

**ISOLASI DAN UJI ANTIBAKTERI ISOLAT PENGHASIL PROTEASE
DARI TERASI PRODUKSI DAERAH LAMPUNG**

(Skripsi)

Oleh

META FOSFI BERLIYANA



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

ABSTRACT

ISOLATION AND ANTIBACTERIAL TEST OF ISOLATE PRODUCING PROTEASE FROM SHRIMP PASTE LAMPUNG REGIONAL PRODUCTION

By

Meta Fosfi Berliyana

In term of effort to discover potency of proteolytic bacteria producing secondary metabolites from typical fermented food of Indonesia, bacterial isolation from 3 samples of shrimp paste origin of Lampung has been conducted by using SMA (*Skim Milk Agar*) selective medium. Four out of 10 candidates had the highest ability to degrade protein substrate in SMA medium. Those isolates were namely L-1-5, L-2-3, LM-3-2, and LM-8-1. From the measurement of Unit Activity (AU) with Kunitz method and measurement of Specific Activity (AS) with Lowry method of the enzyme, the high AU and AS showed by L-1-5 isolate was 314 (U/mL) and 918 (U/mg), L-2-3 isolate was 292 (U/mL) and 994 (U/mg), LM-3-2 isolate was 358 (U/mL) and 1.166 (U/mg), also LM-8-1 isolate was 401 (U/mL) and 1.422 (U/mg). Among those isolate, only LM-3-2 showed antibacterial activity with inhibiting zone of 2,3 mm. The four selected isolates were motile, gram – positive with bacil cell form, except for isolate LM-3-2 with streptobacill form.

Keywords: Proteolytic Bacteria, Protease, antibacterial, Shrimp Paste.

ABSTRAK

ISOLASI DAN UJI ANTIBAKTERI ISOLAT PENGHASIL PROTEASE DARI TERASI PRODUKSI DAERAH LAMPUNG

Oleh

Meta Fosfi Berliyana

Dalam upaya menggali potensi bakteri proteolitik penghasil metabolit sekunder dari makanan fermentasi khas Indonesia, telah dilakukan isolasi bakteri dari 3 sampel terasi produksi 3 daerah di Lampung menggunakan media selektif SMA (*Skim Milk Agar*). Dari 10 isolat kandidat, diperoleh 4 isolat terpilih yang memiliki kemampuan tertinggi dalam mendegradasi substrat protein pada media SMA, yaitu isolat L-1-5, L-2-3, LM-3-2 dan LM-8-1. Ditinjau dari pengukuran Aktivitas Unit (AU) enzim dengan metode Kunitz dan pengukuran Aktivitas Spesifik (AS) enzim dengan metode Lowry, diperoleh AU dan AS tertinggi pada isolat L-1-5 sebesar 314 (U/mL) dan 918 (U/mg), isolat L-2-3 sebesar 292 (U/mL) dan 994 (U/mg), isolat LM-3-2 sebesar 358 (U/mL) dan 1.166 (U/mg), serta isolat LM-8-1 sebesar 401 (U/mL) dan 1.422 (U/mg). Isolat LM-3-2 menunjukkan aktivitas antibakteri dengan zona hambat sebesar 2,3 mm. Keempat isolat terpilih bersifat motil, dan merupakan bakteri gram positif dengan bentuk sel basil, kecuali isolat LM-3-2 yang berbentuk streptobasil.

Kata kunci: *Bakteri Proteolitik, Protease, Antibakteri, Terasi.*

**ISOLASI DAN UJI ANTIBAKTER ISOLAT PENGHASIL PROTEASE DARI
TERASI PRODUKSI DAERAH LAMPUNG**

Oleh

Meta Fosfi Berliyana

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS

pada
Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

Judul Skripsi : **ISOLASI DAN UJI ANTIBAKTERI ISOLAT
PENGHASIL PROTEASE DARI TERASI
PRODUKSI DAERAH LAMPUNG**

Nama Mahasiswa : *Meta Fosfi Berliyana*

No. Pokok Mahasiswa : 1217011038

Jurusan : Kimia

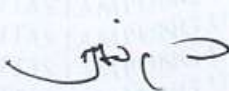
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Ketua Jurusan Kimia

Pembimbing

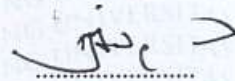

Dr. Eng. Supto Dwi Yuwono, M.T.
NIP 19740705 200003 1 001


Mulyono, Ph.D.
NIP 19740611 200003 1 002

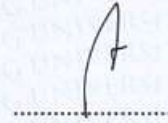
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

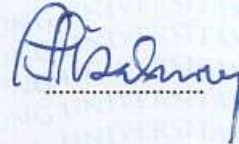
Ketua : **Mulyono, Ph.D.**



Penguji
Bukan Pembimbing : **Dra. Aspita Laila, M.S.**



Penguji
Bukan Pembimbing : **Dr. Noviany, S.Si., 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 : **03 Agustus 2018**

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Timor Tengah Utara pada tanggal 18 September 1994, anak pertama dari tiga bersaudara, yang merupakan buah hati dari pasangan Ponidi dan Martinah. Penulis menyelesaikan pendidikan Sekolah Dasar di SD Negeri 3 Wates, Padang Cermin pada tahun 2006, Sekolah Menengah Pertama (SMP) Negeri 2 Padang Cermin pada tahun 2009, Sekolah Menengah Atas (SMA) Negeri 1 Padang Cermin pada tahun 2012. Penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung pada tahun 2012 melalui jalur Seleksi Mandiri.

Selama menjadi mahasiswa, penulis pernah aktif dalam organisasi kemahasiswaan Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) periode 2012-2013 sebagai Kader Muda HIMAKI (KAMI), dan periode 2013-2014 serta 2014-2015 sebagai anggota Biro Penerbitan HIMAKI. Selain itu, penulis pernah menjadi asisten dosen praktikum Biokimia untuk Jurusan Teknik Pertanian dan Teknologi Hasil Pertanian (THP) pada periode 2015-2016 dan Jurusan serta Kimia pada periode 2016-2017. Pada tahun, 2017 penulis melakukan Kerja Praktik Lapangan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

MOTTO

“ Try or Never !!! ”

“ Sedikit Bicara Banyak Bekerja ”

(Ki.H.Ahmad Dahlan)

“Sebuah Pensil dan Impian dapat membawa anda kemana saja”

(J.Meyers)

“Orang Yang Tak Pernah Melakukan Kesalahan Maka Dia Tak Akan Pernah Menemukan Kebenaran Yang Berharga Untuk Hidup”

(Dr.(Cd).Ponidi)

PERSEMBAHAN

Dengan ketulusan hati ku persembahkan karya kecisku ini kepada :

*Kedua orang tuaku yang ku sayangi, Bapak dan Ibu.
Beribu terimakasih kuucapkan untuk semua kasih sayang,
semangat, pengorbanan, nasehat serta do'a yang selalu
diberikan untukku.*

*Kedua adikku tersayang, Kakak adik sepupu, Nenek dan seluruh
keluarga besar.*

Terimakasih untuk semua semangat dan do'anya

*Serta sahabat-sahabatku, teman-teman Kimia angkatan 2012 yang
selalu menemani dan berjuang bersamaku*

Dan Almamater tercinta.

SANWACANA

Assalamualaikum Wr. Wb.

Alhamdulillahirabbil'alamin. Puji dan syukur penulis senantiasa haturkan kehadiran Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Penyayang, karena atas ridho dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “ **Isolasi dan Uji Antibakteri Isolat Penghasil Protease dari Terasi Produksi Daerah Lampung** ”. Shalawat serta salam tak lupa penulis haturkan kepada baginda Rasulullah Muhammad SAW beserta keluarga dan sahabatnya, yang dinanti-nantikan syafa'atnya di Yaumul Akhir kelak. Aamiin.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Dalam kesempatan ini penulis ingin mengucapkan banyak terimakasih yang tulus kepada :

1. Kedua orang tua, Bapak dan ibu yang selalu memberikan do'a terbaik, semangat, dan kasih sayang yang tak terhingga, terimakasih telah memberikan banyak perhatian dan pengorbanan kepada penulis meskipun penulis banyak kekurangan dan kesalahan, tetapi tak mengurangi sedikitpun kasih sayang dari Bapak dan Ibu,

sehingga penulis dapat menuntut ilmu hingga perguruan tinggi dan menyelesaikannya.

2. Bapak Mulyono, Ph.D., selaku Dosen pembimbing skripsi sekaligus pembimbing akademik Terimakasih karena telah membimbing penulis dengan sabar, memberikan ilmu pengetahuan, arahan, dan nasehat serta motivasi kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
3. Dosen pembahas satu, ibu Dra. Aspita Laila, M.S Terimakasih karena telah membimbing, memberikan kritik dan saran serta ilmunya kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
4. Dosen pembahas dua, ibu Dr. Noviany, M.Si Terimakasih karena telah memberikan masukan berupa kritik dan saran serta ilmunya kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
5. Bapak Prof. Warsito, D.E.A., Ph.D., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam di Universitas Lampung.
6. Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M. T., selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah memberikan bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
7. Laboran Biokimia, Bapak Jon Isman, S.E. Terimakasih karena telah banyak membantu penulis selama menjalani penelitian di laboratorium.
8. Serta segenap staf pengajar dan karyawan Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
9. Kedua Adikku tersayang, Firman Fadhli Mushawwiri dan Novella Laila Putri, yang telah memberikan keceriaan dan penghibur kejenuhan. Semoga dapat

mengeyam pendidikan yang lebih tinggi dan mendapatkan ilmu-ilmu yang bermanfaat.

