

Isolasi Bakteri Proteolitik Hasil Fermentasi Inasua Ikan Bawal (*Colossoma macropomum*)

*Isolation of Proteolytic Bacteria from Fermentation of Inasua Pomfret Fish (*Colossoma macropomum*)*

Insannul Kurniasari, Ayu Rahmawati Sulistyningtyas, Sri Darmawati

Universitas Muhammadiyah Semarang

Corresponding author : ayurs@unimus.ac.id

Abstrak

Enzim protease berperan penting dalam bidang kesehatan, khususnya dalam proses fermentasi. Ikan bawal merupakan produk fermentasi inasua yang mengandung protein tinggi sehingga berpeluang sebagai sumber bakteri penghasil protease. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi bakteri proteolitik yang terdapat pada fermentasi ikan bawal dan tingkat patogenitasnya. Metode isolasi dan purifikasi koloni bakteri dilakukan menggunakan metode streak pada media Nutrient Agar. Uji penghasil enzim protease dilakukan pada media *Skim milk agar*. Uji Tingkat Patogenitas menggunakan *Media Blood agar plate* dan Uji Koagulase. Berdasarkan hasil uji penghasil enzim protease, diketahui bahwa isolat FB1, FB2, FB3 dan FB4 tidak menunjukkan adanya zona bening disekitar koloni. Berdasarkan hasil uji tingkat patogenitas tersebut menunjukkan bahwa isolat FB3 dan FB4 mampu menghemolisa sel darah merah yang ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni. Kedua isolat bakteri bersifat patogenitas rendah yaitu FB1 dan FB2, dan 2 isolat bakteri bersifat patogenitas tinggi yaitu FB3 dan FB4. Kesimpulannya, semua isolat bakteri yang diisolasi dari fermentasi inasua tidak berpotensi sebagai sumber baru enzim protease

Kata Kunci : bakteri, bawal, inasua, patogenitas, proteolitik

Abstract

Protease enzymes play an important role in the health sector, especially in the fermentation process. Pomfret is a fermented insua product that contains high protein so it has the opportunity as a source of protease-producing bacteria. The method of isolation and purification of bacterial colonies was carried out using the streak method on Nutrient Agar media. The protease enzyme production test was carried out on Skim milk agar media. Pathogenicity level test using Blood agar plate Media and Coagulase Test. Based on the results of the protease enzyme-producing test, it was found that isolates FB1, FB2, FB3 and FB4 did not show a clear zone around the colony. Based on the results of the pathogenicity test, it showed that FB3 and FB4 isolates were able to hemolyze red blood cells, which was characterized by the formation of a clear zone around the colony. Both bacterial isolates were of low pathogenicity, namely FB1 and FB2, and 2 isolates of bacteria were of high pathogenicity, namely FB3 and FB4. In conclusion, all bacterial isolates isolated from inasua fermentation had no potential as new sources of protease enzymes

Keywords: *bacteria, inasua, pathogenicity, pomfret, proteolytic*

PENDAHULUAN

Industri enzim saat ini yang sedang berkembang pesat dan menempati posisi penting dalam berbagai bidang industri (Soeka, 2011). Pentingnya industri enzim ini ditunjukkan dengan besarnya persentasi kebutuhan enzim yang mencapai 60 – 65% dari pasar dunia enzim (Melliawati, 2016). Di Indonesia kebutuhan akan enzim protease semakin meningkat, namun kebutuhan ini masih tergantung pada produksi impor. Salah satu cara mengantisipasi ketergantungan terhadap impor tersebut adalah dengan mengupayakan untuk memproduksi enzim protease dengan mengoptimalkan pemanfaatan sumber daya hayati yang dimiliki oleh Indonesia (Suhartono, 2000). Pemanfaatan enzim protease dalam bidang kesehatan yaitu untuk pengobatan radang, tumor, kelainan darah dan pengaturan kekebalan (Rahayu, 2014). Selain itu, peran protein diperlukan untuk membawa kalsium yang terikat pada protein dalam darah, kekurangan protease dapat menyebabkan artritis, osteoporosis dan penyakit-penyakit lain yang berkaitan dengan kekurangan kalsium. Oleh karena itu, orang yang kekurangan protease kekebalannya akan menurun sehingga ia lebih rentan terhadap infeksi bakteri, virus dan jamur (Soeka, 2011)

