Protease dari Isolat Terpilih

### a. Pengukuran Aktivitas Unit (AU)

Aktivitas Unit protease diukur dari medium kultur yang diinokulasi dengan starter. Starter disiapkan dengan menginokulasi 50 mL medium cair dengan 5 ose biakan isolat mikroba yang diperoleh, biakan tersebut diinokulasi pada suhu 32° C dan digoyang di atas *shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 18 jam (*over night*). Sebanyak 2% starter diinokulasikan ke dalam 100 ml medium yang sama, diinkubasikan selama 5 hari di atas *shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Kultur diambil sebanyak 2 mL (setiap interval waktu 12 jam) lalu disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan larutan enzim dari partikel substrat, kemudian disimpan pada lemari pendingin sebelum di lakukan uji aktivitas protease dengan metode *Kunitz*.

1 mL larutan kasein dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambah 1 mL larutan enzim. Kemudian diinkubasi pada 35°C selama 30 menit. Setelah 30 menit, tabung reaksi dikeluarkan lalu ditambah 3 mL larutan TCA , larutan diaduk dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar agar pengendapan sempurna. Endapan yang terbentuk dipisahkan dengan sentrifugasi. Kontrol dibuat dengan menambahkan larutan TCA sebelum enzim lalu diinkubasi.

b. Pengukuran Kadar Protein untuk Penentuan Aktivitas Spesifik (AS)

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Sebanyak 0,1 mL enzim protease yang diproduksi ditambahkan 0,9 mL akuades lalu direaksikan dengan 5 mL pereaksi C dan dihomogenkan. Lalu dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah itu ditambahkan dengan 0,5 mL pereaksi D dan dihomogenkan serta didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Kontrol dibuat dengan mengganti 0,1 mL enzim dengan 0,1 mL akuades, selanjutnya perlakuan sama seperti sampel. Setelah didiamkan selama 30 menit, sampel dan kontrol disentrifuga selama 15 menit, lalu dipisahkan supernatant dari endapannya untuk kemudian diukur absorbansinya. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm. Untuk menentukan konsentrasi protein enzim digunakan kurva standar BSA (*Bovine serum Albumin*).

## 8. Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri hasil isolasi dari tauco dilakukan dengan dua cara yaitu pewarnaan gram dan uji motilitas. Dari pewarnaan gram dapat diketahui bentuk dan struktur dinding sel bakteri sedangkan dengan uji motilitas dapat diketahui pergerakan dari bakteri.

a. Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram dilakukan secara septis, satu ose bakteri diletakkan pada kaca preparat yang telah dibersihkan dengan alkohol, diratakan hingga membentuk lapisan tipis, didiamkan hingga kering, setelah itu difiksasi dengan melewati kaca preparat di atas nyala api spiritus, kemudian ditetesi

dengan larutan kristal violet, setelah itu dicuci dengan air mengalir, kemudian ditetaskan larutan iodine, setelah beberapa saat dibilas kembali menggunakan air mengalir dan dikeringkan. kemudian dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop.

b. Uji Motilitas

Uji motilitas dilakukan dengan cara menusukkan 1 ose bakteri ke dalam agar tegak, kemudian diinkubasi. Apabila terdapat serat-serat halus di sekitar daerah tusukan berarti bakteri tersebut motil.

## 9. Identifikasi Jamur

Identifikasi jamur dilakukan dengan cara pengamatan secara mikroskopik. Jamur diambil 1 ose lalu diletakkan pada *object glass* lalu ditetesi dengan aquadest dan ditutup dengan *cover glass* dan diamati dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran okuler 4x, objektif 10x, total 40x. Perbesaran dilakukan beberapa kali dengan variasi perbesaran pada lensa.

## 10. Uji Aktivitas Antibiotik

Uji antibakteri dilakukan dengan menggunakan kultur bakteri pathogen *E. coli*.

Media pertumbuhan yang digunakan adalah *Nutrient Agar* (NA). Sebanyak 2,8 gram NA ditambahkan 100 mL akuades, kemudian dimasukkan dalam

Erlenmeyer dan dipanaskan hingga NA larut dan berwarna kuning bening.