10. Keluarga besar yang selalu memberikan nasehat, motivasi, dan kasih sayang kepada penulis, sehingga penulis selalu optimis dalam menghadapi semuanya.
11. Teman terbaikku Apri Welda, S.Si, Diani Iska Miranti, S.Si, dan Wiwin Esty Sarwita, S.Si yang selalu memberikan semangat dan motivasi juga selalu menemani penulis untuk mengurus semua persyaratan wisuda dan saat masa-masa sulit penulis.
12. Teman-teman *Sabianovers*, Erni, Mpok Yelbi, Linda Dio, Trayana, Mbak Lia, Uni Atul, Adista, Vanesha, Etis, Ratih, Tami, Wulan, Dini, Tari, Anjar, Delia, Neily, Hikmah, Anisa, Nadia, Ajeng dan adeknya, Atika, Herma, Diana, Uti, Wayan, Maudy, Dwi, Eva, Ezza, Tiara dan Angen yang senantiasa menemani, memberi semangat, menghibur serta terus tumbuh bersama selama masa perkuliahan penulis.
13. Partner Orion Flowry, Mbak Lia yang memberikan banyak motivasi dan pengalaman-pengalaman baru serta semangat kepada penulis.
14. Teman-teman Lab. Biokimia, khususnya Ayu Imani, Teh Didi, Putri, Syatira, Sinta, Mbak Surtini, Pak Helda, Bidari, Monica, Melia, Rian, Vina, Tyas, Asrul, Fernando, Rahma, Bunga, Riza, Rica, Erika, Agung, Leony, Ayuning yang selalu setia menemani dan berbagi keluh kesah selama penelitian, serta selalu meramaikan Lab. dan berjuang bersama untuk mendapatkan gelar S.Si.
15. Teman-teman Chemistry 2012, Adi Setiawan, S.Si; Aditian Sulung S; Agus Ardiansyah; Ajeng Wulandari, S.Si; Ana Maria Kristiani, S.Si; Apri Welda, S.Si;

Arif Nurhidayat, S.Si; Arya Rifansyah, S.Si; Atma Istanami, S.Si; Ayu Imani, S.Si; Ayu Setianingrum, S.Si; Deborah Jovita, S.Si; Derry Vardella, S.Si; Dewi Aniatul Fatimah, S.Si; Diani Iska Miranti, S.Si; Dwi Aggraini, S.Si; Edi Suryadi, S.Si; Eka Hurwaningsih, S.Si; Elsa Zulha, S.Si; Erlita Aisyah, S.Si; Febita Glyssenda, S.Si; Feby Rinaldo Pratama Kusuma, S.Si; Fenti Visiamah, S.Si; Ferdinand Haryanto Simangunsong, S.Si; Fifi Adriyanthi, S.Si; Handri Sanjaya; Hiqi Alim; Indah Wahyu Purnamasari, S.Si; Indry Yani Saney, S.Si; Intan Mailani, S.Si; Ismi Khomsiah, S.Si; Jean Pitaloka, S.Si; Jenny Jessica Sidabalok; Khoirul Anwar, S.Si; Maria Ulfa, S.Si; Muhammad Rizal R; Murni Fitria, S.Si; Nila Amalin Nabilah, S.Si; Putri Ramadhona, S.Si; Radius Uly Artha, S.Si; Riandra Pratama Usman, S.Si; Rifki Husnul Khuluk, S.Si; Rizal Rio Saputra, S.Si; Rizki Putriyana, S.Si; Ruliana Juni Anita, S.Si; Ruwaidah Muliana, S.Si; Siti Aisah, S.Si; Siti Nur Halimah, S.Si; Sofian Sumilat Rizki, S.Si; Sukamto, S.Si; Susy Isnaini Hasanah, S.Si; suwarda Dua Imatu Dela, S.Si; Syathira Assegaf, S.Si; Tazkiya Nurul, S.Si; Tiand Reno, S.Si; Tiara Dewi Astuti, S.Si; Tiurma Debora Simatupang, S.Si; Tri Marital, S.Si; Ulfatun Nurun, S.Si; Wiwin Esty Sarwita, S.Si; Yepi Triapriani, S.Si; Yunsi'U Nasy'ah, S.Si; Zubaidi, S.Si. Terimakasih telah menemani, mewarnai kehidupan kampus penulis, dan berjuang bersama untuk mendapatkan gelar S.Si.

16. Kakak-kakak sebimbingan, mbak Ariyanti, mbak Rani, mbak Ayu, mbak Ajeng dan Kak Aziz. Terimakasih atas motivasi dan waktu yang telah diberikan, serta arahan kepada penulis dan teman-teman agar dapat menyelesaikan penelitian dengan baik dan lancar.

17. Adik-adik sebimbingan 2013, semoga diberi kelancaran disetiap urusan kedepannya.
18. Adik-adik sebimbingan 2014 dan 2015, semoga diberi kelancaran penelitiannya .
19. Adik-adik 2016, 2017, dan 2018 tetap semangat mengikuti perkuliahan, dan tetap peduli dengan sesama temannya.
20. Semua pihak yang telah membantu dan mendukung penulis dalam penyusunan skripsi ini.

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

Bandar Lampung, 2018
Penulis

Meta Fosfi Berliyana

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR GAMBAR	iii
DAFTAR TABEL	iv
 I. PENDAHULUAN	 1
A. Latar Belakang.....	1
B. Tujuan Penelitian	3
C. Manfaat Penelitian	3
 II. TINJAUAN PUSTAKA	 4
A. Udang Rebon	4
B. Terasi	5
C. Fermentasi Terasi.....	6
D. Mikroorganisme.....	8
E. Bakteri.....	10
F. Enzim Protease	11
G. Bakteri Patogen <i>Escherichia coli</i>	17
H. Metabolit Sekunder.....	18
I. Antibakteri	19
J. Identifikasi Fisiologis Bakteri.....	21
 III. METODOLOGI PENELITIAN	 23
A. Waktu dan Tempat Penelitian.....	23
B. Alat dan Bahan	23
C. Prosedur Penelitian	24
1. Tahap Persiapan.....	24
a. Persiapan Alat.....	24
b. Pembuatan Medium Isolasi Padat.....	24
c. Pembuatan Medium Kultur Cair	25
d. Pembuatan Pereaksi Kuitz untuk Pengukuran Aktivitas Protease	25
e. Pembuatan Pereaksi Lowry untuk Pengukuran Kadar Protein	25
f. Peremajaan <i>Escherichia coli</i>	26

g. Preparasi Kertas Cakram	26
2. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease	26
3. Skrining Bakteri Penghasil Enzim Protease	27
4. Produksi Enzim	27
5. Uji Aktivitas Protease	27
6. Penentuan Kurva Pertumbuhan	28
7. Uji Kadar Protein	28
8. Identifikasi Bakteri	29
a. Pewarnaan Gram	29
b. Uji Motilitas	30
c. Uji Antibakteri	30
D. Diagram Alir Prosedur Penelitian	31
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	32
A. Isolat Bakteri Penghasil Enzim Protease	32
B. Isolat Kandidat Bakteri Penghasil Enzim Protease	33
C. Aktivitas Protease Isolat Terpilih	35
D. Kurva Pertumbuhan dan Waktu Optimum Aktivitas Enzim Protease	38
E. Aktivitas Spesifik 4 Isolat Terpilih	42
F. Identitas Isolat Terpilih	45
1. Gram dari 4 Isolat Terpilih	45
2. Motilitas 4 isolat Terpilih	47
G. Kemampuan Antibakteri 4 Isolat Terpilih	48
V. KESIMPULAN DAN SARAN	51
A. Kesimpulan	51
B. Saran	52

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kandungan gizi udang rebon per 100 g	5
2. Kandungan gizi terasi udang	6
3. Sepuluh isolat hasil isolasi 8 kali proses skrining	33
4. Indeks proteolitik isolat hasil isolasi	34
5. Aktivitas enzim protease 4 isolat terpilih	37
6. Penamaan 10 isolat kandidat	59
7. Data standar tirosin	61
8. Data aktivitas enzim protease 8 isolat kandidat pada waktu inkubasi 24 jam	62
9. Data aktivitas enzim protease 8 isolat kandidat pada waktu inkubasi 48 jam	63
10. Data aktivitas enzim protease 4 isolat terpilih pada waktu inkubasi 24 jam	64
11. Data aktivitas enzim protease 4 isolat terpilih pada waktu inkubasi 48 jam	64
12. Data kurva pertumbuhan dan waktu optimum aktivitas enzim protease isolat L-1-5	65
13. Data kurva pertumbuhan dan waktu optimum aktivitas enzim	

protease isolat L-2-3	65
14. Data kurva pertumbuhan dan waktu optimum aktivitas enzim protease isolat LM-3-2	66
15. Data kurva pertumbuhan dan waktu optimum aktivitas enzim protease isolat L-1-5	66
16. Data standar BSA	68
17. Data aktivitas spesifik enzim protease isolat L-1-5	69
18. Data aktivitas spesifik enzim protease isolat L-2-3	69
19. Data aktivitas spesifik enzim protease isolat LM-3-2	70
20. Data aktivitas spesifik enzim protease isolat LM-8-1	70
21. Hasil karakterisasi 4 isolat terpilih	72

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur sekunder <i>beta-sheet</i> dan <i>alpha-helix</i> protein	15
2. Indeks proteolitik 10 isolat	34
3. Grafik aktivitas enzim protease 8 isolat terpilih	36
4. Grafik aktivitas unit enzim protease 4 isolat terpilih	37
5. Grafik profil pertumbuhan sel dan aktivitas enzim protease 4 Isolat	40
6. Grafik perbandingan profil pertumbuhan sel 4 isolat	41
7. Grafik perbandingan aktivitas enzim protease 4 isolat	41
8. Grafik kadar protein dan aktivitas enzim Protease	44
9. Gram 4 isolat terpilih	46
10. Motilitas isolat terpilih	47
11. Kemampuan antibakteri isolat terpilih terhadap <i>E. Coli</i>	48
12. Koloni tunggal 10 isolat kandidat	60
13. Kurva Standar Tirosin	61
14. Kurva Standar BSA	68

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Salah satu komoditas laut yang cukup besar di perairan Indonesia adalah udang. Setiap tahunnya, produksi perikanan tangkap terus meningkat. Hal ini memungkinkan dilakukannya pengembangan produk olahan. Berdasarkan data Kementerian Kelautan dan Perikanan (2011), diketahui bahwa sekitar 19,38 % total ikan yang didaratkan di pasaran dalam bentuk olahan tradisional, dengan olahan ikan fermentasi mencapai 1 % dari total produksi. Salah satu jenis produk olahan ikan fermentasi khas Indonesia ialah terasi.