Protease adalah enzim yang berperan penting dalam reaksi biokatalis yang menyebabkan pemecahan protein. Sumber enzim yang telah diketahui berasal dari hewan, mikroba, dan tanaman. Enzim yang berasal dari tanaman maupun hewan memiliki kelemahan apabila digunakan atau diproduksi, hal tersebut dikarenakan jaringan pada tanaman mengandung bahan yang berbahaya, seperti senyawa fenolik, faktor fisiologi pada organisme yang membutuhkan waktu sangat lama dan adanya inhibitor enzim. Enzim yang berasal dari Mikroba contohnya yaitu bakteri (18,09%) (Mahajan dan Shamkant, 2010). Bakteri proteolitik adalah bakteri yang mampu memproduksi enzim protease ekstraseluler, dengan cara pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel (Situmorang, 2014). Keunggulan penggunaan enzim protease yang berasal dari mikroba yaitu memiliki kestabilannya pada suhu yang tinggi, dan mudah untuk diproduksi dalam jumlah yang banyak, dalam waktu yang relatif singkat dan jumlah enzim yang dihasilkan melimpah (Leveque *et al.*, 2000). Tingginya harga jual enzim protease, masih sedikitnya sumber enzim, dan pentingnya enzim protease mendorong para peneliti untuk mencari sumber - sumber enzim protease yang baru untuk menghemat waktu, tenaga dan biaya produksi (Melliawati, 2015). Substrat untuk pertumbuhan bakteri proteolitik adalah protein. Salah satu sumber protein yang besar adalah ikan bawal. Ikan bawal mengandung protein sebesar 19 g per 100 g. Oleh sebab itu ikan bawal yang melimpah sehingga berpotensi sebagai sumber baru enzim protease.

Bakteri proteolitik mengkonsumsi sumber karbon sederhana yang terkandung di dalam medium. Karbon dalam konsentrasi rendah dan kadar protein tinggi merangsang pembentukan enzim protease. Semakin sedikit sumber karbonnya maka bakteri proteolitik akan menghasilkan enzim protease untuk dapat menguraikan protein (Assodeh dan Mussaabadi, 2012). Bakteri proteolitik yang dapat digunakan sebagai sumber protease adalah dari golongan bakteri nonpatogen. Bakteri nonpatogen tidak menghasilkan metabolit yang bersifat toksik, sehingga metabolitnya, dalam hal ini protease, aman digunakan khususnya sebagai protease dalam produksi ikan. Bakteri nonpatogen dapat diisolasi dari berbagai macam pangan tradisional berfermentasi yang kaya protein. Dalam suatu pangan fermentasi akan mengandung berbagai jenis bakteri proteolitik dan masing-masing bakteri akan menghasilkan protease yang unik dan memiliki spesifisitas yang khas. Sifat ini pada akhirnya akan mempengaruhi apakah protease tersebut dapat digunakan atau tidak untuk menghidrolisis ikatan peptida pada jaringan ikat yang digunakan sebagai bahan baku fermentasi ikan. (Susanti *et al*, 2018)

Di Indonesia fermentasi ikan dengan cara pengawetan tradisional dinilai lebih mudah dan murah. Nilai gizi pada makanan fermentasi lebih tinggi dari bahan asal karena mikroba memiliki kemampuan memecah senyawa kompleks menjadi lebih sederhana. Hal tersebut membuat makanan lebih mudah dicerna. Produk fermentasi secara tradisional dimiliki oleh masing-masing daerah, salah satunya berupa olahan produk ikan fermentasi tradisional yaitu inasua. Inasua berasal dari Pulau Teon, Nila, dan Serua (TNS) di Maluku Tengah yang diasinkan secara basah. Pembuatan inasua dengan cara fermentasi tertutup menggunakan tambahan garam sebagai bahan pengawet dengan konsentrasi 20%-30% selama 3 bulan. Pembuatan inasua berbahan dasar ikan laut seperti ikan kakatua, cakalang, kerong-kerong, bobara, ekor kuning. Fermentasi inasua tidak hanya berlangsung secara anaerobik, tapi juga ditambah sumber karbohidrat dari getah kelapa yang mengandung gula sekitar 5-10% pada pH netral untuk memperpanjang umur simpan produk (Noonpakdee *et al.*, 2009). Penelitian terhadap produk inasua sangat jarang dilakukan oleh karena itu penelitian terhadap aspek mikrobiologis dan kimiawi dari produk tersebut menjadi sangat penting untuk dilakukan. Aspek mikrobiologis salah satunya mengkaji tentang karakteristik mikroba sehingga perlu dilakukan isolasi dan uji tingkat patogenitas bakteri. Ikan merupakan salah satu sumber daya alam hayati yang sangat potensial sebagai sumber protein hewani.

