
ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PROTEOLITIK ASAL TERASI IKAN SELUANG (*Stolephorus* sp.)

Isolation and Characterization Proteolytic Bacteria from Stolephorus sp. Anchovy

Yulia Oktavia^{1*)}, Shanti Dwita Lestari²⁾, Susi Lestari²⁾, Ace Baehaki²⁾, Dwiky Satya Kusuma²⁾

¹⁾Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Maritim Raja Ali Haji, Tanjungpinang, 29111, Indonesia

²⁾Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya, Indralaya, 30862, Indonesia

*korespondensi: yuliaoktavia@umrah.ac.id

Diterima: 14 September 2022; Disetujui 25 Oktober 2022

ABSTRACT

Anchovy is one type of processed fishery product in Indonesia that is made through a fermentation process. The fish paste fermentation process utilizes the activity of hydrolytic bacteria present in the raw materials. These bacteria can produce hydrolytic enzymes capable of hydrolyzing complex molecules into simple ones. This study aims to isolate proteolytic bacteria and determine the character of the isolated bacteria. The test results were analyzed descriptively. The research was conducted in several stages, including determining the proteolytic index, colony and cell morphology tests, and biochemical tests. 4 bacterial isolates had proteolytic activity, namely PT1, PT2, PT3, and PT5. Based on biochemical tests, the PT2 isolate was suspected to be proteolytic lactic acid bacteria.

Keywords: anchovy, fermentation, proteolytic, *Stolephorus* sp.

ABSTRAK

Terasi merupakan produk olahan hasil perikanan yang ada di Indonesia yang dibuat melalui proses fermentasi. Proses fermentasi terasi memanfaatkan aktivitas bakteri hidrolitik yang ada pada bahan baku. Bakteri tersebut mampu menghasilkan enzim hidrolitik yang mampu menghidrolisis molekul kompleks menjadi sederhana. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri proteolitik dan menentukan karakter dari isolat bakteri yang diperoleh. Hasil pengujian dianalisis secara deskriptif. Parameter uji yang dilakukan yaitu penentuan indeks proteolitik, uji morfologi koloni dan sel serta uji biokimia. Terdapat 4 isolat bakteri yang memiliki aktivitas proteolitik yaitu PT1, PT2, PT3, dan PT5. Berdasarkan uji biokimia, isolat PT2 diduga bakteri asam laktat proteolitik.

Kata kunci: fermentasi, proteolitik, *Stolephorus* sp., terasi

PENDAHULUAN

Fermentasi merupakan proses pengolahan dan pengawetan ikan secara tradisional yang banyak dilakukan di Indonesia. Salah satu produk fermentasi hasil perikanan yaitu terasi. Menurut Fadli *et al.* (2016), terasi adalah produk berbahan baku udang rebon atau ikan kecil ekonomis rendah yang ditambahkan garam sebagai bahan pengawet dan telah difermentasi, digiling, dan dijemur. Bahan baku yang sering digunakan untuk pembuatan terasi

yaitu udang rebon dan ikan-ikan kecil yang memiliki nilai ekonomis rendah.

Proses pembuatan terasi dilakukan dengan memanfaatkan aktivitas bakteri asam laktat yang mampu menghasilkan enzim hidrolitik. Bakteri asam laktat tersebut dapat dengan sengaja ditumbuhkan pada bahan baku maupun tumbuh secara spontan dengan merangsang pertumbuhannya melalui penambahan sumber karbohidrat dan garam pada kondisi anaerob. Menurut Putra dan Frevia (2018), *Enterococcus faecalis* dan *Weissella cibaria* merupakan

jenis bakteri asam laktat yang terisolasi dari terasi. Bakteri asam laktat selama fermentasi pembuatan terasi akan mengeksresikan enzim-enzim hidrolitik ekstraseluler yaitu protease, amilase, dan lipase. Menurut Oktavia et al. (2018), isolat bakteri asal terasi ikan teri mampu menghasilkan enzim protease dan amilase. Selain dalam proses fermentasi pengolahan ikan, enzim hidrolitik juga sangat berperan dalam industri-industri lainnya.

Penggunaan enzim hidrolitik dalam bioteknologi modern saat ini semakin berkembang pesat. Enzim banyak digunakan pada industri farmasi, pengolahan pangan, industri tekstil dan industri kimia lainnya. Enzim hidrolitik yang banyak digunakan pada industri dan bidang bioteknologi umumnya dihasilkan dari bakteri dan fungi. Bakteri yang berperan dalam pembuatan terasi tidak menutup kemungkinan untuk dimanfaatkan sebagai sumber penghasil enzim dikarenakan kemampuannya dalam menghasilkan enzim hidrolitik. Untuk itulah perlu dilakukan pengkajian tentang isolasi dan karakterisasi bakteri proteolitik dari terasi ikan teri *Stolephorus* sp.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan Universitas Sriwijaya.

