

**KARAKTERISTIK BAKTERI PROTEOLITIK YANG DI ISOLASI
DARI IKAN SELAR KUNING (*Caranx leptolepis*) ASIN**

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI INDUSTRI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN**

**Oleh:
NULLY PRABOWO
NIM. 0510830052**



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
MALANG
2010**

**KARAKTERISTIK BAKTERI PROTEOLITIK YANG DI ISOLASI
DARI IKAN SELAR KUNING (*Caranx leptolepis*) ASIN**

SKRIPSI

**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI INDUSTRI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan di
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan**

Universitas Brawijaya

Oleh:

NULLY PRABOWO

NIM. 0510830052



UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

MALANG

2010

SKRIPSI

KARAKTERISTIK BAKTERI PROTEOLITIK YANG DI ISOLASI
DARI IKAN SELAR KUNING (*Caranx leptolepis*) ASIN

Oleh:
NULLY PRABOWO
NIM. 0510830052

Mengetahui,
Ketua Jurusan

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I

(Dr. Ir. HAPPY NURSYAM, M.S)
NIP. 19600322 198601 1 001

(Dr. Ir. HARTATI K., M.S)
NIP. 19640726 198903 2 004

Tanggal :

Tanggal:

Dosen Pembimbing II

(Dr. Ir. HAPPY NURSYAM, M.S)
NIP. 19600322 198601 1 001

Tanggal:

RINGKASAN

NULLY PRABOWO (0510830052). Skripsi tentang Karakteristik Bakteri Proteolitik yang di Isolasi dari Ikan Selar Kuning (*Caranx leptolepis*) Asin (dibawah bimbingan **Dr. Ir. Hartati K., M.S** dan **Dr. Ir. Happy Nursyam, M.S**).

Ikan asin adalah ikan yang telah mengalami proses pengeringan dan penggaraman. Salah satu produk hasil olahan menjadi ikan asin yaitu ikan selar kuning (*Caranx leptolepis*). Bakteri proteolitik pada ikan asin mempunyai potensi bioteknologi yang tinggi untuk diteliti karena bakteri yang dapat tumbuh pada ikan asin adalah bakteri yang ekstremofilik atau dapat hidup pada lingkungan yang ekstrem. Bakteri-bakteri pada ikan asin tersebut mampu bertahan hidup dalam lingkungan dengan kadar garam tinggi, suhu tinggi, dan aw rendah karena pembuatan ikan asin melalui proses penggaraman dan pengeringan.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode penelitian eksploratif atau yang bersifat menjelajah. Metode pembuatan ikan asin yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode *brine salt*. Prinsip pengawetan dalam pembuatan ikan asin merupakan kombinasi penambahan garam dan pengeringan. Analisa proksimat yang dilakukan antara lain kadar air, kadar garam, kadar protein, kadar abu, dan kadar lemak. Karakterisasi dilakukan dengan penentuan suhu, pH dan aw sehingga setelah melewati penentuan berdasarkan 3 hal tersebut dapat diketahui berapa isolat bakteri yang bisa tumbuh. Isolat bakteri yang diperoleh dilakukan identifikasi yang meliputi : pengamatan morfologi koloni, pengamatan morfologi bakteri, pengujian sifat biokimia bakteri, pengujian motilitas dan penghitungan kepadatan isolat bakteri.

Dari hasil penelitian diperoleh kandungan kimia ikan selar kuning asin pada hari ke-5 yaitu kadar air 19.57%, abu 34.66%, lemak 4.54%, protein 9.57% dan garam 12.83%. Hasil uji karakteristik isolat berdasarkan suhu pada hari ke-5 yang terbaik pada suhu 60°C diduga jumlah isolat N1 yang tumbuh dibandingkan dengan tingkat kekeruhan Mc Farland yaitu sebesar MF 2 (6.10^8 sel/ml) dan jumlah isolat yang tumbuh pada media padat sekitar 5 koloni. Hasil uji karakteristik berdasarkan pH yang terbaik pada pH4 diduga jumlah isolat N1 yang tumbuh dibandingkan dengan tingkat kekeruhan Mc Farland yaitu sebesar MF 3 (9.10^8 sel/ml) dan jumlah isolat yang tumbuh pada media padat sekitar 6 koloni. Hasil uji karakteristik berdasarkan a_w yang terbaik pada a_w 0.753 diduga jumlah isolat N1 yang tumbuh dibandingkan dengan tingkat kekeruhan Mc Farland yaitu sebesar MF 4 (12.10^8 sel/ml) dan jumlah isolat yang tumbuh pada media padat sekitar 7 koloni. Isolat N1 pada suhu 60°C, pH 4 dan a_w 0.753 ditumbuhkan dalam medium padat untuk melihat morfologi koloni. Isolat yang terpilih berbentuk bulat, tepi tidak rata, elevasi cembung, berwarna putih dan merupakan gram positif

Bakteri dari ikan selar kuning asin yang dikeringkan pada hari ke-5 yang mampu tumbuh pada suhu 60°C, pH 4 dan a_w 0,753 dengan morfologi koloni berbentuk bulat, tepi tidak rata, elevasi cembung, berwarna putih dan merupakan gram positif diduga mendekati ke arah bakteri *Bacillus firmus*.

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, karena atas rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul " Karakteristik Bakteri Proteolitik yang di Isolasi dari Ikan Selar Kuning (*Caranx leptolepis*) Asin".

Pembuatan skripsi ini adalah sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dr. Ir. Hartati K., M.S selaku Dosen Pembimbing I, yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan sehingga laporan ini dapat tersusun.
2. Dr. Ir. Happy Nursyam, M.S selaku Dosen Pembimbing II, yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan sehingga laporan ini dapat tersusun.
3. Bapak dan Ibu atas kasih sayang dan doanya serta dukungan baik moril maupun materil yang diberikan selama ini.
4. Semua pihak yang telah memberi bantuan dan dorongan sehingga laporan ini dapat tersusun.

Akhirnya penulis berharap semoga laporan ini bermanfaat dan dapat memberikan informasi bagi pembaca.

Malang, Juli 2010

Nully Prabowo

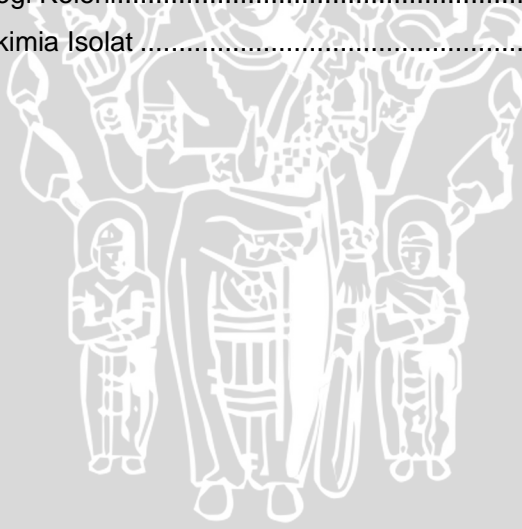
DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Kegunaan Penelitian.....	6
1.5 Tempat dan Waktu.....	6
2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Deskripsi Ikan Selar Kuning.....	7
2.2 Komposisi Gizi.....	8
2.3 Isolasi Bakteri.....	8
2.4 Bakteri Proteolitik.....	9
2.5 Karakterisasi bakteri Proteolitik.....	10
2.6 Enzim Proteolitik.....	10
2.7 Bakteri Halofilik.....	11
2.8 Bakteri Termofil.....	12
3. METODE PENELITIAN	14
3.1 Materi Penelitian.....	14
3.1.1 Bahan Penelitian.....	14
3.1.2 Alat Penelitian.....	14
3.2 Metode Penelitian.....	14
3.3 Prosedur Penelitian.....	15
3.3.1 Pembuatan Ikan Selar Asin.....	15
3.3.2 Analisa Proksimat.....	16
3.3.2.1 Kadar Air.....	16
3.3.2.2 Kadar Garam.....	17
3.3.2.3 Kadar Protein.....	18
3.3.2.4 Kadar Abu.....	18
3.3.2.5 Kadar Lemak.....	19
3.3.3 Isolasi Bakteri.....	19
3.3.4 Penghitungan Zona Bening.....	19
3.3.5 Pengujian Jumlah Bakteri Berdasarkan Metode McFarland dan media padat.....	20
3.3.6 Karakterisasi Isolat.....	21
3.3.6.1 Pengujian Suhu.....	22
3.3.6.2 Pengujian pH.....	22
3.3.6.3 Pengujian a _w	22
3.3.7 Identifikasi Isolat.....	22
3.3.7.1 Pengamatan Morfologi Koloni.....	23
3.3.7.2 Pengamatan Morfologi Bakteri.....	23
3.3.7.3 Pengujian Sifat Biokomia Bakteri.....	23

3.3.7.3.1	Uji Pertumbuhan pada Berbagai Suhu.....	23
3.3.7.3.2	Uji Penggunaan Gula	23
3.3.7.3.3	Uji Citrate	25
3.3.7.3.4	Uji Indole	25
3.3.7.3.5	Uji Voges-Proskauer	26
3.3.7.3.6	Uji Motilitas	27
3.3.7.3.7	Uji Hidrolisis Zat Tepung	28
3.3.7.3.8	Uji Hidrolisis Kasein.....	28
3.3.7.3.9	Uji Beta-Hemolisa.....	29
3.3.7.3.10	Uji Katalase	29
3.3.7.3.11	Uji Oksidase	30
3.3.7.3.12	Uji Reduksi Nitrat.....	30
3.3.7.3.13	Uji Reduksi Methylene Blue	31
3.3.8	Pembuatan Kultur Stok Isolat	31
4.	HASIL dan PEMBAHASAN.....	33
4.1	Hasil Analisa Proksimat.....	33
4.1.1	Kadar Air.....	34
4.1.2	Kadar Abu.....	34
4.1.3	Kadar Lemak	35
4.1.4	Kadar Protein.....	36
4.1.5	Kadar Garam	36
4.2	Hasil Isolasi Bakteri	37
4.3	Karakterisasi Isolat	40
4.3.1	Uji Karakteristik Isolat Berdasarkan Suhu	40
4.3.2	Uji Karakteristik Isolat Berdasarkan pH	43
4.3.3	Uji Karakteristik Isolat Berdasarkan a_w	45
4.4	Hasil Identifikasi Isolat Morfologi Koloni	47
4.5	Hasil Identifikasi Isolat Berdasarkan Uji Biokimia	49
4.5.1	BGP	50
4.5.2	Hasil Uji Fermentasi Gula-gula	51
4.5.3	Hasil Uji Suhu Pertumbuhan.....	51
4.5.4	Hasil Uji SDA	52
4.5.5	Hasil Uji TSI	52
4.5.6	Hasil Uji Sitrat	53
4.5.7	Hasil Uji Indol.....	53
4.5.8	Hasil Uji Vp	54
4.5.9	Hasil Uji NaCl 7%	54
4.5.10	Hasil Uji Motilitas	55
4.5.11	Hasil Uji Hidrolisis Pati.....	55
4.5.12	Hasil Uji Hidrolisis Kasein	56
4.5.13	Hasil Uji Penisilin	56
4.5.14	Hasil Uji Beta-hemolysa.....	57
4.5.15	Hasil Uji Katalase.....	57
4.5.16	Hasil Uji Oksidase.....	58
4.5.17	Hasil Uji Reduksi Nitrat	58
4.5.18	Hasil Uji Methylene Blue.....	59
5.	KESIMPULAN dan SARAN.....	61
	DAFTAR PUSTAKA	62
	LAMPIRAN	65

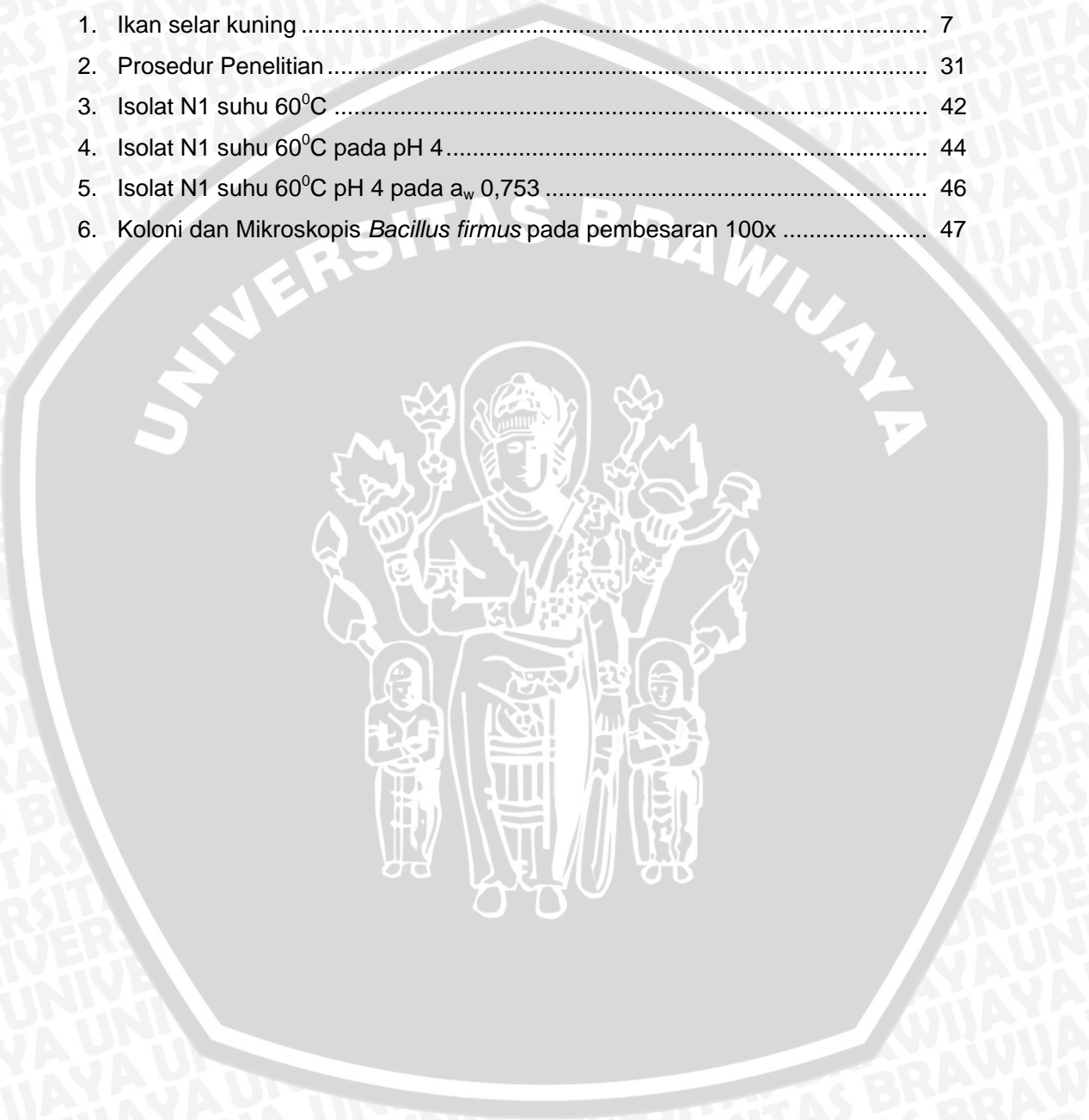
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi kimia daging ikan selar.....	8
2. Analisa proksimat ikan selar asin	32
3. Data Hasil Analisa Proksimat Kadar Air Sampel Ikan Selar Asin	33
4. Data Hasil Analisa Proksimat Kadar Abu Sampel Ikan Selar Asin	33
5. Data Hasil Analisa Proksimat Kadar Lemak Sampel Ikan Selar Asin.....	34
6. Data Hasil Analisa Proksimat Kadar Protein Sampel Ikan Selar Asin	35
7. Data Hasil Analisa Proksimat Kadar Garam Sampel Ikan Selar Asin	35
8. Data Hasil Isolasi Sampel Ikan Selar Asin	38
9. Data Hasil Pengujian Karakteristik Isolat Berdasarkan Suhu	41
10. Data Hasil Pengujian Karakteristik Isolat Berdasarkan pH	43
11. Data Hasil Pengujian Karakteristik Isolat Berdasarkan a_w	45
12. Identifikasi Morfologi Koloni.....	47
13. Data Hasil Uji Biokimia Isolat	49



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ikan selar kuning	7
2. Prosedur Penelitian	31
3. Isolat N1 suhu 60°C	42
4. Isolat N1 suhu 60°C pada pH 4	44
5. Isolat N1 suhu 60°C pH 4 pada a_w 0,753	46
6. Koloni dan Mikroskopis <i>Bacillus firmus</i> pada pembesaran 100x	47



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Langkah dan diagram alir pembuatan ikan asin.....	15
2. Langkah-langkah uji kadar air	16
3. Langkah-langkah uji kadar garam	17
4. Langkah-langkah uji kadar protein	18
5. Langkah-langkah uji kadar abu	18
6. Langkah-langkah uji kadar lemak.....	19
7. Langkah-langkah isolasi bakteri	19
8. Langkah-langkah pengujian suhu	22
9. Langkah-langkah pengujian pH.....	22
10. Langkah-langkah pengujian a_w	22
11. Langkah-langkah uji pertumbuhan pada berbagai suhu	23
12. Langkah-langkah uji penggunaan gula (TSIA)	23
13. Langkah-langkah uji sitrat	25
14. Langkah-langkah uji indole.....	25
15. Langkah-langkah uji VP	26
16. Langkah-langkah uji motilitas	27
17. Langkah-langkah uji hidrolisis zat tepung	28
18. Langkah-langkah uji hidrolisis kasein.....	28
19. Langkah-langkah uji beta-hemolisa.....	28
20. Langkah-langkah uji katalase.....	29
21. Langkah-langkah uji oksidase.....	30
22. Langkah-langkah uji reduksi nitrat.....	30
23. Langkah-langkah uji reduksi methylene blue	31
24. Langkah-langkah untuk pembuatan kultur stok isolat	31

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ikan memiliki kandungan protein yang cukup tinggi, sehingga bakteri proteolitik dapat tumbuh pada produk perikanan tersebut. Bakteri yang tergolong proteolitik adalah bakteri yang memproduksi enzim proteinase ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi didalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel. Protein merupakan makromolekul yang paling melimpah di dalam sel. Unit pembangunnya adalah asam amino yang berikatan secara kovalen untuk menghubungkan molekul-molekul menjadi rantai. Apabila protein dihidrolisis dengan asam, alkali atau enzim akan dihasilkan campuran asam-asam amino. Sebuah asam amino memiliki jenis kandungan Jumlah (gram) yang terdiri dari gugus R (rantai cabang), sebuah gugus asam amino, sebuah gugus karboksil, dan sebuah atom hidrogen (Winarno, 1997).

Menurut Dwidjoseputro (1993), semua bakteri mempunyai enzim proteinase ekstraseluler. Bakteri proteolitik dapat dibedakan atas beberapa kelompok yaitu: bakteri aerobik/anaerobik fakultatif, tidak membentuk spora misalnya *Pseudomonas* dan *Proteus*. Bakteri aerobik / anerobik fakultatif, membentuk spora misalnya: *Bacillus*. Bakteri anaerobik pembentuk spora, misalnya sebagian species *Clostridium*.

Enzim merupakan katalisator protein yang mempercepat reaksi dalam makhluk hidup atau dalam sistem biologik. Sebagai protein, enzim memiliki sifat-sifat umum protein, seperti enzim terdenaturasi pada suhu tinggi atau kondisi ekstrim lainnya. Beberapa oksidator, keadaan polaritas larutan, tekanan osmotik yang abnormal juga dapat menghambat kerja enzim (Suhartono, 1989).

Protease merupakan kelompok enzim-enzim yang sangat kompleks yang menduduki posisi sentral dalam aplikasinya pada bidang fisiologis dan produk-produk komersil. Protease ekstraseluler sebagian besar berperan dalam hidrolisis substrat polipeptida besar. Enzim proteolitik intraseluler memainkan peran penting dalam metabolisme dan proses regulasi pada sel hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme. Seperti mengganti protein, memelihara keseimbangan antara degradasi dan sintesis protein. Protease intraseluler berperan dalam fungsi fisiologis lainnya, seperti pencernaan, maturasi hormon, perakitan virus, respon imun, inflamantasi, fertilisasi, koagulasi darah, fibrinolisis, kontrol tekanan darah, sporulasi, germinasi dan patogenensi (Rao et al, 1998). Protease juga diimplikasikan dalam peran regulasi ekspresi gen, perbaikan DNA, dan sintesis DNA (Kalisz, 1998).

Protease adalah enzim yang mengkatalis pemecahan ikatan peptida dalam peptida, polipeptida dan protein dengan menggunakan reaksi hidrolisis menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana seperti peptidan rantai pendek dan asam amino (Naiola & Widyastuti, 2002).

Bakteri yang tergolong proteolitik adalah bakteri yang memproduksi enzim proteinase ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel. Semua bakteri mempunyai enzim proteinase di dalam sel, tetapi tidak semua mempunyai enzim proteinase ekstraseluler. Banyak bakteri proteolitik penghasil enzim protease pada pengolahan pangan yang diisolasi dari berbagai macam bagian dari ikan maupun dari proses pengolahannya. Antara lain dapat diisolasi dari limbah ikan, isi perut ikan, ikan segar dan ikan olahan misalnya adalah ikan asin.

Penelitian yang telah dilakukan oleh Sopiah dan Susanto (2008), yang telah mengisolasi bakteri proteolitik yang terdapat dalam limbah cangkang udang dapat diidentifikasi 2 (dua) jenis koloni bakteri yang mempunyai aktivitas

protease, yaitu jenis bakteri batang (*bacillus*) dan bulat (*coccus*). Isolat bakteri dengan pembentukan enzim protease mampu hidrolisis substrat protein sebesar 64,03% ~ 85,07%, melalui pemutusan ikatan peptida pada protein. Beberapa sifat limbah perikanan antara lain tidak semua mikroba pembusuk dapat mendegradasi bahan organik yang ada di dalam limbah sehingga dapat mengakibatkan pencemaran bau pada lingkungan, pemanfaatan limbah padat perikanan untuk dijadikan chitin chitosan mengakibatkan terbentuknya limbah baru yang bersifat asam akibat proses deproteinasi dan deasetilasinya selain itu juga dikarenakan oleh proses pemanasan yang dilakukan pada limbah hasil perikanan.

Penelitian lain tentang isolasi bakteri proteolitik dari pencernaan ikan nila galur gift (*Oreochromis niloticus Linnaeus Trewavas*) yang dilakukan oleh Fatimah (2005) menunjukkan isolat berbentuk batang (*bacillus*). Penelitian yang dilakukan oleh Andriyani (2009), yang mengisolasi bakteri pada ikan asin umumnya adalah golongan bakteri halofilik yang dapat ditemukan pada makanan yang diawetkan dengan penggaraman antara lain ikan asin tetapi jenis-jenisnya belum banyak diketahui. Oleh karena itu penelitian tersebut dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui jenis-jenis bakteri halofilik yang diisolasi dari ikan asin. Isolat bakteri halofilik yang berhasil diisolasi dari penelitian tersebut berjumlah 28.

Ikan asin adalah ikan yang telah mengalami proses pengeringan dan penggaraman. Proses penggaraman terdiri dari dua tahap yaitu tahap penggaraman dan tahap pengeringan. Tujuan penggaraman secara umum adalah untuk mengawetkan. Selain itu fungsi garam dapat memperlambat atau membunuh bakteri pembusuk pada ikan. Hasil dari penggaraman adalah ikan asin yang telah mengalami tahap penggaraman sekaligus pengeringan (Rahayu et al., 1992). Penggaraman dapat memperpanjang masa simpan produk, karena

garam mempunyai sifat bakteriosid (daya membunuh) dan bakteriostatik (daya menghambat). Aksi osmotik larutan garam terhadap ikan disebabkan karena kulit ikan dan dinding sel jaringan pada ikan yang masih hidup bertindak sebagai suatu membran semipermeabel itu menurun sehingga bila ikan digarami akan mengikat cairan dalam tubuh ikan dan dapat mereduksi kadar air ikan tersebut sehingga garam berperan untuk menghambat kegiatan bakteriologis dan enzimatis (Ilyas dan Arifudin, 1972).

Kondisi pada ikan asin termasuk ekstrem untuk pertumbuhan mikroba. Bakteri yang mampu tumbuh dalam kondisi ekstrem tersebut berpotensi digunakan untuk pengolahan industri perikanan lebih lanjut. Penelitian yang dilakukan oleh Wibowo (2009), yang mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri halofilik dari ikan selar asin dapat diidentifikasi isolat bakteri proteolitik yang mengacu pada Ventosa *et al* (1998) dan Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994) menunjukkan bahwa bakteri halofilik yang ditemukan adalah *Deleya cupidus1*, *Deleya cupidus2*, *Deleya spesies1*, *Deleya spesies2*, *Deleya spesies3*, *Kurthia spesies1*, *Kurthia spesies2*, dan *Kurthia spesies3*.

Berdasarkan hal di atas, penelitian tentang isolasi bakteri proteolitik pada ikan asin, yang dalam hal ini adalah ikan selar kuning asin perlu dilakukan karena bakteri yang dapat tumbuh pada ikan asin adalah bakteri yang ekstremofilik atau dapat hidup pada lingkungan yang ekstrem dibandingkan dengan bakteri proteolitik yang diisolasi dari isi perut ikan, limbah ikan maupun ikan segar. Bakteri-bakteri tersebut mampu bertahan hidup dalam lingkungan dengan kadar garam tinggi atau halofilik, suhu tinggi atau termofilik dan aw rendah karena pembuatan ikan asin melalui proses penggaraman, penjemuran dan pengeringan.

1.2 Rumusan Masalah

Ikan selar kuning termasuk kategori ikan yang berkadar lemak rendah karena kurang dari 5 % dan memiliki protein yang tergolong tinggi yaitu antara 15% - 20% (Stansby 1982). Salah satu produk hasil olahan menjadi ikan asin yaitu ikan selar kuning (*Caranx leptolepis*). Pada proses penggaraman ikan yang mencapai hingga 30%, pengawetan dilakukan dengan cara mengurangi kadar air dalam badan ikan sampai titik tertentu sehingga bakteri tidak dapat hidup dan berkembang biak lagi. Jadi, peranan garam dalam proses ini tidak bersifat membunuh mikroorganisme (fermicida), tetapi garam mengakibatkan terjadinya proses penarikan air dalam sel daging ikan sehingga terjadi plasmolisis (kadar air dalam sel mikroorganisme berkurang, lama kelamaan bakteri mati). Penggaraman ikan biasanya diikuti dengan pengeringan untuk menurunkan kadar air dalam daging ikan sehingga cairan semakin kental dan proteinnya akan menggumpal.

Bakteri proteolitik pada ikan asin mempunyai potensi bioteknologi yang tinggi untuk diteliti karena bakteri yang dapat tumbuh pada ikan asin adalah bakteri yang extraordinary yang dapat digunakan untuk penelitian lebih lanjut (Wibowo, 2009). Bakteri-bakteri pada ikan asin tersebut mampu bertahan hidup dalam lingkungan dengan kadar garam tinggi, suhu tinggi, dan aw rendah karena pembuatan ikan asin melalui proses penggaraman dan pengeringan. Menurut Andriyani (2009), bakteri yang biasa tumbuh pada lingkungan yang ekstrem atau pada ikan asin merupakan anggota dari delapan genus yaitu genus *Pseudomonas*, *Chromohalobacter*, *Halomonas*, *Deleya*, *Bacillus*, *Salinicoccus*, *Marinococcus* dan *Kurthia*.