Tingkat patogenitas termasuk hal yang dipertimbangan karena enzim protease akan digunakan oleh manusia. Seleksi uji tingkat patogenitas antara lain uji hemolisis dan Uji Koagulase, media yang dapat menggunakan media *Blood agar plate* (BAP)

(Buxton, 2005). Seleksi bakteri proteolitik juga dapat dilakukan dengan media *Skim milk agar* (SMA) (Zahidah *et al.*, 2013).

Media BAP merupakan media diferensial dan media diperkaya karena dapat membedakan bakteri berdasarkan kemampuan dalam menghemolisis sel darah merah. Ada tiga tipe hemolisis yaitu β - hemolysis, α - hemolysis, dan γ - hemolysis. Bakteri dengan tipe β - hemolysis disekitar koloni terdapat zona bening, mampu mendestruksi sel – sel darah dan melisis darah dengan sempurna. Bakteri α - hemolisa di sekitar koloni terdapat daerah kehijauan, mampu mendestruksi sel darah merah sebagian. Bakteri γ - hemolysis di sekitar koloni tidak mampu mendestruksi sel darah merah (Buxton, 2005). Uji Koagulase digunakan untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dari coccus gram positif lainnya. Media SMA media pendukung pertumbuhan bakteri proteolitik karena mengandung kasein yang berfungsi sebagai substrat bagi enzim protease. Bakteri yang memutuskan ikatan peptida dari kasein akan membentuk zona bening pada media SMA (Zahidah *et al.*, 2013). Berdasarkan uraian sebelumnya, isolasi dan uji tingkat patogenitas bakteri proteolitik pada fermentasi inasua ikan bawal penting dilakukan. Hal ini disebabkan fermentasi inasua ikan bawal tersebut berpotensi sebagai sumber baru bakteri penghasil enzim protease.

METODE

1. Preparasi Sampel

Sampel penelitian ini adalah ikan bawal yang telah difermentasi dengan teknik inasua. Sampel tersebut diambil dari Pasar Ngaliyan. Bahan yang digunakan dalam proses fermentasi inasua yaitu garam, air siwalan, dan ikan bawal. Pembuatan inasua dilakukan dengan cara ikan dicuci dan dibersihkan sebanyak 1 ekor dengan berat kurang lebih 100 gram, kemudian dipotong-potong kecil agar mempermudah untuk memasukkan kedalam wadah. Selanjutnya, ditambahkan garam (perbandingan kurang lebih 30% atau 1:3), dan air siwalan (perbandingan 1:1). Waktu fermentasi selama 1 bulan didalam wadah toples yang terbuat dari kaca tertutup dan suhu ruang. Sampling cairan fermentasi diambil 1 ml dan daging ikan diambil 1 gram, dimasukkan ke dalam NaCl fisiologis 9 ml pengenceran tingkat 10^{-1} lalu dilanjutkan hingga 10^{-5} Setiap tingkat pengenceran diinokulasikan ke media NA sebanyak 1 ml dengan metode *spread plate*.