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang diperlukan saat penelitian adalah rumput laut asal perairan Natuna, etanol 96%, methanol, aquades, dan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Peralatan yang dipakai selama penelitian adalah tabung reaksi, gelas kimia, labu erlenmeyer, mikropipet, batang pengaduk, kertas saring, timbangan analitik, blender, oven spektrofotometer UV-Vis.

Metode Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu Skim Milk Agar (SMA) (Oxoid), media Sulfide Indol Motility (SIM)

(Merck), media TSIA (Triple Sugar Iron Agar) (Merck), KH₂PO₄ (Merck), yeast extract (Oxoid), bacto tripton (Oxoid), agar bakteriologis (Oxoid), larutan iodium (Iugol) (Merck), alkohol (Merck), NaCl (Merck), aquadest, nutrient agar (Oxoid), nutrient broth (Oxoid), Man de Rogosa Sharpe Broth (MRSB) (Oxoid), kristal iodin, larutan hidrogen peroksida (H₂O₂), kalium iodida, kristal violet dan safranin. Alat yang digunakan yaitu *laminar flow*, inkubator, vortex (*Stuart SA8 Vortex Mixer*), mikropipet, dan cawan petri.

Metode Penelitian

Parameter yang diamati pada penelitian ini meliputi indeks proteolitik dan karakter (Uji morfologi koloni dan sel serta uji biokimia) isolat bakteri yang diperoleh dari terasi ikan teri. Data yang diperoleh akan dianalisis secara deskriptif.

Prosedur Kerja

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap yaitu pembuatan terasi ikan teri, isolasi bakteri penghasil enzim protease, dan karakterisasi isolat bakteri yang diperoleh.

1. Pembuatan Terasi Ikan Teri

Pembuatan terasi ikan teri dilakukan dengan mengacu pada penelitian Maflahah (2013), yaitu ikan teri dicuci hingga bersih, kemudian dilakukan penjemuran sampai ikan setengah kering. Selanjutnya ikan dihaluskan dan ditambahkan garam sebanyak 20% dari berat total bahan baku. Selanjutnya dilakukan pemeraman selama 18 jam dalam wadah yang ditutup tidak terlalu rapat pada suhu ruang sehingga proses fermentasi awal dapat berlangsung. Ikan hasil fermentasi selanjutnya dihaluskan dan dijemur kembali selama satu hari, kemudian dibungkus rapat dengan daun pisang. Produk terasi difermentasi selama 14 hari dalam toples dengan keadaan tertutup.

2. Isolasi Bakteri Proteolitik

Isolasi bakteri penghasil enzim dari terasi ikan teri dilakukan pada produk yang telah difermentasi selama 14 hari. Isolasi bakteri didasarkan pada kemampuan bakteri tersebut dalam menghidrolisis protein.

Isolasi Bakteri proteolitik menggunakan metode Rupali (2015) yaitu sampel yang telah mengalami pengenceran dituangkan pada media SMA (1%). Selanjutnya dilakukan penginkubasian biakan bakteri selama 48 jam pada suhu 37 °C. Koloni bakteri yang tumbuh diisolasi kembali dengan metode gores untuk mendapatkan koloni tunggal. Koloni tunggal yang dihasilkan akan diukur indeks proteolitiknya dengan menginokulasikan koloni tunggal pada media dan kondisi pertumbuhan yang sama dengan kondisi isolasi. Indeks proteolitik koloni bakteri terduga diukur dengan membandingkan zona bening yang terdapat di sekitar koloni terhadap diameter koloni bakteri.

3. Karakterisasi Isolat Bakteri Proteolitik

Bakteri yang memiliki indeks proteolitik selanjutnya dilakukan karakterisasi. Karakterisasi ini dilakukan dengan mengamati morfologi koloni, morfologi sel (pewarnaan gram, bentuk sel, motilitas, uji katalase, H₂S, fermentasi gula dan gas, dan kebutuhan oksigen).