Terasi yang berbahan dasar ikan atau udang mengandung beragam mikroorganisme dengan beragam potensi. Salah satunya, mikroorganisme yang memiliki potensi untuk obat-obatan, suplemen, kosmetik, agrokimia, dan enzim, yang umumnya berasal dari bakteri metabolit sekunder. Metabolit diklasifikasikan menjadi dua, yaitu metabolit primer yang penting untuk pertumbuhan dan kelangsungan hidup makhluk hidup, serta metabolit sekunder yang tidak digunakan untuk pertumbuhan. Metabolit sekunder dibentuk dari metabolit primer pada kondisi stres. Keterbatasan nutrisi dan penurunan kecepatan pertumbuhan akan menghasilkan sinyal yang mempunyai efek regulasi sehingga menyebabkan diferensiasi kimia membentuk metabolit sekunder. Salah

satu kegunaan metabolit sekunder adalah sebagai antibiotik. Antibiotik yang dihasilkan oleh mikroorganisme hidup dalam kondisi rendah dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh organisme lain (Rahayu, 2006). Mikroba dari terasi juga berpotensi dalam menghasilkan metabolit sekunder yang berfungsi sebagai antibiotik.

Isolasi mikroba proteolitik dari terasi telah dilaporkan oleh beberapa peneliti, diantaranya pada penelitian sebelumnya telah berhasil diisolasi bakteri *Bacillus subtilis* strain FP-133 yang bersifat halotoleran. Enzim yang telah dimurnikan menunjukkan aktivitas optimum pada konsentrasi NaCl 5% (Setyorini *et al.*, 2006). Selain itu, dari tahap pemurnian dengan presipitasi ammonium sulfat 55%, dialisis, dan pemekatan dengan polietilenglikol (PEG), telah diperoleh enzim protease yang menunjukkan aktivitas fibrinolitik dari isolat bakteri D1T2 yang diisolasi dari terasi Medan (Kristiana *et al.*, 2006). Dari penelitian lain, dilakukan uji pengaruh ion logam sebagai aktivator atau inhibitor terhadap enzim protease yang diukur dengan spektrofotometer pada λ 280 nm. Dengan aktivitas tertinggi sebesar 93,11 U/mL pada waktu inkubasi tiga hari, suhu 50°C dan pH 8,5, telah diperoleh bakteri protease alkalin *Bacillus subtilis* strain A₁ yang diisolasi dari terasi Samarinda (Soeka dan Sulistiani, 2014).

Pada penelitian ini dilakukan eksplorasi bakteri dari terasi asal daerah Lampung, yaitu Labuhan Maringgai, Lempasing, dan Menggala. Isolat yang diperoleh mampu menghasilkan metabolit sekunder yang mampu menghambat perkembangan bakteri patogen *Escherichia coli*. Untuk mengetahui aktivitas dan kuantitas isolat yang diperoleh, uji aktivitas protease ditentukan menggunakan

metode *Kunitz*, dan kadar protein ditentukan menggunakan metode *Lowry*. Isolat terpilih selanjutnya diuji aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram.

B. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mendapatkan isolat bakteri protease yang terdapat pada terasi
2. Mengidentifikasi karakteristik isolat bakteri protease dari terasi
3. Mengetahui kemampuan antibakteri isolat bakteri protease dari terasi terhadap *Eschericia coli*

C. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini ialah mengetahui karakteristik isolat bakteri protease yang terdapat pada terasi serta kemampuan bakteri protease sebagai antibakteri yang dapat dimanfaatkan dalam industri pangan maupun industri lainnya.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Udang Rebon

Udang rebon (*Acetes*) adalah salah satu hasil laut dari jenis udang-udangan dengan ukuran kecil. Di pasaran, udang rebon lebih mudah ditemukan dalam bentuk bahan seperti terasi atau telah dikeringkan, sangat jarang dijual dalam keadaan segar (Putra, 2016). Menurut Grave (2015), udang rebon pertama kali ditemukan oleh H. Milne-Edwards tahun 1830 dan diklasifikasikan dalam genus *Acetes*. Sampai saat ini, udang rebon terdapat 14 jenis spesies, dimana spesies *Acetes indicus* merupakan spesies udang rebon terbanyak di Indonesia. Udang memiliki sifat fototaksis positif, yaitu tingkah lakunya yang tertarik untuk mendekati sumber cahaya. Udang rebon hidup diperairan pantai yang dangkal dan belumpur (Akbar *et al.*, 2013).

Kandungan gizi udang rebon hampir sama dengan kandungan gizi udang segar. Karena itu, udang rebon baik dikonsumsi pada masa pertumbuhan. Bahkan udang rebon efektif dalam memperbaiki gizi bagi anak malnutrisi. Berikut kandungan gizi udang rebon dapat dilihat di Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan gizi udang rebon per 100 g

Kandungan gizi	Udang rebon kering	Udang rebon segar
Energi (kkal)	299,0	81,0
Protein (g)	59,4	16,2
Lemak (g)	3,6	1,2
Karbohidrat (g)	3,2	0,7
Kalsium (mg)	2,3	757,0
Fosfor (mg)	265,0	292,0
Besi (Mg)	21,4	2,2
Vitamin A (SI)	0	60,0
Vitamin B1 (mg)	0,1	0,1
Air (g)	21,6	79,0

Sumber: Putra, 2016

B. Terasi

Menurut Subagio (2006), terasi yang merupakan produk awetan dari ikan atau udang memiliki rasa gurih yang didapatkan dari senyawa asam-asam amino penyusun protein, seperti asam glutamat dan asam nukleat. Terasi merupakan salah satu produk hasil fermentasi ikan atau udang yang mengalami perlakuan penggaraman tanpa diikuti dengan penambahan warna, kemudian didiamkan beberapa saat agar terjadi proses fermentasi (Afrianto dan Liviawaty, 2005). Berikut kandungan gizi terasi udang dapat dilihat di Tabel 2.

Tabel 2. Kandungan gizi terasi udang

Zat gizi	Komposisi
Energi (kal)	155,0
Protein (gram)	22,3
Lemak (gram)	2,9
Hidrat arang (gram)	9,9
Serat (gram)	2,7
Abu (gram)	31,1
Kalsium (mg)	38,2
Fosfor (mg)	726,0
Besi (mg)	78,5
Karoten (mkg)	0
Vitamin A (g)	0
Vitamin B1 (g)	0,24
Vitamin C (kkal)	0
Air (gram)	33,8
b.d.d (%)	100,0

Sumber: Suprapti, 2002

C. Fermentasi Terasi

Fermentasi berasal dari kata latin “*fervere*” yang berarti mendidih yang menunjukkan adanya aktivitas pada ekstrak buah-buahan atau malt biji-bijian. Kelihatan seperti mendidih karena terbentuknya gelembung-gelembung CO₂ akibat dari proses katabolisme secara anaerobik dari gula yang ada dalam ekstrak. Fermentasi merupakan suatu reaksi reduksi-oksidasi dalam sistem biologi yang menghasilkan energi (Tanyildizi *et al.*, 2007). Menurut Hidayat *et al.*, (2006), fermentasi dapat didefinisikan sebagai perubahan gradual oleh enzim beberapa bakteri, khamir, dan jamur. Dalam proses fermentasi, sifat-sifat proses harus disesuaikan dengan kondisi yang dibutuhkan mikroba dalam melakukan metabolisme. Kondisinya dapat aerob ataupun anaerob, sedangkan bentuk mediumnya dapat cair ataupun padat. Untuk proses produksinya dapat digunakan

proses tertutup atau kontinu. Perbedaan kondisi yang dibutuhkan mikroba juga mempengaruhi hasil, seperti :

1. Tipe fermentor
2. Optimasi lingkungan : pH, aerasi, suhu, kadar nutrien
3. Macam alat bantu : sumber air, listrik, kompresor, dan sebagainya
4. Cara pengambilan hasil, sterilisasi

Dalam pembuatan terasi, proses fermentasi berlangsung karena adanya aktifitas enzim yang berasal dari udang. Pada proses fermentasi terjadi penguraian senyawa-senyawa yang lebih sederhana oleh enzim (Afrianto dan Liviawati, 2005).

Prinsip dari fermentasi udang adalah fermentasi di dalam larutan garam atau dengan penambahan garam kristal sehingga terbentuk flavor. Penambahan garam berfungsi sebagai pengendali fermentasi, garam dapat menarik kandungan air dalam suatu bahan, dan menarik air dari sel mikroorganisme (plasmolisis), garam juga dapat menghambat kerja enzim proteolitik. Sehingga enzim proteolitik akan lambat aktivitasnya dalam menghidrolisis karbohidrat, protein, dan lemak dalam molekul sederhana maupun senyawa-senyawa yang mudah menguap (Majid *et al.*, 2014). Menurut Suprihatin (2010), garam yang digunakan berfungsi sebagai pengawet serta sebagai media penyeleksi pertumbuhan mikroba. Penambahan garam membantu menurunkan pH pada bahan pembuatan terasi, sehingga mikroorganisme pembusuk sulit untuk tumbuh, sedangkan bakteri asam laktat dapat tumbuh dengan baik. Kandungan nitrogen pada bahan mula-mula rendah, namun setelah disimpan beberapa hari (selama proses fermentasi) akan menyebabkan terjadinya proses hidrolisis protein sehingga kandungan nitrogen

terlarut bertambah banyak. Pada prinsipnya protein akan didegradasi menjadi asam-asam amino dan turunannya. Proses fermentasi ini menghasilkan gas ammonia dimana gas tersebut menyebabkan aroma yang menyengat pada terasi (Hanafiarti, 2015).