2. Isolasi Mikroorganisme dari inasua ikan bawal

Tahap pertama yang dilakukan adalah mengisolasi bakteri pendegradasi senyawa organik menggunakan media seri pengenceran. Pengenceran dilakukan dengan

menyiapkan 5 tabung pengencer yang diisi NaCl fisiologis masing-masing tabung sebanyak 9 ml, lalu tabung reaksi diberi label pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Sampel dipipet sebanyak 1 ml lalu dimasukkan ke dalam tabung pengenceran 10^{-1} dan dihomogenkan, kemudian dari tabung pengenceran 10^{-1} diambil sampel sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung pengenceran 10^{-2} . Pengenceran dilakukan secara bertingkat hingga 10^{-5} . Sampel hasil pengenceran selanjutnya dikultur pada media NA diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah dilakukan pemurnian bakteri pada tahap pertama, kemudian dilakukan subkultur tahap kedua menggunakan media NA dengan cara diambil 1 ml dan diinokulasikan pada media NA menggunakan teknik spread plate secara aseptis, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh kemudian dipurifikasi supaya didapatkan isolat murni. Koloni yang tumbuh diamati secara makroskopis meliputi bentuk, ukuran, warna, tepi, elevasi, dan konsistensi. Berdasarkan perbedaan penampilan koloni lalu dilakukan tahap pemurnian sehingga akan diperoleh sejumlah isolat. Koloni murni yang diperoleh digunakan sebagai stok isolat untuk uji selanjutnya (Darmayasa, 2008).

3. Purifikasi Mikroorganisme

Hasil inokulasi dari media NA dilakukan purifikasi menggunakan metode *streak plate* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh dipurifikasi dengan tujuan supaya didapatkan isolat murni. Koloni yang tumbuh diamati secara makroskopis meliputi bentuk, ukuran, warna, tepi, elevasi, dan konsistensi. Setelah proses purifikasi akan didapatkan perbedaan penampilan koloni sehingga akan diperoleh sejumlah isolat. Koloni murni yang diperoleh digunakan sebagai stok isolat untuk uji selanjutnya (Darmayasa, 2008).

4. Seleksi mikroorganisme

a. Identifikasi ini meliputi karakterisasi morfologi dan karakterisasi fisiologi.

Bakteri murni dari isolat terpilih yang ditumbuhkan selama 24 jam. Karakterisasi secara mikroskopis meliputi warna koloni dan bentuk koloni sedangkan secara makroskopis dengan melihat morfologi sel dan warna. Bakteri Gram-positif akan berwarna biru keunguan, sedangkan bakteri Gram negatif akan berwarna merah (Winahyu et al., 2019).

b. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengetahui bentuk dan keseragaman sel (Purwadi et al., 2019; Winahyu et al., 2019). Isolat diremajakan dalam media NA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam. Kemudian, dilakukan pewarnaan Gram untuk mengetahui morfologi koloni. Kemudian ambil akuades diteteskan pada kaca

objek ditambahkan 1 ose biakan sampel. Lalu difiksasi diatas api. Tetesi pewarnaan kristal violet dan biarkan selama 1 menit, cuci dengan air mengalir, kemudian tetesi lugol biarkan 1 menit dan kembali dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya tetesi alkohol 96 % biarkan selama 10-20 detik, cuci dengan air mengalir dan tambahkan safranin biarkan selama 20-30 detik kemudian cuci lagi dengan menggunakan kertas serap dan tambahkan minyak imersi dan amati dibawah mikroskop. Bila pewarnaan diperoleh bakteri berwarna merah maka bakteri tersebut adalah bakteri Gram-negatif, sedangkan bila diperoleh bakteri berwarna ungu maka bakteri tersebut merupakan bakteri Gram-positif (Fitri dkk., 2011).

5. Uji Patogenitas menggunakan Media BAP dan Uji Koagulase

Media BAP dapat diketahui kemampuan bakteri dalam menghemolisis sel darah merah yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni. Mikroorganisme yang bersifat patogen, ditunjukkan dengan kemampuan yang dapat menghemolisi sel darah merah. Koloni bakteri dari hasil purifikasi diinokulasi kedalam Media BAP lalu diinkubasi 1 x 24 jam pada suhu 37°C. Koloni yang tumbuh kemudian diamati (Pamungkas *et al.*, 2018).