Berdasarkan uraian diatas, rumusan masalah yang ingin dijawab melalui kegiatan penelitian ini adalah:

- Apakah ada isolat bakteri proteolitik dari ikan selar kuning asin dengan karakteristik yang tahan terhadap garam, suhu tinggi, pH rendah dan a_w rendah?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian yang dilakukan adalah untuk:

- Untuk memperoleh isolat bakteri proteolitik dari ikan selar kuning asin dengan karakteristik yang tahan terhadap garam, suhu tinggi, pH rendah dan a_w rendah.

1.4 Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat :

- Mendapatkan informasi jenis isolat bakteri proteolitik dari ikan selar kuning asin dengan karakteristik yang tahan terhadap garam, suhu tinggi, pH rendah dan a_w rendah.

1.5 Tempat dan Waktu

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium THP Laboratorium Biokimia Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, pada bulan Desember 2009 – April 2010.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Deskripsi Ikan Selar Kuning (*Caranx leptolepis*)

Klasifikasi ikan selar kuning (*Caranx leptolepis*) berdasarkan Saanin (1984) adalah sebagai berikut :

Filum	: Chordata
Sub Filum	: Vertebrata
Kelas	: Pisces
Sub kelas	: Teleostei
Ordo	: Percomorphi
Sub Ordo	: Perciformes
Famili	: Carangidae
Genus	: <i>Caranx</i>
Spesies	: <i>Caranx leptolepis</i>



Gambar 1. Ikan selar kuning (*Caranx leptolepis*)

Bentuk tubuh ikan selar kuning (*Caranx leptolepis*) lebih kecil dari pada ikan selar yang lain. Panjang tubuh ikan ini sampai dengan 16 cm. Jenis ikan ini ditandai dengan garis lebar berwarna kuning dari mata sampai ekor. Sirip punggung ikan selar kuning terpisah dengan jelas, bagian depan disokong oleh jari-jari keras dan banyak jari-jari lunak. Sirip ekor becagak dua dengan lekukan yang dalam. Sirip perut terletak di bawah sirip dada. Ikan selar kuning termasuk ikan laut perenang cepat dan kuat. Daerah penyebaran ikan ini adalah semua laut di daerah tropis dan semua lautan Indofasifik, ikan ini banyak tertangkap di

perairan pantai serta hidup berkelompok sampai kedalaman 80 m (Djuhanda 1981).

2.2 Komposisi Gizi

Komposisi kimia daging ikan sangat bervariasi tergantung pada spesies, tingkat umur, musim, habitat dan kebiasaan makan. Nilai gizi daging ikan terutama ditentukan oleh kandungan lemak dan proteinnya. Ikan selar kuning termasuk kategori ikan yang berkadar lemak rendah karena kurang dari 5 % dan memiliki protein yang tergolong tinggi yaitu antara 15 % - 20 % (Stansby 1982).

Menurut Sediaoetama (2004), komposisi kimia ikan selar adalah air 75g%; energi 100kal; protein 18,8g%; lemak 2,2g%; calsium 40mg%; fospor 179mg%; fe 0,5mg%; Vit A 150SI/100g; Vit B1 0,37mg%; karbohidrat 0g%.

Tabel 1 memperlihatkan komposisi kimia ikan selar.

Tabel 1. Komposisi kimia daging ikan selar dalam setiap 100 gram bahan

Jenis kandungan	Jumlah (gram)
Air	75,4
Abu	1,36
Protein	18,8
Lemak	2,2

Sumber : Direktorat Gizi Departemen Kesehatan RI (1989)

2.3 Isolasi Bakteri

Menurut Rochima (2005), Isolasi merupakan penanaman bakteri dengan tujuan akhir untuk mengetahui dan mengidentifikasi jenis bakteri. Dalam isolasi terjadi pemurnian, pemisahan, penanaman, identifikasi, pengujian, dan penyeleksian. Pada tahap seleksi, digunakan medium spesifik dengan substrat tertentu dimana mediumnya dipilih medium yang memungkinkan isolat dapat tumbuh dengan baik dan memberikan penampakan bahan genetik yang maksimum. Dalam isolasi bakteri juga terjadi pemurnian dan penumbuhan Isolat pada suatu media. Isolat yang diperoleh harus diuji terlebih dahulu terhadap

kemampuan membuat produk yang diharapkan, senyawa-senyawa penghambat dan pemacu pertumbuhannya, kondisi lingkungan yang diharapkan untuk tumbuh dan berproduksi secara optimum dan sebagainya.

2.4 Bakteri Proteolitik

Bakteri proteolitik adalah bakteri yang memproduksi enzim protease ekstraseluler yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel. Semua bakteri mempunyai enzim protease di dalam sel tetapi tidak semuanya mempunyai enzim protease ekstraseluler. Bakteri proteolitik dapat digolongkan menjadi beberapa kelompok: 1).Bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif, tidak membentuk spora misalnya *Pseudomonas* dan *Proteus*; 2). Bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif membentuk spora misalnya *Bacillus*; 3). Bakteri anaerobik pembentuk spora misalnya sebagian spesies *Clostridium*. (Wikipedia, 2009). Mikroba penghasil enzim proteolitik adalah *Bacillus substilus*, enzim proteolitik bakteri yeast maupun fungi mempunyai karakter dan spesifikasi yang berbeda (Poernomo dan Purwanto, 2003). Beberapa bakteri disebut proteolitik asam yaitu dapat memecah protein sekaligus memfermentasi asam misalnya *Streptococcus faocalin van linguefaciens* dan *Micrococcus caseolitycus*. Bakteri *Streptococcus* merupakan bakteri yang sering digunakan untuk pengawetan makanan khususnya untuk menghambat pertumbuhan bakteri pathogen sedangkan bakteri *Micrococcus* membentuk pigmen kuning, oranye dan merah muda (Fardiaz, 1992).

Hidrolisis protein oleh mikroorganisme pada makanan mungkin menghasilkan berbagai macam kerusakan bau dan rasa. Selama proses hidrolisis, protein didegradasi melalui protease, pepton, polipeptida dan dipeptida menjadi asam amino. Selanjutnya penipuan oleh asam amino berperan penting untuk karakteristik bau busuk pada beberapa makanan yang telah rusak. Jenis bakteri proteolitik umumnya diantara genus *Acetobacter*,

Bacillus, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* dan *Proteus*, termasuk proteolitik ragi dan jamur. Mikroorganisme yang membawa hidrolisis protein dan fermentasi asam disebut sebagai proteolitik asam, contohnya *Enterococcus faecalis* dan *Micrococcus caseolyticus* (Marcy and Pruett dalam Downes and Ito, 2001).

2.5 Karakterisasi Bakteri Proteolitik

Menurut Megiandari (2009), Karakterisasi merupakan pencirian ataupun pendefinisian jenis bakteri yang sebelumnya telah diisolasi. Menurut Fatimah (2005), karakterisasi bertujuan untuk menentukan suhu dan pH optimum, ketahanan terhadap panas dan pH, serta pengaruh penambahan senyawa kation dan penghambat bakteri proteolitik. Penentuan pH optimum dilakukan dengan cara penumbuhan bakteri pada berbagai pH. Penentuan suhu optimum dilakukan dengan cara penumbuhan bakteri pada berbagai suhu inkubasi. Pengaruh penambahan senyawa penghambat dan kation, ekstrak kasar enzim direaksikan dengan etilena diamina tetra asetat (EDTA) dan berbagai kation monovalen (Na^+ dan K^+) dan kation bivalen (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , dan Zn^{2+}) yang masing-masing berasal dari garam NaCl , KCl , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CoCl_2 , CuCl_2 , dan ZnCl_2 serta dilakukan pengujian ketahanan terhadap panas dan pH.

Bakteri dengan tipe berbeda memiliki kebutuhan yang jelas berbeda seperti pada suhu berapa mereka akan tumbuh. Di antara suhu maksimum, ke atas yang mana kultur akan tidak berkembang, dan suhu minimum, ke bawah yang mana kultur akan tidak berkembang, adalah jarak di mana pertumbuhan akan tampak. Pertumbuhan terbaik agak berada dalam jarak terbatas yang disebut suhu optimum. Suhu optimum bagi pertumbuhan spesies mikroba adalah hubungan terbaik dengan suhu habitat asli organisme (Seeley dan Vandemark, 1962).

2.6 Enzim Proteolitik

Enzim proteolitik adalah enzim yang dapat menguraikan atau memecahkan protein. Protease termasuk ke dalam kelas utama enzim hidrolase yang mengkatalisis reaksi-reaksi hidrolisis (Dixon, Webb 1979).

Enzim proteolitik atau protease mempunyai dua pengertian, yaitu proteinase yang mengkatalisis hidrolisis molekul protein menjadi fragmen-fragmen yang lebih sederhana, dan peptidase yang menghidrolisis fragmen polipeptida menjadi asam amino. Enzim proteolitik yang berasal dari mikroorganisme adalah protease yang mengandung proteinase dan peptidase (Frazier, Westhoff 1983).

Menurut Winarno (1997), enzim proteolitik berdasarkan sisi aktifnya diklasifikasikan menjadi empat golongan yaitu:

- Proteolitik serin, mempunyai residu pada sisi aktifnya dan secara spesifik dihambat oleh DIFP (diisopropilfosfoluridat) dan turunan organofosforis lainnya. Enzim ini semuanya bersifat endopeptidase. Enzim yang termasuk golongan ini adalah tripsin, kimotripsin, elastase dan subtilin.
- Proteolitik thiol atau disebut proteolitik sulfhidril, keaktifannya tergantung pada residu SH pada sisi aktifnya. Enzim ini dihambat oleh senyawa oksidator dan logam berat. Enzim yang termasuk golongan ini adalah papain, bromelin dan fisin.
- Proteolitik metal, yaitu enzim yang keaktifannya tergantung pada adanya metal, biasanya terdapat hubungan stokiometrik yaitu 1 mol metal per mol enzim. Metal tersebut dapat terdiri dari Mg, Zn, Co, Fe, Hg, Ni dan lain sebagainya. Enzim ini dihambat oleh *Ethylene Diamini Tetra Acetic Acid* (EDTA) yang dapat mengkelat logam sehingga

keaktifan enzim akan berkurang. Contoh enzim yang termasuk golongan ini adalah karboksipeptidase A dan beberapa aminopeptidase.

- Proteolitik asam, yaitu enzim yang pada lokasi aktifnya terdapat dua gugus karboksil. Keaktifannya dapat dihambat oleh p-bromofenasilibromida. Enzim yang termasuk golongan ini adalah pepsin, renin dan protease kapang. Enzim ini hanya aktif pada pH rendah.

2.7 Bakteri Halofilik

Bakteri halofilik merupakan salah satu kelompok mikroorganisme yang dapat hidup di lingkungan berkadar garam tinggi hingga 30% (Andriyani, 2009). Bakteri halofilik membutuhkan konsentrasi NaCl minimal tertentu untuk pertumbuhannya optimum bervariasi yaitu 5-20% untuk bakteri halofilik sedang dan 20-30% untuk bakteri halofilik ekstrem. Spesies yang tumbuh baik pada medium yang mengandung 2-5% garam disebut halofilik ringan. Beberapa bakteri disebut halotoleran yaitu bakteri yang dapat tumbuh dengan atau tanpa garam. Bakteri halofilik dan halotoleran sering ditemukan pada makanan yang berkadar garam tinggi dan di dalam larutan garam. Bakteri tersebut dapat ditemukan pada makanan yang diawetkan dengan penggaraman antara lain ikan selar asin tetapi jenis-jenisnya belum banyak diketahui. Bakteri-bakteri tersebut diantaranya tergolong dalam jenis *Halobacterium*, *Halococcus*, *Sarcina*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Pediococcus*, dan *Alcaligenes*. (Fardiaz, 1992)

Diantara bakteri-bakteri penghasil lipase seperti *Micrococcus sp*, *Pseudomonas sp*, dan *Achromobacter sp* merupakan bakteri yang bersifat halofilik. Bakteri ini tahan hidup pada larutan garam sampai 30%. Ini berarti

bahwa larutan garam 35% dapat menghambat pertumbuhan baik bakteri non halofilik maupun bakteri halofilik (Suprayitno, 2006).

2.8 Bakteri Termofil

Termofil adalah mikroorganisme yang menyukai suhu antara 48-80°C. Bakteri termofil adalah mikroba yang mempunyai suhu optimum pertumbuhan 45-60°C dengan suhu minimum pertumbuhan 25-45°C dan suhu maksimal 60-80°C. Untuk menghitung jumlah sel vegetatif termofil, suhu inkubasi yang digunakan adalah 55°C selama 2-3 hari (Fardiaz, 1993). Apabila panas yang digunakan untuk mencegah suatu bahan pangan, maka kemampuan tahan panas mikroorganisme mempunyai peranan penting dalam menentukan tipe mikroorganisme mana yang akhirnya banyak terdapat suatu perlakuan pasteurisasi dengan panas ringan (76°C selama 30 menit) masih memungkinkan mikroorganisme termofilik seperti *Micrococcus* dan *Streptococcus*, juga dari bentuk spora dari jenis *Bacillus* dan *Clostridium* tetap hidup. Sedangkan pemanasan yang lebih sedikit tinggi (80°C selama 30 menit) umumnya memungkinkan mikroorganisme pembentuk spora tunggal hidup (Buckle *et al.*, 1987). Menurut Fardiaz (1989), Contoh bakteri termofil misalnya *Bacillus stearothermophilus* penyebab kebusukan asam tanpa gas (*flat sour*), *Clostridium thermosaccharolyticum* penyebab busuk kembung pada makanan kaleng, dan *Lactobacillus thermophilus* yang merupakan bakteri asam laktat termofil.

III. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam karakterisasi bakteri proteolitik ini terdiri dari bahan utama dan bahan kimia. Bahan utama yang digunakan yaitu ikan selar segar sebanyak 150 gram yang diperoleh dari Tempat Pelelangan Ikan (TPI) Probolinggo, Jawa Timur. Bahan kimia untuk pembuatan media yang digunakan yaitu media NA (*nutrient agar*), kasein, ekstrak yeast, pepton, aluminium foil, NaCl, MgCl, KI, KCl, K₂SO₄, alkohol 90%, asam asetat 10%, Mg(NO₃)₂, buffer fosfat 2, 4, 6, 8, 10, kristal ungu, iodium, safranin, hexan, kertas saring dan aquadest didapatkan dari Panadia *Laboratory*, Jalan Taman Sulfat X/16-27 Malang dan CV Makmur Sejati, Perumahan Griya Santha.

3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam karakterisasi bakteri proteolitik ini terdiri dari timbangan digital, nampan, bak plastik, dan *cabinet dryer*, mortar, gelas ukur 100 ml, *washing bottle*, pipet volume 10 ml, *water bath*, bola hisap, *incase*, cawan petri, spatula, tabung reaksi, *colony counter*, jarum loop, jarum ose, pipet serologis, autoklaf, erlenmeyer 250, 500 dan 1000 ml, rak tabung reaksi, kompor, *sprayer*, serbet, panci, *vortex mixer*, *triangle*, dan bunsen, oven, *goldfish*, botol timbang, kurs porselen, *crushable tang*, *muffle*, desikator, gelas piala dan timbangan analitik.

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode penelitian eksploratif atau yang bersifat menjelajah. Artinya, penelitian yang dilakukan bila pengetahuan tentang gejala yang diteliti masih sangat kurang atau tidak ada sama sekali. Seringkali penelitian ini dilakukan sebagai suatu *feasibility* studi,

artinya untuk meneliti apakah penelitian itu dapat dilakukan berdasarkan adanya atau dapat diperolehnya data yang diperlukan dan sebagainya. Penelitian Eksploratif seringkali berupa studi kasus, yang masih kurang diketahui orang. Penelitian jenis ini bertujuan untuk memperdalam pengetahuan mengenai suatu gejala tertentu, atau mendapatkan ide-ide baru mengenai gejala itu dengan maksud untuk merumuskan masalahnya secara lebih terperinci atau untuk mengembangkan hipotesa. Dalam hal ini, masalahnya sangat terbuka dan belum ada hipotesa, penelitian ini juga bertujuan untuk memformulasikan pertanyaan penelitian yang lebih tepat, sehingga hasil penelitian nanti dapat menjawab pertanyaan-pertanyaan selanjutnya di masa mendatang (Yumei dan Yulia, 2008).

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pembuatan Ikan Selar Kuning Asin (*Caranx leptolepis*)

Metode pembuatan ikan asin yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode *brine salt*. Proses penggaraman ikan mencapai 30% dengan perhitungan seperti dibawah ini:

Air : 500 ml

Ikan : 1000 gr

Garam : $\frac{30}{100} \times 100 = 300 \text{ gr}$

% kadar garam : $\frac{300}{500+300} \times 100 = 37.5\%$

Prinsip pengawetan dalam pembuatan ikan asin merupakan kombinasi penambahan garam dan pengeringan. Dalam jumlah yang cukup, garam dapat mencegah terjadinya autolisis, yaitu kerusakan ikan yang disebabkan oleh enzim-enzim yang terdapat pada ikan, dan mencegah terjadinya pembusukan oleh jasad renik. Daya pengawetan oleh garam ini disebabkan garam atau NaCl mempunyai osmotik tinggi, sehingga selain dapat menarik air dari daging ikan sekaligus menarik cairan sel mikroorganisme sehingga sel mengalami

plasmolisis dan mati. Garam menyebabkan denaturasi dan koagulasi protein dan enzim, sehingga terjadi pengerutan daging ikan akibatnya air akan terperas keluar. Konsentrasi garam yang tinggi akan mengakibatkan kematian bakteri patogen dan pembusuk yang pada umumnya sangat sensitif pada garam.

Selain karena adanya garam, ikan asin menjadi awet karena perlakuan pengeringan. Pengeringan akan mengurangi kandungan air pada ikan sehingga jasad renik tidak dapat tumbuh dan proses pembusukan dapat dicegah (Margono *et al*, 2000). Langkah dan diagram alir pembuatan ikan asin dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.3.2 Analisa Proksimat

Analisa dapat diartikan sebagai usaha pemisahan suatu kesatuan materi bahan menjadi komponen-komponen penyusunnya sehingga dapat dikaji lebih lanjut. Dalam cabang ilmu kimia, analisa berarti penguraian bahan menjadi senyawa-senyawa penyusunnya yang kemudian dapat dipakai sebagai data untuk menetapkan komposisi (susunan) bahan tersebut. Bahan yang dianalisa adalah ikan asin setelah penjemuran hari 1, 2, 3, 4 dan 5. Analisa proksimat yang dilakukan antara lain:

3.3.2.1 Kadar Air (Sudarmadji *et al.*, 1997)

Menurut Sudarmadji, *et al.* (2003) kadar air dalam bahan makanan dapat ditentukan dengan berbagai cara, antara lain: Metode pengeringan (thermogravimetri), Metode destilasi (thermovolumetri), Metode Khemis, Metode fisis, Metode khusus (misalnya dengan kromatografi, Nuclear Magnetic, Resonances).

Prinsip penentuan dasar air dengan destilasi adalah menyiapkan air dengan "pembawa" cairan kimia yang mempunyai titik didih lebih tinggi dari pada air dan tidak dapat campur dengan air serta mempunyai berat jenis lebih rendah

dari pada air. Zat kimia yang dapat digunakan antara lain toluen, xylen, benzen, tetra khlorethilen dan xylol.

Metode pengeringan dengan oven kering digunakan untuk seluruh hasil pertanian dan perikanan, kecuali bahan tersebut mengandung senyawa volatil dan mengalami kerusakan komposisi pada pemanasan suhu 100°C pada tekanan 1 atm (Widjanarko, 1996). Langkah-langkah uji kadar air dapat dilihat pada Lampiran 2.

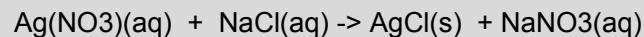
rumus untuk mencari kadar air basah (%Wb) dan kadar air kering (%Db) :

$$\% \text{ Wb} = \frac{\text{sampel} - (\text{berat akhir} - \text{berat botol timbang})}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Db} = \frac{\text{sampel} - (\text{berat akhir} - \text{berat botol timbang})}{\text{berat akhir} - \text{berat botol timbang}} \times 100\%$$

3.3.2.2 Kadar Garam (Kimia Analisa, 2008)

Analisa kadar garam dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kadar garam yang ada di dalam daging sampel, merupakan jumlah garam yang terserap maupun yang telah ada dalam sampel tersebut. Metode yang digunakan dalam pengujian kadar garam ini adalah metode Argentometri. Menurut anonymous (2010), Dasar titrasi argentometri adalah pembentukan endapan yang tidak mudah larut antara titran dengan analit. Sebagai contoh yang banyak dipakai adalah titrasi penentuan NaCl dimana ion Ag⁺ dari titran akan bereaksi dengan ion Cl⁻ dari analit membentuk garam yang tidak mudah larut AgCl.



Setelah semua ion klorida dalam analit habis maka kelebihan ion perak akan bereaksi dengan indikator. Indikator yang dipakai biasanya adalah ion kromat CrO₄²⁻ dimana dengan indikator ini ion perak akan membentuk endapan berwarna coklat kemerahan sehingga titik akhir titrasi dapat diamati. Indikator lain yang bisa dipakai adalah tiosianida dan indikator adsorpsi. Berdasarkan jenis

indikator dan teknik titrasi yang dipakai maka titrasi argentometri dapat dibedakan atas Argentometri dengan metode Mohr, Volhard, atau Fajans. Langkah-langkah uji kadar garam dapat dilihat pada Lampiran 3.

Untuk menghitung kadar garam menggunakan rumus :

$$\% \text{ Garam} = \frac{(V \times N) \times 58,5}{\text{berat sampel (gr)} \times 10^3} \times 100\%$$

3.3.2.3 Kadar Protein (N total) (Sudarmadji *et al.*, 2003)

Penentuan jumlah protein secara empiris yang umum dilakukan adalah dengan menentukan jumlah nitrogen (N) yang dikandung oleh suatu bahan. Dalam penentuan protein, seharusnya hanya nitrogen yang berasal dari protein saja yang ditentukan. Akan tetapi secara teknis hal ini sulit sekali dilakukan dan mengingat jumlah kandungan senyawa lain selain protein dalam bahan biasanya sangat sedikit, maka penentuan jumlah N total ini tetap dilakukan untuk mewakili jumlah protein yang ada. Kadar protein yang ditentukan berdasarkan cara Kjeldahl-Spektrofotometer ini dengan demikian sering disebut sebagai kadar protein kasar (*Crude protein*). Menurut Sudarmadji, *et al.* (2003), penentuan protein berdasarkan jumlah N menunjukkan protein kasar karena selain protein juga terikut senyawa N bukan protein misalnya urea, asam nukleat, ammonia, nitrat, nitrit, asam amino, amida, purin dan pirimidin. Langkah-langkah uji kadar protein dapat dilihat pada Lampiran 4.

3.3.2.4 Kadar Abu (Sudarmadji *et al.*, 1997)

Kadar abu merupakan residu anorganik bahan setelah proses destruksi bahan organik dengan asam kuat. Kadar abu tidak selalu mewakili kadar mineral dalam bahan, disebabkan sebagian mineral rusak dan menguap atau saling bereaksi satu dengan lainnya selama pengabuan pada suhu amat tinggi (Widjanarko, 1996). Menurut Sediaoetama (2004), kadar abu menggambarkan kandungan mineral dari sample bahan makanan yang disebut kadar abu ialah

material yang tertinggal bila bahan makanan dipijarkan dan diabukan pada suhu sekitar 500⁰-800⁰C. Langkah-langkah uji kadar abu dapat dilihat pada Lampiran 5.

Penentuan kadar abu dapat ditentukan dengan rumus:

$$\text{Kadar abu} = \frac{\text{berat akhir} - \text{berat kurs porselen}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

3.3.2.5 Kadar Lemak (Sudarmadji *et al.*, 1997)

Lemak dan minyak merupakan sumber energi yang lebih efektif dibanding dengan karbohidrat dan protein. Satu gram minyak atau lemak dapat menghasilkan 9 kkal, sedangkan karbohidrat dan protein hanya menghasilkan 4 kkal/gram. Minyak dan lemak, khususnya minyak nabati, mengandung asam lemak esensial seperti asam linoleat, linolenat, dan arakidonat (Winarno,1997).

Pada analisa kadar lemak ini, metode yang digunakan adalah metode Goldfish. Langkah-langkah uji kadar lemak dapat dilihat pada Lampiran 6.

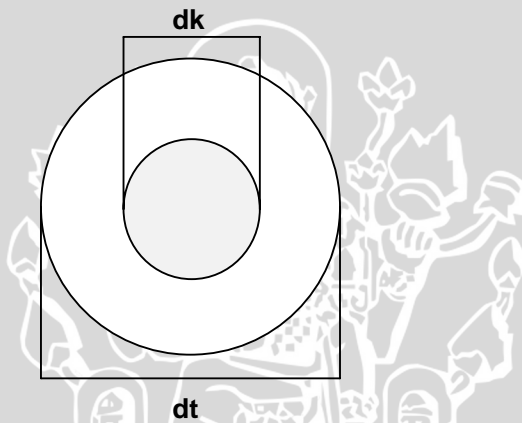
$$\text{Kadar lemak} = \frac{(\text{sampel} + \text{berat kertas saring}) - \text{berat akhir}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

3.3.3 Isolasi Bakteri (Mercy and Pruett dalam Downes and Ito, 2001)

Tahap penumbuhan bakteri proteolitik menggunakan metode Marcy and Pruett dalam Downes and Ito (2001). Metode yang digunakan pada saat penanaman adalah metode spread (sebar) dengan meratakan sampel menggunakan triangel yang steril. Media yang digunakan adalah Skim Milk Agar (SMA) yang berasal dari Nutrien Agar ditambahkan kasein dengan perbandingan 10:1. Kemudian dilakukan penghitungan jumlah koloni, karakteristik isolat, dan identifikasi protease. Langkah-langkah isolasi bakteri dapat dilihat pada Lampiran 7.

3.3.4 Penghitungan Zona Bening (Pirzada, 2009)

Menurut Pirzada (2009), pengamatan koloni yang bersifat proteolitik dan dapat mencerna kasein akan membuat zona bening disekitarnya karena adanya hidrolisa kasein menjadi senyawa nitrogen terlarut. Perhitungan zona bening dilakukan dengan cara menghitung luas besar dikurangi luas kecil dibagi dengan luas kecil seperti yang tertera pada Gambar 2 tentang Perhitungan Zona Bening. Zona bening terluas menunjukkan kemampuan bakteri menghasilkan protease paling optimal. Indeks zona bening dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:



Gambar 2. Perhitungan Zona Bening

Keterangan Gambar:

dt : diameter total (jumlah keseluruhan diameter total dibagi jumlah diameter besar yang dihitung)

dk : diameter koloni (jumlah keseluruhan diameter kecil dibagi jumlah diameter kecil yang dihitung)

Perhitungan:

Luas total (Lt) = πr^2

Luas koloni (Lk) = πr^2

Luas zona (Lz) = Lt - L

Index = Lz / Lk

3.3.5 Pengujian Jumlah Bakteri Berdasarkan Metode Mc Farland dan Media Padat (SMA) (Lammert, 2007)

Secara garis besar kita dapat mengenal dua macam media yaitu media umum dan media khusus. Media umum adalah media yang dapat digunakan mikroba pada umumnya, sedangkan media khusus adalah media yang sengaja dibuat dengan komponen yang telah diketahui komposisinya. Media khusus biasanya digunakan untuk mensintesis atau hanya dapat digunakan pada jenis mikroba tertentu saja (Wanto dan Arief, 1980).