D. Mikroorganisme

Mikroorganisme adalah sumber produksi enzim yang potensial dan lebih banyak digunakan dibandingkan hewan dan tumbuhan. Sebagai sumber enzim, mikroorganisme lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat dan mudah diatur, dapat tumbuh pada substrat yang murah, dapat diproduksi dalam skala besar dan mutu yang lebih seragam (Hanafiarti, 2015). Banyak mikroorganisme yang telah dimanfaatkan untuk produk fermentasi. Mikroorganisme yang digunakan dalam fermentasi pangan tradisional umumnya merupakan kultur campuran yang diperoleh dari bahan baku ataupun lingkungan dan sering tidak teridentifikasi. Sebagai faktor utama dalam proses fermentasi, mikroba harus memenuhi syarat-syarat tertentu, yaitu :

1. Murni. Untuk menjaga agar biakan tetap murni dalam proses, maka kondisi lingkungan harus dijaga tetap steril.
2. Unggul. Pada kondisi fermentasi yang diberikan, mikroba harus mampu menghasilkan perubahan-perubahan yang dikehendaki. Sifat unggul yang ada harus dipertahankan. Hal tersebut berkaitan dengan kondisi proses yang diharapkan. Proses rekayasa genetik dapat dilakukan untuk memperbaiki sifat jasad dengan maksud mempertinggi produk yang diharapkan dan mengurangi produk campuran.

3. Stabil. Pada kondisi yang diberikan, mikroba harus mempunyai sifat-sifat yang tetap, tidak mengalami perubahan karena mutasi atau lingkungan.
4. Bukan patogen. Mikroba yang digunakan haruslah yang bukan patogen bagi manusia maupun hewan, terkecuali untuk produksi bahan kimia tertentu. Jika digunakan, mikroba patogen harus dijaga agar tidak menimbulkan akibat samping pada lingkungan (Hidayat *et al.*, 2006).

Ada empat macam fase pertumbuhan mikroorganisme, yaitu :

1. Fase lag merupakan fase adaptasi, yaitu fase penyesuaian mikroorganisme pada suatu lingkungan baru. Ciri fase lag adalah tidak adanya peningkatan jumlah sel, yang ada hanyalah peningkatan ukuran sel. Lama fase lag tergantung pada kondisi dan jumlah awal mikroorganisme dan media pertumbuhan. Bila sel-sel mikroorganisme diambil dari kultur yang berlainan, maka yang terjadi adalah mikroorganisme tersebut tidak mampu tumbuh dalam kultur.
2. Fase log (fase eksponensial) merupakan fase dimana mikroorganisme tumbuh dan membelah pada kecepatan maksimum, tergantung pada genetika mikroorganisme, sifat media, dan kondisi pertumbuhan. Hal yang dapat menghambat laju pertumbuhan adalah bila satu atau lebih nutrisi dalam kultur habis, sehingga hasil metabolisme yang bersifat racun akan tertimbun dan menghambat pertumbuhan.
3. Fase stasioner merupakan fase dimana pertumbuhan mikroorganisme berhenti dan terjadi keseimbangan antara jumlah sel yang membelah dengan jumlah sel yang mati. Pada fase ini terjadi akumulasi produk buangan yang toksik. Pada sebagian besar kasus, pergantian sel terjadi dalam fase ini. Terdapat

kehilangan sel yang lambat karena kematian diimbangi oleh pembentukan sel-sel baru melalui pertumbuhan dan pembelahan dengan nutrisi yang dilepaskan oleh sel-sel yang mati karena mengalami lisis.

4. Fase kematian, fase dimana jumlah sel yang mati meningkat. Faktor penyebabnya adalah ketidaktersediaan nutrisi dan akumulasi produk buangan yang toksik (Pratiwi, 2008).

E. Bakteri

Bakteri merupakan organisme bersel satu yang berukuran *micron* (1/ 1000 mm) (Dwidjoseputro, 2010). Ciri khas reproduksi bakteri adalah pembelahan biner (binary fission), di mana dari satu sel bakteri dapat dihasilkan dua sel anakan yang sama besar. Bila sel tunggal bakteri berproduksi dengan pembelahan biner, maka populasi bakteri bertambah secara geometrik:

$$1 \rightarrow 2 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3 \rightarrow 2^4 \dots 2^n$$

Interval waktu yang dibutuhkan bagi sel untuk membelah diri atau untuk populasi menjadi berjumlah dua kali lipat dikenal sebagai waktu generasi. Tidak semua spesies bakteri memiliki waktu generasi berkisar 1-3 jam. Waktu generasi untuk spesies bakteri tertentu juga tidak sama pada semua kondisi. Waktu generasi sangat tergantung pada cukup tidaknya nutrisi di dalam media pertumbuhan serta sesuai tidaknya kondisi fisik yang mendukung pertumbuhan (Pratiwi, 2008).

Seperti makhluk hidup lain, bakteri juga membutuhkan makanan, air dan suhu yang sesuai untuk hidup dan berkembang biak. Untuk mendapatkan bakteri yang potensial perlu dilakukan penapisan mikroorganisme dari lingkungan (Dwidjoseputro, 2010). Umumnya isolat bakteri diperoleh sesuai dengan

lingkungan tempat hidupnya. Hal ini dikarenakan kondisi lingkungan tersebut biasanya digunakan bakteri sebagai substrat utamanya (Khairunnisa, 2014).

Bakteri yang berhasil diisolasi dari terasi adalah *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Staphylococcus*.

Keberadaan *Bacillus sp.* sangat diharapkan keberadaannya terutama untuk proses fermentasi terasi udang, karena bakteri jenis *B. Mycoides* banyak digunakan sebagai starter dalam mempercepat proses fermentasi pada berbagai bahan pangan. *Bacillus sp.* merupakan jenis bakteri yang berbentuk basil (batang), bersifat gram positif, motil, katalase positif, oksidasi negatif dan bersifat oksidatif-fermentatif. Selain *Bacillus sp.*, *Staphylococcus Piscifermentans* juga merupakan fermenter, karena dapat memunculkan rasa asam, mengawetkan, serta mempengaruhi tingkat higienitas yang tinggi. *Staphylococcus sp.* merupakan bakteri yang berbentuk kokus, gram positif, nonmotil, katalase positif, oksidase negative dan bersifat fermentative (Setiawan *et al.*, 2006).

F. Enzim Protease

Enzim adalah protein yang khusus disintesa oleh sel hidup untuk mengkatalisis reaksi yang berlangsung di dalamnya (Fidyasari, 2013). Enzim mempunyai fungsi penting sebagai katalisator reaksi biokimia yang secara kolektif membentuk metabolisme-perantara (*intermediary metabolism*) dari sel (Wirahadikusumah, 2001). Enzim memiliki tenaga katalitik yang luar biasa, yang biasanya jauh lebih besar dari katalisator sintetik. Spesifisitas enzim amat tinggi terhadap substratnya, enzim mempercepat reaksi kimiawi spesifik tanpa pembentukan produk samping. Sebagai unit fungsional dari metabolisme sel,

enzim bekerja dengan urutan-urutan tertentu, mengkatalisis ratusan reaksi bertahap yang menguraikan molekul nutrient, reaksi yang menyimpan dan mengubah energi kimiawi, dan yang membuat mikromolekul sel (Juniarso, 2008).

Menurut Poedjiadi *et al.*, (2009), enzim berfungsi sebagai katalis proses biokimia yang terjadi dalam sel maupun diluar sel, yang dapat mempercepat reaksi 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat daripada apabila reaksi tersebut berlangsung tanpa katalis. Beberapa kelebihan enzim sebagai katalis dibandingkan dengan katalisator sintetik antara lain : (1) enzim mempunyai spesifitas singgi, (2) enzim bekerja secara spesifik (hanya mengkatalisis substrat tertentu), (3) tidak terbentuk produk samping yang tidak diinginkan, (4) mempunyai produktivitas tinggi, (5) produk akhir pada umumnya tidak terkontaminasi sehingga mengurangi biaya purifikasi dan mengurangi efek kerusakan terhadap lingkungan (Fitriyanti, 2014).

Keunggulan lain dari enzim adalah dapat bekerja pada kondisi yang ramah, sehingga dapat menekan konsumsi energi (suhu dan tekanan tinggi). Hal ini menyebabkan reaksi yang dikatalisis enzim menjadi lebih efisien dibandingkan dengan reaksi yang dikatalisis oleh katalisis kimia. Enzim sebagai biokatalisator telah dapat diaplikasikan secara komersial untuk proses-proses industri, antara lain industry pangan, medis (diagnosis), kimia, dan farmasi (Junita *et al.*, 2002). Untuk dapat digunakan dalam industri, enzim harus memiliki kondisi yang dibutuhkan dalam proses industri, seperti kestabilan pada kondisi suhu tinggi dan pH yang ekstrim (Denila, 2016).

Berikut ini beberapa faktor yang berpengaruh terhadap kerja enzim :

1. Konsentrasi enzim

Konsentrasi enzim secara langsung mempengaruhi kecepatan laju reaksi enzimatis. Pada suatu konsentrasi substrat tertentu, laju reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim (Poedjiadi, 2009). Dengan enzim-enzim yang derajat kemuriannya tinggi, di dalam batas-batas tertentu, terdapat suatu hubungan linear antara jumlah enzim dan taraf aktivitas, dimana aktivitas enzim merupakan ukuran lenyapnya reaktan atau munculnya produk dari reaksi yang dikatalisis (Winarwi, 2006)

2. Konsentrasi substrat

Laju reaksi enzimatis akan meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat rendah, bagian aktif enzim hanya menampung substrat sedikit. Bila konsentrasi substrat diperbesar, maka akan semakin banyak substrat yang berhubungan dengan enzim pada bagian aktif, sehingga konsentrasi enzim-substrat makin besar dan menyebabkan besarnya laju reaksi. Namun pada batas konsentrasi substrat tertentu, semua bagian aktif telah dipenuhi substrat. Dalam kondisi ini, bertambahnya konsentrasi enzim-substrat, mengakibatkan jumlah hasil reaksi tidak bertambah (Poedjiadi, 2009).