Identifikasi bakteri khususnya bakteri yang patogen untuk manusia dapat dilakukan dengan beberapa cara seperti pengamatan sifat morfologi koloni bakteri, pengamatan mikroskopis melalui pewarnaan bakteri, dan identifikasi bakteri melalui uji biokimia. Penentuan spesies bakteri jarang sekali dapat ditentukan hanya dengan berdasarkan sifat morfologi atau biakan biasa, namun memerlukan kumpulan berbagai sifat biokimia dari suatu bakteri. Uji biokimia didasarkan pada berbagai hasil metabolisme yang disebabkan oleh daya kerja enzim. Salah satu uji biokimia yang luas digunakan untuk penentuan spesies bakteri adalah uji koagulase. Uji koagulase digunakan untuk diferensiasi *Staphylococcus aureus* dari spesies *Staphylococcus* lainnya. Bakteri *Staphylococcus aureus* memberikan hasil uji koagulase positif, sedangkan *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus intermedius*, dan spesies *Staphylococcus* lainnya memberikan hasil uji koagulase negatif. Uji koagulase dilakukan untuk mendeteksi pembentukan enzim koagulase yang terikat ke dinding sel bakteri . Uji koagulase dapat dilakukan dengan menggunakan salah satu dari dua metode yaitu uji koagulase metode tabung dan uji koagulase metode slide.

6. Uji Aktivitas Proteolitik menggunakan Media Selektif SMA

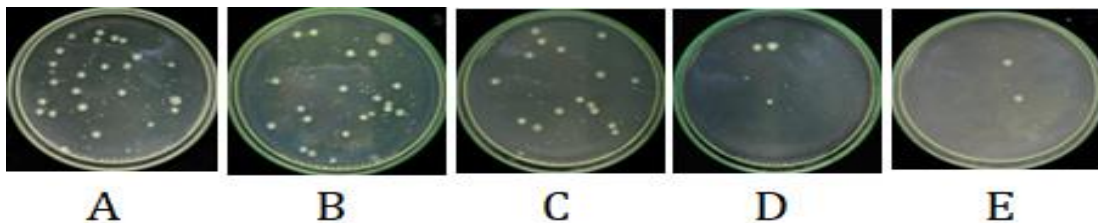
Pengujian potensi bakteri proteolitik dilakukan dengan cara isolat bakteri ditumbuhkan pada media SMA dengan metode dotting (Pamungkas dkk., 2018). Setelah

diinkubasi 1x 24 jam pada suhu 37°C, disekitar isolate bakteri yang memiliki aktivitas protease akan terlihat zona bening (Zaidah *et al.*, 2018)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fermentasi inasua ikan bawal selama 1 bulan menggunakan campuran nira kelapa dan garam. Selain garam, nira kelapa juga ditambahkan kedalam ikan bawal untuk digunakan mikroorganisme sebagai sumber baru enzim. Berikut ini merupakan hasil isolasi bakteri inasua ikan bawal:

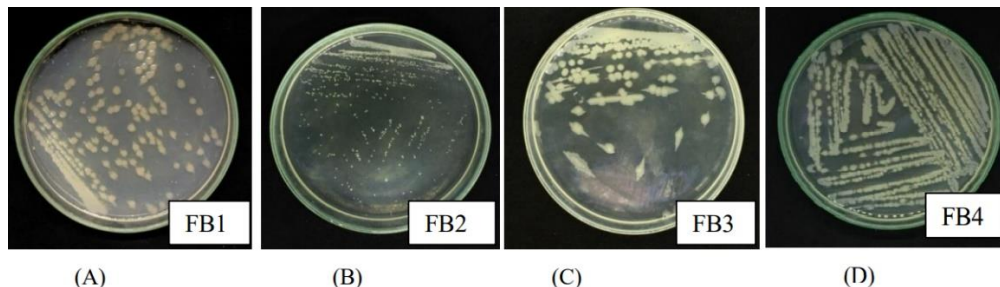
Gambar 1. Hasil Inokulasi dari media NA. (A) : Sampel pengenceran 10^{-1} . (B) : Sampel pengenceran 10^{-2} . (C):Sampel pengenceran 10^{-3} . (D) : Sampel pengenceran 10^{-4} . (E) : Sampel pengenceran 10^{-5}



Sumber: Dokumentasi Pribadi

Berdasarkan Gambar 1 menunjukkan bahwa semakin tinggi tingkat pengenceran, maka semakin sedikit koloni yang terisolasi. Metode pengenceran bertingkat mempunyai tujuan yaitu memperkecil atau mengurangi jumlah mikroba yang terdapat dalam cairan, maka semakin banyak tingkat pengenceran maka akan menghasilkan mikroba yang semakin sedikit (Ariyanti, dkk 2016). Selanjutnya dilakukan purifikasi isolat bakteri dari fermentasi inasua ikan bawal. Berikut ini merupakan hasil purifikasi isolat bakteri:

Gambar 2. Hasil Purifikasi Mikroorganisme.