Menurut Lammert (2007), pertumbuhan populasi bakteri pada media cair mendekati 10^7 sel/ml, tampak keruh pada media cair, suspensi kekeruhan pada media cair dihitung dengan metode Mc Farland yang mencapai kekeruhan 10^8 ml/sel. Pembuatan Mc Farland, bahan yang digunakan antara lain BaCl_2 (1,175% 10/v. $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dan H_2SO_4 (1% v/v). Prosedur yang dilakukan adalah sebagai berikut : ditambahkan 0,05 ml dari 0,048 M BaCl_2 (1,175% 10/v. $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) pada 99,5 ml dari 0,35 N H_2SO_4 (1% v/v) (Lorian, 1980)

Agar digunakan untuk membuat médium menjadi padat. Agar dapat larut dalam larutan dan menjadi padat pada suhu dibawah 45°C . Bahan utama yang terdapat dalam agar adalah galaktan, yaitu suatu kompleks karbohidrat yang diekstraksi dari alga marin genus *Geldium* (Hadioetomo, 1993). Meskipun agar tersebut merupakan karbohidrat, namun sebagian besar jasad renik tidak dapat menggunakannya sebagai makanan, sehingga hanya berfungsi sebagai bahan pematat (Lehninger, 1995).

3.3.6 Karakterisasi Isolat (Megiandari, 2009)

Menurut Megiandari (2009), Karakterisasi merupakan pencirian ataupun pendefinisian jenis bakteri yang sebelumnya telah diisolasi. Karakterisasi dilakukan dengan penentuan suhu, pH dan a_w sehingga setelah melewati penentuan berdasarkan 3 hal tersebut dapat diketahui berapa isolat bakteri yang

bisa tumbuh. Dalam karakterisasi isolat didapatkan isolat bakteri proteolitik yang tahan suhu tinggi, tahan pH rendah dan mampu bertahan pada a_w rendah.

3.3.6.1 Pengujian Suhu (Seeley and Vandemark, 2005)

Menurut Seeley and Vandemark, (2005), Penentuan suhu berbeda dilakukan dengan cara mengukur pertumbuhan bakteri pada berbagai suhu inkubasi, yaitu: pada kisaran 40°C dan 80°C dengan selang 10°C. Diambil bakteri pada suhu maksimum. Langkah-langkah penentuan suhu dapat dilihat pada Lampiran 8.

3.3.6.2 Pengujian pH (Hurrigan dan Margaret, 1976)

Menurut Hurrigan dan Margaret (1976), penentuan pH berbeda dilakukan dengan cara mengukur pertumbuhan bakteri pada berbagai pH. Larutan bufer yang digunakan adalah buffer fosfat pH 2, 4, 6, 8, dan 10. Diambil bakteri pada pH minimum. Langkah-langkah penentuan pH dapat dilihat pada Lampiran 9.

3.3.6.3 Pengujian a_w (Water activity) (Troller *et al.*, 1984)

Menurut Troller *et al.* (1984), Pengujian a_w dapat dilakukan menggunakan berbagai macam garam yang dilarutkan menggunakan aquadest, kemudian ditempatkan pada wadah tertutup. Untuk a_w 0,970 menggunakan K₂SO₄, untuk a_w 0,836 menggunakan KCl, untuk a_w 0,753 menggunakan NaCl, untuk a_w 0,689 menggunakan KI, dan untuk a_w 0,514 menggunakan Mg(NO₃)₂. Diambil bakteri pada a_w minimum. Langkah-langkah penentuan a_w dapat dilihat pada Lampiran 10.

3.3.7 Identifikasi Isolat (Holt *et al.*, 1994)

Identifikasi bakteri dilakukan terhadap isolat yang diperoleh dengan berpedoman pada buku Bergey's Determinative Bacteriology (Holt et al, 1994) dengan melakukan serangkaian uji morfologi dan biokimia yaitu uji pewarnaan Gram, uji motilitas, sifat aerobik dan anaerobik, kemampuan tumbuh pada suhu 5°C, 20°C, dan 30°C. Isolat bakteri yang diperoleh akan dilakukan identifikasi

yang meliputi : pengamatan morfologi koloni, pengamatan morfologi bakteri, pengujian sifat biokimia bakteri, pengujian motilitas dan penghitungan kepadatan isolat bakteri.

- **Pengamatan Morfologi Koloni (Holt et al., 1994)**

Menurut Holt et al., (1994) dalam Feliatra et al., (2004), Pengamatan morfologi koloni dilakukan pada saat isolat yang telah murni dan terpisah. Pengamatan dilakukan juga pada warna koloni, ukuran koloni, bentuk koloni yang dilihat dari dalam, samping dan atas.

- **Pengamatan Morfologi Bakteri (Holt et al., 1994)**

Menurut Holt et al., (1994) dalam Feliatra et al., (2004), morfologi bakteri diamati dengan teknik pewarnaan gram, selanjutnya diamati bentuk morfologi bakteri apakah batang (*Bacillus*), bulat (*Coccus*), atau bentuk spiral, motilitas dengan menggunakan Mikroskop Binokuler Nikon pada pembesaran 10x dan 40x.

- **Pengujian Sifat Biokimia Bakteri**

- a) **Uji Pertumbuhan Pada Berbagai Suhu (Holt et al., 1994)**

Menurut Holt et al., (1994) dalam Feliatra et al., (2004), Kisaran suhu untuk tumbuh dan pertumbuhan optimal merupakan karakteristik dari kelompok bakteri gram positif. Uji pertumbuhan bakteri gram positif dilakukan pada suhu kamar 25°C, suhu pertumbuhan optimal 37°C, 40°C dan 45°C selama 72 jam. Pengamatan pertumbuhan bakteri dilihat dengan *Optical Density* (OD)-nya pada panjang gelombang 620 nm. Langkah-langkah uji pertumbuhan pada berbagai suhu dapat dilihat pada Lampiran 11.

- b) **Uji Penggunaan Gula (TSI) (Lammert, 2007)**

Pengujian ini menggunakan medium TSIA (Triple Sugar Iron Agar), uji ini digunakan untuk membedakan antara anggota kelompok Enterobacteriaceae

dan membedakan kelompok Enterobacteriaceae dengan kelompok lainnya. Pada uji ini digunakan bakteri *Bacillus subtilis* dan *S. epidermis* dengan menggunakan medium TSIA yang mengandung tiga macam gula yaitu glukosa, laktosa, dan sukrosa. Kemudian diinkubasi selama 7x24 jam pada suhu 37°C.

H₂S diproduksi oleh beberapa jenis mikroorganisme melalui pemecahan asam amino yang mengandung unsur belerang (S) seperti lisin dan metionin. H₂S dapat juga diproduksi melalui reduksi senyawa-senyawa belerang anorganik, misalnya : tiosulfat, sulfid atau sulfat. Adanya H₂S dapat diamati dengan menambahkan garam-garam logam berat ke dalam medium. Dikatakan positif apabila H₂S bereaksi dengan senyawa-senyawa ini ditandai dengan terbentuknya logam sulfid yang berwarna hitam. Dan dikatakan negatif apabila tidak terbentuk logam sulfid yang berwarna hitam karena bakteri yang berada dalam medium tersebut tidak dapat menghidrolisis logam-logam berat yang terkandung dalam medium.

Pada percobaan ini, reaksi yang dapat timbul adalah :

- Kuning pada butt (dasar) dan merah pada slant (permukaan miring), menunjukkan adanya fermentasi glukosa.
- Kuning pada butt dan slant, menunjukkan adanya fermentasi laktosa dan/atau sukrosa.
- Pembentukan gas, yang ditandai dengan pembentukan ruang udara dibawah medium sehingga medium terangkat ke atas.
- Pembentukan gas (H₂S), terlihat dari pembentukan warna hitam pada medium.
- Merah pada butt dan slant, menunjukkan tidak adanya fermentasi gula dan pembentukan gas atau pembentukan H₂S.

Langkah-langkah uji penggunaan gula (TSIA) dapat dilihat pada Lampiran 12.

(Harley, 2002)

c) Uji *Citrate* (Lammert, 2007)

Uji sitrat merupakan salah satu pengujian dari kelompok tes IMViC. Pengujian ini digunakan untuk melihat kemampuan mikroorganisme menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Untuk uji ini digunakan medium sitrat koser (SCA) yang merupakan medium sintetik dengan Na sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon, NH_4^+ sebagai sumber N dan indikator BTB (Brom Timol Blue) yang merupakan indikator pH.

Bila mikroba mampu menggunakan sitrat, maka asam akan dihilangkan dari medium biakan, sehingga menyebabkan peningkatan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru.



(alkali), pH meningkat (indicator BTB menunjukkan warna biru) (Harley, 2002).

Langkah-langkah uji sitrat dapat dilihat pada Lampiran 13.

d) Uji *Indole* (Lammert, 2007)

Mikroorganisme menggunakan asam amino sebagai pemuka protein, komponen sel dan kadang kala sebagai sumber energi. Asam amino ini dimodifikasikan dengan berbagai cara sewaktu metabolisme. Dalam percobaan diperlihatkan berbagai cara mikroorganisme memodifikasikan asam amino. Dimana modifikasi asam amino dapat digunakan untuk pengidentifikasian untuk suatu jenis bakteri.

Asam amino triptofan merupakan komponen asam amino yang lazim terdapat pada protein, sehingga asam amino ini dengan mudah dapat digunakan oleh mikroorganisme. Dimana asam amino triptofan apabila dihidrolisis oleh enzim triptofamase akan menghasilkan indol dan asam pemuat.

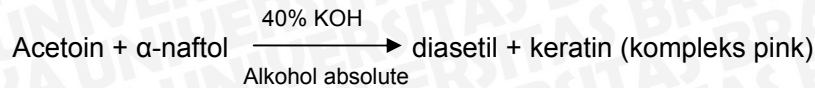
Untuk uji ini, digunakan medium cair yang kaya akan triptofan yaitu dalam bentuk tripton 1% sebagai sumber karbon. Indol yang terbentuk akan berwarna merah dengan penambahan reagen Kovach atau Erlich yang mengandung p-dimetilbenzaldehyd. Dikatakan positif apabila senyawa ini menghasilkan senyawa para amino benzaldehyd yang tidak larut dalam air dan membentuk warna merah pada permukaan medium (Harley, 2002). Langkah-langkah uji indole dapat dilihat pada Lampiran 14.

e) Uji Voges-Proskauer (VP) (Lammert, 2007)

Uji Voges-Proskauer digunakan untuk mengidentifikasi mikroorganisme yang melakukan fermentase dengan hasil akhir 2,3 butanadiol. Bila bakteri memfermentasikan karbohidrat menjadi 2,3 butanadiol sebagai produk utama, akan terjadi penumpukan bahan tersebut dalam media pertumbuhan. Pada uji VP ini dilakukan penambahan 40% KOH dan 5% larutan alfa naftol pada saat pengamatan. Hal ini dapat menentukan adanya asetoin (asetil metal karbinol), suatu senyawa pemula dalam sintesis 2,3 butanadiol.

Dengan adanya penambahan KOH 40 %, keberadaan setoin ditunjukkan dengan perubahan warna medium menjadi merah, dan perubahan ini makin jelas dengan penambahan alfa naftol beberapa tetes. Uji VP ini sebenarnya merupakan uji tidak langsung untuk mengetahui adanya 2,3 butanadiol. Karena uji ini lebih dulu menentukan asetoin, dan seperti yang kita ketahui bahwa asetoin adalah senyawa pemula dalam sintesis 2,3 butanadiol, sehingga dapat dipastikan bahwa dengan adanya asetoin dalam media berarti menunjukkan adanya produk 2,3 butanadiol sebagai hasil fermentasi (Harley ,2002). Langkah-langkah uji VP dapat dilihat pada Lampiran 15.

Mekanisme terjadinya reaksi pada Uji Voges-Proskauer dapat digambarkan sebagai berikut :

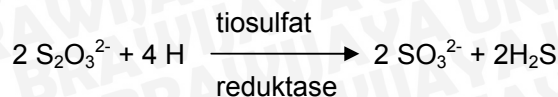


f) Uji Motilitas (Lammert, 2007)

Menurut Harley (2002), Motilitas adalah salah satu dari ciri makhluk hidup, begitu pula dengan mikroorganisme, namun alat geraknya masih sederhana berupa flagella atau cilia. Bakteri melakukan motilitas dengan menggunakan energi yang diperoleh dari ATP yang diuraikan oleh koenzim ATP-ase membentuk fosfo anorganik. Beberapa protein kaya akan asam amino yang mengandung gugus sulfur seperti sistein. Jika protein ini dihidrolisis oleh bakteri, asam amino akan dilepaskan. Sistein dengan adanya sistein desulfurase, akan melepaskan atom sulfur yang dengan adanya hydrogen dari air akan membentuk gas hydrogen sulfide. gas ini juga dapat diproduksi dengan reduksi senyawa anorganik yang mengandung sulfur seperti tiosulfat, sulfat atau sulfid.

Pada percobaan ini, sebagai petunjuk adanya aktivitas motilitas ini dapat diamati daerah bekas tusukan dari medium yang telah diinokulasikan oleh biakan dan diinkubasikan. Medium ini ditambahkan senyawa anorganik yang mengandung sulfur, yaitu natrium tiosulfat. Natrium tiosulfat ini akan bereaksi dengan ion hidrogen dari air, dan dengan adanya enzim tiosulfat reduktase, maka akan dihasilkan ion sulfid dan gas H₂S. Gas ini akan bereaksi dengan feri ammonium sulfat yang ditambahkan (sebagai indikator untuk H₂S) ke dalam media sehingga terbentuk FeS yang berwarna hitam. Pembentukan FeS inilah yang diamati sebagai petunjuk adanya aktivitas motil dari bakteri uji pada tabung yang berisi medium motility setelah diinkubasikan. Langkah-langkah uji motilitas dapat dilihat pada Lampiran 16.

Berikut ini adalah mekanisme reaksi yang terjadi pada uji motilitas :





g) Uji Hidrolisis Zat Tepung (Lammert, 2007)

Menurut John (2007), Zat tepung dalam sebuah media dideteksi dengan menambahkan iodine (larutan iodine). Ketika iodine bereaksi dengan zat tepung, akan muncul warna ungu kehitaman. Jika bakteri tumbuh pada agar (zat tepung yang memproduksi amilase), semua zat tepung sekitar pertumbuhan akan dikonsumsi setelah inkubasi. Ketika iodine ditambahkan, tidak adanya perubahan warna berarti bahwa tidak ada lagi zat tepung. Ini adalah tes yang positif untuk hidrolisis zat tepung. Langkah-langkah uji hidrolisis zat tepung dapat dilihat pada Lampiran 17.

h) Uji Hidrolisis Kasein (Lammert, 2007)

Kasein, merupakan protein utama dalam susu, dapat digunakan sebagai substrat untuk melakukan produksi proteinase (protease) oleh bakteri tertentu. Ketika bakteri mensekresikan kaseinase (protease tertentu), molekul kasein dicerna dan daerah sekitar pertumbuhan bakteri menjadi bersih. Zona bersih ini adalah tes yang positif. Jika bakteri tidak mensekresikan kaseinase, media akan menyisakan warna putih disekitar pertumbuhan bakteri (Lammert, 2007). Langkah-langkah uji hidrolisis kasein dapat dilihat pada Lampiran 18.

i) Uji Beta-Hemolisa (Cappuccino dan Sherman, 2008)

Lysis dari sel darah merah dengan destruksi sempurna dan penggunaan hemoglobin oleh organisme menghasilkan zona yang bersih di sekeliling koloni. Hemolysis ini diproduksi oleh 2 tipe beta-hemolisa yang dinamakan streptolysin O, sebuah antigenik, enzim oksigen yang labil, dan streptolysin S, sebuah non

antigenik, lysin oksigen yang stabil. Reaks hemolytic diperjelas ketika pelat agar darah dicoret dan secara simultan ditusuk untuk menunjukkan bagian permukaan hemolysis oleh streptolysin O dalam suatu lingkungan dengan tensi oksigen yang terduks. Langkah-langkah uji beta-hemolisa dapat dilihat pada Lampiran 19.

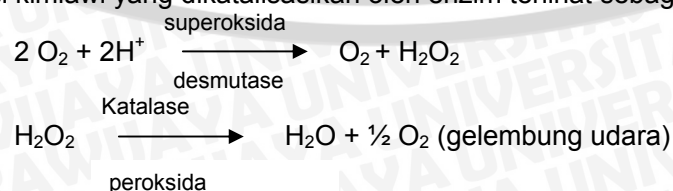
j) Uji Katalase (Lammert, 2007)

Beberapa bakteri yang memiliki flavoprotein dapat mereduksi O_2 dengan menghasilkan hidrogen peroksida (H_2O_2) atau superoksida (O_2^-). Kedua bahan ini merupakan bahan yang toksik dan menghancurkan komponen sel dengan sangat cepat. Bakteri harus dapat mempertahankan diri seperti dengan produksi O_2 atau akan terbunuh. Beberapa bakteri dapat memproduksi enzim yang dapat mengkatalisis superoksids yaitu peroksida dismutase, dan juga katalase atau peroksidase yang dapat mendekstruksi hidrogen peroksida.

Katalase adalah enzim yang mengkatalisasikan penguraian hydrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air dan O_2 . Hidrogen peroksida terbentuk sewaktu metabolisme aerob, sehingga mikroorganisme yang tumbuh dalam lingkungan aerob dapat menguarikan zat toksik tersebut.

Uji katalase ini dilakukan untuk mengidentifikasi kelompok bakteri bentuk kokkus, dalam membedakan Staphylococcus dan Streptococcus. Dimana kelompok streptococcus bersifat katalase negatif dan Staphylococcus bersifat katalase positif. Penentuan adanya katalase ini terlihat dari pembentukan gelembung udara di sekitar koloni setelah ditambahkan larutan H_2O_2 3% (Harley, 2002). Langkah-langkah uji katalase dapat dilihat pada Lampiran 20.

Reaksi kimiawi yang dikatalisasikan oleh enzim terlihat sebagai berikut :

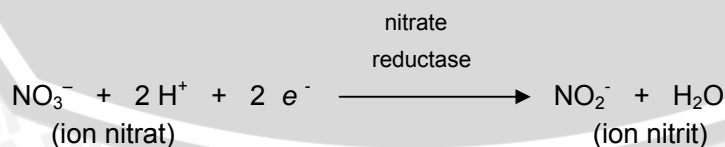


k) Uji Oksidase (Lammert, 2007)

Uji oksidase bertujuan untuk menentukan apakah bakteri memiliki cytochrome oksidase, bagian dalam elektron transport selama respirasi. Molekul elektron transport dalam membran plasma bakteri menggunakan energi dalam elektron yang dipindah dari molekul makanan untuk menciptakan kekuatan gerak proton menjadi membran. Energi ini kemudian diubah menjadi bentuk yang dapat digunakan sel untuk bekerja. Pada akhir elektron transport, cytochrome (C) oxydase mengumpulkan elektron-elektron dan memudahkan penambahannya terhadap molekul O_2 dan dengan H^+ untuk membentuk H_2O . Beberapa bakteri menggunakan cytochrome oxydase untuk menambahkan elektron-elektron terhadap nitrat dimana O_2 tidak tersedia (reduksi nitrat). Tidak semua bakteri yang dapat tumbuh dalam O_2 memiliki cytochrome oxydase. Ketika cytochrome oxydase menambahkan elektron terhadap pereaktan oxydase, bentuk yang telah tereduksi berubah dari biru tua menjadi ungu dalam beberapa detik (Lammert, 2007). Langkah-langkah uji oksidase dapat dilihat pada Lampiran 21.

l) Uji Reduksi Nitrat (Lammert, 2007)

Menurut Lammert (2007), Uji nitrat bertujuan untuk menentukan apakah bakteri dapat mereduksi ion nitrat menjadi ion nitrit atau gas nitrogen. Dalam respirasi anaerobik, bakteri menambahkan elektron yang telah melewati rantai elektron transport terhadap substansi inorganik yang bukan oksigen. salah satu aseptor akhir elektron adalah ion nitrat. Enzim kompleks nitrat reduktase memudahkan reduksi ion nitrat. Untuk beberapa bakteri yang melakukan ini ion nitrat direduksi menjadi ion nitrit :



Langkah-langkah uji reduksi nitrat dapat dilihat pada Lampiran 22.

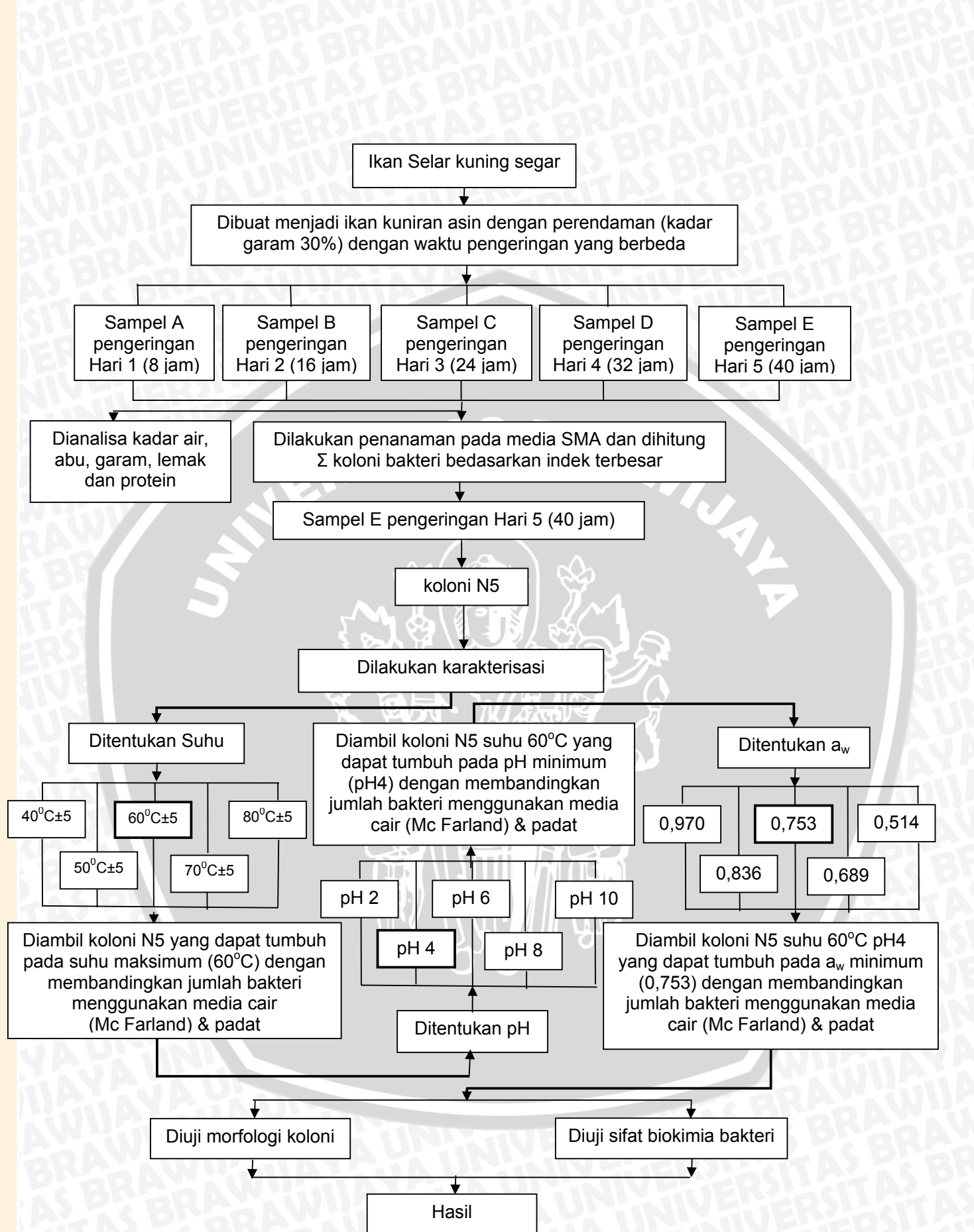
m) Uji Reduksi Methylene Blue (Lammert, 2007)

Tujuan dari uji reduksi methylene blue adalah untuk mengisolasi dan membedakan gram negatif enteric bacillus. Agar EMB (eosin methylene blue) mengandung bahan eosin, methylene, gula laktosa dan sukrosa. Agar EMB adalah media yang selektif karena bahan-bahannya akan menghambat pertumbuhan banyak bakteri gram-positif. Media ini digunakan secara utama untuk identifikasi pendahuluan mengenai enteric bacilli yaitu bakteri yang menghambat dan mempengaruhi jalur intestinal. Agar EMB adalah medium yang membedakan antara bakteri yang memfermentasi laktosa dan atau sukrosa serta bakteri yang tidak demikian (John, 2007). Langkah-langkah uji reduksi methylene blue dapat dilihat pada Lampiran 23.

3.3.8 Pembuatan Kultur Stok isolat (Fatimah, 2005)

Menurut Fatimah (2005), Isolat bakteri proteolitik yang didapatkan pada tiap tahap isolasi, karakteristik dan identifikasi isolat yang telah murni dikulturkan pada media Nutrien Agar (NA) miring dan disimpan dalam refrigerator -20°C . Peremajaan isolat dilakukan secara rutin tiap 2 minggu. Langkah-langkah untuk pembuatan kultur stok isolat dapat dilihat pada Lampiran 24.

Langkah-langkah prosedur penelitian karakteristik bakteri proteolitik pada ikan selar asin dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Prosedur Penelitian

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Analisa Proksimat

Hasil analisa proksimat ikan selar asin dapat dilihat pada Tabel 2. Dalam tabel tersebut terdapat 5 analisa proksimat ikan selar asin yaitu analisa kadar air, kadar abu, kadar lemak, kadar protein dan kadar garam. Kelima analisa proksimat tersebut dilakukan dengan lama pengeringan yang berbeda yaitu hari pertama, hari kedua, hari ketiga, hari keempat dan hari kelima. Analisa proksimat dilakukan untuk mengetahui kandungan gizi ikan selar asin. Komposisi kimia daging ikan dipengaruhi oleh faktor yang berasal dari ikan itu sendiri dan yang berasal dari luar. Faktor dari ikan meliputi jenis dan golongan ikan, jenis kelamin serta sifat warisan; sedangkan faktor yang berasal dari luar antara lain daerah kehidupan ikan, musim dan jenis makanan yang tersedia (Hadiwiyoto 1993). Dan untuk mengetahui kondisi sampel atau lingkungan pertumbuhan bakteri. Pada penelitian ini dipilih ikan selar kuning karena ikan ini termasuk jenis ikan yang selalu ada tiap musim dan harganya relatif murah.

Tabel 2. Analisa proksimat ikan selar asin

No	Parameter	Hari ke-				
		1	2	3	4	5
1.	Kadar air (%)	54.12±0.42	34.63±0.82	29.60±0.53	25.38±0.41	19.57±0.39
2.	Kadar abu (%)	18.11±0.37	23.77±0.36	25.46±0.49	28.15±0.35	34.66±0.48
3.	Kadar lemak (%)	9.48±0.30	8.50±0.29	7.83±0.34	4.69±0.47	4.54±0.31
4.	Kadar protein (%)	10.86±0.37	10.36±0.46	10.20±0.43	9.77±0.48	9.57±0.35
5.	Kadar garam (%)	11.34±0.41	11.92±0.38	12.34±0.36	12.54±0.49	12.83±0.39

4.1.1 Kadar Air

Tabel 3. Data Hasil Analisa Kadar Air Sampel Ikan Selar Asin

Sampel Hari ke-	Kadar Air (%)			Rata-rata
	1	2	3	
1	54.16	54.05	54.83	54.35±0.42
2	35.58	34.22	34.08	34.63±0.82
3	29.53	30.17	29.11	29.60±0.53
4	25.42	24.95	25.77	25.38±0.41
5	19.12	19.89	19.69	19.57±0.39

Dari hasil penelitian, kadar air yang didapat berkisar antara 54.35% - 19.69%. Hasil kadar air tertinggi terdapat pada hari ke-1 yaitu sebesar 54.35% dan yang terendah terdapat pada hari ke-5 yaitu sebesar 19.69%. Kadar air tersebut semakin rendah dengan semakin bertambahnya lama proses pengasinan yang diberikan. Hasil analisa kadar air dapat dilihat pada Tabel 3.