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Isolat Bakteri Proteolitik

Bakteri proteolitik adalah bakteri yang mampu mendegradasi media yang kaya akan kandungan protein. Bakteri tersebut dapat mendegradasi protein karena kemampuannya dalam menghasilkan enzim protease. Menurut Sharma *et al.* (2015), enzim protease merupakan enzim yang mampu mengkatalis reaksi hidrolisis ikatan peptida pada protein. Isolasi bakteri proteolitik pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan media SMA (Skim Milk Agar). Hasil pengukuran indeks proteolitik dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 2. Morfologi koloni dan sel bakteri proteolitik

Isolat	Morfologi Koloni			Morfologi Sel		
	Bentuk	Elevasi	Margin	Warna	Sel	Gram
PT1	bundar	undulate	Timbul	putih	bulat	Positif
PT2	bundar	undulate	Datar	krem	bulat	Positif
PT3	bundar	undulate	datar	krem	bulat	Positif
PT5	bundar	bulat halus	datar	putih	bulat	Positif

Tabel 1. Menunjukkan bahwa terdapat 5 isolat bakteri yang bersifat proteolitik. isolat PT3 memiliki indeks proteolitik tertinggi dibandingkan dengan isolat lainnya. Pengukuran indeks didasarkan pada adanya zona bening yang terdapat disekitar koloni bakteri, sedangkan isolat bakteri PT4 memiliki diameter zona bening sama dengan diameter koloni isolat bakteri.

Tabel 1. Indeks proteolitik Bakteri Asal Terasi Ikan Teri

Isolat Bakteri Proteolitik	Indeks Proteolitik
PT1	1,2
PT2	1,2
PT3	1,3
PT4	0
PT5	1,2

Keberadaan zona bening di sekitar koloni menunjukkan kemampuan bakteri tersebut dalam menghasilkan enzim golongan protease yang mampu mendegradasi protein menjadi senyawa sederhana di media. Menurut Alemu (2015), terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri dapat diindikasikan bahwa bakteri tersebut positif menghidrolisis kasein yang merupakan substrat yang mengandung protein. Zona bening tersebut dapat membuktikan bahwa bakteri tersebut mampu mensekresikan enzim protease.

2. Karakter Isolat Bakteri Proteolitik

Karakterisasi isolat bakteri proteolitik hanya dilakukan pada isolat yang memiliki nilai indeks lebih dari nol. karakterisasi ini meliputi uji morfologi koloni dan sel, uji pewarnaan gram, uji motilitas, uji katalase, uji pembentukan gas dan fermentasi gula, serta uji kebutuhan bakteri akan oksigen untuk hidupnya.

Morfologi Koloni dan Sel

Pengamatan morfologi koloni meliputi bentuk, elevasi, dan margin koloni sedangkan pengamatan morfologi sel bakteri meliputi bentuk dan pewarnaan gram sel bakteri. Hasil pengamatan morfologi koloni dan sel isolat bakteri proteolitik disajikan pada Tabel 2.

Berdasarkan Tabel 2. perbedaan isolat berdasarkan morfologi koloni yang terdiri dari bentuk, elevasi, dan margin. Bentuk koloni isolat bakteri proteolitik berbentuk bundar. Elevasi dari koloni yaitu undulate dan bulat halus. Isolat bakteri proteolitik memiliki margin timbul dan datar.

Penentuan gram bakteri dapat dilakukan dengan metode pewarnaan gram. Metode ini akan membedakan bakteri menjadi dua yaitu gram positif dan gram negatif. Berdasarkan Tabel 2, hasil pewarnaan gram isolat bakteri proteolitik yaitu gram positif. Diduga isolat bakteri yang terisolasi pada penelitian ini merupakan bakteri asam laktat. Menurut Laily et al., (2013), bakteri asam laktat merupakan bakteri gram positif yang mampu mempertahankan warna ungu kristal violet pada tahap akhir pewarnaan. Menurut Kurahman et al. (2020), bakteri gram negatif memiliki dinding sel dengan kandungan lipid yang tinggi dalam bentuk lipopolisakarida dan lipoprotein. Selama proses pewarnaan, lipid akan larut oleh alkohol. Hal ini menyebabkan warna kristal ungu di dinding sel tidak dapat dipertahankan dan akan berikatan dengan warna merah yang berasal dari safranin. Bentuk sel juga dapat diketahui melalui pewarnaan gram. Berdasarkan hasil pengamatan melalui mikroskop diketahui bahwa bentuk sel isolat bakteri proteolitik yang diperoleh yaitu bulat (*coccus*).

Motilitas

Motilitas merupakan salah satu ciri untuk membedakan mikroorganisme.

Motilitas adalah salah satu ciri makhluk hidup tidak terkecuali mikroorganisme. Pengujian motilitas dapat memberikan informasi apakah bakteri tersebut dapat berpindah tempat atau tidak. Bakteri dapat berpindah tempat dikarenakan memiliki alat pergerakan berupa *flagella* (Putri et al., 2020).