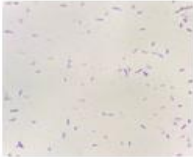




Sumber: Dokumentasi Pribadi

Berdasarkan Gambar 2, hasil purifikasi terdapat 4 jenis isolate bakteri dengan morfologi koloni yang berbeda yaitu isolat FB1, FB2, FB3, dan FB4. Isolat FB1

mempunyai bentuk: bundar, warna: putih keruh, tepi: *undulate*, elevasi: *convex*, konsistensi: *smooth*. Isolat FB2 mempunyai karakteristik bentuk: bundar, warna : putih keruh, tepi: *entire*, elevasi: *convex*, konsistensi: *smooth*. Isolat FB3 mempunyai karakteristik bentuk: bundar, warna: putih keruh, tepi: *entire*, elevasi: *flat*, konsistensi: *rough*. Isolat FB4 mempunyai bentuk bundar, warna : putih keruh, tepi : *undulate*, elevasi : *flat*, konsistensi : *rough*.

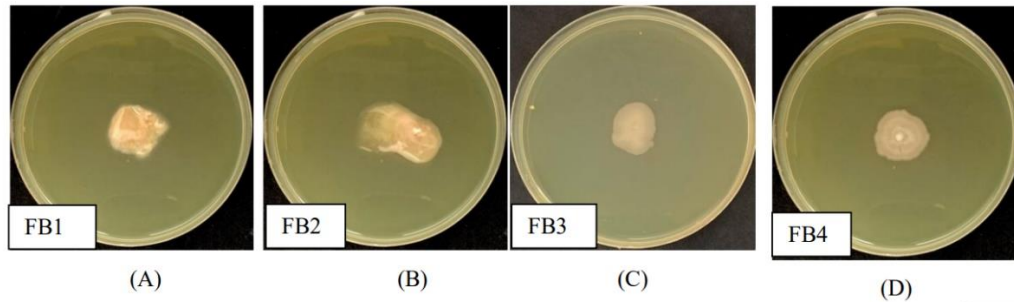
Tabel 1. Hasil Pewarnaan Gram Isolat Bakteri

Kode Sampel	Gambar	Bentuk	Susunan	Sifat
FB1		Basil Berspora	Berderet	Gram- positif
FB2		Basil Berspora	Berderet	Gram - positif
FB3		Basil berspora	Berderet	Gram - positif
FB4		Basil berspora	Berderet	Gram - positif

Sumber: Dokumentasi Pribadi

Uji Aktifitas Proteolitik Media Selektif (Skim Milk Agar) Pengujian yang dilakukan ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas proteolitik dari isolat yang didapatkan. Pengujian potensi bakteri proteolitik dilakukan dengan cara isolat bakteri ditumbuhkan pada medium SMA. Disekitar isolat bakteri yang memiliki aktivitas protease akan terlihat zona bening (Zahidah dkk, 2013).

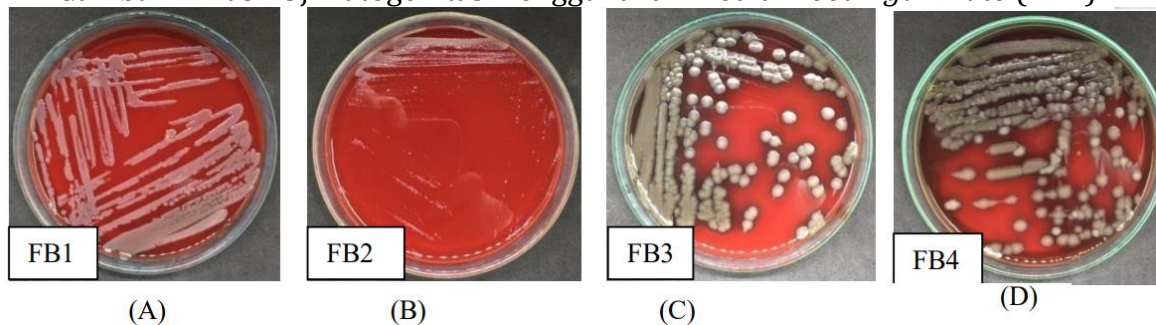
Gambar 3. Hasil Uji Bakteri Penghasil Enzim Protease