Setelah itu medium NA yang telah dilarutkan dan alat lain seperti cawan petri,

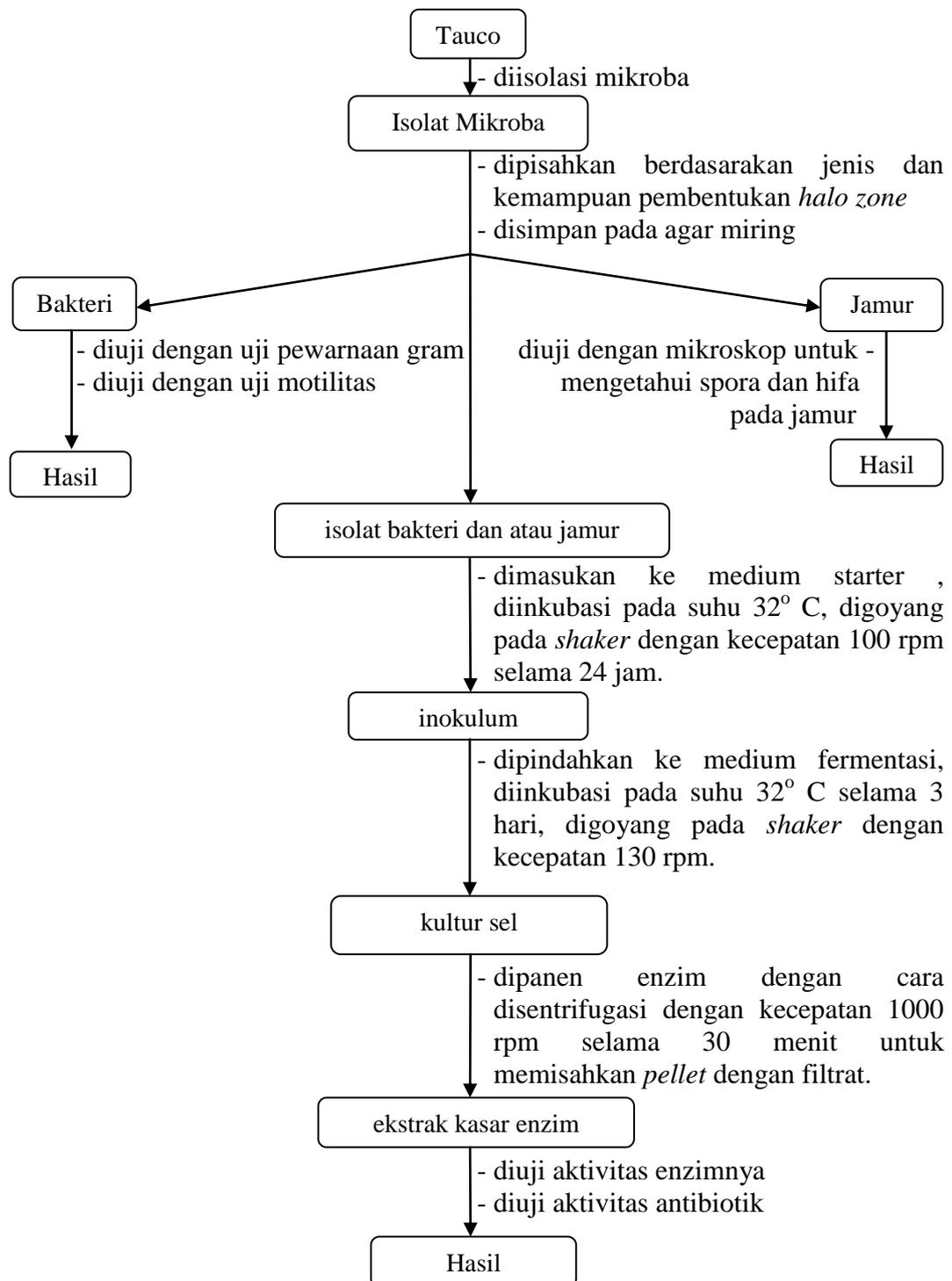
pinset, *cotton bud*, mikropipet dan kertas cakram disterilkan dalam *autoclave* pada

suhu 85°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Medium NA yang telah

disterilkan dituangkan ke dalam cawan petri dan didiamkan hingga mengeras.