Pengamatan aktivitas motilitas dilakukan dengan melihat daerah bekas tusukan pada media agar miring yang telah ditanamkan bakteri uji. Menurut Misgiyarta dan Widowati (2013), bakteri asam laktat umumnya berbentuk batang (*basil*) atau bulat (*coccus*), motilitas negatif, bersifat gram positif, katalase negatif, endospora negatif, dan mampu menghasilkan asam laktat. Hasil pengujian motilitas bakteri proteolitik disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Uji Motiitas Isolat Bakteri Proteolitik asal Terasi Ikan Teri

Nama Isolat	Aktivitas
PT1	non motil
PT2	non motil
PT3	motil
PT5	non motil

Tabel 3. menunjukkan bahwa isolat bakteri yang bersifat non motil pada isolat bakteri proteolitik yaitu PT1, PT2, dan PT5. Menurut Damayanti et al. (2018), motilitas suatu bakteri ditandai dengan pertumbuhan bakteri yang menyebar dan keruhnya media menyerupai kabut.

Uji Biokimia

Uji Biokimia dilakukan dalam beberapa uji diantaranya pengujian katalase, fermentasi gula, kemampuan bakteri dalam menghasilkan gas, dan kebutuhan bakteri akan oksigen untuk hidupnya. Hasil pengujian secara biokimia bakteri proteolitik disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Uji Biokimia Isolat Bakteri Proteolitik asal Terasi Ikan Teri

Nama Isolat	Morfologi Koloni			
	Katalase	Fermentasi gula	Gas/H ₂ S	Oksigen
PT1	+	-	H ₂ S	Aerob
PT2	-	glukosa	H ₂ S	anaerob fakultatif
PT3	+	-	H ₂ S	Aerob
PT5	-	-	H ₂ S	anaerob fakultatif

Berdasarkan Tabel 4. diketahui bahwa isolat bakteri yang diperoleh bersifat katalase positif dan katalase negatif. Menurut Manalu *et al.* (2021), uji katalase negatif dapat diketahui dari tidak adanya gelembung udara yang terbentuk saat isolat bakteri ditetesi dengan larutan H₂O₂. Menurut Finanda *et al.* (2021), tidak terbentuknya gelembung pada katalase negatif dikarenakan bakteri bersifat anaerob fakultatif yang mampu menghasilkan enzim peroksidase yang akan memecah H₂O₂ menjadi H₂O dan senyawa organik dan tidak menghasilkan gelembung.

Uji H₂S, fermentasi glukosa dan pembentukan gas merupakan pengujian yang dilakukan dengan menggunakan media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA). Uji H₂S ini bertujuan untuk memberikan konfirmasi bahwa bakteri mampu menghasilkan enzim desulfurase yang dapat memecah asam amino sistein menjadi asam disulfida (H₂S). Pada kondisi anaerobik, sistin mula-mula akan dipecah menjadi 2 molekul sistin dan kemudian sistein akan dipecah menjadi H₂S, asam asetat, asam format, dan amonia. Isolat bakteri yang positif menghasilkan H₂S ditandai dengan di bagian bawah tabung akan terbentuk endapan berwarna hitam sehingga dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri tersebut mampu menggunakan asam amino sistein sebagai sumber energinya.

Uji fermentasi glukosa digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasi glukosa dengan menghasilkan asam dan gas (Kosasi *et al.*, 2019). Menurut Fallo dan Sine (2016), uji fermentasi glukosa positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna pada media menjadi kuning dan terbentuk gelembung pada tabung durham.

Berdasarkan kebutuhan oksigen, beberapa bakteri tidak membutuhkan oksigen dalam pertumbuhan hidupnya. Menurut Puspitasari *et al.* (2012), bakteri dapat digolongkan menjadi aerob obligat, anaerob fakultatif, anaerob obligat, anaerob aerotoleran, dan mikroaerofil. Berdasarkan Tabel 4, isolat bakteri proteolitik yang diperoleh termasuk dalam bakteri aerob dan anaerob fakultatif. Bakteri aerob merupakan bakteri yang

membutuhkan udara bebas untuk kelangsungan hidupnya. Sedangkan bakteri anaerob fakultatif yaitu jenis bakteri yang tidak membutuhkan oksigen untuk kelangsungan hidupnya. Contoh bakteri yang tergolong anaerob fakultatif yaitu bakteri asam laktat.