Sumber: Dokumentasi Pribadi

Berdasarkan uji bakteri penghasil enzim protease menggunakan media SMA diketahui pada isolat FB1, FB2, FB3, dan FB4 tidak mampu menghasilkan enzim protease. Hal ini dibuktikan dengan tidak terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri tersebut. Kemampuan hidrolisis protein dari bakteri proteolitik didapatkan dari hasil bagi diameter zona bening terhadap diameter koloni isolat bakteri pada media SMA (Hastuti *et al*, 2017). Bakteri proteolitik adalah bakteri yang mampu memproduksi enzim protease ekstraseluler, dengan cara pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel. Substrat untuk pertumbuhan bakteri proteolitik adalah protein. Salah satu sumber protein yang besar adalah ikan bawal. Ikan bawal mengandung protein sebesar 19/gr. Oleh sebab itu ikan bawal yang melimpah sehingga berpotensi sebagai sumber baru enzim protease.

Gambar 4. Hasil Uji Patogenitas Menggunakan Media *Blood Agar Plate* (BAP)

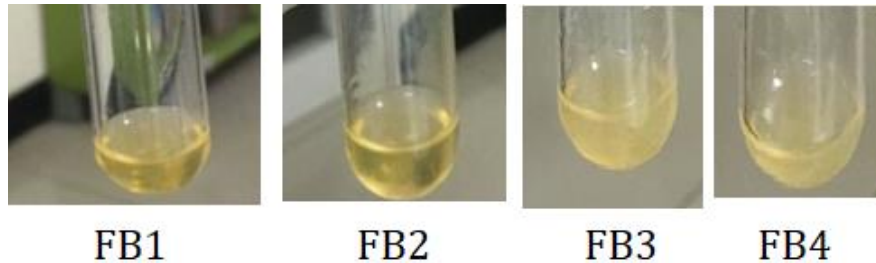


Sumber: Dokumentasi Pribadi

Uji Tingkat Patogenitas dilakukan dengan kemampuan bakteri dalam menghemolisa Sel darah Merah Manusia terdapat 2 isolat yang ada. Berdasarkan hasil uji tersebut diketahui bahwa isolat FB3 dan FB4 memiliki sifat β hemolisis sehingga mampu menghemolisa sel darah merah yang ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni. Sedangkan FB1 dan FB 2 memiliki sifat γ hemolisis.

Mikroorganisme yang bersifat patogen, ditunjukkan dengan kemampuannya yang dapat menghemolisis sel darah merah (Buxton, 2005).

Gambar 5. Hasil Uji Patogenitas Menggunakan Tes Koagulase



Sumber: Dokumentasi Pribadi

Uji koagulase digunakan untuk diferensiasi *Staphylococcus aureus* dari spesies *Staphylococcus* lainnya. Bakteri *Staphylococcus aureus* memberikan hasil uji koagulase positif, sedangkan *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus intermedius*, dan spesies *Staphylococcus* lainnya memberikan hasil uji koagulase negatif.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang sudah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Dari sampel fermentasi inasua ikan bawal diperoleh 4 isolat bakteri dengan bentuk koloni yang berbeda yaitu isolat bakteri FB1, FB2, FB3, dan FB4.
2. Dari keempat isolat bakteri tersebut, 4 isolat tidak mampu menghasilkan zona bening pada media skim milk disekitar koloni, yaitu isolat FB1, FB2, FB3 dan FB4.
3. Dari keempat isolat bakteri tersebut, 2 isolat mampu menghemolisa sel darah merah disekitar koloni, yaitu FB3 dan FB4
4. Dari hasil identifikasi, 2 isolat bakteri bersifat patogenitas rendah yaitu FB1 dan FB2, dan 2 isolat bakteri bersifat patogenitas tinggi yaitu FB3 dan FB4. Dengan demikian isolat bakteri FB1, FB2, FB3, dan FB4 tidak berpotensi sebagai sumber baru enzim protease. Karena isolat tersebut tidak mampu menghasilkan zona bening disekitar koloni.