Berkurangnya kadar air ini dapat dikarenakan keluarnya air dalam bahan yang disebabkan oleh penguapan atau perbedaan tekanan osmosis karena adanya garam di dalam bahan. Menurut Hadiwiyoto (1993), Garam paling banyak digunakan untuk mengawetkan hasil perikanan karena dapat menyebabkan berkurangnya jumlah air dalam daging dan protein mikrobia terdenaturasi, menyebabkan sel-sel mikrobia menjadi lisis karena perubahan tekanan osmosa dan mempunyai daya toksisitas yang tinggi pada mikrobia.

4.1.2 Kadar Abu

Tabel 4. Data Hasil Analisa Kadar Abu Sampel Ikan Selar Asin

Sampel Hari ke-	Kadar Abu (%)			Rata-rata
	1	2	3	
1	18.13	17.73	18.47	18.11±0.37
2	23.68	24.17	23.46	23.77±0.36
3	25.91	24.93	25.53	25.46±0.49
4	27.76	28.43	28.25	28.15±0.35
5	35.13	34.17	34.67	34.66±0.48

Dari hasil penelitian, kadar abu yang didapat berkisar antara 18.11% - 34.66%. Hasil kadar abu tertinggi terdapat pada hari ke-5 yaitu sebesar 34.66% dan yang terendah terdapat pada hari ke-1 yaitu sebesar 18.11%. Dengan semakin lamanya proses pengasinan maka kadar abu semakin tinggi. Hasil analisa kadar abu dapat dilihat pada Tabel 4.

Kadar abu semakin tinggi dengan semakin lamanya proses pengasinan. Penentuan kadar abu bertujuan untuk menentukan mineral suatu bahan (Sudarmadji *et al.*, 1996). Mineral yang terdapat pada ikan selar asin dapat berasal dari pemberian garam yang dilakukan. Meningkatnya kadar abu didukung dengan data kadar garam yang semakin meningkat seiring dengan semakin lamanya proses pengeringan.

4.1.3 Kadar Lemak

Tabel 5. Data Hasil Analisa Kadar Lemak Sampel Ikan Selar Asin

Sampel Hari ke-	Kadar Lemak (%)			
	1	2	3	Rata-rata
1	9.74	9.14	9.56	9.48±0.30
2	8.59	8.17	8.73	8.50±0.29
3	8.16	7.49	7.83	7.83±0.34
4	5.16	4.22	4.69	4.69±0.47
5	4.82	4.59	4.21	4.54±0.31

Lemak merupakan salah satu unsur yang penting dalam pangan yang berfungsi sebagai sumber energi. Selain itu lemak dan minyak merupakan zat makanan yang penting untuk menjaga kesehatan tubuh manusia (Winarno 1997). Hasil analisa kadar lemak dapat dilihat pada Tabel 5.

Dari hasil penelitian, kadar lemak yang didapat berkisar antara 9.48% - 4.54%. Hasil kadar lemak tertinggi terdapat pada hari ke-1 yaitu sebesar 9.48% dan yang terendah terdapat pada hari ke-5 yaitu sebesar 4.54%. Kadar lemak

tersebut semakin rendah dengan semakin bertambahnya lama proses pengasinan yang diberikan.

4.1.4 Kadar Protein

Tabel 6. Data Hasil Analisa Kadar Protein Sampel Ikan Selar Asin

Sampel Hari ke-	Kadar Protein (%)			Rata-rata
	1	2	3	
1	11.18	10,94	10.46	10.86±0.37
2	10.84	10,32	9.92	10.36±0.46
3	10.68	10,04	9.87	10.20±0.43
4	9.25	9,85	10.20	9.77±0.48
5	9.38	9,55	9.77	9.57±0.35

Protein adalah makromolekul yang paling berlimpah di dalam sel hidup dan merupakan 50 % atau lebih berat kering sel (Lehninger 1990). Protein tersusun atas unsur C, H, O, dan N. Molekul protein juga mengandung unsur fosfor, belerang, dan ada dua jenis protein tertentu yang mengandung unsur logam seperti besi dan tembaga (Winarno 1997). Hasil analisa kadar protein dapat dilihat pada Tabel 6.

Dari hasil penelitian, kadar protein yang didapat berkisar antara 10.86% - 9.57%. Hasil kadar protein tertinggi terdapat pada hari ke-1 yaitu sebesar 10.86% dan yang terendah terdapat pada hari ke-5 yaitu sebesar 9.57%. Kadar protein tersebut semakin rendah dengan semakin bertambahnya lama proses pengasinan yang diberikan.

4.1.5 Kadar Garam

Tabel 7. Data Hasil Analisa Kadar Garam Sampel Ikan Selar Asin

Sampel Hari ke-	Kadar Garam (%)			Rata-rata
	1	2	3	
1	10.96	11.28	11.78	11.34±0.41
2	11.95	12.28	11.52	11.92±0.38
3	11.94	12.63	12.44	12.34±0.36
4	11.98	12.73	12.90	12.54±0.49
5	13.25	12.76	12.48	12.83±0.39

Dari hasil penelitian, kadar garam yang didapat berkisar antara 11.34% - 12.83%. Hasil kadar garam tertinggi terdapat pada hari ke-5 yaitu sebesar 12.83% dan yang terendah terdapat pada hari ke-1 yaitu sebesar 11.34%. Dengan semakin lamanya proses pengasinan maka kadar garam semakin tinggi. Hasil analisa kadar garam dapat dilihat pada Tabel 7.

Kadar garam semakin tinggi dikarenakan adanya penetrasi garam ke dalam tubuh daging. Menurut Adawyah (2007), selama proses penggaraman berlangsung terjadi penetrasi garam ke dalam tubuh ikan dan keluarnya cairan dari tubuh ikan karena adanya perbedaan konsentrasi. Cairan tersebut dengan cepat akan melarutkan Kristal garam atau mengencerkan larutan garam. Bersamaan dengan keluarnya cairan dari dalam tubuh ikan, partikel garam pun masuk ke dalam tubuh ikan.

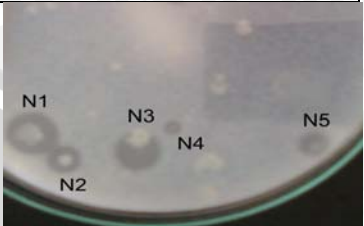
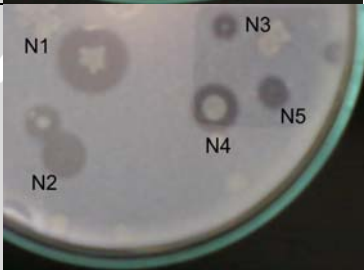
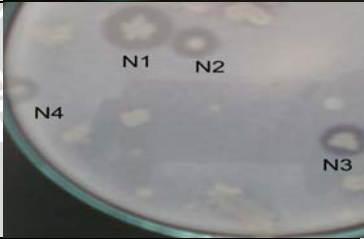
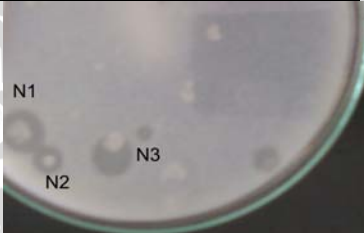

4.2 Hasil Isolasi bakteri

Dari hasil penelitian, jumlah koloni terbanyak yang didapat pada hari ke-1 sampai hari ke-5 adalah pada hari ke-1 dan ke-2 sebanyak 5 koloni dengan indeks zona bening pada hari ke1 yaitu N1 – 2.189; N2 – 2.516; N3 – 4.444; N4 – 11.25; N5 – 20.78. Pada hari ke2 indeks zona beningnya adalah N1 – 8; N2 – 19.25; N3 – 35; N4 – 1.25; N5 – 63. Dan yang paling sedikit pada hari ke-5 hanya didapat 1 koloni dengan indeks zona beningnya adalah 0.291. Zona bening merupakan salah satu metode untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghidrolisis protein dengan memproduksi enzim protease sebagai produk ekstraseluler. Dekomposisi protein oleh mikroorganisme lebih kompleks dari pada pemecahan karbohidrat dan produk akhirnya juga lebih bervariasi (Olajuyigbe, *et al.*, 2005). Media isolasi dan seleksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah skim milk agar (SMA). Menurut Fardiaz, (1993), Skim Milk Agar adalah dengan mencampurkan Nutrient Agar atau medium lainnya yang

tidak mengandung karbohidrat dengan konsentrasi dua kali lipat (*double strength*) pada suhu 50-55°C, dengan susu skim steril pada suhu 50°C dalam jumlah sama. pertumbuhan koloni mikroba yang memecah protein (bersifat proteolitik) pada Skim Milk Agar akan dikelilingi oleh areal bening. Bakteri yang tergolong proteolitik adalah bakteri yang mengandung atau memproduksi enzim proteinase ekstraseluler yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian di lepaskan keluar dari sel. Hasil isolasi bakteri proteolitik dapat dilihat pada Tabel 8.

Isolat bakteri proteolitik yang tumbuh kemudian dilakukan penelitian lanjutan yaitu uji karakteristik yang meliputi uji suhu, uji pH, uji a_w dan uji identifikasi bakteri proteolitik. Pengujian karakteristik dan identifikasi bakteri proteolitik menggunakan isolat pada pengeringan paling lama yaitu pada hari kelima yang hanya didapat 1 koloni dengan indeks zona beningnya adalah 0.291. Uji karakteristik bakteri proteolitik menggunakan media cair yaitu nutrient broth. Menggunakan isolat pada pengeringan yang paling lama karena memiliki kadar air paling rendah yaitu 19.57%, memiliki kadar abu paling tinggi yaitu 34.66%, memiliki kadar lemak paling rendah yaitu 4.54%, memiliki kadar protein paling rendah yaitu 9.57% dan memiliki kadar garam paling tinggi yaitu 12.83%.

Tabel 8. Data Hasil Isolasi Sampel Ikan Selar Asin

Sampel Hari ke-	Isolat	Lt	Lk	Lz	Indeks	Gambar
1	N1.1	4.906	1.539	3.368	2.189	
	N1.2	1.766	0.502	1.264	2.516	
	N1.3	3.462	0.636	2.826	4.444	
	N1.4	0.385	0.031	0.353	11.25	
	N1.5	1.539	0.701	1.468	20.78	
2	N2.1	2.543	0.283	2.261	8	
	N2.2	0.636	0.031	0.604	19.25	
	N2.3	0.283	0.008	0.275	35	
	N2.4	1.130	0.502	0.628	1.25	
	N2.5	0.502	0.008	0.494	63	
3	N3.1	1.766	0.950	0.816	0.859	
	N3.2	0.785	0.196	0.589	3	
	N3.3	0.950	0.636	0.314	0.494	
	N3.4	0.283	0.071	0.212	3	
4	N4.1	1.130	0.385	0.746	1.939	
	N4.2	0.385	0.031	0.353	11.25	
	N4.3	0.950	0.071	0.879	12.44	
5	N5	19.63	15.20	4.427	0.291	

4.3 Karakterisasi Isolat

Dalam penelitian ini karakterisasi dilakukan dengan penentuan suhu, pH dan aw sehingga setelah melewati penentuan berdasarkan 3 hal tersebut dapat diketahui berapa isolat bakteri yang bisa tumbuh. Dalam karakterisasi isolat didapatkan isolat bakteri proteolitik yang tahan suhu tinggi, tahan pH rendah dan mampu bertahan pada aw rendah. Media yang digunakan dalam karakterisasi isolat adalah menggunakan media cair yaitu nutrient broth. Menurut Cappuccino (2008), nutrient broth merupakan media kompleks dasar yang disiapkan dengan mencampurkan bahan-bahan berikut per 1000 ml air suling yaitu pepton 5.0g dan ekstrak sapi 3.0g. Pepton, protein semidigested adalah sumber nitrogen utama. Ekstrak sapi adalah sumber karbon organik, nitrogen, vitamin, dan garam inorganik.

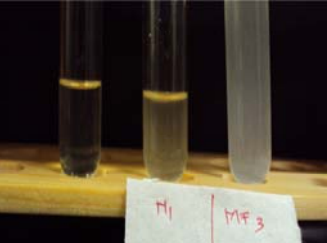
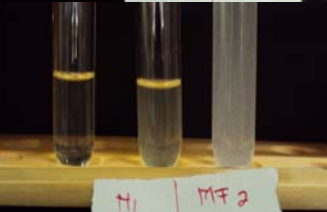
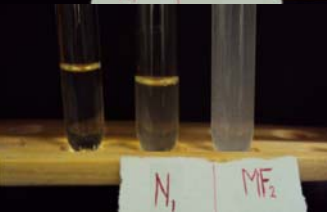


4.3.1 Uji Karakteristik Isolat Berdasarkan Suhu

Hasil pengujian karakteristik isolat berdasarkan suhu dilakukan terhadap 1 isolat bakteri N5 yang tumbuh dibandingkan dengan metode Mc Farland yang kemudian ditumbuhkan ke dalam media padat untuk mengetahui jumlah isolat yang tumbuh. Menggunakan pembanding Mc Farland adalah hanya untuk menduga jumlah bakteri yang tumbuh berdasarkan tingkat kekeruhannya. Dan untuk menghitung jumlah bakteri yang tumbuh adalah dengan menumbuhkan pada media padat. Uji kakarakteristik isolat berdasarkan suhu dilakukan dengan tingkatan suhu yang berbeda yaitu suhu 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C. Dari hasil penelitian pada suhu yang berbeda didapat hasil yaitu pada suhu 40°C diduga jumlah isolat N5 yang tumbuh dibandingkan dengan tingkat kekeruhan Mc Farland yaitu sebesar MF 3 (9.10^8 sel/ml) dan jumlah isolat yang tumbuh pada media padat sekitar 9 koloni. Pada suhu 50°C diduga jumlah isolat N5 yang

tumbuh dibandingkan dengan tingkat kekeruhan Mc Farland yaitu sebesar MF 2 (6.10^8 sel/ml) dan jumlah isolat yang tumbuh pada media padat sekitar 5 koloni. Pada suhu 60°C diduga jumlah isolat N5 yang tumbuh dibandingkan dengan tingkat kekeruhan Mc Farland yaitu sebesar MF 2 (6.10^8 sel/ml) dan jumlah isolat yang tumbuh pada media padat sekitar 5 koloni. Sedangkan pada suhu 70°C dan 80°C tingkat kekeruhan Mc Farland-nya adalah bening atau tidak tumbuh. Isolat N5 tumbuh pada suhu 40°C , 50°C , dan 60°C menandakan bahwa isolat N5 termasuk dalam kondisi fakultatif termofil. Menurut Sherman (2008), termofil merupakan spesies bakteri yang akan tumbuh pada suhu 35°C dan di atasnya. Termofil dibagi menjadi 2 kelompok yaitu a).Fakultatif termofil : organisme yang akan tumbuh pada suhu 37°C dengan suhu optimum pertumbuhan 45°C hingga 60°C . b).Obligate termofil : organisme yang akan tumbuh hanya pada suhu di atas 50°C dengan suhu optimum pertumbuhan di atas 60°C .

Kemudian dipilih isolat N5 pada suhu 60°C untuk diuji karakteristik isolat berdasarkan pH. Gambar isolat N5 pada suhu 60°C yang ditumbuhkan pada media padat dapat dilihat pada Gambar 3. Hasil uji karakteristik isolat N5 berdasarkan suhu dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Data Hasil Pengujian Karakteristik Isolat Berdasarkan Suhu

Suhu	Isolat	Kekeruhan Mc Farland (MF)	Gambar
40°C	N5	MF 3 (9.10^8 sel/ml)	
50°C	N5	MF 2 (6.10^8 sel/ml)	
60°C	N5	MF 2 (6.10^8 sel/ml)	
70°C	N5	Bening / tidak tumbuh	
80°C	N5	Bening / tidak tumbuh	




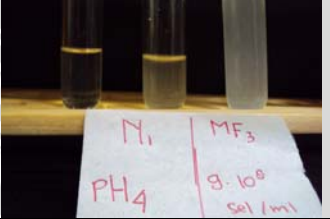
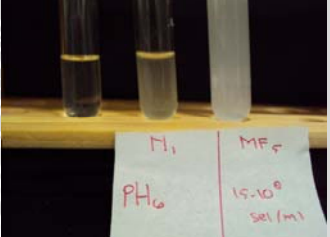

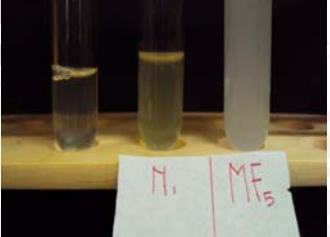
Gambar 3. Isolat N5 suhu 60°C

4.3.2 Uji Karakteristik Isolat Berdasarkan pH

Hasil pengujian karakteristik isolat berdasarkan pH dilakukan pada isolat bakteri N5 pada suhu 60°C yang tumbuh dibandingkan dengan metode Mc Farland yang kemudian ditumbuhkan ke dalam media padat untuk mengetahui jumlah isolat yang tumbuh. Uji karakteristik berdasarkan pH dilakukan dengan pH yang berbeda yaitu pH 2, 4, 6, 8 dan 10. Dari hasil penelitian menggunakan pH yang berbeda di dapat hasil yaitu pada pH 2 tingkat kekeruhannya adalah bening atau tidak tumbuh. Pada pH 4 diduga jumlah isolat N5 yang tumbuh dibandingkan dengan tingkat kekeruhan Mc Farland yaitu sebesar MF 3 ($9 \cdot 10^8$ sel/ml) dan jumlah isolat yang tumbuh pada media padat sekitar 6 koloni. Pada pH 6, 8 dan 10 diduga jumlah isolat N5 yang tumbuh dibandingkan dengan tingkat kekeruhan Mc Farland yaitu sebesar MF 5 ($15 \cdot 10^8$ sel/ml) dan jumlah isolat yang tumbuh pada media padat sekitar 15, 13 dan 11. Menurut Cappuccino (2008), walau terdapat keberagaman dan kenyataan bahwa organisme tertentu dapat tumbuh pada skala pH yang ekstrem, dapat dibuat garis besar. Rentang spesifik untuk bakteri adalah antara 4 hingga 9 dengan optimum antara 6,5 hingga 7,5. Jamur (jamur dan ragi) lebih menyukai lingkungan yang asam dengan aktifitas optimum pada pH 4 hingga 6. Karena lingkungan netral atau hampir netral secara umum bermanfaat bagi pertumbuhan mikroorganisme, pH media laboratorium seringkali disesuaikan kira-kira 7.

Kemudian dipilih isolat N5 suhu 60°C pada pH 4 untuk uji karakteristik berdasarkan a_w . Gambar isolat N5 suhu 60°C pada pH 4 yang ditumbuhkan pada media padat dapat dilihat pada Gambar 4. Hasil uji karakteristik isolat berdasarkan pH dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Data Hasil Pengujian Karakteristik Isolat Berdasarkan pH

pH	Isolat	Kekeruhan Mc Farland (MF)	Gambar
2	N5 suhu 60°C	Bening / tidak tumbuh	
4	N5 suhu 60°C	MF 3 ($9 \cdot 10^8$ sel/ml)	
6	N5 suhu 60°C	MF 5 ($15 \cdot 10^8$ sel/ml)	
8	N5 suhu 60°C	MF 5 ($15 \cdot 10^8$ sel/ml)	
10	N5 suhu 60°C	MF 5 ($15 \cdot 10^8$ sel/ml)	







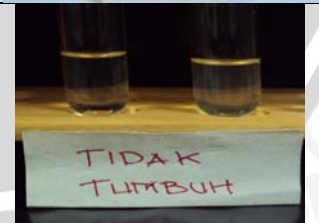
Gambar 4. Isolat N5 suhu 60°C pada pH 4

4.3.3 Uji Karakteristik Isolat Berdasarkan a_w

Hasil pengujian karakteristik isolat berdasarkan a_w dilakukan pada isolat bakteri N1 suhu 60°C pH 4 yang tumbuh dibandingkan dengan metode Mc Farland yang kemudian ditumbuhkan ke dalam media padat untuk mengetahui jumlah isolat yang tumbuh. Uji karakteristik berdasarkan a_w dilakukan dengan a_w yang berbeda yaitu 0.970, 0.836, 0.753, 0.689, 0.514. Dari hasil penelitian pada a_w yang berbeda didapat hasil yaitu pada a_w 0.970 dan a_w 0.836 diduga jumlah isolat N1 yang tumbuh dibandingkan dengan tingkat kekeruhan Mc Farland yaitu sebesar MF 5 ($15 \cdot 10^8$ sel/ml) dan jumlah isolat yang tumbuh pada media padat sekitar 14 dan 17 koloni. Pada a_w 0.753 diduga jumlah isolat N5 yang tumbuh dibandingkan dengan tingkat kekeruhan Mc Farland yaitu sebesar MF 4 ($12 \cdot 10^8$ sel/ml) dan jumlah isolat yang tumbuh pada media padat sekitar 7 koloni. Pada a_w 0.689 dan a_w 0.514 tingkat kekeruhannya adalah bening atau tidak tumbuh. Mikroorganisme umumnya tumbuh baik pada a_w 0,90-0,999, sementara itu sebagian besar bakteri akan berhenti pertumbuhannya pada $a_w < 0,900$. Tetapi, bakteri halofilik (tahan garam) tidak dapat tumbuh dalam media tanpa garam dan harus mempunyai syarat yaitu banyak mengandung garam (NaCl) (Gibs and Gekas, 2009). Kemudian dipilih isolat N5 suhu 60°C pH 4 pada a_w 0.753 untuk dilanjutkan ke uji identifikasi bakteri proteolitik. Gambar isolat N5 suhu 60°C pH 4

pada a_w 0,753 yang ditumbuhkan pada media padat dapat dilihat pada Gambar 5. Hasil uji karakteristik isolat berdasarkan a_w dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Data Hasil Pengujian Karakteristik Isolat Berdasarkan a_w

a_w	Isolat	Kekeruhan Mc Farland (MF)	Gambar
0,973	N5 suhu 60°C pH 4	MF 5 ($15 \cdot 10^8$ sel/ml)	
0,843	N5 suhu 60°C pH 4	MF 5 ($15 \cdot 10^8$ sel/ml)	
0,753	N5 suhu 60°C pH 4	MF 4 ($12 \cdot 10^8$ sel/ml)	
0,689	N5 suhu 60°C pH 4	Bening / tidak tumbuh	
0,514	N5 suhu 60°C pH 4	Bening / tidak tumbuh	



Gambar 5. Isolat N5 suhu 60°C pH 4 pada a_w 0,753

4.4 Hasil Identifikasi Isolat Morfologi Koloni

Isolat yang terpilih diidentifikasi berdasarkan morfologi koloni, isolat N5 pada suhu 60°C, pH 4 dan a_w 0.753 ditumbuhkan dalam medium padat untuk melihat morfologi koloni. Isolat yang terpilih berbentuk bulat, tepi tidak rata, elevasi cembung, berwarna putih dan merupakan gram positif. Menurut Benson (2002), pengamatan morfologi koloni meliputi bentuk, tepi, elevasi, dan warna koloni. Penggolongan karakterisasi morfologi berdasarkan bentuk, tepi, elevasi dan warna koloni merupakan salah satu tahapan yang sangat diperlukan dalam menentukan jenis suatu bakteri. Pengamatan morfologi bakteri dilakukan dengan teknik pewarnaan gram yang ditentukan oleh komposisi dari dinding sel. Pewarnaan gram bertujuan untuk mengelompokkan bakteri menjadi dua, yaitu bakteri gram positif dan gram negatif berdasarkan reaksi atau sifat bakteri terhadap cat tersebut. Prinsip dasar pewarnaan gram ini adalah mewarnai bakteri dengan pewarnaan dasar, yaitu Kristal violet; menguatkan pelekatan zat pewarna dengan garam iodine; melunturkan warna dasar dengan alcohol; pewarnaan kembali dengan pewarna pembanding (counter stain) yaitu safranin (Anonymous, 2007). Hasil identifikasi morfologi koloni yang diisolasi dari ikan selar asin pada suhu 60°C, pH 4 dan a_w 0.753 dapat dilihat pada Tabel 12.

Tabel 12. Identifikasi Morfologi Koloni

Isolat	Identifikasi Morfologi Koloni				
	Bentuk	Tepi	Elevasi	Warna	Gram
N5 pada suhu 60°C, pH 4 dan a_w 0,753	Bulat	Tidak Rata	Cembung	Putih	Positif

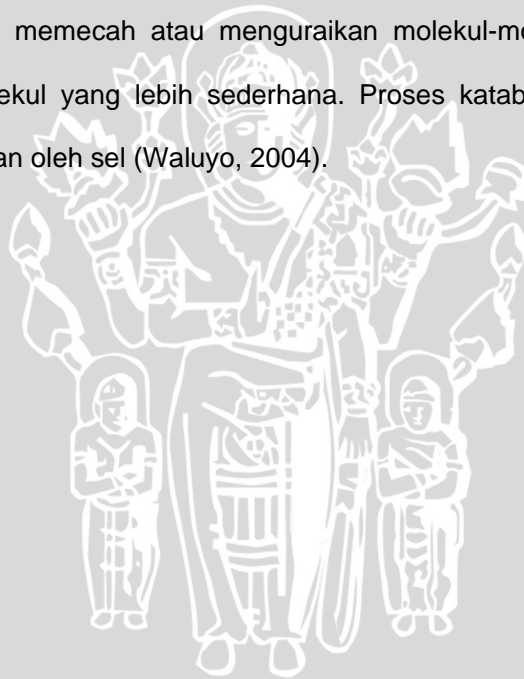
Menurut Lay (1984); Leatherwood *et al.* (1999) dan Delalibera *et al.* (2005), karakteristik bakteri gram positif sebagian besar dinding sel bakterinya terdiri dari peptidoglikan yang terdiri dari 30 lapisan. Permeabilitas dinding sel kurang dan kompleks kristal yodium tidak dapat keluar dan bakteri akan tetap berwarna ungu. Sedangkan bakteri gram negatif mempunyai lapisan peptidoglikan yang tipis, hanya 1 - 2 lapisan dan susunan dinding selnya tidak kompak. Permeabilitas dinding sel lebih besar sehingga memungkinkan terlepasnya kompleks kristal yodium setelah dibilas dengan alkohol, bakteri akan terwarnai merah oleh pewarna pembanding (safranin).



Gambar 6. Koloni dan Mikroskopis *Bacillus firmus* pada pembesaran 100x

4.5 Hasil Identifikasi Isolat Berdasarkan Uji Biokimia

Dari hasil identifikasi isolat berdasarkan uji biokimia isolat yang didapat diduga mendekati kelompok bakteri *Bacillus firmus*. Hasil identifikasi berdasarkan uji kimia dapat dilihat pada Tabel 13. Metabolisme merupakan reaksi-reaksi kimia yang terjadi pada makhluk hidup. Proses metabolisme dibedakan menjadi dua jenis yaitu anabolisme dan katabolisme. Anabolisme (Biosintesis) yaitu reaksi biokimia yang merakit molekul-molekul sederhana menjadi molekul-molekul yang lebih kompleks. Misalnya pembentukan protein dari asam amino. Secara umum proses anabolik membutuhkan energi. Sedangkan katabolisme yaitu reaksi biokimia yang memecah atau menguraikan molekul-molekul kompleks menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana. Proses katabolik melepaskan energi yang dibutuhkan oleh sel (Waluyo, 2004).