KESIMPULAN

Terdapat 4 isolat bakteri yang bersifat proteolitik yaitu PT1, PT2, PT3, dan PT5. Berdasarkan uji biokimia Isolasi bakteri PT2 diduga merupakan bakteri asam laktat proteolitik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DIPA Universitas Sriwijaya melalui Program Penelitian Sains Teknologi dan Seni Universitas Sriwijaya No 989/UN9.3.1/PP/2017 dengan judul Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease, Amilase, dan Lipase dari Terasi Ikan Teri *Stolephorus* sp.

DAFTAR PUSTAKA

- Alemu, F. 2015. Isolation and screening of protease enzyme producing bacteria from cheese at Dilla University, Ethiopia. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*. 4(2): 234-239.
- Amelia, R., Philip, K., Pratama, Y.E., Purwati E. 2021. Characterization and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from dadiah sampled in West Sumatra *Rinita Food Science and Technology*. 41(2): 746-752.
- Damayanti, S.S., Komala, O., Effendi, E.M. 2018. Identifikasi bakteri dari pupuk organik cair isi rumen sapi. *Ekologia : Jurnal Ilmiah Ilmu Dasar dan Lingkungan Hidup*. 18(2): 63-71.
- Fadli, R. A., Ibrahim, M. N., Sadimantara, S. 2016. Analisis kandungan zat pengawet pada terasi yang diperdagangkan di pasar tradisional

- Kota Kendari. *J. Sains dan Teknologi Pangan*. 1(1): 73-78.
- Fallo, G. dan Sine, Y. 2016. Isolasi dan uji biokimia bakteri selulolitik asal saluran pencernaan rayap pekerja (*Macrotermes* spp.) *Jurnal Pendidikan Biologi*. 1(2): 27-29.
- Finanda, A., Mukarlina, Rahmawati. 2021. Isolasi dan karakterisasi genus bakteri asam laktat dari fermentasi daging buah pisang kepok (*Musa paradisiaca* L.). *Protobiont*. 10 (2): 37-41.
- Kosasi, C., Lolo, W. A., Sedewi, S. 2019. Isolasi dan uji aktivitas antibakteri dari bakteri yang berasosiasi dengan alga *Turbinaria ornata* (Turner) J. Agardh serta Identifikasi secara biokimia. *Pharmakon*. 8(2): 351-359.
- Kurahman, O.T., Yuliawati A., Haerunnisa L., Supriyatna, A., Cahyanto, T., Suryani Y., Supriadin, A., Hidayat, C., Masri, M. 2020. The isolation and identification bacteria on jallalah animal (study on the feeding tilapia (*Oreochromis niloticus*) with chicken manure as foods. *Elkawanie: Journal of Islamic Science and Technology*. 6(2): 222-236.
- Laily, I.N., Utami, R., Widowati, E. 2013. Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat penghasil riboflavin dari produk fermentasi sawi asin. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 2(4): 179-184.
- Maflahah, I. 2013. Kajian potensi pembuatan terasi udang studi kasus di Desa Bantelan, Kecamatan Batu Putih, Kabupaten Sumenep. Fakultas Pertanian Universitas Trunojoyo. Madura.
- Manalu, R.T., Febriani, A., Syamsinar. 2021. Isolation and characterization of lactic acid bacteria in fermented sweet corn (*Zea mays* L.) as antibacterial. *Bioscience*. 5(2): 141-149.
- Misgiyarta, Widowati, S. 2013. Seleksi dan karakterisasi bakteri asam laktat (BAL) indigenus. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman. 377-387.
- Oktavia, Y. Lestari, S. D., Lestari, S., Herpandi, Jannah, M. 2018. Optimasi waktu inkubasi produksi protease dan amilase isolat bakteri asal terasi ikan teri *Stolephorus* sp. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. 10(3): 719-725.
- Puspitasari, F.D., Shovitri, M., Kuswytasari, N. D. 2012. Isolasi dan karakterisasi bakteri aerob proteolitik dari tangki septik. *Jurnal Sains dan Seni ITS*. 1(1): E1-E4.
- Putri, I., Jannah, S.N., Purwantisari, S. 2020. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from *Apis mellifera* and their potential as antibacterial using in vitro test against growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *NICHE Journal of Tropical Biology*. 3(1): 26-34.
- Putra, R. W dan Fevria, R. 2018. Isolation and identification of probiotic candidate lactic acid bacteria (LAB) from shrimp paste (*Mysis relicta*) based on 16s rRNA gene. *Bioscience*. 2(1): 64-71.
- Sharma, A.K., Sharma, V., Saxena, J., Yadav, B., Alam, A., Prakash, A. 2015. Optimization of protease production from bacteria isolated from soil. *Applied Research Journal*. 1(7): 388-394.