DAFTAR PUSTAKA

Ariyanti, V. N., Supriharyono, S., & Widyorini, N. 2016. Hubungan kerapatan lamun dengan kelimpahan bakteri heterotrof di perairan Pantai Kartini Kabupaten

- Jepeara. Management of Aquatic Resources Journal (MAQUARES), 5(3), 142-149.
- Asoodeh, A., & Mohammadian Musaabadi, H. 2012. Purification and characterization of a thermostable neutrophilic metalloprotease from *Pseudomonas* sp. DR89. Iranian Journal of Biotechnology, 10(2), 120-128.
- Buxton, R. 2005. Blood agar plates and hemolysis protocols. American Society for Microbiology, 1-9.
- Darmayasa, I. G. 2008. Isolasi dan identifikasi bakteri pendegradasi lipid (lemak) pada beberapa tempat pembuangan limbah dan estuari DAM Denpasar. Bumi Lestari Journal of Environment, 8(2). Fitri, L. dan Yasmin, Y., 2011. Isolat dan Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Kitinolitik. 3 (2). 20-25
- Hastuti, U. S., Nugraheni, F. S. A., & Al Asna, P. M. 2017. Identifikasi dan Penentuan Indeks Hidrolisis Protein pada Bakteri Proteolitik dari Tanah Mangrove di Margomulyo, Balikpapan. In Proceeding Biology Education Conference: Biology, Science, Environmental, and Learning (Vol. 14, No. 1, pp. 265-270). Hermawan, 2019).
- Mahajan, R. T., & Badgular, S. B. 2010. Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review", Journal of Pharmacy Research, 3(9), 2048-2068.
- Melliawati, R., Djohan, A. C., & Yopi, Y. 2015. Selection of lactic acid bacteria as a protease enzyme producer. In Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia (Vol. 1, No. 2, pp. 184-188).
- Melliawati, R., Rohmattusolihat, R., Nuryati, N., Rahmani, N., & Yopi, Y. 2016. Seleksi Dan Identifikasi Bakteri Endofit Potensial Penghasil Enzim Protease Dari Taman Nasional Gunung Halimun-(the Selection and Identification of Potential Endophyte Bacteria as Protease Enzyme Producer From Halimun Mount National Park). Biopropal Industri, 7(2), 73-82.
- Noonpakdee, W., Jumriangrit, P., Wittayakom, K., Zendo, J., Nakayama, J., Sonomoto, K., & Panyim, S. 2009. Two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* PMU 33 strain isolated from som-fak, a Thai low salt fermented fish product. Asia Pasific Journal of Molecular Biology and Biotechnology, 17(1), 19-25.
- Pamungkas, N. D., Firmansyah, A., & Ethica, S. N. 2018. Isolasi dan Uji Patogenitas Bakteri Indigen Penghasil Enzim Selulase dari Limbah Ampas Kelapa di Pasar Tradisional Ngawen untuk Bioremediasi. In Prosiding Seminar Nasional Mahasiswa Unimus (Vol. 1).
- Purwadi, A. A., Darmawati, S., Sulistyanyingtyas, A. R., & Ethica, S. N. 2019. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Proteolitik *Bacillus cereus* strain IRPMD-3 pada Rusip Udang Windu (*Penaeus monodon*) Berdasarkan Gen 16S rRNA. In Prosiding Seminar Nasional Mahasiswa Unimus (Vol. 2).



- Soeka, Y, S., Rahayu, S, H., Setianingrum, N., Nayola, L., 2011. Kemampuan *Bacillus* Licheniformis dalam Memproduksi Enzim Protease yang Bersifat Alakalin dan Termofilik. *Media Litbang Kesehatan*. 21. 2. pp. 89.
- Winahyu, P., Sulistyanyngtyas, A. R., & Darmawati, S. 2019. Isolasi Bakteri Indigenous Penghasil Enzim Protease dari Limbah Cair Industri Tempe. In *Prosiding Seminar Nasional Mahasiswa Unimus (Vol. 2)*.
- Zahidah, D., & Shovitri, M. 2013. Isolasi, karakterisasi dan potensi bakteri aerob sebagai pendegradasi limbah organik. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 2(1), E12-E15.