Biakan bakteri *E. coli* sebanyak 1 ose dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 1 mL akuades dan dihomogenkan. Setelah itu, suspensi bakteri tersebut digoreskan pada medium NA yang telah mengeras. Lalu kertas cakram diletakkan pada permukaan media tersebut. Seluruh perlakuan antibakteri dilakukan dalam *Laminar Air Flow* (LAF) dan diberi sinar UV selama 3 menit. Adapun kertas cakram yang digunakan berisi (1) kontrol negatif berupa medium kultur tanpa isolat, (2) kontrol positif berupa antibiotik untuk bakteri yaitu *Chloramphenicol* 100 ppm, dan (3) sampel kultur bakteri terpilih dalam medium cair. Pengujian ini diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C, kemudian diamati untuk melihat dan menghitung zona hambatnya.

#### D. Diagram Alir Prosedur Penelitian



## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Dari proses isolasi diperoleh 15 isolat kandidat.
2. Dari proses seleksi berdasarkan indeks zona bening dipilih 9 isolat kemudian seleksi kedua dipilih 8 isolat.
3. Dari proses seleksi berdasarkan aktivitas enzim dipilih 5 isolat kemudian seleksi kedua dipilih 3 isolat yaitu isolat A.4.6, A.5.2 dan A.5.8.
4. Berdasarkan kurva pertumbuhan sel, pertumbuhan tertinggi terjadi pada waktu inkubasi 24 jam.
5. Tiga isolat terpilih menunjukkan Aktivitas Unit (AU), Kadar Protein (KP) Dan Aktivitas Spesifik (AS) pada waktu inkubasi 48 jam.
6. Tiga isolat terpilih memiliki daya hambat terhadap bakteri patogen yaitu bakteri *E. coli*.
7. Tiga isolat terpilih bersifat motil dan sifat gram nya negatif.

## B. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, maka untuk penelitian selanjutnya disarankan sebagai berikut :

1. Perlunya dilakukan karakterisasi berdasarkan karakteristik fenotipnya.  
Karakterisasi fenotip meliputi uji pertumbuhan isolat pada pH, suhu, dan salinitas yang berbeda, serta pengamatan terhadap tipe fermentasi isolat.  
Karakteristik fenotip juga dapat dilakukan untuk mengetahui genera dari isolat yang diamati.
2. Perlunya dilakukan isolasi bakteri proteolitik dari sumber isolat berupa produk pangan fermentasi lainnya juga untuk membandingkan konsentrasi enzim protease yang dihasilkan dari sumber isolat dari tauco dibandingkan sumber isolat lainnya.
3. Perlunya dilakukan uji antimikroba dengan beberapa golongan antibiotik dalam berbagai variasi konsentrasi agar lebih diketahui secara spesifik kemampuan isolat bakteri asam laktat dalam menghasilkan daya hambat.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alexopoulos, C.J. and Mims, C.W. 1979. *Introductory Mycology*. John Wiley and sons Inc. USA.
- Alakomi ,H.L., Skytta,E., Saarela, M., Mattila-Sandhol, T., Latva-Kala, K. and Helander, I.M. 2000. *Lactic acid permeabilizes gram negative bacteria by disrupting the outer membrane. Applied and Environmental Microbiology* (66): p.p 2001-2005.
- Backman, P. A., and Breneman, T. B. 1994. *Stem Rot*. dalam Kokalisburelle, N., *Compendium of Peanut Disease*. St Paul. Hal 36-37.
- Bergmeyer, H.U. and Grassl, M.M. 1983. *Method of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie. Weinheim.
- Buckle, K.A., R.A. Edwards, G.H. Fleet, M. Wootton. 2007. *Ilmu pangan*. Terj, dari *Food science* oleh Purnomo, H. & Adiono. UI-Press, Jakarta.
- Budianto, A.K. 2009. *Dasar-dasar Ilmu Gizi*. UMM-Press.Malang.
- Chaplin, M.F. and Bucke. 1990. *Enzyme Technology*. Cambridge University Press. Cambridge. Great Britain.
- Cupp, C., dan Enyard. 2008. Sigma's non-specific protease activity assay – casein as a substrate. *Journal of Visualized Experiments*. (19). p.p 899-900.
- Dillon, V.M. and Cook, P.E. 2000. Biocontrol of undesirable microorganisms in food. In: Dillon, V.M. and R.E. Board . *Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation*. Wallingford: CAB International.
- Dryer, R.L. 1993. *Biokimia Jilid I*.UGM-Press. Yogyakarta. Hlm. 180-181.
- Dwidjoseputro, D. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djambatan. Jakarta.

- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Fessenden, R.J. dan J. S. Fessenden. 1992. *Kimia Organik* Jilid I. Erlangga. Jakarta.
- Febriyansari, A.N. 2014. *Penerapan Model Gompertz Pada pertumbuhan Bakteri L. acidophilus dan B. Longum Di Media Adonan Es Krim (Ice Cream Mix atau ICM) Jenis Standar*. Skripsi. Malang: Universitas Brawijaya.
- Gandjar, I., Samson, A.R., Oetari, A., Santoso, I. 1999. *Pengenalan Kapang Tropik Umum*. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta.
- Gandjar, I., W. Sjamsuridzal dan Oetari, A. 2006. *Mikologi Dasar dan Terapan*. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta.
- Gupte, S. 1990. *Mikrobiologi Dasar*. Binarupa Aksara. Jakarta.
- Gultom, T. 2013. *Prosedur Praktikum Analisa Bahan Pangan*. Gramedia. Jakarta.
- Hidayat, H., Sekarini, Mageswari, A. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Penerbit Andi. Yogyakarta.
- Hosono, T.K. 1989. *Makanan Tradisional Nusantara*. Gramedia. Jakarta. Hal 39.
- Jawetz, M. and Adelberg. 2005. *Medical Microbiology*. Mc Graw Hill Companies Inc. New York. p.p 33 – 36.
- Khurrry.2012. *Pembutan Bathing Agent dan Aktivitas Enzim*. Press Inc. New York
- Kuswanto, K.R. 2004. *The Industry of Fermented Food in Indonesia: Present Status and Development*. Di dalam: Proceedings of the International Seminar on Developing Agricultural Technology for Value-added Food Production in Asia. Japan.
- Kwon, T.W. and Song, Y.S. 1996. *The Role of Soybean in Oriental Food System*. Proceedings of The Second International Soybean Processing and Utilization Conference. Bangkok.
- Limbong, L.N. 1981. *Pengaruh Jenis Kedelai, Konsentrasi Larutan Garam dan Waktu Fermentasi dalam Larutan Garam terhadap Mutu Tauco*. Skripsi. Departemen Teknologi Hasil dan Mekanisasi Pertanian Fakultas Pertanian. USU. Medan.

- Lowry, *et al.* 1951. Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* (3) (No. 12). p.p 193-265.
- Mc-Kane, L. 1996. *Microbiology Applied and Practice*. Mc-Graw Hill Book Company. New York.
- Meevootisom, V., Somsuk, P., Prachartam, R., and Feegel, L.W. 1983. Simple Screening Method for Isolation of Penicillin Acylase Producing Bacteria. *Applied Environment Microbial.* (no.46) p.p 1227-1229.
- Mongomeri, Rex. 1993. *Biokimia Jilid I*. UGM. Yogyakarta.
- Naiola, N. dan Widhyastuti, N. 2002. *Isolasi, Seleksi dan Optimasi Produksi Protease dari Beberapa Isolat Bakteri*. Berita Biologi. (6). Hal : 467-473.
- Nuritasari, Yana. 2012. *Isolasi dan Seleksi Mikroba Penghasil Enzim Penggumpal Susu dari Pangan Fermentasi sebagai Pengganti renin dalam Pembuatan Keju*. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. Jakarta. (3). Hal : 56-59.
- Odum, P.E. 1993. *Dasar-Dasar Ekologi*. Terjemahan Ir. Thahjono Samingan. UGM-Press. Yogyakarta.
- Page, D.S. 1997. *Prinsip-prinsip Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Palmer, T. 1995. *Understanding Enzymes 4<sup>th</sup> edition*. Prentice Hall. London.
- Pelczar, M. dan Chan, E. 1988, *Dasar-dasar Mikrobiologi*, UI Press, Jakarta
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. UI-Press. Jakarta.
- Poernomo, A.T. 2004. *Uji Aktivitas Crude Enzim Proteolitik Bacillus Subtilis FNCC 0059 Hasil Fermentasi Curah*. Majalah Farmasi Airlangga. (3) hal : 103-107.
- Pratiwi, S. 2007. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga. Jakarta. Hal. 34.
- Prawiroharsono, S. 2007. *Ilmu Usaha Tani*. BPFE. Yogyakarta. Hal. 16.
- Radji, M. 2008. *Penuntun Praktikum Mikrobiologi Farmasi*. Departemen Farmasi Fakultas MIPA Universitas Indonesia. Jakarta.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., dan Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* (no.62). p.p 597-635.

