



ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ENDOFIT MANGROVE *Sonneratia alba* PENGHASIL ENZIM GELATINASE DARI PANTAI SENDANG BIRU, MALANG, JAWA TIMUR

Asep Awaludin Prihanto^{1,2,3*}, Hanan Dwi Laksono Timur¹⁾, Aziz Abdul Jaziri^{1,2,3)},
Rahmi Nurdiani^{1,3)}, dan Ken Audia Pradarameswari^{1,3)}

¹⁾Jurusan Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya
Jl. Veteran Malang No.16, Ketawanggede, Kec. Lowokwaru, Kota Malang, Jawa Timur 65145
Telp./Fax. (0341) 553512

²⁾Pusat Studi Halal Thoyib, Gedung Layanan Bersama Universitas Brawijaya
Jl. MT.Haryono, Ketawanggede, Kec. Lowokwaru, Kota Malang, Jawa Timur 65145

³⁾BIO-SEAFOOD Research Unit, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya
Jl. Veteran Malang No.16, Ketawanggede, Kec. Lowokwaru, Kota Malang, Jawa Timur 65145

^{*}Penulis korespondensi: asep_awa@ub.ac.id

Abstrak

*Enzim gelatinase merupakan enzim yang berperan penting pada sektor industri pangan dan non pangan. Sumber dari enzim gelatinase dapat berasal dari hewan, tumbuhan dan mikroorganisme. Enzim gelatinase termasuk enzim protease dan fungsi dari enzim gelatinase sendiri adalah sebagai pengurai gelatin. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri penghasil enzim gelatinase dari endofit mangrove *Sonneratia alba* dan untuk mengetahui jenis spesies bakteri penghasil enzim gelatinase dari endofit mangrove *Sonneratia alba* dari pantai Sendang Biru. Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah deskriptif eksploratif yang dilakukan dalam dua tahapan. Tahap pertama yaitu isolasi dan skrining bakteri yang menghasilkan enzim gelatinase dari endofit mangrove *Sonneratia alba*. Tahap kedua yaitu identifikasi bakteri penghasil enzim gelatinase berdasarkan uji microbact system. Hasil skrining enzim menandakan bahwa isolat dari daun *Sonneratia alba* merupakan isolat bakteri yang mampu tumbuh dengan baik dan menghasilkan enzim gelatinase yang paling baik. Bakteri endofit daun pada uji microbact system diketahui sebagai jenis bakteri *Paenibacillus alvei* dengan hasil oksidase negatif sehingga termasuk bakteri Gram positif sehingga dilakukan dengan uji microbact 12A/E. Karakteristik bakteri mempunyai karakteristik berbentuk bulat dan berwarna ungu.*

Kata kunci: *gelatinase, enzim, Sonneratia alba, Malang, halal*

Abstract

*Isolation and Identification endophytic bacteria Mangrove *Sonneratia alba* gelatinase enzyme Producer From The Beach Sendang Biru, Malang, East Java. Gelatinase enzyme is an enzyme that plays an important role in the food and non-food industries. The source of the gelatinase enzyme can come from animals, plants and microorganisms. Gelatinase enzymes include protease enzymes and the function of the enzyme gelatinase itself is to decompose gelatin. This study aims to obtain an enzyme that produces gelatinase from mangrove endophytes *Sonneratia alba* and to determine the*

type of bacteria that produces gelatinase enzymes from mangrove endophytes Sonneratia alba from Sendang Biru beach. The research method used in this research is explorative descriptive which is carried out in two stages. The first stage is isolation and filtering of bacteria that produce enzyme gelatinase from mangrove endophytes Sonneratia alba. The second stage is the identification of bacteria that produce gelatinase enzymes based on microbial system tests. The results of enzyme examination showed that isolates from Sonneratia alba leaves were bacterial isolates that could grow well and produce the best gelatinase enzyme. Leaf endophytic bacteria in the microbact system test are known as Paenibacillus alvei bacteria with negative oxidase results so that they are included as Gram positive bacteria so that it is carried out by microbial test 12A / E. Characteristics of bacteria have characteristics of round and purple.

Kata kunci: gelatinase, enzim, *Sonneratia alba*, Malang, halal

PENDAHULUAN

Enzim adalah molekul protein kompleks yang dihasilkan oleh sel hidup dan bekerja sebagai katalisator dalam berbagai proses kimia di dalam tubuh. Reaksi yang tidak dikatalisis kerap kali memberikan hasil produk yang tidak spesifik, tetapi reaksi yang dikatalisis enzim akan menghasilkan produk spesifik tergantung dari spesifik substrat yang diberikan (Soeka *et al.*, 2011).

Contoh dari aplikasi enzim dalam bidang pengolahan pangan adalah hidrolisat gelatin. Hidrolisat gelatin adalah hasil gelatin yang diproses secara kimia, pemanasan, atau biokimia (Scriber dan Herbert, 2007). Gelatin memiliki kandungan asam amino gelatin yang terdiri dari glisin 26-34%, prolin 10-18%, hidroksiprolin 7-15%, alanin 8-11%, arginin 8-9%, asam aspartat 6-7% dan asam glutamat 10-12% (Ulfah, 2011). Enzim masih jarang digunakan dalam pembuatan hidrolisat gelatin, sehingga perlu adanya sebuah penelitian tentang kemampuan enzim dalam menghidrolisis gelatin. Salah satu jenis enzim yakni enzim protease, di mana salah satu contohnya adalah enzim gelatinase.