3. Suhu

Suhu dapat meningkatkan laju reaksi enzimatis sampai batas tertentu. Suhu yang terlalu tinggi (jauh dari suhu optimum suatu enzim) akan menyebabkan enzim terdenaturasi. Bila enzim terdenaturasi, maka bagian aktifnya akan terganggu dan dengan demikian konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang. Hal ini menyebabkan laju reaksi enzimatis menurun (Poedjiadi, 2009).

4. pH

Aktivitas suatu enzim sangat dipengaruhi oleh konsentrasi ion hidrogen (keasaman dan kebasaan). Hal ini disebabkan residu asam amino yang terdapat pada pusat aktif enzim yang harus berada dalam keadaan ionisasi yang tepat agar menjadi aktif (Zusfahair dan Fatoni, 2011). Aktivitas maksimum dicapai pada pH tertentu dan penyimpangan – penyimpangan dari pH tersebut menyebabkan berkurangnya aktivitas (Winarwi, 2006).

5. Inhibitor

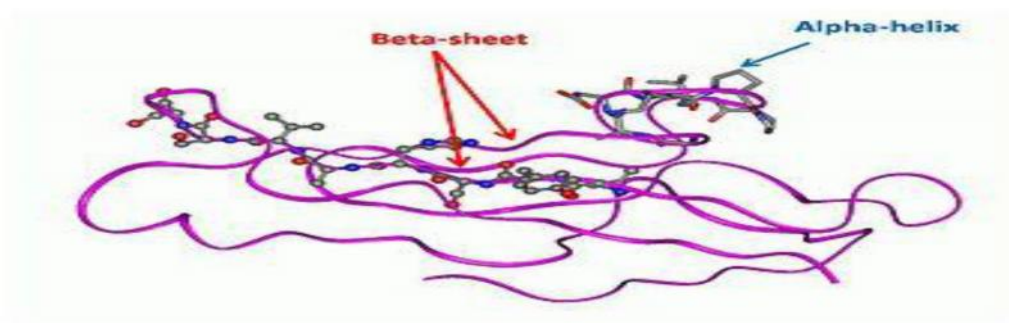
Inhibitor merupakan molekul atau ion yang menghambat reaksi enzimatik (Poedjiadi, 2009). Inhibitor akan menyerang sisi aktif enzim sehingga enzim tidak dapat berikatan dengan substrat dan enzim tidak mempunyai fungsi katalitik lagi (disebut inhibisi kompetitif). Jika inhibitor terikat pada sisi lain enzim sehingga memperlambat kerja enzim (disebut inhibisi nonkompetitif). Sedangkan inhibitor yang tidak menghalangi terbentuknya kompleks enzim-substrat, tetapi menghalangi reaksi selanjutnya, disebut inhibisi unkompetitif.

6. Waktu inkubasi

Setiap enzim membutuhkan waktu inkubasi tertentu untuk dapat bereaksi secara optimum dengan substrat hingga menghasilkan produk.

Enzim yang berperan dalam proses fermentasi pada produk perikanan didominasi oleh enzim proteolitik yang mampu mengurai protein (Kulsum dan Hidayat, 2017). Enzim protease juga berperan dalam bidang industry, terutama dalam aplikasi bioteknologi (Mohsen *et al.*, 2005). Aplikasi protease sangat luas diberbagai industri pangan, industri farmasi (Melliawati, 2015), dan dalam proses pengempukan daging (Melliawati, 2015).

Protease yang disebut juga peptidase atau proteinase, merupakan enzim golongan hidrolase yang bekerja memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana, seperti oligopeptide pendek atau asam amino dengan reaksi hidrolisis pada ikatan peptida (Melliawati, 2015). Enzim protease diperlukan oleh semua makhluk hidup karena bersifat esensial dalam metabolisme protein. Enzim protease memiliki banyak struktur sekunder *beta-sheet* dan *alpha-helix* yang sangat pendek (Poliana and MacCabe, 2007).



Gambar 1. Struktur sekunder *beta-sheet* dan *alpha-helix* protein

Menurut Harley dan Prescott (2002), protease dibagi menjadi 4 golongan :

1. Protease Serin. Memiliki residu serin dalam lokasi aktifnya, bersifat endopeptidase, yang termasuk enzim ini : tripsin, kimotripsin, elastase dan subtilin.
2. Protease Sulfhidril. Memiliki residu sulfhidril pada lokasi aktif, kerja enzim dapat dihambat oleh senyawa oksidator dan alkilator serta logam berat, yang termasuk enzim ini : protease dari tanaman dan mikroba seperti papain, fisin, bromielin.
3. Protease Metal. Keaktifannya tergantung pada adanya metal dengan hubungan stoikiometrik 1 mol metal/1mol enzim, dapat dihambat oleh EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid*) dimana dapat mengkhelat metal

sehingga keaktifan enzim hilang atau berkurang, yang termasuk enzim ini :
karboksipeptidase untuk beberapa amino peptidase.

4. Protease Asam. Enzim yang pada lokasi aktifnya terdapat di gugus karboksil, aktif pada pH rendah (optimum 2,0 – 5,0), keaktifannya dapat dihambat oleh *p*-bromo fenasilbromida, yang termasuk enzim ini : pepsin, renin, dan protease kapang.

Enzim protease dapat dihasilkan dari berbagai sumber, 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 dengan makhluk hidup lainnya.
- b. Skala produksi enzim mudah ditingkatkan.
- c. Biaya produksi enzim lebih rendah.
- d. Kondisi produksi tidak tergantung pada musim dan waktu proses produksi enzim lebih pendek (Poernomo dan Purwanto, 2003).

Untuk menguji suatu biakan bakteri menghasilkan enzim protease ekstraseluler, maka bakteri tersebut harus ditumbuhkan pada medium yang mengandung kasein yaitu *Skim Milk Agar* (Hanafiarti, 2015). Kasein merupakan salah satu jenis protein. Hidrolisis kasein digunakan untuk memperlihatkan aktivitas hidrolitik protease yang memutuskan ikatan peptida CO-NH, yang ditunjukkan dengan adanya zona bening disekeliling pertumbuhan bakteri (Susanti, 2003). Pengujian secara kualitatif bakteri penghasil enzim protease ekstraseluler dilakukan dengan cara mengamati zona bening yang berada disekitar kolonibakteri, kemudian

membagi diameter zona bening dengan diameter koloni bakteri. Hasil bagi diameter tersebut dinyatakan sebagai aktifitas protease secara relatif (Sastono *et al.*, 2008). Besar kecilnya diameter zona menunjukkan konsentrasi dan aktivitas enzim yang dihasilkan (Hanafiarti, 2015).

Protease adalah enzim yang mengkatalisis pemecahan ikatan peptida dalam peptida, polipeptida dan protein dengan menggunakan reaksi hidrolisis menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana seperti peptide rantai pendek dan asam amino (Naiola dan Widyastuti, 2002). Hidrolisis ikatan peptide adalah reaksi penambahan-penghilangan, dimana protease bertindak sebagai nukleofilik atau bereaksi dengan membentuk satu molekul air (Pramitha, 2014). Secara umum nukleofilik membentuk intermediat tetrahedral dengan atom karbon karbonil pada ikatan peptida. Satu gugus amina dilepaskan dan dikeluarkan dari sisi aktif, yang digantikan secara bersamaan dengan satu molekul air. Pada protease tertentu, adisi enzim dapat dibentuk dan menghasilkan produk karboksilat, proton dan enzim bebas yang diregenerasi (Pakpahan, 2009).

G. Bakteri Patogen *Escherichia coli*

Patogen adalah organisme (umumnya berupa mikroorganisme) yang menyebabkan penyakit pada mikroorganisme lain. Kemampuan patogen untuk menyebabkan penyakit disebut dengan patogenitas (Pratiwi, 2008). *Escherichia coli* (*E. Coli*) adalah kuman oportunistik yang banyak ditemukan di dalam usus besar manusia. Bakteri ini berbentuk batang pendek (kokobasil), dengan ukuran 0,4-0,7 μm x 1,4 μm , dan berupa bakteri gram negatif. *E. coli* tumbuh baik pada hampir semua media yang biasa dipakai di laboratorium Mikrobiologi. Pada media yang

digunakan untuk isolasi kuman enterik, sebagian besar *strain E. coli* tumbuh sebagai koloni yang meragi laktosa. *E. coli* memiliki sifat mikroaerofilik, serta mempunyai antigen O, H dan K. *E. coli* sensitif terhadap obat-obat antimikroba yang digunakan untuk mikroorganisme gram negatif. *E. coli* memiliki waktu generasi yang cukup singkat, berkisar 15-20 menit (Pratiwi, 2008).

E. coli umumnya menyerang saluran pencernaan dan menyebabkan gangguan penyerapan zat makanan (Baumgart *et al.*, 2007). Strain yang tidak berbahaya (seperti kebanyakan strain *E.coli*) adalah bagian dari floral normal di usus dan dapat memberi efek menguntungkan dengan memproduksi vitamin K₂, dan mencegah perkembangbiakan dari bakteri patogenik dalam usus (Hudault *et al.*, 2001). Banyak spesies bakteri gram negatif yang bersifat patogen, yang berarti berbahaya bagi organisme inang. Sifat patogen ini umumnya berkaitan dengan komponen tertentu pada dinding sel gram negatif, terutama lapisan lipo polisakarida, atau yang dikenal juga dengan LPS atau endotoksin (Edwin, 2011).

H. Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder merupakan suatu molekul atau produk metabolit yang dihasilkan oleh proses metabolisme sekunder mikroorganisme dimana produk tersebut bukan merupakan kebutuhan pokok mikroorganisme untuk hidup dan tumbuh. Meskipun demikian, metabolit sekunder juga berfungsi sebagai nutrisi darurat untuk bertahan hidup. Metabolit sekunder banyak bermanfaat bagi manusia dan makhluk hidup lain karena banyak diantaranya bersifat sebagai obat, pigmen, vitamin, ataupun hormon. Metabolit sekunder tidak diproduksi pada saat pertumbuhan sel secara cepat (fase logaritmik), tetapi biasanya disintesis pada

akhir siklus pertumbuhan sel, yaitu pada fase stasioner saat populasi sel tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Pada fase ini sel mikroorganisme lebih tahan terhadap keadaan ekstrem, misalnya suhu yang lebih panas atau dingin, radiasi, bahan-bahan kimia, dan metabolit-metabolit yang dihasilkan sendiri, seperti antibiotik. Sintesis metabolit sekunder dimulai pada saat beberapa zat gizi di dalam media pertumbuhan mikroorganisme telah habis. Keterbatasan zat gizi tersebut menyebabkan terakumulasinya inducer enzim metabolit sekunder dan terlepasnya gen-gen untuk sintesis metabolit sekunder dari represi katabolit. Metabolit sekunder dapat menghambat (menginhibisi) aktivitas atau menekan (merepresi) sintesis enzim yang diperlukan untuk produksi metabolit sekunder itu sendiri. Biosintesis metabolit sekunder seperti antibiotik juga dapat dihambat oleh penggunaan nutrisi yang dikonsumsi secara cepat oleh mikroorganisme (Pratiwi, 2008).

I. Antibakteri

Antibakteri adalah senyawa yang digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan bakteri yang bersifat merugikan. Pengendalian pertumbuhan mikroorganisme bertujuan untuk mencegah penyebaran penyakit dan infeksi, membasmi mikroorganisme pada inang yang terinfeksi, dan mencegah pembusukan serta kerusakan bahan oleh mikroorganisme. Antimikroba meliputi golongan antibakteri, antimikotik, dan antiviral (Widiati, 2011). Mekanisme penghambatan bakteri oleh senyawa antibakteri dapat berupa kerusakan dinding sel dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah terbentuk, perubahan permeabilitas membran sitoplasma sehingga menyebabkan keluarnya bahan

makanan dari dalam sel, perubahan molekul protein dan asam nukleat, penghambatan kerja enzim, dan penghambatan sintesis asam nukleat dan protein. Antibakteri disebut juga antibiotik, yaitu suatu substansi kimia yang dihasilkan oleh mikroba dan dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain. Senyawa antibakteri dapat bekerja secara bakteristatik, bakteriosidal, dan bakteriolitik (Putri, 2010).

Uji aktivitas antimikroba dilakukan dengan berbagai metode, diantaranya metode difusi cakram. Cara yang mudah untuk menetapkan kerentanan organisme terhadap antibiotik adalah dengan menginokulasi pelat agar dengan biakan dan membiarkan antibiotik terdifusi ke media agar. Cakram yang telah mengandung antibiotik diletakkan di permukaan pelat agar yang mengandung organisme yang diuji. Pada jarak tertentu pada masing-masing cakram, antibiotik terdifusi sampai titik antibiotik tersebut tidak lagi menghambat pertumbuhan mikroba. Efektivitas antibiotik ditunjukkan oleh zona hambat. Zona hambatan terlihat sebagai area jernih atau bersih mengelilingi cakram tempat zat dengan aktivitas antimikroba terdifusi. Diameter zona dapat diukur dengan penggaris. Ukuran zona hambatan dapat dipengaruhi oleh kepadatan media biakan, kecepatan difusi antibiotik, konsentrasi antibiotik pada cakram filter, sensitivitas organisme terhadap antibiotik, dan interaksi antibiotik terhadap media suatu zat yang mempunyai efek samping signifikan tidak boleh digunakan.

Antibiotik sebagai obat pembasmi bakteri, khususnya bakteri yang merugikan manusia, harus memiliki sifat toksitas selektif setinggi mungkin, artinya obat harus bersifat sangat toksik untuk bakteri, tetapi relatif tidak toksik untuk hospes

(Setiabudy, 2007). Antibiotik dapat diklasifikasikan berdasarkan spektrum atau kisaran kerja, mekanisme aksi, strain penghasil, cara biosintesis maupun berdasarkan struktur biokimianya. Berdasarkan spektrum atau kisaran kerjanya antibiotik dapat dibedakan menjadi antibiotik berspektrum sempit dan antibiotik berspektrum luas. Antibiotik berspektrum sempit hanya mampu menghambat segolongan jenis bakteri saja, contohnya hanya mampu menghambat atau membunuh bakteri gram positif atau gram negatif saja. Sedangkan antibiotik berspektrum luas dapat menghambat atau membunuh bakteri dari golongan gram positif maupun gram negatif. Berdasarkan mekanismenya, antibiotik dibedakan menjadi lima, yaitu antibiotik dengan mekanisme penghambat sintesis dinding sel, kerusakan membran plasma, penghambat sintesis protein, penghambat sintesis asam nukleat, dan penghambat sintesis metabolit esensial (Pratiwi, 2008).

J. Identifikasi Fisiologi Bakteri

Identifikasi atau karakterisasi fisiologi dilakukan untuk mengelompokkan taksonomi mikroorganisme, termasuk taksonomi bakteri. Pengujian fisiologi dapat dilakukan dengan uji motilitas dan uji pewarna gram

1. Uji Motilitas

Motilitas adalah salah satu dari ciri mikroorganisme yang memiliki alat gerak sederhana berupa flagella atau cilia. Sebagai petunjuk adanya aktivitas motilitas, dapat diamati pada daerah bekas tusukan medium yang telah diinokulasikan oleh biakan dan diinkubasikan.

2. Uji Pewarna Gram

Menurut Karmana (2008), pewarnaan gram merupakan metode yang digunakan untuk membedakan spesies bakteri menjadi dua kelompok besar, yaitu gram positif dan gram negatif, berdasarkan sifat kimia dan fisik dinding sel-nya. Pada uji pewarnaan gram, suatu pewarna penimbal (*counterstrain*) ditambahkan setelah metil ungu, yang membuat semua bakteri gram negatif menjadi berwarna merah atau merah muda. Pengujian ini berguna untuk mengklasifikasikan kedua tipe bakteri ini berdasarkan perbedaan struktur dinding sel-nya. Bakteri gram negatif adalah bakteri yang tidak mempertahankan zat warna metil ungu pada metode pewarnaan gram. Warna merah muda akan terlihat di bawah mikroskop. Sedangkan bakteri gram positif akan mempertahankan zat warna metil ungu setelah dicuci dengan alkohol, dan akan tampak biru dibawah mikroskop. Perbedaan klasifikasi antara kedua jenis bakteri ini terutama didasarkan pada perbedaan struktur dinding sel bakteri.

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2017- April 2018 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, kasa, kapas, rak tabung, jarum ose, mikropipet, pemanas bunsen, kompor gas, kaca preparat, mikroskop cahaya, *magnetic stirrer*, neraca digital, *vortex*, sentrifuga, tabung sentrifuga, *waterbath*, oven, *autoclave*, *laminar air flow*, *shaker incubator*, serta *incubator*, kertas cakram, dan spektrofotometri *UV-Vis*.

Sedangkan bahan-bahan yang digunakan adalah akuades, NaCl, *yeast extract*, agar, kasein, *skim milk*, *dextrose*, buffer fosfat pH 7, TCA, NaOH, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na-K-tartarat, reagen Folin Ciocelteau, larutan kristal violet, larutan iodin, alkohol, larutan safranin, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dan terasi tradisional sebanyak 3 sampel yang diambil dari 3 daerah di Lampung, yaitu daerah Labuhan Maringgai, Lempasing, dan Menggala.

C. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

a. Persiapan Alat

Alat-alat gelas dan rak tabung yang digunakan dicuci, dikeringkan, dan dibungkus menggunakan kertas lalu disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Kemudian, untuk mengeringkan alat-alat gelas dilakukan sterilisasi menggunakan oven dengan suhu 180 °C selama 15 menit. Sterilisasi bertujuan untuk menghilangkan mikroba yang tidak diinginkan dari alat-alat yang akan digunakan.

b. Pembuatan Medium Isolasi Padat (Setyorini *et al.*, 2006)

Isolasi mikroba dilakukan dengan menggunakan medium padat SMA (*Skim Milk Agar*). Medium ini disiapkan dengan cara melarutkan 0,5 g kasein dalam 15 ml larutan buffer fosfat pH 7; menimbang 0,25 g *yeast extrac*; 0,1 g *dextrose*; 1,5 g agar; 15 ml *skim milk* kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer dan ditambahkan akuades hingga 100 mL, lalu dihomogenkan. Medium yang telah homogen selanjutnya disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121 °C bertekanan 1 atm selama 15 menit, dan medium steril dituangkan kedalam cawan petri. Penuangan medium dilakukan di dalam *Laminar Air Flow*, untuk menghindari kontaminasi. Tabung reaksi yang berisi medium steril selanjutnya dimiringkan dan dibiarkan memadat pada suhu kamar.

c. Pembuatan Medium Kultur Cair

Media kultur cair yang digunakan sama dengan komposisi media SMA, tetapi tanpa penambahan agar (Setyorini *et al.*, 2006). Media fermentasi dibuat dengan komposisi yang sama tetapi digunakan volume yang lebih banyak serta waktu inkubasi yang lebih lama, menyesuaikan kurva pertumbuhan. Untuk media cair diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37 °C selama 24 jam.

d. Pembuatan Pereaksi Kunitz untuk Pengukuran Aktivitas Protease (Kunitz, 1950 dalam Suwarso dkk, 2016)

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

e. Pembuatan Pereaksi Lowry untuk Pengukuran Kadar Protein (Lowry *et al.*, 1951 dalam Putri dkk, 2013)

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 g Na_2CO_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) kedalam 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. Peremajaan *Escherichia coli*

Peremajaan *E. coli* bertujuan untuk memperoleh biakan bakteri uji yang masih aktif dalam pertumbuhan dan metabolismenya. Bakteri *E. coli* dari persediaan induk (stok) diambil 1 ose, kemudian ditransfer ke dalam tabung reaksi yang berisi medium NA dengan metode gores *zig-zag*, dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C.

g. Preparasi Kertas Cakram

Preparasi kertas cakram dilakukan dengan cara menotolkan masing-masing kertas cakram yang telah dipotong dengan diameter 0,6 cm dengan 10 µL sampel berupa larutan enzim, kontrol positif kloramfenikol, dan kontrol negatif berupa medium kultur cair.

2. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease

Isolasi dilakukan menggunakan medium padat SMA dengan pengenceran bertingkat. Sampel yang digunakan adalah terasi udang dari berbagai daerah di Lampung. Dilakukan isolasi di dalam *Laminar Air Flow* untuk menghindari kontaminasi mikroba lain. Isolasi dengan metode pengenceran bertingkat dilakukan dengan cara ditimbang 1 g sampel, kemudian disuspensikan kedalam 10 mL larutan salin (0,085g NaCl dalam 10 ml akuades). Suspensi tersebut selanjutnya diencerkan sebanyak 10 kali pengenceran. Dari masing-masing pengenceran kemudian diambil sebanyak 100 µL dan ditanam dengan *Spread Plate Method* pada media SMA, lalu diinkubasi selama 24 jam. Isolat mikroba yang mampu mendegradasi protein ditandai dengan terbentuknya zona bening pada sekitar tumbuhnya koloni.

3. Skrining Bakteri Penghasil Enzim Protease

Dilakukan pemilihan koloni tunggal menggunakan metode *Streak Plate*. Hasil *Streak Plate* selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Untuk memperoleh koloni tunggal, dilakukan pengulangan tahap hingga 3-4 kali. Koloni tunggal yang diperoleh selanjutnya dipindahkan ke media SMA miring. Penyimpanan bakteri sebagai kultur stok murni dilakukan dengan menginokulasi 1 ose koloni pada media SMA miring, menggunakan metode *zig-zag*. Kemudian bakteri diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37 °C .

4. Produksi Enzim

Produksi enzim dilakukan menggunakan media SMA cair. Mula-mula, diinokulasi bakteri kedalam medium *Skim Milk* sebagai medium *starter*, lalu diinkubasi menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37 °C selama 24 jam. Kemudian, sebanyak 2% (2 mL dalam 100 mL) *starter* ditransfer kedalam medium kultur dengan komposisi yang sama dan volume dua kali lebih banyak dari media *starter*. Lalu diinkubasi kembali menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37 °C selama 48 jam. Hasil produksi enzim digunakan untuk penentuan kurva pertumbuhan, uji aktivitas protease, dan uji kadar protein serta uji antibakteri.

5. Uji Aktivitas Protease

Aktivitas protease ditentukan dengan metode Kunitz (Kunitz, 1950 dalam Suwarso dkk, 2016). Dimasukkan 1 mL larutan enzim ke dalam tabung reaksi berisi 1 mL larutan kasein. Selanjutnya campuran diinkubasi pada suhu 60 °C

selama 30 menit. Setelah 30 menit inkubasi dihentikan dan ditambah 3 mL larutan TCA dalam tabung tersebut, lalu dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar, agar pengendapan berjalan sempurna. Endapan yang terbentuk dipisahkan dengan sentrifugasi dan penyaringan. Setelah itu, diukur absorbansi filtrat menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 280 nm. Kontrol dibuat dengan menambahkan 3 mL TCA dalam tabung reaksi berisi 1 mL enzim, lalu diinkubasi. Penambahan 1 mL kasein dilakukan setelah larutan diinkubasi selama 30 menit. Aktivitas enzim dihitung berdasarkan jumlah asam amino (peptida sederhana) yang terbentuk dengan menggunakan kurva standar tirosin.

6. Penentuan Kurva Pertumbuhan

Pertumbuhan mikroorganisme meliputi fase lag, fase eksponensial, fase stasioner dan fase kematian. Untuk mengetahui fase pertumbuhan tersebut, dilakukan pengukuran OD (*optical density*) pada selang waktu 12, 24, 36, 48, 60, dan 72 jam. Sebanyak 0,3 mL enzim yang diencerkan dalam 2,7 mL akuades diukur OD pada panjang gelombang 600 nm (Ariyanti, 2015).

7. Uji Kadar Protein

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951 dalam Putri dkk, 2013). 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 di sentrifuga selama 15 menit, lalu dipisahkan supernatant dari endapannya untuk kemudian di ukur 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

Dilakukan beberapa uji morfologi bakteri, yaitu uji pewarnaan gram dan uji motilitas serta uji antibakteri. Isolat diidentifikasi secara taksonomi menggunakan metode *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

a. Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram dilakukan dengan meletakkan 1 ose bakteri pada kaca preparat yang telah dibersihkan dengan akuades, lalu diratakan sampai terbentuk lapisan tipis kemudian dikeringkan. Setelah kering, difiksasi lapisan dengan melewati kaca preparat di atas nyala api spiritus, lalu ditambahkan 2-3 tetes larutan kristal violet dan didiamkan selama 20 detik. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan selama beberapa detik, lalu ditetaskan larutan iodin dan didiamkan kembali selama 1 menit, lalu dicuci dengan alkohol serta dikeringkan pada suhu ruang selama 10-20 detik. Setelah kering dilakukan penambahan larutan safranin, didiamkan selama 1 menit lalu dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya, dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop. Identifikasi

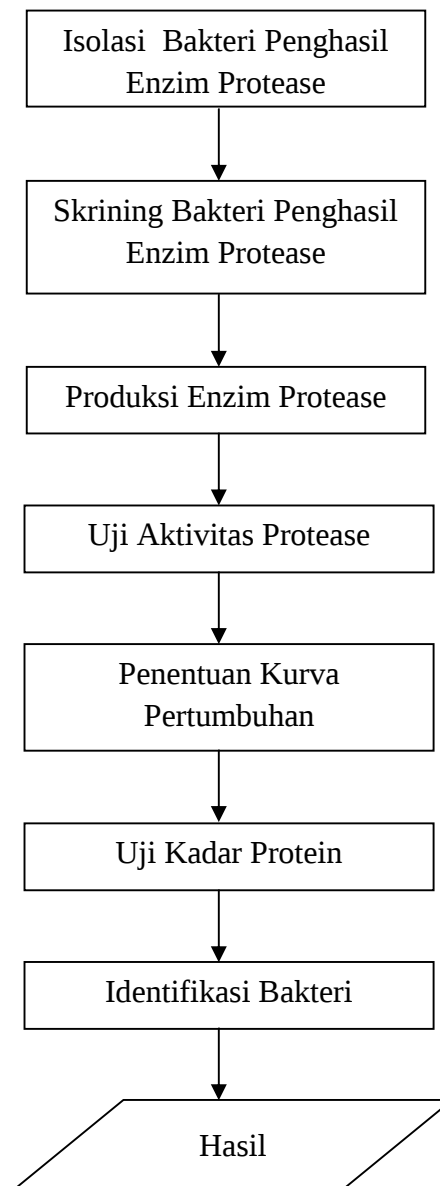
dilakukan dalam keadaan aseptis. Bakteri gram positif menunjukkan warna violet, sedangkan bakteri gram negatif berwarna merah. Dari hasil pewarnaan gram dapat diketahui bentuk serta struktur dinding sel bakteri metabolit sekunder yang diperoleh.

b. Uji Motilitas

Uji motilitas dilakukan dengan menusuk 1 ose bakteri kedalam agar secara tegak, lalu diinkubasi selama 24 jam. Uji positif bila disekitar daerah tusukan terbentuk serat-serat halus. Dari hasil uji dapat diketahui apakah bakteri bergerak atau tidak.

c. Uji Antibakteri

Uji antibakteri dilakukan dengan metode cakram. Sebanyak 1 ose bakteri *E. coli* dalam 1 mL akuades steril dimasukkan ke dalam cawan petri berisi media NA yang masih dalam keadaan cair (suhu 60 °C). Cawan petri kemudian digoyangkan membentuk angka 8 beberapa kali hingga media dan bakteri tercampur. Pembentukan media dilakukan di dekat api bunsen dalam *Laminar Air Flow*. Setelah agar memadat, setiap cawan petri dibuat diagram 4 bagian. Kertas cakram kontrol positif, kontrol negatif dan cakram yang telah dipreparasi dengan supernatan diletakkan pada masing-masing bagian dan kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam (Nufailah *et al.*, 2008). Area jernih disekeliling cakram menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri patogen, yang kemudian diukur diameter zona hambatnya. Berdasarkan terbentuknya zona bening di sekitar kertas cakram dapat diketahui aktivitas antibakterinya.

D. Diagram Alir Prosedur Penelitian

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang didapat dari penelitian ini maka dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Dari serangkaian proses skrining diperoleh empat isolat penghasil protease dengan indeks proteolitik serta aktivitas enzim tertinggi, yaitu isolat L-1-5; L-2-3; LM-3-2; dan LM-8-1.
2. Identifikasi isolat terpilih menunjukkan bahwa ke 4 isolat terpilih bersifat motil, dan merupakan bakteri gram positif dengan bentuk basil pada isolat L-1-5, L-2-3, dan LM-8-1, serta bentuk streptobasil pada isolat LM-3-2.
3. Pada waktu kultur 48 jam Isolat LM-3-2 mampu menghambat pertumbuhan *E. coli*. Sedangkan ke 3 isolat lainnya yaitu, isolat L-1-5, L-2-3, dan LM-8-1 tidak dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* baik pada kultur dengan waktu inkubasi 24 jam maupun 48 jam.

B. Saran

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

1. Perlunya dilakukan uji aktivitas protein serta uji pertumbuhan sel pada waktu inkubasi empat sampai lima hari dengan interval waktu 8 jam, untuk mengetahui keempat fase pertumbuhan isolat yang diperoleh.
2. Perlunya dilakukan uji antibakteri pada waktu inkubasi dimana pertumbuhan sel optimum, dimana hal tersebut dapat dilihat dari perubahan warna kultur menjadi berwarna hijau. Uji antibakteri juga perlu diuji dengan berbagai variasi konsentrasi, untuk mengetahui konsentrasi zona hambat minimum isolate yang diperoleh.
3. Perlunya dilakukan karakterisasi pH serta temperatur optimum produksi enzim isolat yang diperoleh.