- Ray, B. 2004. *Fundamental Food Microbiology*. CRC Press LLC. USA.
- Sastrodinoto, S. 1980. *Biologi Umum I*. Gramedia. Jakarta.
- Setyaningsih, D. 2013. *Analisis Sensori untuk Industri Pangan dan Hasil Pertanian*. IPB-Press. Bogor.
- Soedigdo. 1998. *Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Enzim Ekstraseluler yang Berasal dari Sedimen Kawasan Mangrove*. Ilmu Kelautan. UNDIP. (17). Hal : 164-168.
- Schelenge, H.G. and K. Schmidt. 1994. *Protein Purification*. Springer Verlag. New York. Hal. 56.
- Smith, I.H. and Webber, N.S. 1988. *The Mushroom Hunter's Field Guide*. University of Michigan-Press. USA.
- Steinkraus, K.H. 1985. *Indigenous fermented-food technologies for small-scale industries*. Food and Nutrition Bulletin (vol.7). Japan.
- Stringer, J.L. 2006. *Basic Concepts in Pharmacology*. Mc Graw Hill. New York.
- Sumanti D. 2003. *Teknologi Fermentasi dalam Pelatihan Teknologi Pengolahan Hasil Pertanian*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Supartono, Wijayati, N. Herlina L. dan Ratnaningsih, E. 2008. *Produksi dan Karakterisasi Antibiotika dari Bacillus subtilis BAC4 Galur Lokal Baru. Laporan Penelitian Hibah Bersaing*. DP2M Dirjen Dikti Depdiknas RI.
- Susanti, A. 2003. *Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Beluntas terhadap Escherichia coli Secara In Vitro*. Jurnal Universitas Airlangga. p.p 12-18.
- Teyssset, C.M., F. de la Torre and J.R. Garel. 2000. Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* upon aeration: involvement of on NADH oxidase in oxidative stress. *Journal of Applied Environmental Microbiology*. (66) (1). p.p 262-267.
- Tjay, T. H., dan Rahardja, K. 2007. *Obat-Obat Penting*. Elex Media Komputindo. Jakarta. Hal. 41-42.

- Tjitrosoepomo. 1991. *Taksonomi Tumbuhan (Schizophyta, Thallophyta, Bryophyta, Pteridophyta)*. UGM. Yogyakarta.
- Torotora, G.J. 2001. *Microbiology*. Pearson Education. USA.
- Volk, W.A. dan Wheeler, M.F. 1993. *Mikrobiologi Dasar*. Erlangga. Jakarta.
- Ward, O.P. 1983. *Proteinases*. in Fogarty MW, editor. *Microbial and Enzyme Technology*. New York : *Applied Science Publishing*. (19) p.p 251-305.
- Winarno, F.G. 1980. *Pengantar Teknologi Pangan*. Gramedia. Jakarta. Hal. 27-28.
- Wirahardikusumah, M. 1989. *Biokimia : Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. ITB-Press. Bandung.
- Yunita, S. P. 2012. *Suksesi Mikroba dan Aspek Biokimiawi Fermentasi Mendai*. *Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga. Jakarta.
- Yuniati, R. 2015. *Uji Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Enzim Protease dari Tiga Isolat Bacillus sp. Galur Lokal Riau*. *Skripsi*. FMIPA, Universitas Riau, Pekanbaru.