Tabel 13. Data Hasil Uji Biokimia Isolat

JENIS TES	HASIL
BGP	POSITIF
SPORA	POSITIF
FERMENT GULA-GULA	
Glukosa	NEGATIF
Xylosa	POSITIF
Mannitol	POSITIF
Laktosa	NEGATIF
Sukrosa	NEGATIF
Maltosa	NEGATIF
Arabinosa	POSITIF
SUHU PERTUMBUHAN	
20°C	POSITIF
37°C	POSITIF
40°C	POSITIF
45°C	POSITIF
TUMBUH DI	
Nutrient Broth	POSITIF
SDA	NEGATIF
TSI	A/A,H2S-
CITRAT	NEGATIF
INDOL	NEGATIF
VP	NEGATIF
NaCl 7%	POSITIF
Motilitas	POSITIF
Starch hydrolysis	POSITIF
Casein hydrolysis	POSITIF
PENICILLIN	SENSITIV
BETA-HEMOLISA	POSITIF
Katalase	POSITIF
Oksidase	POSITIF
Reduksi Nitrat	POSITIF
Reduksi Methylene Blue	NEGATIF
DX. LAB.	<i>B. firmus</i>

4.5.1 BGP (Batang Gram Positif)

Dari hasil uji biokimia menunjukkan isolat merupakan bakteri gram positif dan membentuk spora. Gram-positif adalah bakteri yang mempertahankan zat warna kristal violet sewaktu proses pewarnaan Gram sehingga akan berwarna biru atau ungu di bawah mikroskop. Disisi lain, bakteri gram-negatif akan berwarna merah atau merah muda. Perbedaan keduanya didasarkan pada perbedaan struktur dinding sel yang berbeda dan dapat dinyatakan oleh

prosedur pewarnaan Gram. Prosedur ini ditemukan pada tahun 1884 oleh ilmuwan Denmark bernama Christian Gram dan merupakan prosedur penting dalam klasifikasi bakteri. Bakteri gram positif seperti *Staphylococcus aureus* (bakteri patogen yang umum pada manusia) hanya mempunyai membran plasma tunggal yang dikelilingi dinding sel tebal berupa peptidoglikan. Sekitar 90 persen dari dinding sel tersebut tersusun atas peptidoglikan sedangkan sisanya berupa molekul lain bernama asam teikhoat. Di sisi lain, bakteri gram negatif (seperti *E. coli*) memiliki sistem membran ganda di mana membran plasmanya diselimuti oleh membran luar permeabel. Bakteri ini mempunyai dinding sel tebal berupa peptidoglikan, yang terletak di antara membran dalam dan membran luarnya (Wikipedia, 2010). Hasil dari uji BGP dapat dilihat pada Tabel 13.

4.5.2 Hasil Uji Fermentasi Gula-Gula

Hasil yang didapat dari uji fermentasi gula-gula, menunjukkan isolat mampu memfermentasi xylosa, manitol dan arabinosa. Dan tidak mampu memfermentasi glukosa, laktosa, sukrosa dan maltosa. Uji ini dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri yang mampu memfermentasikan karbohidrat. Pada uji gula-gula hanya terjadi perubahan warna pada media glukosa yang berubah menjadi warna kuning, artinya bakteri ini membentuk asam dari fermentasi glukosa. Pada media glukosa juga terbentuk gelembung pada tabung durham yang diletakan terbalik didalam tabung media, artinya hasil fermentasi berbentuk gas (Anonim, 2008). Hasil dari uji fermentasi gula-gula dapat dilihat pada tabel 13.

4.5.3 Hasil Uji Suhu Pertumbuhan

Dari hasil uji pertumbuhan menunjukkan isolat mampu hidup pada suhu 20°C, 37°C, 40°C, 45°C. Menurut Holt *et al.*, (1994) dalam Feliatra *et al.*, (2004),

Kisaran suhu untuk tumbuh dan pertumbuhan optimal merupakan karakteristik dari kelompok bakteri gram positif. Uji pertumbuhan bakteri gram positif dilakukan pada suhu kamar 25°C, suhu pertumbuhan optimal 37°C, 40°C dan 45°C selama 72 jam. Pengamatan pertumbuhan bakteri dilihat dengan *Optical Density* (OD)-nya pada panjang gelombang 620 nm. Hasil dari uji suhu pertumbuhan dapat dilihat pada tabel 13.

4.5.4 Hasil Uji SDA (Sabouraud Dextrose Agar)

Dari hasil uji SDA (sabouraud dextrose agar) adalah negatif atau tidak ada jamur. Menurut Jarret (1980), Pepton adalah sumber nitrogen faktor pertumbuhan. Dekstrosa menyediakan sumber energi bagi pertumbuhan mikroorganisme. Gentamisin adalah aminoglikosida antibiotik yang menghambat pertumbuhan bakteri gram-negatif. Kloramfenikol adalah hambat untuk berbagai bakteri gram negatif dan gram positif. Hasil dari uji SDA dapat dilihat pada tabel 13.

4.5.5 Hasil Uji TSI (Triple Sugar Iron)

Dari hasil uji TSI menunjukkan isolat mampu memecah asam amino cysteine atau mengurai thiosulfate dan membentuk H₂S sebagai produk sampingan. Menurut Lammert (2007), Beberapa bakteri menggunakan enzim desulfurase untuk menguraikan cysteine, sebuah sulfur yang mengandung asam amino untuk membentuk piruvat yang kemudian dimanfaatkan sebagai energi. H₂S adalah produk sampingan yang tidak digunakan oleh bakteri. Bakteri lain mereduksi tiosulfat dalam jalur pembangkitan energi dan juga menghasilkan H₂S.

H₂S diproduksi oleh beberapa jenis mikroorganisme melalui pemecahan asam amino yang mengandung unsur belerang (S) seperti lisin dan metionin.

H₂S dapat juga diproduksi melalui reduksi senyawa-senyawa belerang anorganik, misalnya : tiosulfat, sulfat atau sulfat. Adanya H₂S dapat diamati dengan menambahkan garam-garam logam berat ke dalam medium. Dikatakan positif apabila H₂S bereaksi dengan senyawa-senyawa ini ditandai dengan terbentuknya logam sulfat yang berwarna hitam. Dan dikatakan negatif apabila tidak terbentuk logam sulfat yang berwarna hitam karena bakteri yang berada dalam medium tersebut tidak dapat menghidrolisis logam-logam berat yang terkandung dalam medium (Harley, 2002). Hasil dari uji TSI dapat dilihat pada tabel 13.

4.5.6 Hasil Uji Sitrat

Hasil yang didapat dari uji sitrat adalah negatif, hal ini menunjukkan bahwa isolat tidak mampu menggunakan sitrat sehingga asam tidak hilang dari medium biakan. Menurut Lammert (2007), tujuan uji sitrat adalah untuk menentukan apakah bakteri dapat memanfaatkan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Bakteri yang dapat memanfaatkan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi harus memiliki membran transportasi sitrat permease. Ketika berada dalam penghubung sitoplasma sel, enzim selular mengubah sitrat menjadi piruvat dan CO₂. Jika bakteri memanfaatkan sitrat, produk tambahan CO₂ berkombinasi dengan Na⁺ dalam media untuk membentuk NaCO₃, senyawa alkalin. Indikator pH bromothymol biru berubah menjadi biru dalam pH alkalin. Perubahan warna media dari hijau menjadi biru menandakan tes positif. Hasil dari uji sitrat dapat dilihat pada tabel 13.

4.5.7 Hasil Uji Indol

Dari hasil uji indol menunjukkan isolat tidak mampu memecah asam amino tryptophan menjadi indol dan asam piruvat. Menurut Lammert (2007),

Beberapa bakteri dapat menggunakan tryptophan sebagai sumber energi dengan menurunkan asam amino untuk mendapatkan piruvat. Indol adalah produk sampingan yang tidak digunakan oleh bakteri. Hasil dari uji indol dapat dilihat pada tabel 13.

4.5.8 Hasil Uji VP (Voges-Proskauer)

Dari hasil uji VP menunjukkan isolat tidak mampu memfermentasi glukosa melalui fermentasi butanediol. Tujuan dari uji VP adalah untuk menentukan kemampuan beberapa bakteri untuk memfermentasi glukosa melalui fermentasi butanediol. Beberapa bakteri memfermentasikan glukosa melalui jalur fermentasi butanediol. Perintis dari alkohol netral 2,3 butanediol adalah acetylmethylcarbinol yang juga dikenal dengan acetoin. Ketika asam organik juga diproduksi dalam jalur ini, jumlahnya tidak begitu banyak setelah 48 jam inkubasi. VP bereaksi dengan acetoin dalam kehadiran oksigen untuk membentuk produk merah. Warna merah ini menandakan tes VP yang positif. Tidak adanya perubahan warna setelah penambahan, VP menandakan tes negatif (Lammert, 2007). Hasil dari uji VP dapat dilihat pada tabel 13.

4.5.9 Hasil Uji NaCl 7%

Dari hasil uji NaCl menunjukkan isolat merupakan bakteri yang tahan garam atau bakteri halofilik. Menurut Winiati (1992), garam dapur akan meningkatkan tekanan osmotik substrat menyebabkan terjadinya penarikan air dari dalam bahan pangan akan menurun dan mikroorganisme tidak akan tumbuh. Mengakibatkan terjadinya penarikan air dari dalam sel mikroorganisme sehingga sel akan kehilangan air dari dalam sel mikroorganisme dan mengalami pengerutan. Ionisasi garam akan menghasilkan ion khlor yang beracun terhadap mikroorganisme, serta dapat mengganggu kerja enzim proteolitik karena dapat

mengakibatkan terjadinya denaturasi protein. Hasil dari uji NaCl 7% dapat dilihat pada tabel 13.

4.5.10 Hasil Uji Motilitas

Dari hasil uji motilitas menunjukkan bahwa isolat mampu bermotilitas. Menurut Harley (2002), Motilitas adalah salah satu dari ciri makhluk hidup, begitu pula dengan mikroorganisme, namun alat geraknya masih sederhana berupa flagella atau cilia. Bakteri melakukan motilitas dengan menggunakan energi yang diperoleh dari ATP yang diuraikan oleh koenzim ATP-ase membentuk fosfo anorganik. Beberapa protein kaya akan asam amino yang mengandung gugus sulfur seperti sistein. Jika protein ini dihidrolisis oleh bakteri, asam amino akan dilepaskan. Sistein dengan adanya sistein desulfurase, akan melepaskan atom sulfur yang dengan adanya hydrogen dari air akan membentuk gas hydrogen sulfide. gas ini juga dapat diproduksi dengan reduksi senyawa anorganik yang mengandung sulfur seperti tiosulfat, sulfat atau sulfit. Hasil dari uji motilitas dapat dilihat pada tabel 13.

4.5.11 Hasil Uji Hidrolisis Pati

Dari Hasil uji hidrolisis pati menunjukkan isolat mampu menghidrolisis pati atau zat tepung. Menurut Lammert (2007), tujuan dari hidrolisis pati atau zat tepung adalah untuk membedakan bakteri berdasarkan kemampuan untuk menghidrolisis (mencerna) zat tepung. Tumbuhan menyimpan glukosa sebagai molekul yang sangat besar yang disebut zat tepung. Zat tepung terbuat dari amylase (polimer panjang tak bercabang dari ratusan sub unit glukosa) dan amilopektin (polimer bercabang). Ketika tumbuhan mati, bakteri dalam tanah mencerna zat tepung pada sel tumbuhan. Bakteri menggunakan enzim ekstraseluler yang disebut amylase untuk menghidrolisis ikatan yang

menghubungkan sub unit glukosa. Produk glukosa dan maltosa ditransportasikan melalui membrane plasma bakteri, dimana produk tersebut digunakan untuk energi dan pembentukan biomolekul lain. Hasil uji hidrolisis pati dapat dilihat pada Tabel 13.

4.5.12 Hasil Uji Hidrolisis Kasein

Dari hasil uji hidrolisis kasein menunjukkan bahwa isolat mampu menghidrolisis kasein. Menurut John (2007), tujuan dari uji hidrolisis kasein adalah untuk membedakan bakteri berdasarkan kemampuannya untuk menghidrolisis (mencerna) kasein yang merupakan protein terbesar dalam susu. Banyak bakteri mensekresikan enzim untuk menghidrolisis protein dalam daerah dekat sekeliling permukaannya. Asam amino dan peptida yang dihasilkan (rantai pendek asam amino) kemudian ditransportasikan membrane sel dimana asam amino dan peptida tersebut digunakan untuk membentuk protein bakteri, untuk digunakan seperti karbon dan sumber nitrogen dan sebagai sumber energi. Hasil uji hidrolisis kasein dapat dilihat pada Tabel 13.

4.5.13 Hasil Uji Penicilin

Dari hasil uji penicillin menunjukkan zona hambat isolat adalah sensitif. Penicillin bersifat bakterisid dan bekerja dengan cara menghambat sintesis dinding sel. Obat ini berdifusi dengan baik di jaringan dan cairan tubuh, tapi penetrasi ke dalam cairan otak kurang baik kecuali jika selaput otak mengalami infeksi. Obat ini diekskresi ke urin dalam kadar terapeutik. Probenesid menghambat ekskresi penicillin oleh tubulus ginjal sehingga kadar dalam darah lebih tinggi dan masa kerjanya lebih panjang. Penicillin berpengaruh terhadap sel yang sedang tumbuh dan hanya berpengaruh kurang berarti terhadap kuman yang sedang tidak aktif tumbuh (dorman). Penicillin tidak mempengaruhi sel-sel

jaringan mamalia, karena sel mamalia tidak memiliki dinding masif seperti halnya pada kuman (Anonymous, 2010). Hasil uji penisilin dapat dilihat pada Tabel 13.

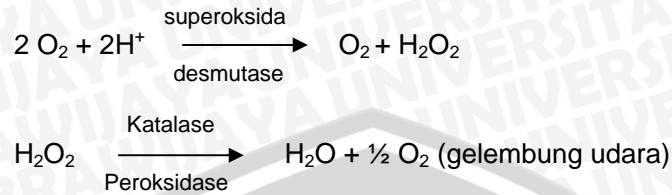
4.5.14 Hasil Uji Beta-Hemolisa

Dari hasil uji beta-hemolisa menunjukkan isolat dapat mengkoagulasi eritrosit atau darah mamalia. Menurut Cappuccino dan Sherman (2008), Lysis dari sel darah merah dengan destruksi sempurna dan penggunaan hemoglobin oleh organisme menghasilkan zona yang bersih di sekeliling koloni. Hemolysis ini diproduksi oleh 2 tipe beta-hemolisa yang dinamakan streptolysin O, sebuah antigenik, enzim oksigen yang labil, dan streptolysin S, sebuah non antigenik, lysin oksigen yang stabil. Reaksi hemolytic diperjelas ketika pelat agar darah dicoret dan secara simultan ditusuk untuk menunjukkan bagian permukaan hemolysis oleh streptolysin O dalam suatu lingkungan dengan tensi oksigen yang terduksi. Hasil uji beta-hemolisa dapat dilihat pada Tabel 13.

4.5.15 Hasil Uji Katalase

Hasil yang didapat dari uji katalase adalah positif. Menurut Harley (2002). Uji katalase ini dilakukan untuk mengidentifikasi kelompok bakteri bentuk kokkus, dalam membedakan Staphylococcus dan Streptococcus. Dimana kelompok Streptococcus bersifat katalase negatif dan Staphylococcus bersifat katalase positif. Penentuan adanya katalase ini terlihat dari pembentukan gelembung udara di sekitar koloni setelah ditambahkan larutan H₂O₂ 3%. Hasil uji katalase dapat dilihat pada Tabel 13.

Reaksi kimiawi yang dikatalisasikan oleh enzim terlihat sebagai berikut :



4.5.16 Hasil Uji Oksidase

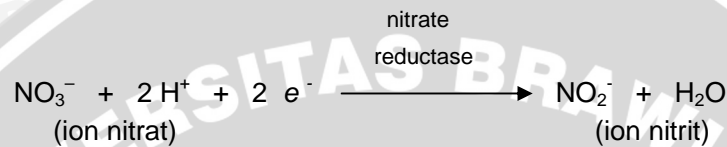
Dari hasil uji oksidase menunjukkan bahwa isolat memiliki cytochrome oksidase yang merupakan bagian dalam elektron transport selama respirasi. Menurut John (2007), molekul elektron transport dalam membran plasma bakteri menggunakan energi dalam elektron yang dipindah dari molekul makanan untuk menciptakan kekuatan gerak proton menjadi membran. Energi ini kemudian diubah menjadi bentuk yang dapat digunakan sel untuk bekerja. Pada akhir elektron transport, cytochrome (C) oxydase mengumpulkan elektron-elektron dan memudahkan penambahannya terhadap molekul O_2 dan dengan H^+ untuk membentuk H_2O . Beberapa bakteri menggunakan cytochrome oxydase untuk menambahkan elektron-elektron terhadap nitrat dimana O_2 tidak tersedia (reduksi nitrat). Tidak semua bakteri yang dapat tumbuh dalam O_2 memiliki cytochrome oxydase. Ketika cytochrome oxydase menambahkan elektron terhadap pereaktan oxydase, bentuk yang telah tereduksi berubah dari biru tua menjadi ungu dalam beberapa detik. Hasil uji oksidase dapat dilihat pada Tabel 13.

4.5.17 Hasil Uji Reduksi Nitrat

Hasil yang didapat dari uji reduksi nitrat adalah positif, hal ini menunjukkan bakteri dapat mereduksi ion nitrat menjadi ion nitrit atau gas

nitrogen. Menurut John (2007), dalam respirasi anaerobik, bakteri menambahkan elektron yang telah melewati rantai elektron transport terhadap substansi inorganik yang bukan oksigen. Salah satu aseptor akhir elektron adalah ion nitrat. Enzim kompleks nitrat reduktase memudahkan reduksi ion nitrat. Hasil uji reduksi nitrat dapat dilihat pada Tabel 13.

Untuk beberapa bakteri yang melakukan ini ion nitrat direduksi menjadi ion nitrit :



4.5.18 Hasil Uji Reduksi Methylene Blue

Dari hasil uji reduksi methylene blue menunjukkan isolat tidak mampu untuk mengisolasi dan membedakan gram negatif enteric bacillus. Menurut Lammert (2008), Agar EMB (eosin methylene blue) mengandung bahan eosin, methylene, gula laktosa dan sukrosa. Agar EMB adalah media yang selektif karena bahan-bahannya akan menghambat pertumbuhan banyak bakteri gram-positif. Media ini digunakan secara utama untuk identifikasi pendahuluan mengenai enteric bacilli yaitu bakteri yang menghambat dan mempengaruhi jalur intestinal. Agar EMB adalah medium yang membedakan antara bakteri yang memfermentasi laktosa dan atau sukrosa serta bakteri yang tidak demikian. Hasil uji reduksi methylene blue dapat dilihat pada Tabel 13.

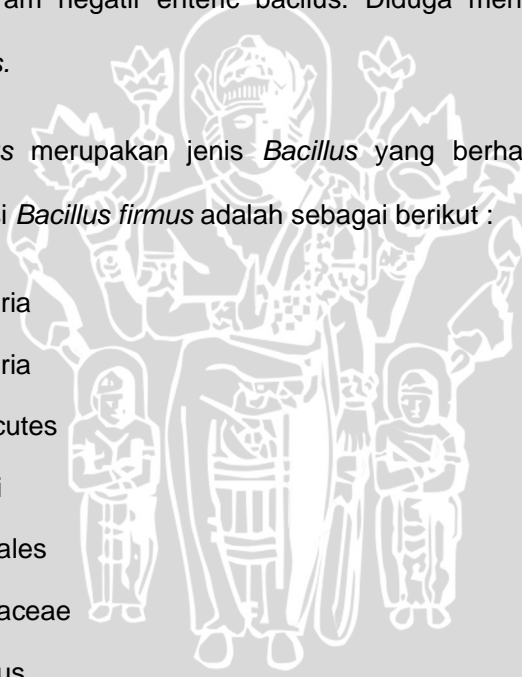
Dari hasil uji biokimia isolat yang dilakukan mengindikasikan bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri gram positif yang dapat membentuk spora. Mampu memfermentasi xylosa, manitol dan arabinosa dan tidak mampu memfermentasi glukosa, laktosa, sukrosa dan maltosa. Merupakan kelompok dari mesofil, tidak terdapat jamur. Isolat mampu memecah asam amino cysteine atau mengurai thiosulfate dan membentuk H₂S sebagai produk sampingan dan

tidak mampu menggunakan sitrat sehingga asam tidak hilang dari medium biakan. Tidak mampu memecah asam amino tryptophan menjadi indol dan asam piruvat, Tidak mampu memfermentasi glukosa melalui fermentasi butanediol. Isolat juga termasuk kelompok dari bakteri halofilik. Mampu bermotilitas, mampu menghidrolisis zat tepung dan mampu menghidrolisis kasein. Zona hambatnya sensitif, mampu mengkoagulasi eritrosit atau darah mamalia. Isolat mampu mendeteksi keberadaan katalase dan memiliki cytochrome oksidase yang merupakan bagian dalam elektron transport selama respirasi. Dapat mereduksi ion nitrat menjadi ion nitrit atau gas nitrogen. Tidak mampu untuk mengisolasi dan membedakan gram negatif enteric bacillus. Diduga mendekati kelompok bakteri *Bacillus firmus*.

Bacillus firmus merupakan jenis *Bacillus* yang berhasil diisolasi dari habitat laut. Klasifikasi *Bacillus firmus* adalah sebagai berikut :

Domain : Bacteria
Kingdom : Bacteria
Phylum : Firmicutes
Class : Bacilli
Order : Bacillales
Family : Bacillaceae
Genus : Bacillus

Scientific name: *Bacillus firmus*



V. KESIMPULAN DAN SARAN

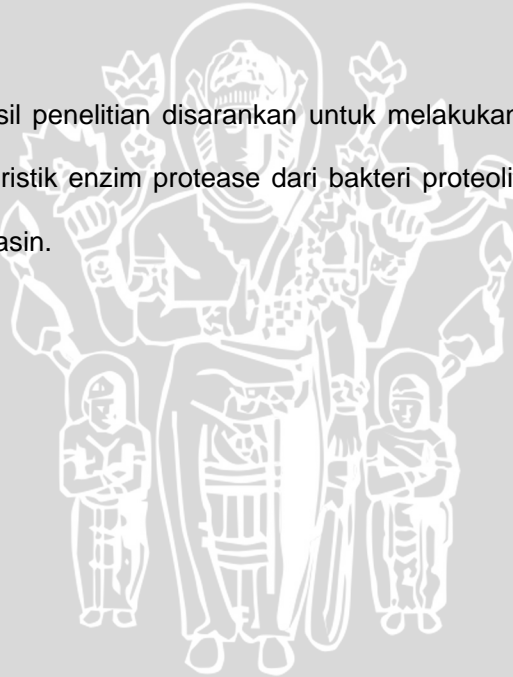
5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan tentang karakteristik bakteri proteolitik yang diisolasi dari ikan selar asin dapat disimpulkan :

Bakteri dari ikan selar asin yang dikeringkan pada hari ke-5 yang mampu tumbuh pada suhu 60⁰C, pH 4 dan aw 0,753 dengan morfologi koloni berbentuk bulat, tepi tidak rata, elevasi cembung, berwarna putih dan merupakan gram positif diduga mendekati ke arah bakteri *Bacillus firmus*.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut tentang Karakteristik enzim protease dari bakteri proteolitik yang diisolasi dari ikan selar kuning asin.



DAFTAR PUSTAKA

- Andriyani, D. 2009. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Halofilik dari Ikan Asin. <http://google/halofilik/IkanAsin.php>. Diakses 30 Agustus 2009. Pukul 12.00 WIB.
- Anonymous. (2007). Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Umum. Tim Pengajar Mikrobiologi, Jur. Biologi, Fak. MIPA. Univ. Brawijaya. Malang.
- Anonim,2008:http://hafizluengdaneun.multiply.com/journal/item/1/Laporan_Koasi_stensi_Mikrobiologi_ Diakses hari selasa, Pukul 11.45, Samarinda.
- Anonymous.2010.http://www.vet-indo.com/Berita-Umum/Penicillin-dan_Penggunaanya-dalam-Dunia-Veteriner.html. Diakses 12 juli 2010, pukul 12.00 WIB.
- Afrianto, E dan E. Liviawaty. 1989. Pengawetan dan Pengolahan Ikan. Kanisius. Yogyakarta.
- Atlas, R.M. and R. Bartha. 1987. Microbial Ecology, Fundamentals and Application, 2nd edition. The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc. Menlo Par, California : 560 pp.
- Bell, C., P. Neaves, A. P. Williams. 2005. Food Microbiology and Laboratory Practice. Blackwell Publishing. Oxford, UK.
- Benson, H. 2002. Microbiological Applications Manual in General Microbiology Eight Edition. Mc Graw Hill. Boston. 478 hal.
- Capucinno, J.G and N. Sherman. 2008. Microbiology: A Laboratory Manual. 8th ed. Benjamin Cummings. State University of New York.
- Djuhanda T. 1981. *Dunia Ikan*. Bandung : Penerbit Armico.
- Delalibera, I. J.R., Jo Handsman and Kenneth Raffa. 2003. Contrasts in Cellulolytic Activities of Gut Microorganisms Between The Wood Borer, *Saperda Vestita* (Coleoptera; Cerambycidae), and The Bark Beetkes, *Ips pini* and *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera; Curculionidae). *Environ Entomol.* 34(3): 541-547.
- Dixon M, Webb EE. 1979. *Enzymes*. New York: Academic Press.
- Downes, F. P. and K. Ito. 2001. Compendium of Methods For The Microbiological Examination of Food. American Public Health Association. Washington, D. C.
- Dwidjoseputro,D. 1998. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Djambatan. Jakarta.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan 1*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

- _____. 1993. Analisis Mikrobiologi Pangan. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Fatimah, Irma. 2005. Isolasi Bakteri Proteolitik dari Pencernaan Ikan Nila Galur Gift (*Oreochromis niloticus* (Linnaeus) Trewavas) dan Karakterisasi Protease Ekstraselulernya. Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB. Bogor.
- Feliatra, I. Efendi dan E. Suryadi. 2004. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik dari Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscogatus*) dalam Upaya Efisiensi Pakan Ikan. Jurnal Natur Indonesia 6 (2): 75-80 (2004).
- Frazier WL, Westhoff DC. 1983. *Food Microbiology*. New delhi: Mc.Graw Hill Publishing Company, Ltd.
- Hadiwiyoto S. 1993. *Teknologi Pengolahan Hasil Perikanan*. Yogyakarta : Liberty.
- Jarett, L., and A.C. Sonnenwirth (ed) 1980. Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis, 8th ed. CV Mosby.
- Kalisz HK. 1988. Microbial Proteinase. *Advances in Biochemical Engineering & Biotechnology*. 36: 1-65.
- Lay, B. W., 1994. Analisis Mikrobia di Laboratorium. Manajemen PT. Grasifindo Persada. Jakarta. 46 Hal.
- Lammert, J.M., 2007. *Techniques In Microbiology*. Benjamin Cummings. San Fransisco.
- Lehninger. 1995. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: Erlangga.
- Megiandri. A. 2009. Isolasi dan Pencirian Enzim Protease Keratinolitik dari Usus Biawak Air. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Moeljanto R. 1992. *Pengawetan dan Pengolahan Hasil Perikanan*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Naiola E & Widhyastuti N. 2002. Isolasi, seleksi, dan optimisasi produksi protease dari beberapa isolat bakteri. *Hayati*. 13; 51-56
- Olajuyigbe, F. M. and J. O. Ajele. 2005. Production Dynamics of Extracellular Protease from *Bacillus* Species. *African Journal of Biotechnology* Vol. 4 (8), pp. 776-779, August, 2005.
- Pakpahan, R. 2009. Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Protease Termofilik dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara Sumatera Utara. Tesis Universitas Sumatera Utara. Medan
- Pirzada, H. A. 2009. Kajian Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Protease Bakteri *Micrococcus* sp. Yang Diisolasi dari Larva Ikan Patin Siam (*Pangasius hypthalmus*). Program Pascasarjana Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang

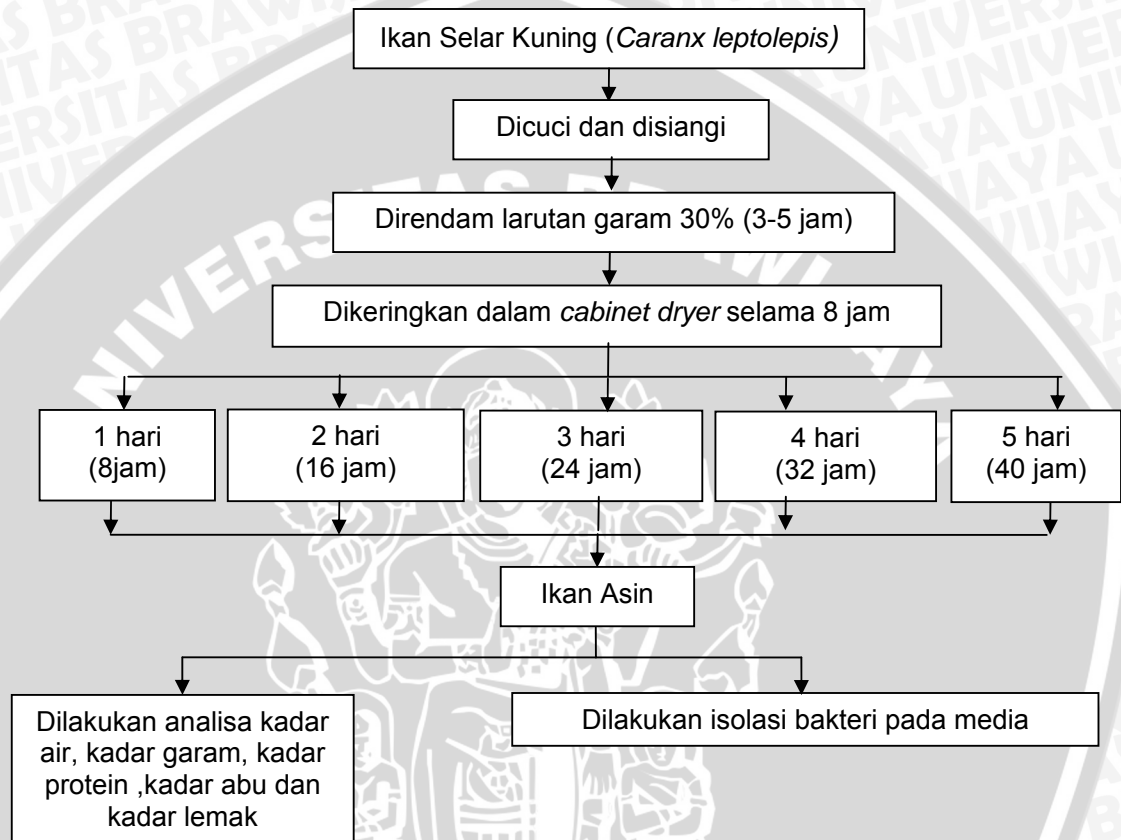
- Poernomo,A.T dan D.A, Purwanto. 2003. Uji Aktivitas “crude” Enzim Proteolitik Bacillus Substilis FNCCOO59 Hasil Fermentasi Curah. Majalah Farmasi Airlangga Vol 3.
- Prescott, Harley. 2002. Laboratory Exercises in Microbiology. The MC-Graw Hill Companies. New York ; 126, 139.
- Poedjiadi, A. 1994. Dasar-dasar Biokimia. Penerbit Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Rahayu WP., Ma’oen S, Suliantari, Fardiaz S. 1992. Teknologi Fermentasi Produk Perikanan. Depdibud. Dirjen Dikti. PAU Pangan dan Gizi. IPB. Bogor.140 hal.
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS & Deshpande VV. 1998. Moleculer and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Moleculer Biology Rev. Sci Am. 62 : 597-635.
- Rochima, Emma. Dinamika Jumlah Bakteri Selama Fermentasi Selama Prosesing Ikan Asin Jambal Roti.
- Saanin H. 1984. *Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan*. Jilid 1-2. Bandung : Bina Cipta.
- Sediaoetama. 2004. Ilmu Gizi , Dian Rakyat. Jakarta.
- SmallCrab. 2009. Penggunaan Formalin Dalam Produk Pangan. <http://smallcrab.com>. Diakses 30 Agustus 2009. Pukul 14.00 WIB.
- Sopiah, N. dan J. P. Susanto. 2002. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Proteolitik Terhadap Deproteinasi Limbah Cangkang Rajungan pada Proses Pembuatan Chitin. Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia, Vol.4, No.4 (Juli 2002), hal. 9-14.
- Stansby ME. 1982. Properties of fish oils and the ir application to handling of fish and to nutritional and industrial use. *In Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*. RE Martin (Ed.). Westport Conecticut : The AVI Publishing Company.
- Seeley jr.H.W. and Vandemark.P.J. 1976. Selected Exercises From Microbes in Action a Laboratory Manual of Microbiology. Cornell University. London.
- Sudarmadji., S. Haryono., B. Suhardi., 2003. Analisa Bahan Makanan dan Pertanian. Liberty. Yogyakarta.
- Suhartono MT. 1989. Enzim dan Bioteknologi. PAU Bioteknologi IPB. Bogor.
- Tatang.1981.Dunia Ikan. Armico. Bandung Genisa, AS.1999.Pengenalan Jenis-Jenis Ikan Laut ekonomis penting di Indonesia. Jakarta.

- Thaler, J. 2009. A Survey of Halophilic Microorganisms at the Mars Desert Research Station. [http://google/BiologyProposal_Halophilic Microorganism](http://google/BiologyProposal_Halophilic%20Microorganism). Diakses 30 Agustus 2009. Pukul 12.00 WIB.
- Tri Margono, Detty Suryati, Sri Hartinah, *Buku Panduan Teknologi Pangan*, Pusat Informasi Wanita dalam Pembangunan PDII-LIPI bekerjasama dengan Swiss Development Cooperation, 1993.
- Troller. J. A, Bernard. D. T, and Scott. V. N. 1984. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association. Washington D. C.
- Verschuere L, Rombaut G, Sorgelos P, Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microb Mol Biol Rev*: 655-671.
- Waluyo, L. 2004. *Mikrobiologi Umum*. Universitas Muhammadiyah Malang: Malang.
- Wibowo, A. K. 2009. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Halofilik Penghasil Amilase dan Protease dari Ikan Asin. <http://www.google.co.id>. Diakses 2 September 2009. Pukul 16.00 WIB
- Widjanarko, S. B. 1996. Analisa hasil Pertanian. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang. Malang.
- Winarno FG .1997. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta : P.T. Gramedia.
- WordPress. 2009. Studi Club Kimia Indonesia. <http://wordpress.com>. Diakses 30 Agustus 2009. Pukul 14.00 WIB.
- Yumei dan Yulia. 2008. Metode Penelitian Sosial (Resume). Diakses 2 September 2009. Pukul 16.00 WIB

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan ikan Selar asin

1.1 Skema Pembuatan Ikan Selar Asin



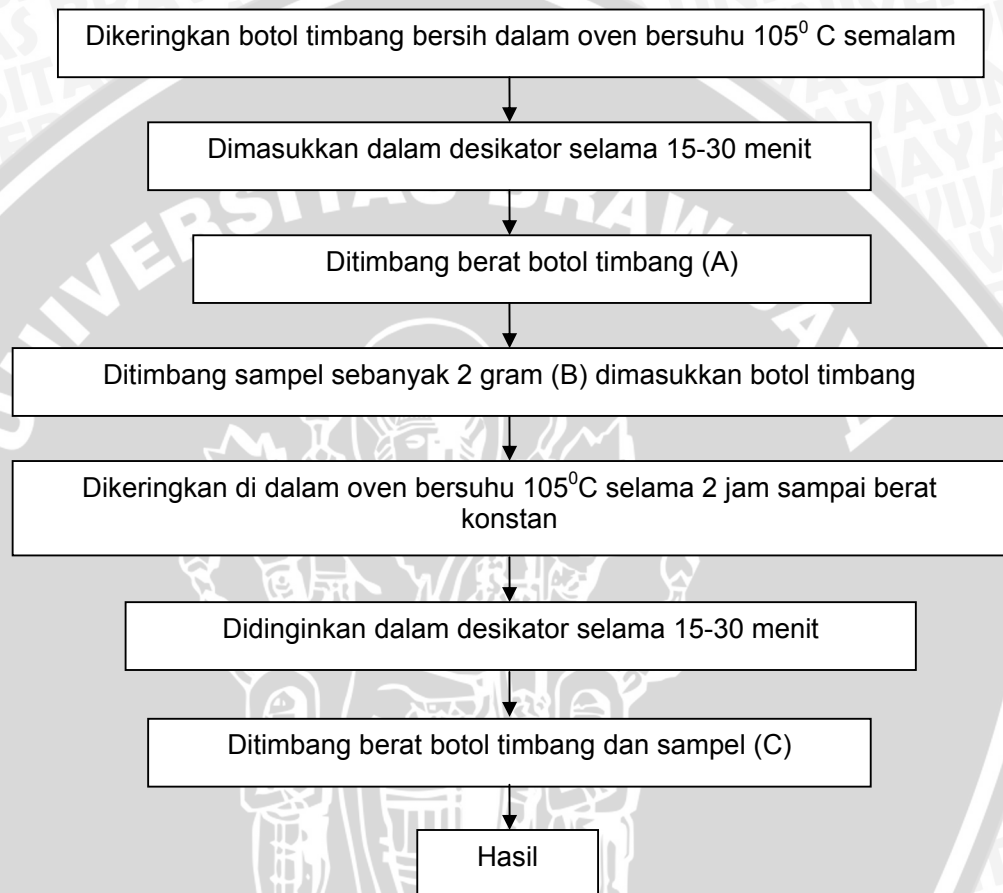
1.2 Langkah-Langkah Pembuatan Ikan Selar Asin

- Ikan selar disiangi dan dicuci
- Dibagi menjadi 15 bagian, masing-masing 20 gram
- Direndam dalam larutan garam 30% selama 1 hari di dalam bak plastik
- Dikeringkan menggunakan *cabinet dryer* selama 8 jam tiap 1, 2, 3, 4, dan 5 hari
- Dilakukan isolasi bakteri pada media Nutrien Agar (NA)

- Hasil pengeringan sisa isolasi diuji kadar air, kadar abu, kadar lemak, kadar garam dan kadar protein

Lampiran 2. Analisa Kadar Air

2.1 Skema Analisa Kadar Air



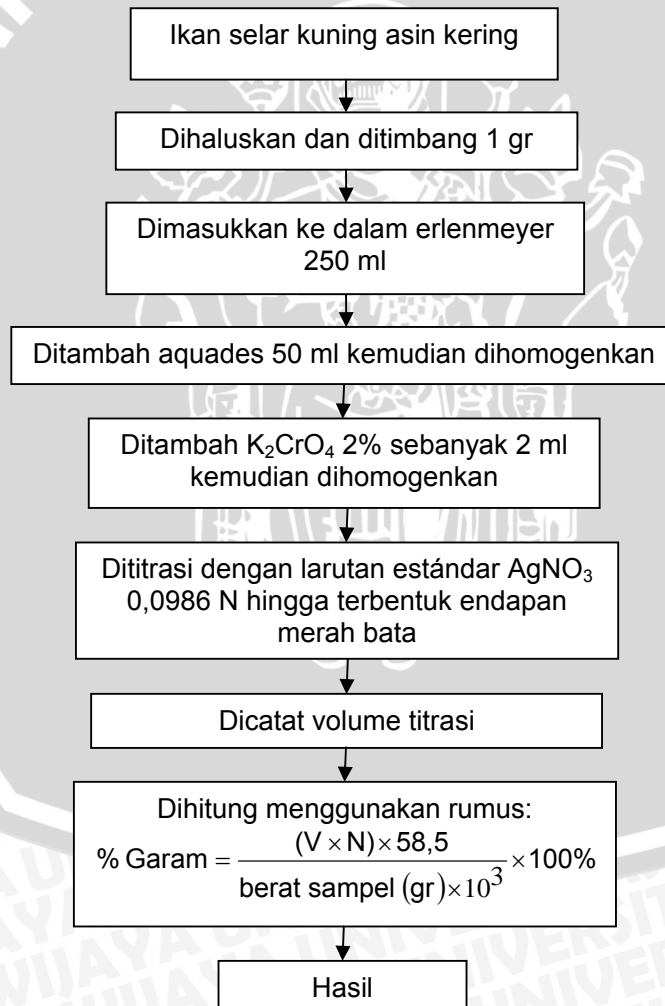
2.2 Langkah-langkah Analisa Kadar Air

- Dimasukkan botol timbang bersih dalam oven dengan alas loyang pada suhu 105°C selama semalam dengan tutup setengah terbuka
- Diambil dengan *crushable tang* jika botol timbang telah kering lalu didinginkan dalam desikator selama 15-30 menit
- Ditimbang menggunakan timbangan analitik dan dicatat beratnya

- Dihaluskan sampel ikan selar kuning asin menggunakan mortar dan ditimbang sebanyak 2 gr dengan timbangan analitik
- Dimasukkan ke dalam botol timbang lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama semalam hingga berat konstan
- Diambil dari oven dan dimasukkan desikator selama 15-30 menit untuk kemudian ditimbang beratnya
- Dihitung kadar air menggunakan rumus

Lampiran 3. Analisa Kadar Garam

3.1 Skema Analisa Kadar Garam



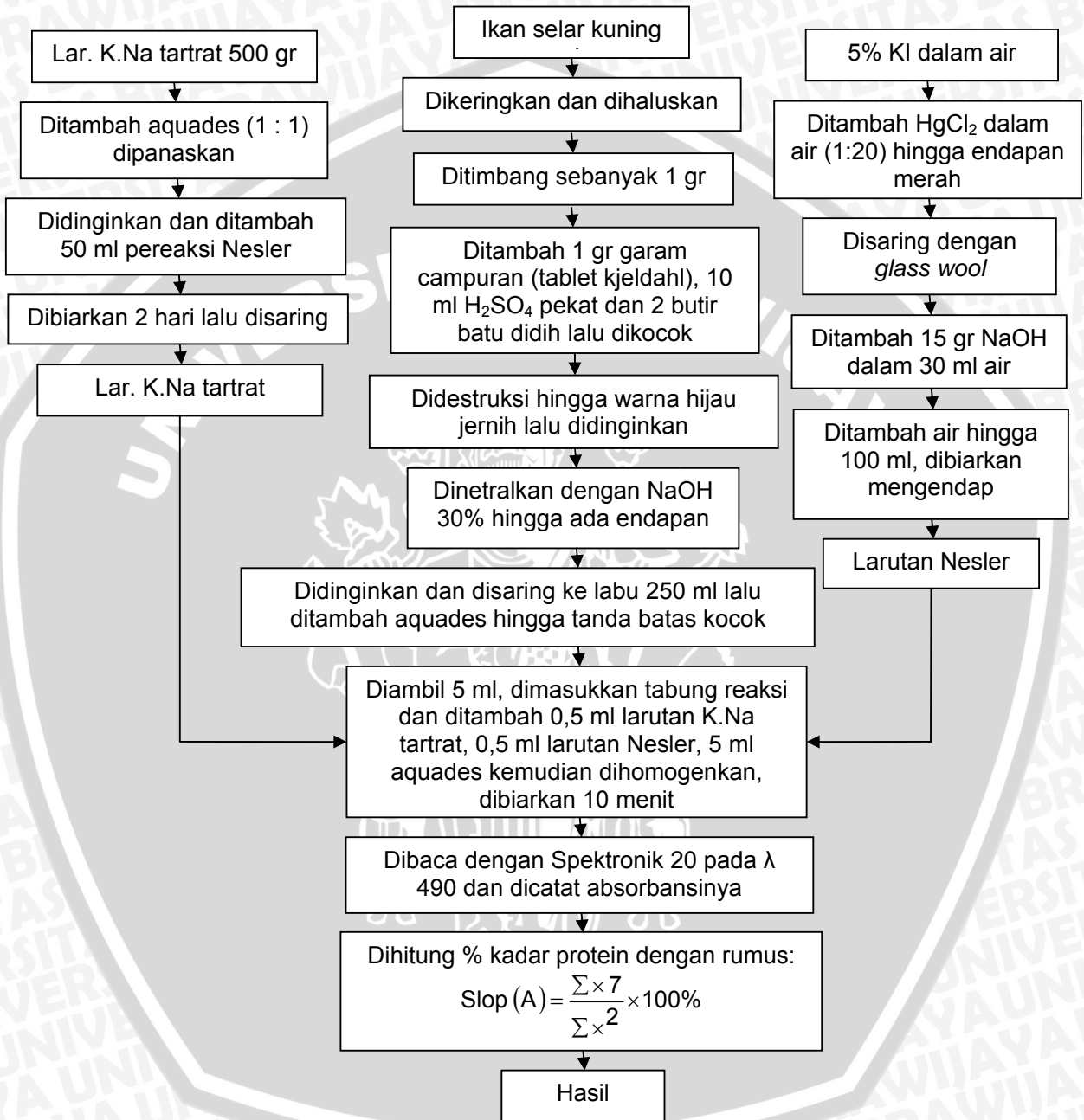
3.2 Langkah-langkah Analisa Kadar Garam

- Ditimbang sampel ikan selar kuning asin sebanyak 1 gram, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer
- Ditambahkan aquadest 50 ml dan dihomogenkan, lalu ditambah K_2CrO_4 2% sebanyak 2 ml dan dihomogenkan lagi
- Dititrasi hasil penambahan dengan larutan standar $AgNO_3$ 0,0986 N hingga terbentuk endapan merah bata dan dicatat volume titrasinya
- Dihitung kadar garamnya menggunakan rumus



Lampiran 4. Analisa Kadar Protein

4.1 Skema Analisa Kadar Protein



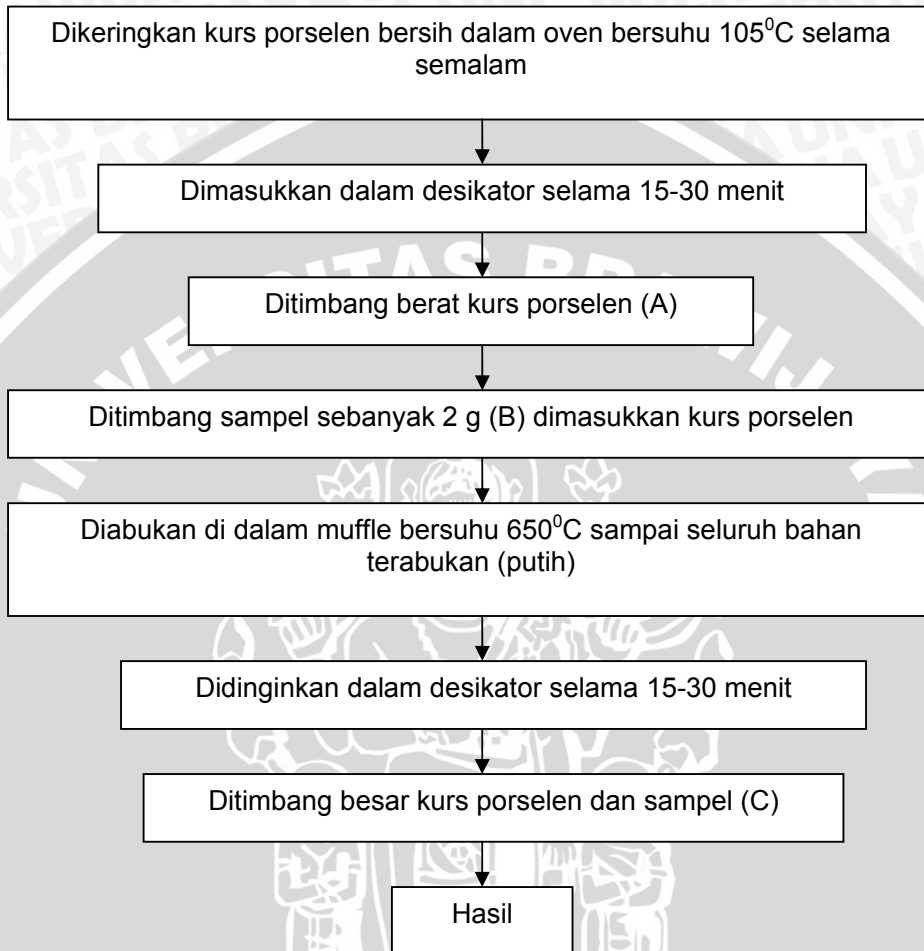
4.2 Langkah-langkah Analisa Kadar Protein

- Ditimbang 1 gr sampel ikan selar kuning asin yang dimasukkan dalam labu kjeldahl kemudian ditambahkan dengan 1 gr garam campuran (tablet kjeldahl), 10 ml H₂SO₄ pekat dan 2 butir batu didih kocok
- Dipanaskan campuran tersebut pada alat destruksi hingga warna hijau jernih kemudian didinginkan
- Dinetralkan larutan menggunakan NaOH 30% yang ditandai dengan adanya endapan, setelah itu didinginkan dan disaring ke labu 250 ml lalu ditambah aquadest hingga tanda batas kocok
- Diambil 5 ml larutan, dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambah dengan 0,5 ml larutan K.Na tartrat, 0,5 ml larutan Nessler, 5 ml aquadest, dihomogenkan dan dibiarkan selama 10 menit
- Dibaca hasil dengan spektrometrik pada panjang gelombang 490 nm dan catat absorbansinya
- Dihitung N protein menggunakan rumus

repository.ub.ac

Lampiran 5. Skema Analisa Kadar Abu

5.1 Skema Analisa Kadar Abu



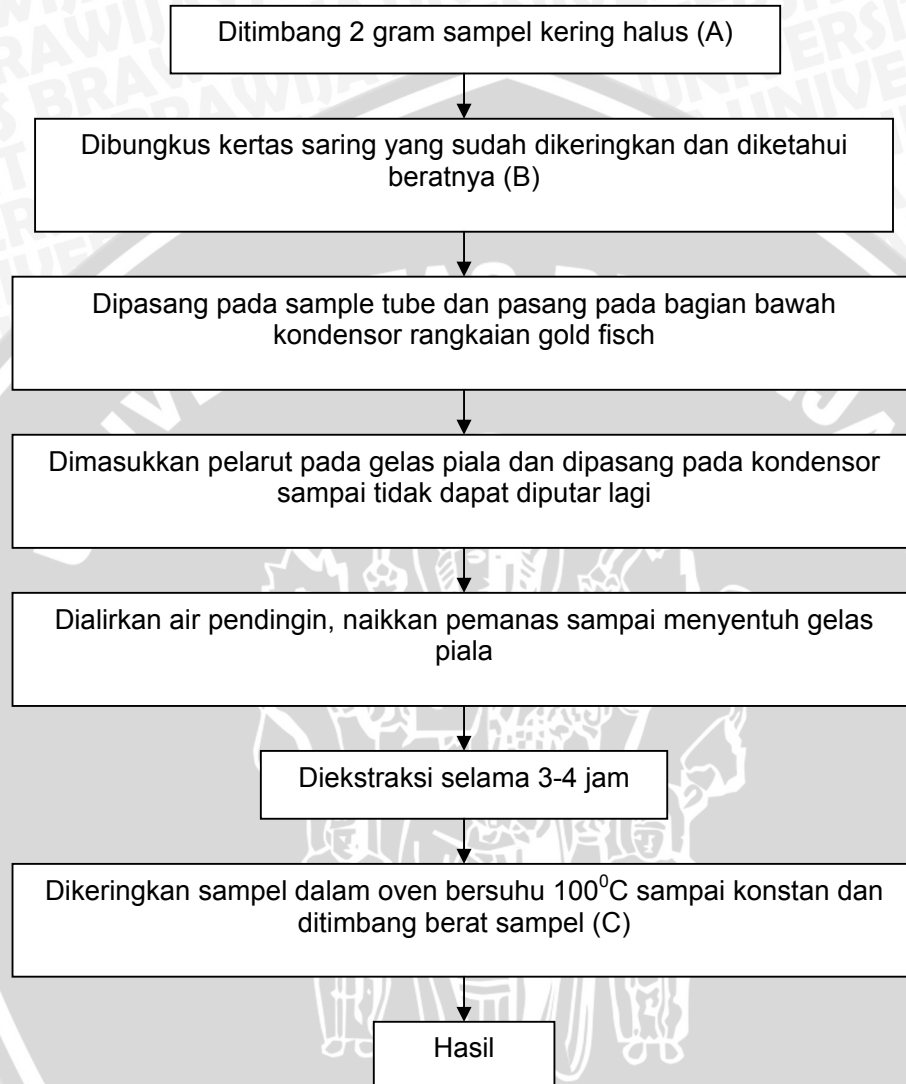
5.2 Langkah-langkah Analisa Kadar Abu

- Dikeringkan kurs porselen bersih dalam oven bersuhu 105°C selama semalam
- Diangkat menggunakan *crushable tang*, kemudian dimasukkan dalam desikator selama 15-30 menit
- Ditimbang kurs porselen menggunakan timbangan analitik apabila telah dingin dan hasilnya dicatat sebagai berat (A)
- Dihaluskan sampel ikan selar kuning asin menggunakan mortar dan ditimbang 2 gr (B), kemudian dimasukkan ke dalam kurs porselen lalu langsung dimasukkan ke dalam *muffle*
- Ditunggu hingga suhu dalam *muffle* mencapai 650°C dan bahan berwarna putih keabu-abuan
- Diambil dari *muffle* dengan menggunakan *crushable tang* dan didinginkan dalam desikator selama 15-30 menit kemudian ditimbang beratnya (C)
- Dihitung kadar abu menggunakan rumus

repository.ub.ac

Lampiran 6. Analisa Kadar Lemak

6.1 Skema Analisa Kadar Lemak

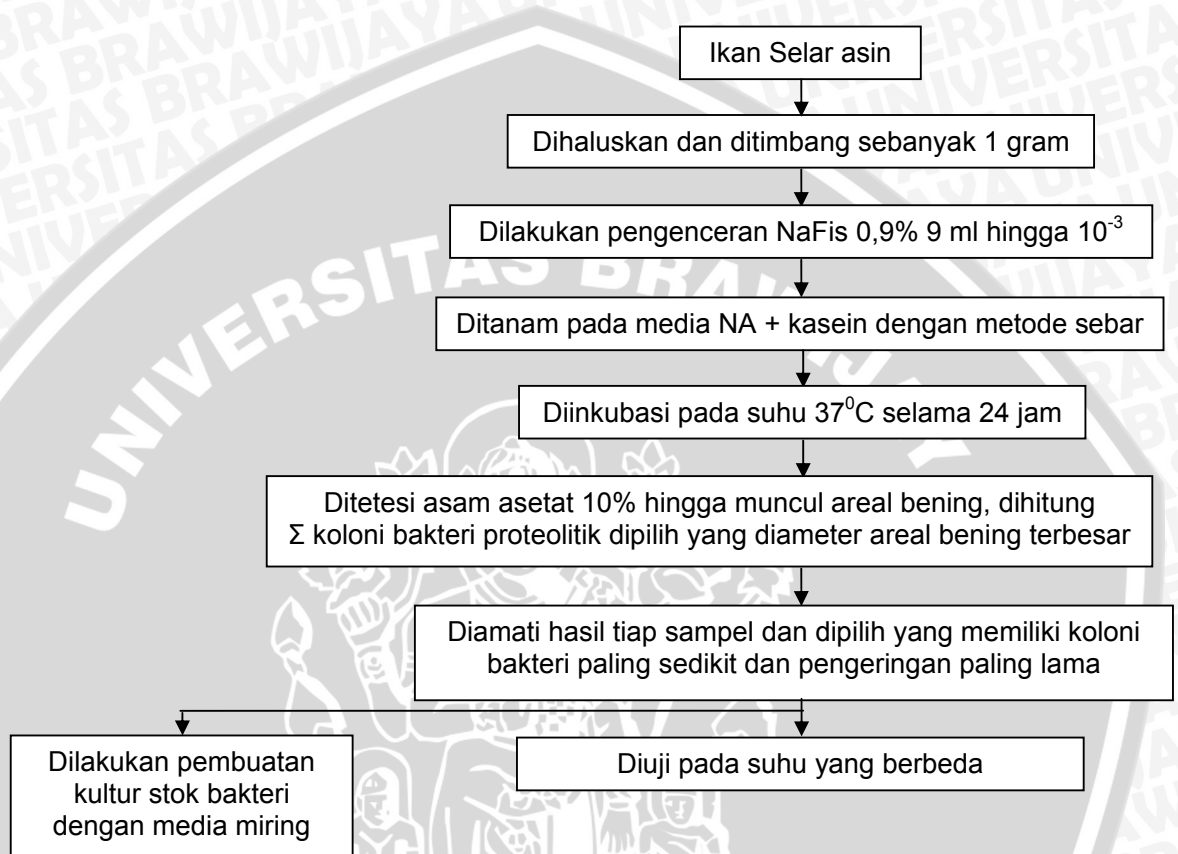


6.2 Langkah-langkah Analisa Kadar Lemak

- Dihaluskan sampel ikan selar kuning asin menggunakan mortar dan ditimbang sebanyak 2 gr
- Kertas saring dibentuk bundar menggunakan cawan petri sebagai cetakan lalu dioven bersamaan dengan sampel selama semalam suhu 105°C hingga didapatkan berat konstan
- Sampel pada saat dioven, dialasi dengan kertas kemudian ditempatkan pada Loyang
- Setelah semalam, sampel dihaluskan lagi dan ditimbang sebanyak 2 gr.
- Dikeluarkan kertas saring dari oven menggunakan *crushable tang* dan dimasukkan ke dalam desikator selama 5-10 menit kemudian ditimbang beratnya
- Sampel yang telah ditimbang kemudian dibungkus dengan kertas saring yang telah diketahui beratnya
- Dipasang sampel pada sampel tube pada bagian bawah kondensor rangkaian goldfish
- Dimasukkan pelarut hexan pada gelas piala tapi tidak sampai mengenai sampel tube dan dipasang gelas piala pada kondensor hingga tidak dapat diputar lagi
- Dialirkan aliran pendingin, dinaikkan pemanas sampai menyentuh gelas piala dan dinyalakan pemanas serta diekstraksi selama 3 jam
- Jika ekstraksi telah selesai maka diambil residu sampel dan dikeringkan dalam oven pada suhu 100°C sampai berat konstan dan ditimbang beratnya
- Dihitung kadar lemak menggunakan rumus