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, E dan E. Liviawaty. 2005. *Pengawetan dan Pengolahan Ikan*. Kanisius. Yogyakarta.
- Akbar, P.P., A. Solichin, dan S.W. Saputra. 2013. Analisis panjang-berat dan faktor kondisi pada udang rebon (*acetes japonicas*) di perairan Cilacap, Jawa Tengah. *Journal of Management of Aqautic Resources* 2(2):161-169.
- Ariyanti. 2015. Isolasi dan identifikasi enzim dari *Trichoderma koningii* sebagai penghambat jamur patogen busuk buah kakao. (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Baumgart, T., Hammond, A.T., Sengupta. P., Hess, S.T., Holowka, D.A., Baird, B.A., and Webb WW. 2007. Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* (104):3165-3170.
- Brown, A. 2001. *Microbiological Applications Lab Manual*. 8th Ed. The McGraw-Hill Companies, New York.
- Choma, I.M., Edyta, M.G. 2010. Bioatography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A* Chroma-351708.
- Denila, A.I. 2016. Pengaruh penambahan sorbitol terhadap stabilitas enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148. (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Dwidjoseputro, D. 2010. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djambatan. Jakarta.
- Edwin, 2011. *Materi Kuliah Mikrobiologi*. UNLAM. Banjarbaru.
- Fitriyanti 2014. Peningkatan stabilitas enzim selulase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan modifikasi kimia menggunakan sianurat klorida polietilenglikol (CC-PEG). (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Grave, D.S, 2015. World Register of Marine Species.
<http://www.marinespecies.org> (Diaksespada: 14 Januari 2017).

- Hakim, L. 2011. Studi aktivitas proteolitik *Actinomycetes* isolat lokal pada media limbah cair tahu. (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Hanafiarti, D. 2015. Isolasi dan identifikasi bakteri penghasil protease dari terasi udang rebon (*Mysis relicta*). (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Harley and Prescott. 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology*. Fifth Edition. The McGraw-Hill Companies.
- Hidayat, N., Padaga, M.C., Suhartini, S., 2006. *Mikrobiologi Industri*. ANDI.Yogyakarta.
- Hudault, S., Guignot, J., and Servin, A.L. 2001. “ *Escherichia coli* strains colonizing the gastrointestinal tract protect germfree mice against salmonella typhimurium infection” *International journal of Gastroenterology and Hepatology*., Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale.
- Holetz, F.B., Pessini, G., Nakamura, C.V., dan Dias Filho, B.P. 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7), 1027-1031.
- Juniarso, E.T. 2008. Pemanfaatan ekstrak kasar protease dari perut ikan lemur (*Sardinella sp.*) untuk deproteinisasi limbah udang secara enzimatis dalam proses produksi kitosan. (Skripsi). Universitas Jember. Jember.
- Junita, F., S. Muhartini dan D, Kastono. 2002. Pengaruh frekuensi penyiraman dantakaran pupuk kandang terhadap pertumbuhan dan hasil patchauli. *Jurnal Ilmu Pertanian UGM* : (9):37-45.
- Karmana, O., 2008. *Biologi*. PT Grafindo Media Pratama. Jakarta.
- Kementrian Kelautan dan Perikanan. 2011. *Petunjuk Pembenihan Ikan Lele Sangkuriang*. Direktorat Jendral Perikanan. Sukabumi.
- Khairunnisa, T.R. 2014. Pemurnian dan karakterisasi enzim CGT-ase (siklodekstrin glukano transferase) dari bakteri isolat LTi-A.24. (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Kristiana, D., dan Sajuthi, D., Yanti. 2006. Pemilihan dan karakterisasi bakteri penghasil enzim proteolitik dari terasi Medan. (Skripsi). IPB. Bogor.
- Kulsum, U. dan Hidayat, M.T. 2017. Peningkatan pendapatan wanita nelayan di desa Tamberu kecamatan Batu Marmar melalui pelatihan teknologi pengemasan terasi. (Skripsi). Universitas Islam Madura. Madura.

- Majid, A., Agustini, T.W., Rianingsi, L. 2014. Pengaruh perbedaan konsentrasi garam terhadap mutu sensori dan kandungan senyawa volatile pada terasi ikan teri (*Stolephorus sp*). *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan* 3(2): 17-24.
- Melliawati, R., Djohan, A.C., Yopi. 2015. Seleksi bakteri asam laktat sebagai penghasil enzim protease. *Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia* 1(2):184-188.
- Mohsen, F.N., Dileep, D., and Deepthi, D. 2005. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. *Biotechnol Ind*, (8) :197-203.
- Naiola, E., dan Widhyastuti, N. 2002. Isolasi, seleksi dan optimasi produk protease dari beberapa isolat bakteri. *Hayati* (6):467-473.
- Nufailah, D., Wibawa, P.J., dan Wijanarko. 2008. Uji aktivitas antibakteri produk reduksi asam palmitat dalam sistem $\text{NaBH}_4/\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. (Skripsi). Universitas Diponegoro. Semarang.
- Pakpahan, R. 2009. Isolasi bakteri dan uji aktivitas protease termofilik dari sumber air panas sipoholon Tapanuli Utara Sumatera Utara. (Tesis). USU. Medan.
- Poedjiadi, A. dan Supriyanti, T. 2009. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI Press. Jakarta. 469 halaman.
- Poernomo, A.T., dan Purwanto, D.A., 2003. Uji aktifitas crude enzim proteolitik *Bacillus subtilis* FNCC 0059 hasil fermentasi curah. *Majalah Farmasi Airlangga*, 3(3):103-107.
- Poliana J. And A.P. MacCabe, 2007. *Industrial Enzymes : Structur, Fonction, and Applictions*. Dardrecht, Springer. ISBN. Hal 24.
- Pramitha, D.A.I. 2014. *Produksi dan Aplikasi Protease Termotabil*. Universitas Udayana. Denpasar.
- Pratiwi, S. T., 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga. Jakarta.
- Puspitasari, F.D., Shovitri, M., Kuswyasari, N.D. 2012. Isolasi dan karakterisasi bakteri aerob proteolitik dari tangki septik. *Jurnal Sains dan Seni ITS* 1(1).
- Putra, D. 2016. Penapisan bakteri penghasil enzim kitinolitik pada terasi udang rebon (*Mysis relicta*). (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Putri, R.A., Kusrijadi, A., Suryatna, A. 2013. Kajian penggunaan ammonium sulfat pada pengendapan enzim protease (papain) dari buah papaya sebagai

- koagulan dalam produksi keju *cottage*. *Jurnal Sains dan Teknologi Kimia* 4(2): 159-168.
- Putri, Z.F. 2010. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirih (piper betle l.) terhadap *Propionibacterium acne* dan *Staphylococcus aureus* Multiresisten. (Skripsi). Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Rahayu, T. 2006. Potensi antibiotik isolat bakteri *Rizosfer* terhadap bakteri *Escherichia coli* multiresisten. (Skripsi). Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Sastono, U., dan Sutardi., Verdial, O.F. 2008. Optimasi pemecahan emulsi kail dengan cara pendinginan dan pengadukan pada virgin coconut oil (VCO): (Abstrak) *Prosiding Seminar*. IPB. Bogor.
- Setiabudy, R., dan Gan, V.H. 2007. Pengantar Antimikroba. Dalam : *Farmakologi dan Terapi Edisi 5*. Gaya Baru, Jakarta. Halaman 571-578.
- Setiawan, A.T.A., Asikin, A.N., Hasanah, R. 2006. Isolasi dan karakterisasi bakteri pada terasi udang rebon (*Mysis relicta*) dari Bontang Kuala, Bontang. *Jurnal Ilmu Perikanan Tropis* 20(2).
- Setyorini, E., Kim, Y.J. Takenaka, S., Murakami, S., dan Aoki, K. 2006. Purification and characterization of a halotolerant intracellular protease from *Bacillus subtilis* strain FP-133. *Journal of Basic Microbiology*, 46(4):294-304.
- Sihmawati, R.R., Rosida, D.A., Fidysari, A. 2013. Analisis kualitas kecap manis instan dari daging sapi tetelan. *Jurnal Agroknow*. 1(1)
- Soeka, Y.S., dan Sulistiani. 2014. Karakterisasi protease *Bacillus subtilis* A₁ InaCC B398 yang diisolasi dari terasi Samarinda. *Berita Biologi* 13(2)-Agustus 2014.
- Stefani, D. 2005. Isolasi dan karakterisasi enzim protease dari bakteri isolat lokal. (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung
- Subagio, A. 2006. Mengembangkan terasi instan. *Food Review Indonesia*, 1 (9): 58-61
- Suprpti, L. 2002. *Membuat Terasi*. Kanisius. Yogyakarta.
- Suprihatin, 2010. *Teknologi Fermentasi*. UNESA Pres. Surabaya.
- Susanti. 2003. *Analisis Kimia Farmasi Kuantitatif*. Fakultas Farmasi Universitas Muslim Indonesia. Makassar.

- Suwarso, N., Yandri, A.S., Hadi, S. 2016. Peningkatan kestabilan enzim protease dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan modifikasi kimia menggunakan sitrakonat anhidrida. *Jurnal Analisis Kesehatan* 5(1): 475-482.
- Tanyildizi, M. Saban, D. Özer and M. Elibol. 2007. Production of bacterial α -amylase by *B.myloliquefaciens* Under Solid Substrate Fermentation. *Biochemical Engineering Journal* (37), Issue 3, 15 December 2007, 294-297pp.
- Widiati, S. 2011. Daya hambat ekstrak ampas teh hitam (*Camellia sinensis* L.) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis*. (Skripsi). UAJY. Yogyakarta.
- Winarwi. 2006. Uji viabilitas bakteri dan aktivitas enzim bakteri proteolitik pada media carrier bekatul. (Skripsi). Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Wirahadikusumah, M. 2001. *Biokimia: protein, enzim, dan asam nukleat*. ITB. Bandung. 91 halaman.
- Zusfahair dan Fatoni, A. 2011. Amobilisasi protease dari *Bacillus* sp. BT 1 menggunakan poliakrilamida. *Molekul* 6(2): 84-92.