Lampiran 7. Isolasi bakteri

7.1 Skema Isolasi Bakteri

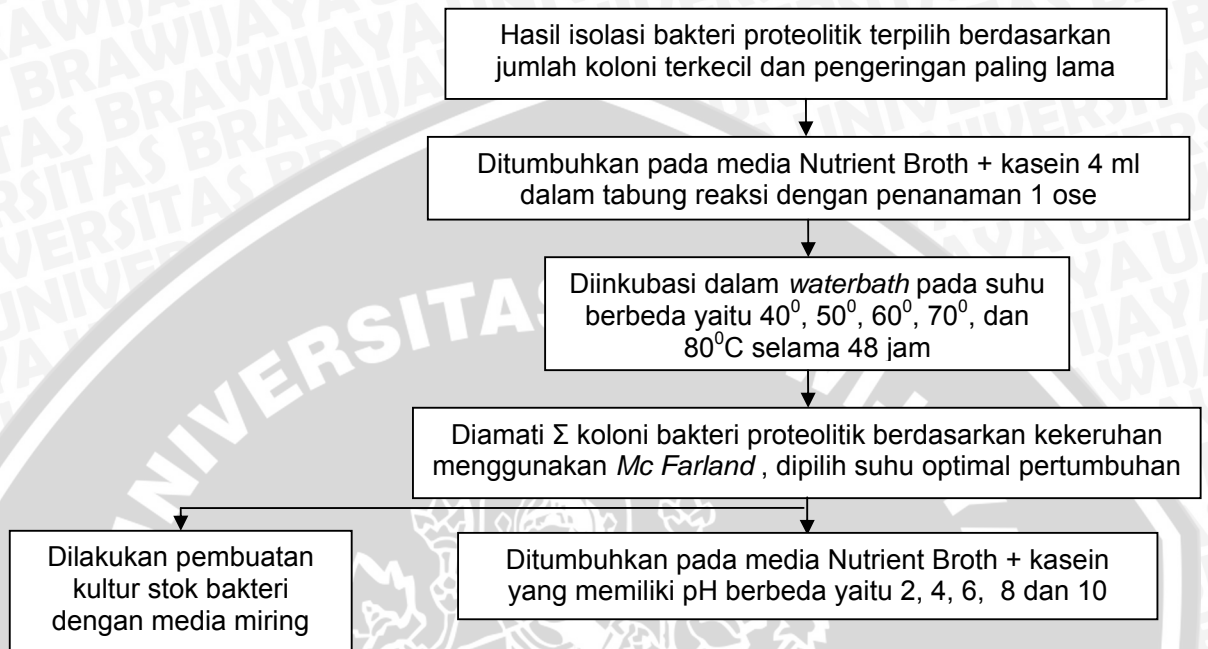


7.2 Langkah-langkah Isolasi Bakteri

- Disterilisasi alat yang akan digunakan pada saat pembuatan media atau penanaman
- Diambil 1 gram sampel ikan asin dengan perlakuan lama penjemuran yang berbeda kemudian dihaluskan dan diencerkan menggunakan Na-Fis 0,9% 9 ml
- Pengenceran dilakukan sebanyak 3 kali (10^{-3})
- Dibuat media Skim Milk Agar (SMA) yang berasal dari Nutrien Agar ditambahkan dengan kasein NA (*nutrient agar*) + kasein dengan perbandingan 10 : 1 yang dilarutkan ke dalam aquadest dengan perbandingan 1:5
- SMA sebelumnya telah melalui pensterilisasian menggunakan autoklaf pada suhu 121°C 1 atm selama 15 menit bersamaan dengan NaFis
- digunakan 0,1 ml sampel pada saat penanaman dengan metode *spread* (sebar)
- Diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang
- Cawan berisi media tersebut ditetesi dengan HCl 1% atau 10% larutan asam asetat selama 1 menit
- Dihitung jumlah koloni yang berada di sekeliling areal bening yang dihasilkan oleh proteolisis
- Diseleksi berdasarkan diameter terbesar
- Dilakukan karakterisasi protease isolat dengan penentuan suhu
- Dilakukan pengkulturan untuk stok isolat

Lampiran 8. Pengujian pada suhu berbeda

8.1 Skema Pengujian Pada Suhu Berbeda

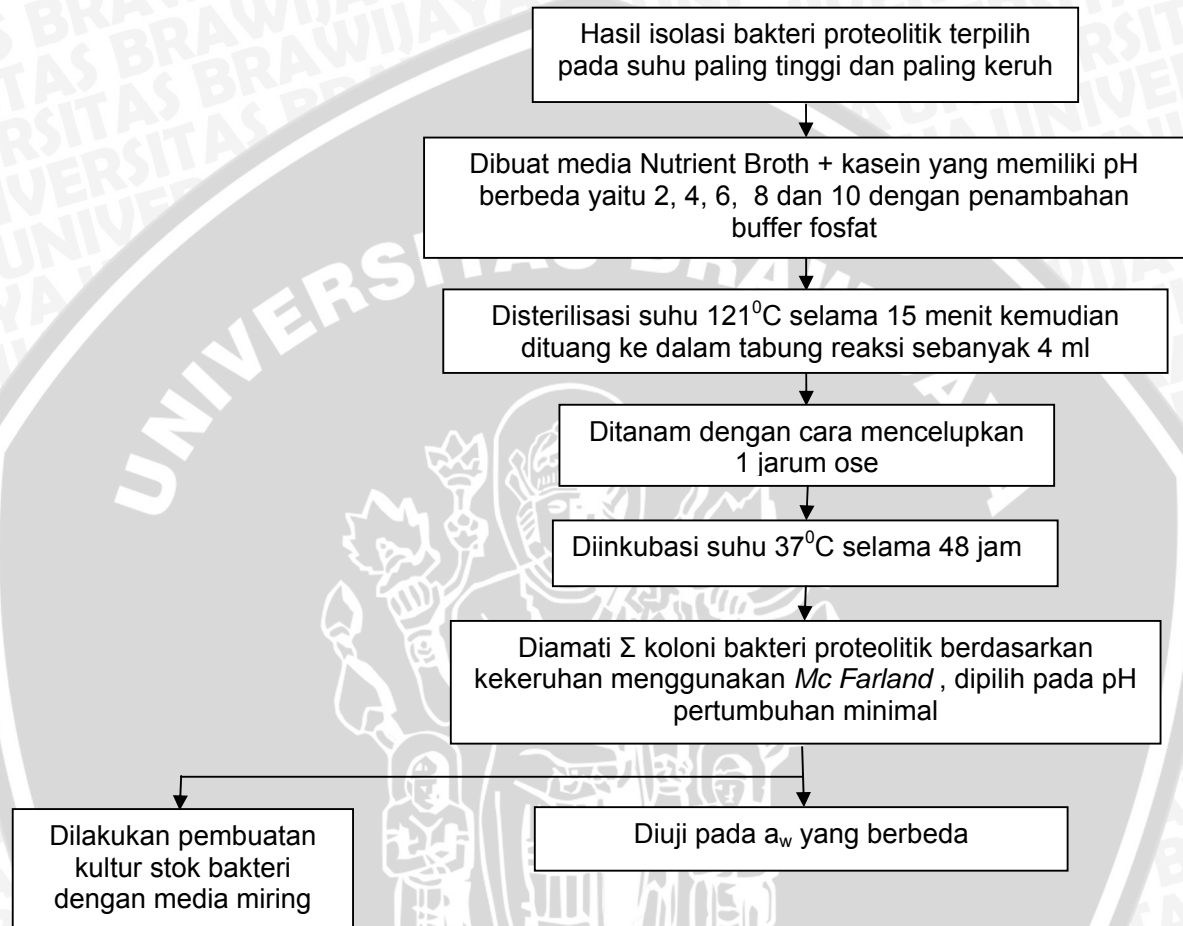


8.2 Langkah-Langkah Pengujian Pada Suhu Berbeda

- Bakteri hasil isolasi diambil sebanyak 1 jarum ose kemudian ditanam ke dalam Nutrient Broth + kasein 3 ml
- Dilakukan pengujian suhu menggunakan *waterbath* dengan suhu 40, 50, 60, 70, dan 80°C
- Diinkubasi selama 2 x 24 jam agar pertumbuhan optimal
- Diamati kekeruhannya setelah 48 jam berdasarkan metode *Mc Farland* untuk mengetahui jumlah koloni bakteri proteolitik yang tumbuh di dalamnya
- Dipilih koloni yang tumbuh pada suhu maksimum
- Dilakukan karakterisasi protease isolat dengan penentuan pH
- Dilakukan pengkulturan untuk stok isolat

Lampiran 9. Pengujian pada pH berbeda

9.1 Skema Pengujian pada pH Berbeda



Dilakukan pembuatan kultur stok bakteri dengan media miring

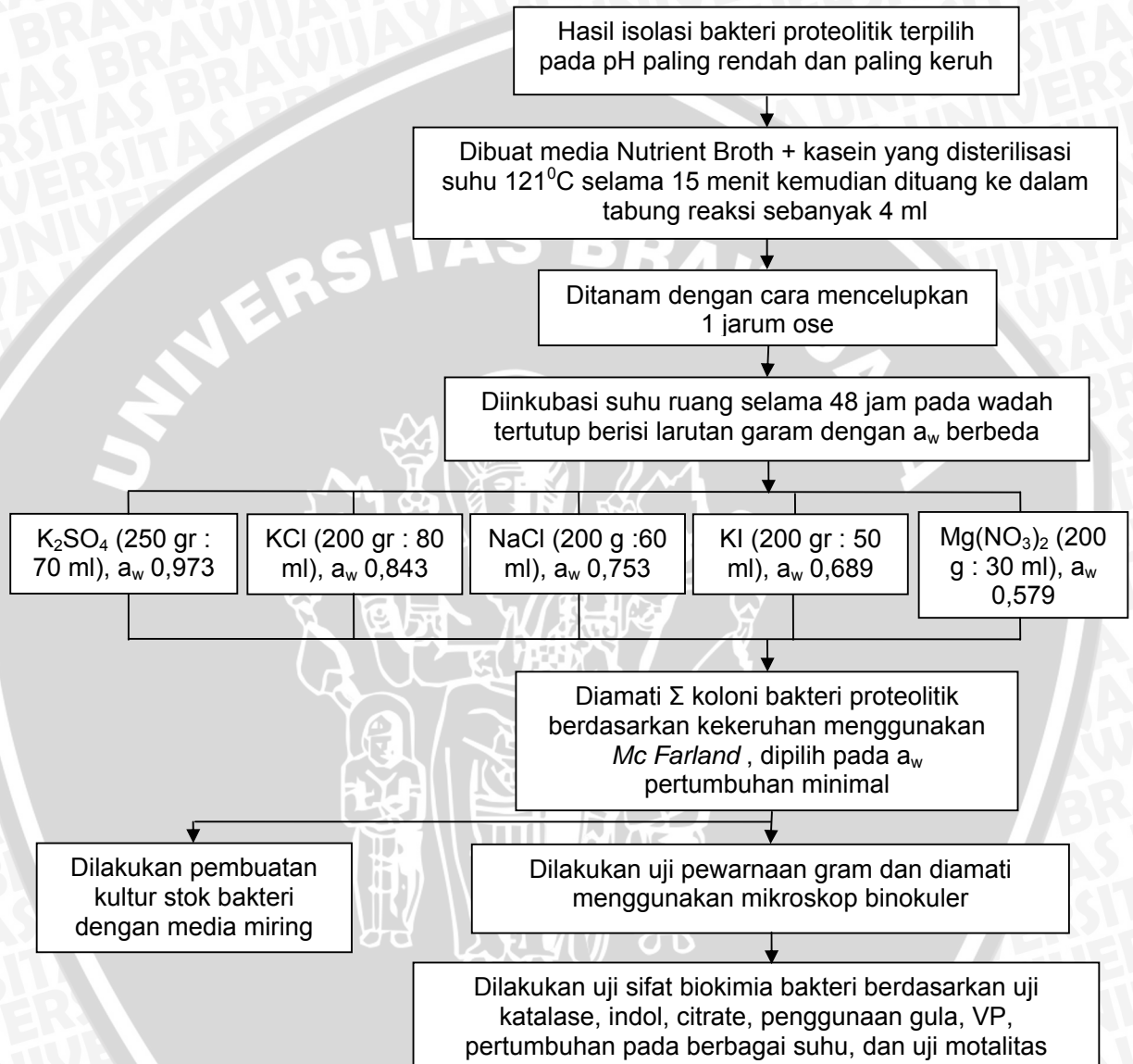
Diuji pada a_w yang berbeda

9.2 Langkah-Langkah Pengujian pada Ph Berbeda

- Dilakukan pembuatan media dengan pH berbeda menggunakan penambahan buffer 0,1 N NaOH untuk pH 8 dan 10, buffer 0,1 N HCl untuk pH 2, 4 dan 6.
- Diukur dengan pH meter yang telah dikalibrasi agar didapatkan media dengan pH sesuai
- Disterilisasi media dan alat yang akan dipakai menggunakan autoklaf suhu 121°C 1 atm selama 15 menit
- Isolat bakteri ditanamkan ke dalam media Nutrient Broth dengan dicelupkan menggunakan jarum ose
- Diinkubasikan suhu 37°C selama 48 jam
- Diamati kekeruhannya berdasarkan metode *Mc Farland* untuk mengetahui jumlah koloni bakteri proteolitik yang tumbuh di dalamnya
- Dipilih koloni yang tumbuh pada pH minimum (paling asam)
- Dilakukan karakterisasi protease isolat dengan penentuan a_w
- Dilakukan pengkulturan untuk stok isolat

Lampiran 10. Pengujian pada a_w berbeda

10.1 Skema Pengujian pada a_w Berbeda

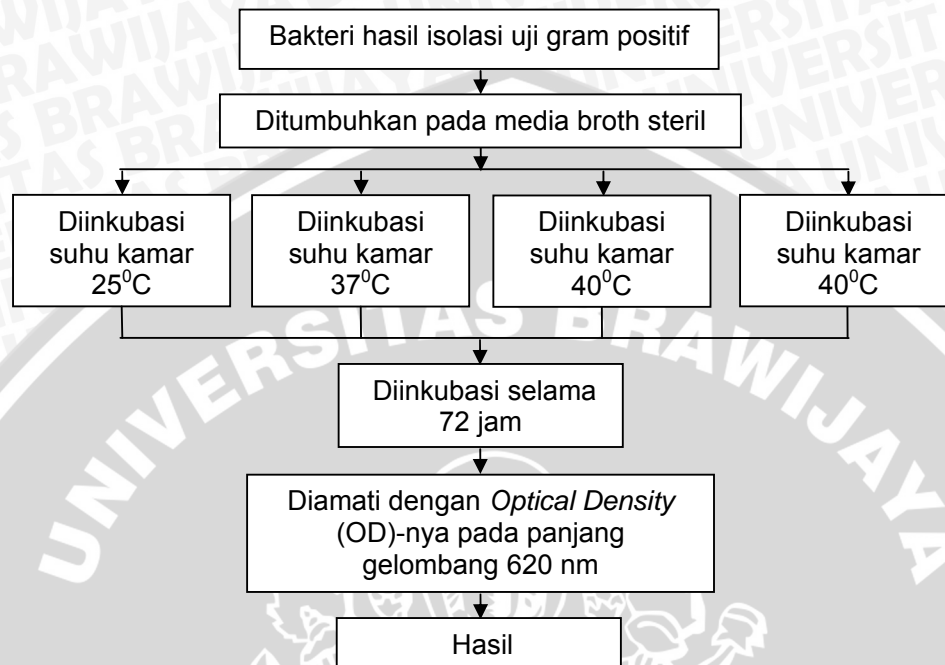


10.2 Langkah-Langkah Pengujian pada a_w Berbeda

- Dibuat larutan garam yang ditambah dengan aquadest, untuk a_w 0,970 menggunakan 250 gr K_2SO_4 + 70 ml aquadest, untuk a_w 0,836 menggunakan 200 gr KCl + 80 ml aquadest, untuk a_w 0,753 menggunakan 200 gr NaCl + 60 ml, untuk a_w 0,689 menggunakan 200 gr KI + 50 ml aquadest, dan untuk a_w 0,514 menggunakan 200 gr $Mg(NO_3)_2$ + 30 ml aquadest.
- Dihomogenkan menggunakan *stirer* dan diletakkan pada wadah tertutup pada suhu 30°C
- Dibuat media Nutrient Broth + kasein kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf suhu 121°C 1 atm selama 15 menit
- Ditanamkan 1 jarum ose isolat bakteri hasil uji pH ke dalam media broth dengan cara dicelupkan
- Diinkubasi selama 48 jam ke dalam wadah yang telah berisi larutan garam kemudian ditutup
- Diamati kekeruhannya berdasarkan metode *Mc Farland*
- Dipilih koloni yang tumbuh pada a_w minimum
- Dilakukan identifikasi protease isolat dengan penentuan morfologi koloni sel
- Dilakukan pengkulturan untuk stok isolat

Lampiran 11. Uji Pertumbuhan pada Berbagai Suhu

11.1 Skema Uji Pertumbuhan pada Berbagai Suhu

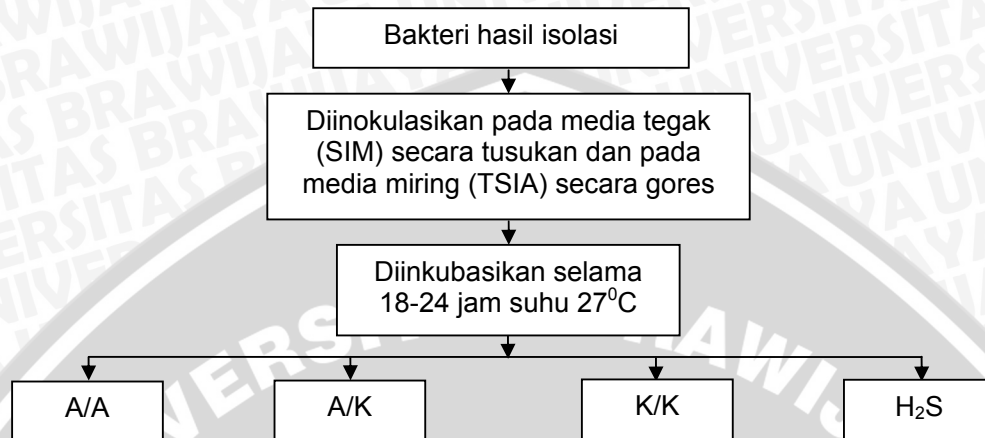


11.2 Langkah-langkah Uji Pertumbuhan pada Berbagai Suhu

- Uji pertumbuhan bakteri gram positif ditumbuhkan pada media broth diinkubasi pada suhu kamar 25°C, suhu pertumbuhan optimal 37°C, 40°C dan 45°C selama 72 jam
- Pengamatan pertumbuhan bakteri dilihat dengan *Optical Density* (OD)-nya pada panjang gelombang 620 nm

Lampiran 12. Uji Penggunaan Gula

12.1 Skema Uji Penggunaan Gula

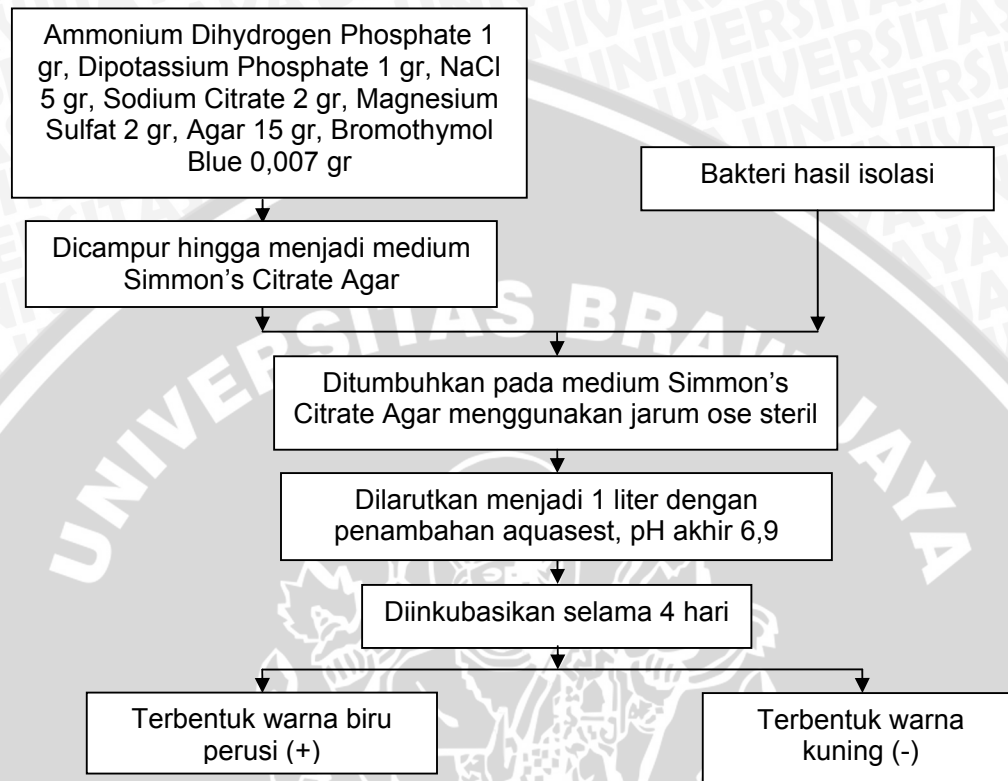


12.2 Langkah-langkah Uji Penggunaan Gula

- Disiapkan media TSIA terlebih dahulu
- Diinokulasikan isolat bakteri secara tusukan pada media tegak (SIM) dan goresan pada media miring (TSIA)
- Diinkubasikan selama 18-24 jam pada suhu 27°C
- Hasil uji K/A apabila hanya glukosa yang terfermentasi, A/A apabila glukosa dan laktosa atau sukrosa terfermentasi, A/K apabila laktosa atau sukrosa yang terfermentasi, K/K apabila gula tidak terfermentasi, H₂S apabila terbentuk warna kehitaman pada bekas goresan, terbentuk gas apabila terjadi retakan pada media

Lampiran 13. Uji Citrate

13.1 Skema Uji Citrate



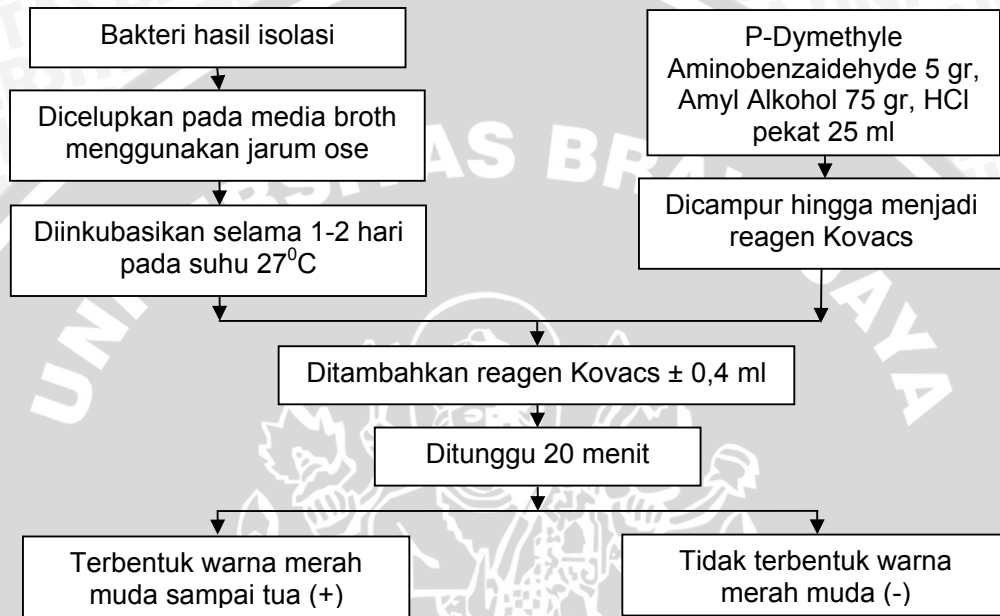
13.2 Langkah-langkah Uji Citrate

- Ammonium Dihydrogen Phosphate 1 gr, Dipotassium Phosphate 1 gr, NaCl 5 gr, Sodium Citrate 2 gr, Magnesium Sulfat 2 gr, Agar 15 gr, Bromothymol Blue 0,007 gr dicampur hingga menjadi media Simmon's Citrate Agar
- Dilartkan bahan menjadi 1 liter dengan penambahan aquadest, pH akhir adalah 6,9
- Bakteri diinokulasikan secara goresan dengan menggunakan jarum ose steril pada médium Simmon's Citrate Agar
- Diinkubasikan selama 1 - 4 hari

- Hasil uji positif (+) jika terbentuk warna biru perusi dan negatif (-) jika terbentuk warna kuning

Lampiran 14. Uji Indole

14.1 Skema Uji Indole

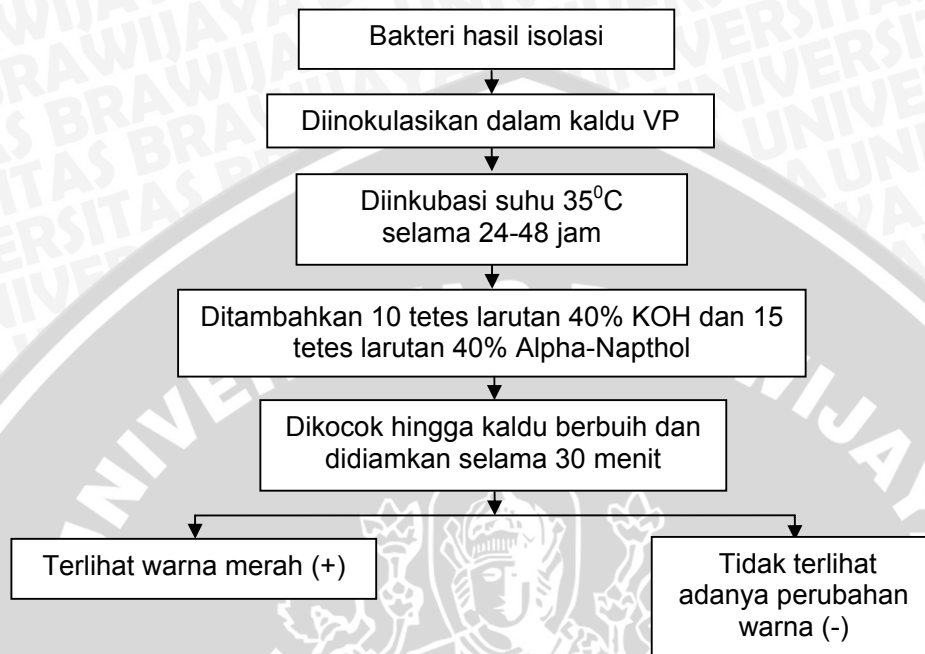


14.2 Langkah-langkah Uji Indole

- Diinokulasikan isolat bakteri dengan cara tusukan pada medium SIM atau dicelupkan menggunakan jarum ose ke dalam larutan broth
- Diinkubasikan selama 1-2 hari pada suhu 27°C
- Ditambahkan reagen Kovacs (P-Dymethyle Aminobenzaldehyde 5 gr, Amyl Alkohol 75 gr, HCl pekat 25 ml) yang berwarna kuning cerah sampai coklat cerah sebanyak $\pm 0,4$ ml
- Hasil uji setelah 20 menit menunjukkan reaksi positif (+) jika terbentuk warna merah muda sampai tua pada lapisan reagen

Lampiran 15. Uji *Vogues-Proskauer* (VP)

15.1 Skema Uji *Vogues-Proskauer* (VP)

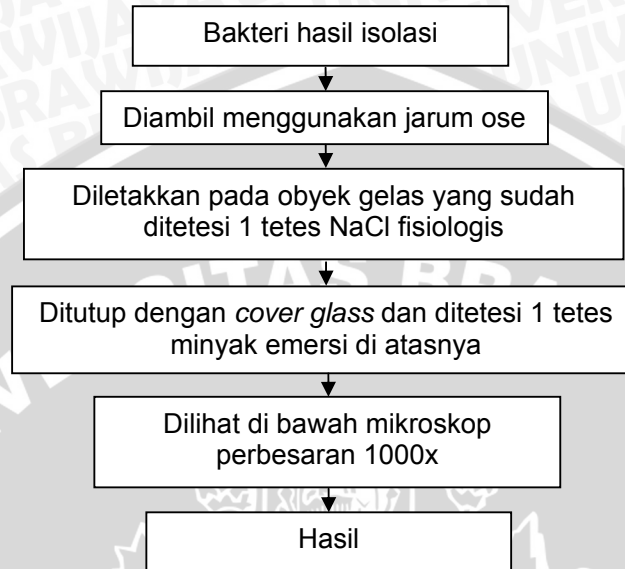


15.2 Langkah-langkah Uji *Vogues-Proskauer* (VP)

- Diinokulasikan isolat bakteri dalam kaldu VP dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 - 48 jam
- Ditambahkan 10 tetes larutan 40% KOH dan 15 tetes larutan 40% Alpha-Napthol dalam kaldu VP, dikocok tabung hingga kaldu berbuih dan didiamkan selama 30 menit
- Uji bersifat positif (+) bila pada tabung terlihat warna merah sedangkan uji bersifat negatif (-) bila pada tabung tidak memperlihatkan warna setelah penambahan reagen

Lampiran 16. Uji Motilitas

16.1 Skema Uji Motilitas

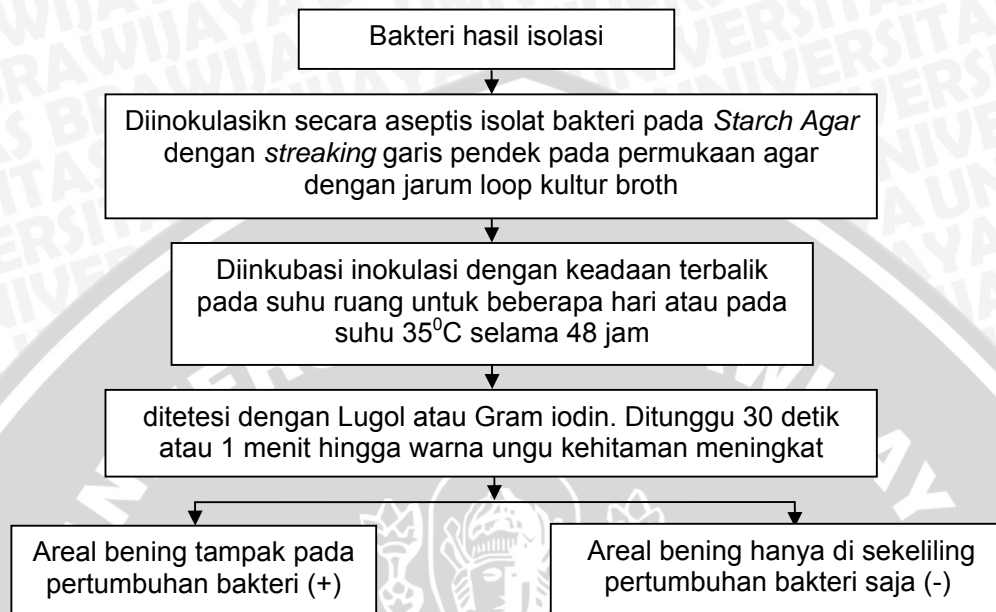


16.2 Langkah-langkah Uji Motilitas

- Koloni dari kultur bakteri diambil dengan menggunakan jarum ose lalu diletakkan pada obyek gelas yang sudah ditetesi dengan 1 tetes NaCl fisiologis
- Ditutup dengan *cover glass* dan di atasnya ditetesi dengan satu tetes minyak emersi
- Dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x

Lampiran 17. Uji Hidrolisis Zat Tepung

17.1 Skema Uji Hidrolisis Zat Tepung

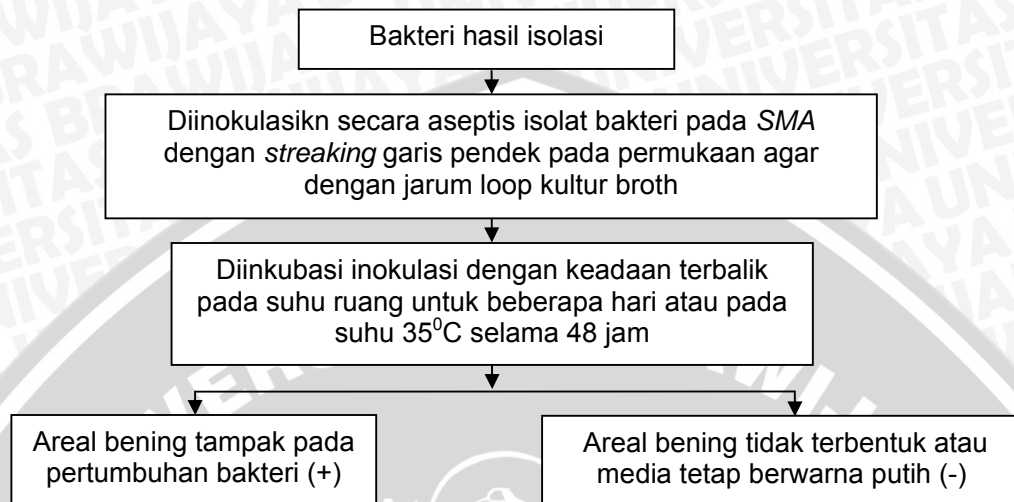


17.2 Langkah-langkah Uji Hidrolisis Zat Tepung

- Disiapkan media *Starch Agar*
- Diinokulasikn secara aseptis isolat bakteri pada *Starch Agar* dengan *streaking* garis pendek pada permukaan agar dengan jarum loop kultur broth
- Diinkubasi cawan inokulasi dengan keadaan terbalik pada suhu ruang untuk beberapa hari atau pada suhu 35°C selama 48 jam
- Setelah diinkubasi, permukaan agar ditetesi dengan Lugol atau Gram iodin. Ditunggu 30 detik hingga 1 menit hingga warna ungu kehitaman meningkat yang mengindikasikan keberadaan pati pada agar
- Hasil tes positif hidrolisis pati jika areal bening tampak pada pertumbuhan bakteri, namun bila areal bening hanya di sekeliling pertumbuhan maka hasil uji adalah negatif.

Lampiran 18. Uji Hidrolisis Kasein

18.1 Skema kerja Uji Hidrolisis Kasein

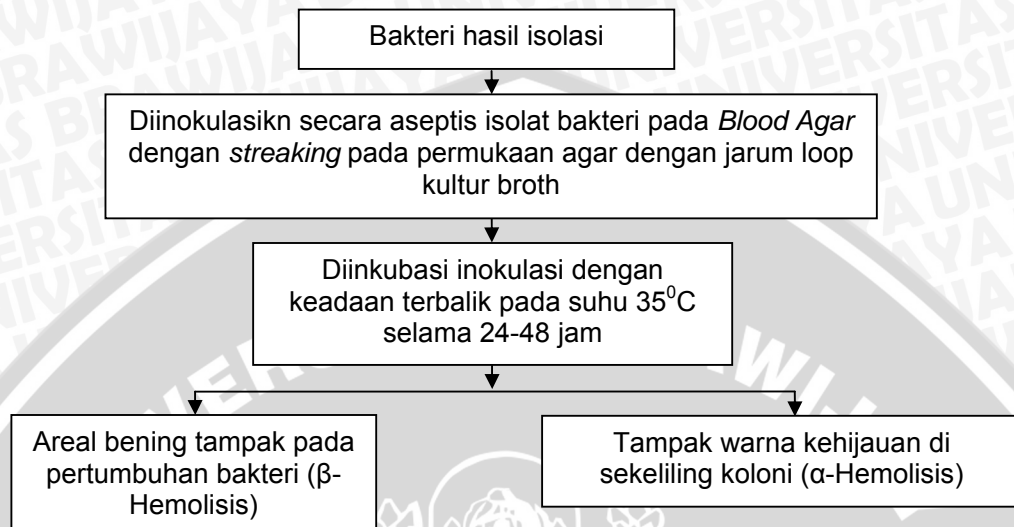


18.2 Langkah-langkah Uji Hidrolisis Kasein

- Disiapkan media *Skim Milk Agar* (SMA) steril
- Diinokulasikn secara aseptis isolat bakteri pada SMA dengan *streaking* garis pendek pada permukaan agar dengan jarum loop kultur broth
- Diinkubasi cawan inokulasi dengan keadaan terbalik pada suhu ruang untuk beberapa hari atau pada suhu 35°C selama 48 jam
- Hasil tes positif hidrolisis kasein jika areal bening tampak pada pertumbuhan bakteri, namun bila areal bening tidak nampak maka hasil uji adalah negatif.

Lampiran 19. Uji Beta-Hemolisa

19.1 Skema Uji Beta-hemolisa



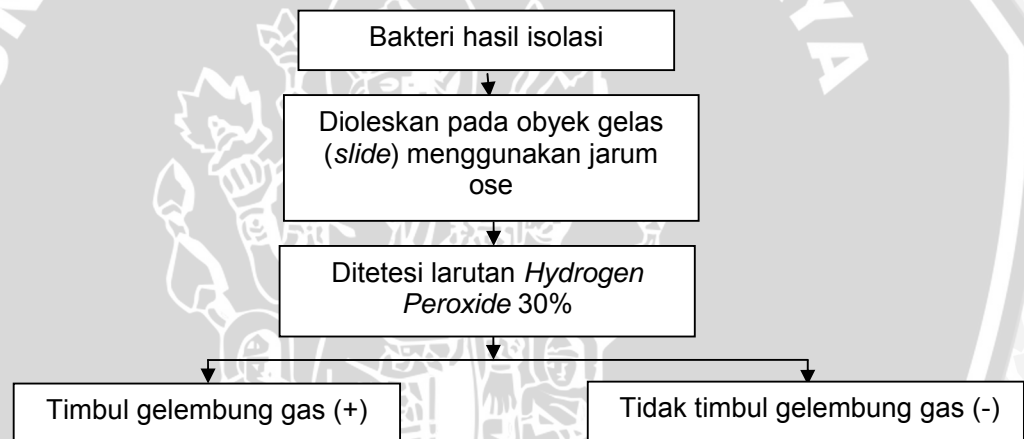
19.2 Langkah-langkah Uji Beta-hemolisa

- Disiapkan media *Blood Agar* steril
- Diinokulasikan secara aseptis isolat bakteri pada *Blood Agar* dengan *streaking* pada permukaan agar dengan jarum loop kultur broth. Ini akan mengisolasi koloni individu dari contoh bakteri campuran
- Diinkubasi cawan inokulasi dengan keadaan terbalik pada suhu 35°C selama 24-48 jam
- Diuji cawan untuk reaksi hemolitik, untuk pembacaan yang akurat, diamati bagian yang terang dari belakang.
- Berikan masing-masing media berbeda sebagai berikut:
 - a) Phenylethyl alkohol agar : *E.coli*, *S.aureus*, dan *E.faecalis*
 - b) Crystal violet agar : *E.coli*, *S.aureus*, dan *E.faecalis*
 - c) 7,5% natrium klorida agar : *S.aureus*, *S.epidermis*, dan *E.coli*

- d) Manitol garam agar : *S.aureus*, *S.epedermis*, *Sterptococcus var.* Lancefield Grup E dan *E.coli*.
 - e) MacConkey agar dan eosin-methylen agar biru : *E.coli*, *E.aerogenes*, *S.typhimurium*, dan *S.aureus*
 - f) Agar darah : *E. Faecalis*, *S.mitis*, dan *var streptokokus*: Lancifield Group E.
- Diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 sampai 72 jam dalam posisi miring

Lampiran 20. Uji Katalase

20.1 Skema Uji Katalase

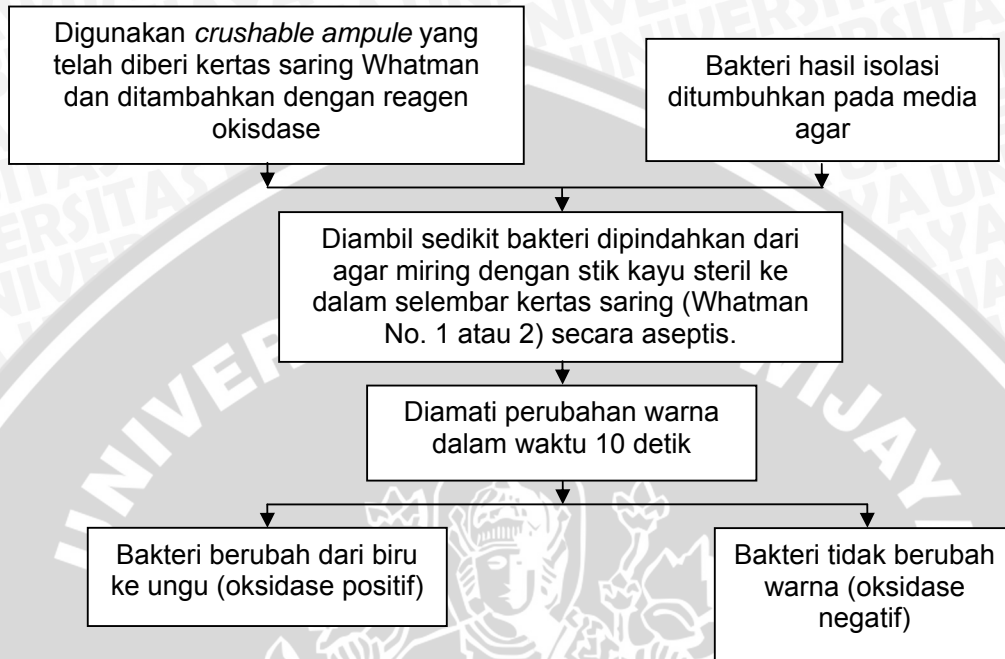


20.2 Langkah-langkah Uji Katalase

- Dioleskan bakteri isolat pada obyek gelas (*slide*) dengan menggunakan jarum ose
- Diteteskan larutan *Hydrogen Peroxide* 30% pada daerah yang telah diolesi bakteri
- Apabila setelah tetesan *Hydrogen Peroxide* timbul gelembung gas menunjukkan terjadi pelepasan oksigen (+) jika tidak timbul gelembung gas maka menunjukkan tidak terjadi pelepasan oksigen (-)

Lampiran 21. Uji Oksidase

21.1 Skema Uji oksidase



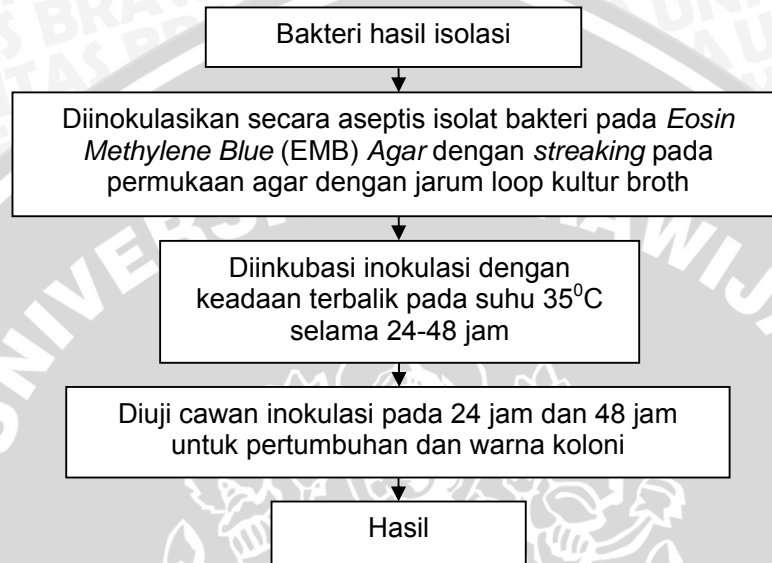
21.2 Langkah-langkah Uji oksidase

- Isolat bakteri ditumbuhkan pada cawan agar
- Digunakan *crushable ampule* yang telah diberi kertas saring Whatman dan ditambahkan dengan reagen oksidase
- Diambil sedikit bakteri dipindahkan dari agar miring dengan stik kayu steril ke dalam selembur kertas saring (Whatman No. 1 atau 2) secara aseptis.
- Jika dalam waktu 10 detik bakteri berubah dari biru ke ungu maka menunjukkan bahwa reaksi oksidase positif
- Jika reagen oksidasenya terserap ke dalam secarik kertas, menggunakan stik kayu steril dipindahkan dari agar ke dalam selembur kertas.

Ditambahkan sedikit aquades pada bakteri di kertas. Diamati penampakan warna ungu sedikit demi sedikit pada bagian atasnya.

Lampiran 22. Uji Methylene Blue

22.1 Skema Uji Methylene Blue

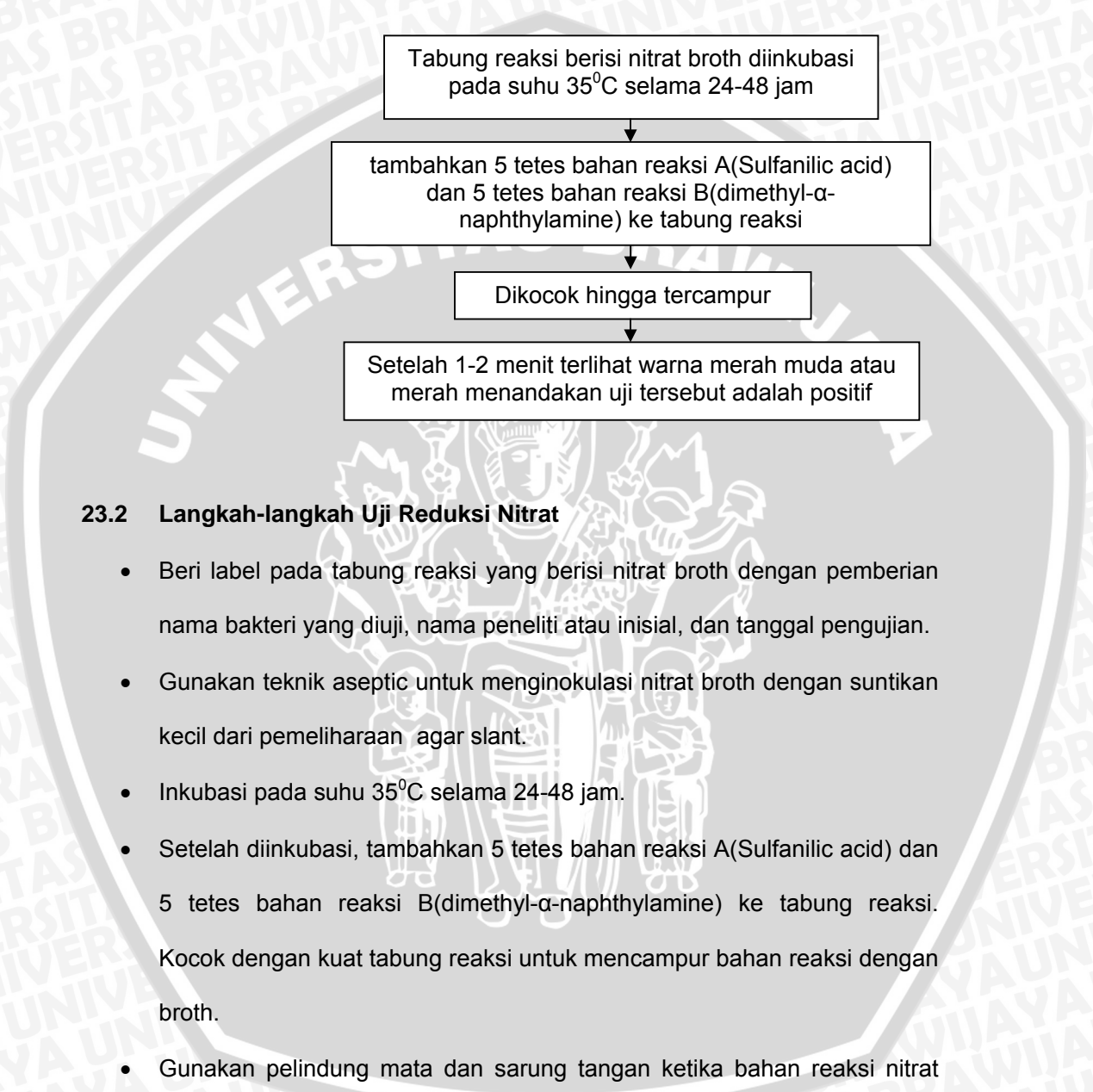


22.2 Langkah-langkah Uji Methylene Blue

- Disiapkan media *Eosin Methylene Blue* (EMB) Agar
- Diinokulasikan secara aseptis isolat bakteri pada *Eosin Methylene Blue* (EMB) Agar dengan *streaking* pada permukaan agar dengan jarum loop kultur broth. Ini akan mengisolasi koloni individu dari contoh bakteri campuran
- Diinkubasi cawan inokulasi dengan keadaan terbalik pada suhu 35°C selama 24-48 jam
- Diuji cawan inokulasi pada 24 jam dan 48 jam untuk pertumbuhan dan warna koloni

Lampiran 23. Uji Reduksi Nitrat

23.1 Skema kerja Uji Reduksi Nitrat



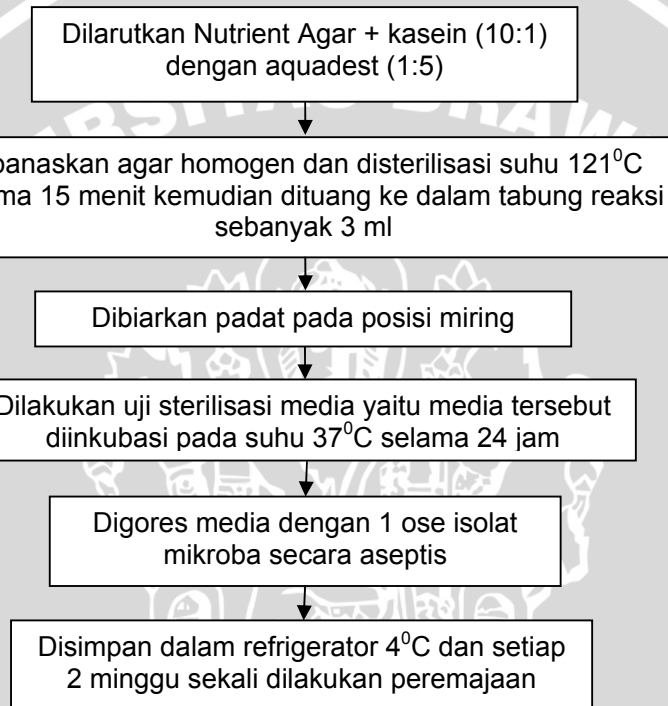
23.2 Langkah-langkah Uji Reduksi Nitrat

- Beri label pada tabung reaksi yang berisi nitrat broth dengan pemberian nama bakteri yang diuji, nama peneliti atau inisial, dan tanggal pengujian.
- Gunakan teknik aseptik untuk menginokulasi nitrat broth dengan suntikan kecil dari pemeliharaan agar slant.
- Inkubasi pada suhu 35°C selama 24-48 jam.
- Setelah diinkubasi, tambahkan 5 tetes bahan reaksi A(Sulfanilic acid) dan 5 tetes bahan reaksi B(dimethyl-α-naphthylamine) ke tabung reaksi. Kocok dengan kuat tabung reaksi untuk mencampur bahan reaksi dengan broth.
- Gunakan pelindung mata dan sarung tangan ketika bahan reaksi nitrat ditambahkan. Jika terlihat warna merah muda atau merah setelah 1-2 menit, tes tersebut adalah positif untuk reduksi nitrat.

- Jika tidak ada perubahan warna tambahkan sedikit zinc ke dalam tabung reaksi. Apabila tidak terlihat perubahan warna setelah 10 menit, tes reduksi nitrat adalah negatif.

Lampiran 24. Skema pembuatan kultur stok isolat

24.1 Skema pembuatan kultur stok isolat



24.2 Langkah-langkah Pembuatan Kultur Stok Isolat

- Dilutkan Nutrien Agar + Kasein (10:1) dengan aquadest (1:5)
- Dipanaskan dan disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit, dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak 3 ml dan dibiarkan padat pada posisi miring
- Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
- Digores media dengan 1 ose isolat secara aseptis

- Disimpan dalam refrigerator 4°C dan setiap 2 minggu sekali dilakukan peremajaan