Enzim gelatinase termasuk enzim protease. Fungsi dari enzim gelatinase yaitu sebagai enzim yang menguraikan gelatin (Indah, 2004). Gelatin pada pangan berfungsi sebagai pengatur keseimbangan, pengembang, pembentuk gel, pengental, dll (GMIA, 2012). Enzim gelatinase juga dapat digunakan oleh organisme melintasi selaput sel. Bakteri tertentu yang dapat memproduksi gelatinase yaitu *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, dan *Serratia marcescens* (Balan *et al.*, 2012).

Sumber enzim gelatinase dapat berasal dari hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme. Menurut Smith dan Goodner (1958), bakteri penghasil gelatinase dapat menghidrolisis gelatin menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti asam amino. Beberapa genus bakteri yang diketahui dapat menghasilkan enzim gelatinase yaitu *Micrococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium*, *Salmonella*, *Vibrio comma*, *Chromobacterium violaceum*, *Staphylococcus aureus* dan *Proteus*. Salah satunya,

enzim gelatinase dapat ditemukan dari endofit mangrove.

Mikroba endofit adalah mikroba yang hidup di dalam jaringan tumbuhan serta mampu membentuk suatu koloni dalam jaringan tumbuhan tanpa memberikan efek negatif pada inangnya (Kasi *et al.*, 2015). Endofit mangrove merupakan sumber mikroba yang memiliki potensi besar menghasilkan metabolit sekunder. Mikroba endofit mempunyai ukuran mikroskopis yang dapat hidup dalam jaringan tanaman, akar, batang dan daun. dalam proses pengambilan nutrisi tumbuhan sangat mikroba endofit sangat berperan penting (Chanway, 1996). Endofit mangrove sebagian besar belum dimanfaatkan secara maksimal. Ekosistem pesisir merupakan gabungan dari ekosistem perairan dan daratan yang banyak menyediakan jenis mikroorganisme (Katili, 2009).

Beberapa penelitian terhadap tumbuhan armangrove, diketahui bahwa tumbuhan ini merupakan bahan alami yang mengandung senyawa bioaktif seperti: saponin, tanin, flavonoid, diterpenoid, oktacosil alkohol yang aktif sebagai bahan antimikroba (Nursal *et al.*, 1998). Dari beberapa penelitian tersebut, spesies *Sonneratia alba* juga termasuk dari tumbuhan mangrove yang menghasilkan tanin. Tanin merupakan suatu nama deskriptif umum untuk satu grup substansi fenolik polimer yang mampu menyamak kulit atau mempresipitasi gelatin, suatu sifat yang dikenal sebagai astringensi. Tanin berperan sebagai astringensia yang dapat mempresipitasikan protein karena mempunyai afinitas yang tinggi terhadap molekul protein untuk membentuk kompleks enzim-substrat (Booth dan McDonald, 1982). Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi lebih lanjut terhadap endofit mangrove *Sonneratia alba* yang mengasilkan enzim gelatinase dari daerah pantai.

METODE PENELITIAN

Peralatan yang digunakan untuk penelitian penapisan endofit mangrove adalah sebagai berikut: pengaduk magnet (*stirer*), pinset, pisau steril, spatula bahan, timbangan digital, gelas ukur 100ml, beaker

glass 500ml, erlenmeyer 250ml, autoklaf, inkubator, pH-meter, bunsen, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet volume, pipet serologis, bola hisap, nampan, jarum loop, jarum ose, corong kaca, botol kaca, sprayer, *washing bottle*, kompor, *Laminar Air Flow*, panci dan lemari pendingin. Bahan yang digunakan antara lain, sampel mangrove *Sonneratia alba* (akar, batang dan daun), aquades, *yeast extract*, pepton, NaCl, agar bakteriologi, media gelatin (pepton, *beef extract* dan gelatin), spirtus, benang kasur, kapas, aluminium foil, kertas label dan *plastic wrap*.

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah deskriptif eksploratif yang dilakukan dalam dua tahapan. Tahap pertama yaitu isolasi dan skrining bakteri yang menghasilkan enzim gelatinase dari endofit mangrove *Sonneratia alba*. Tahap kedua yaitu identifikasi bakteri penghasil enzim gelatinase berdasarkan uji *microbact system*. Hasil penelitian dipaparkan secara deskriptif eksploratif berdasarkan tahapan-tahapan penelitian yang dilakukan.

Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel yang berasal dari endofit mangrove jenis *Sonneratia alba* yaitu akar, batang dan daun yang berasal dari pantai Sendang Biru Malang Jawa Timur. Selanjutnya sampel dimasukkan dalam masing-masing plastik yang berbeda yang sudah diberi label kemudian dimasukkan dalam wadah *sterofoam* dan diberi es batu dan ditutup rapat, dengan suhu 4°C sehingga selama perjalanan dari pantai hingga ke Laboratorium Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang sampel masih dalam keadaan segar.

Isolasi Bakteri Endofit Mangrove

Pembuatan Media LBA (Luria Bertani Agar)

Siapkan erlenmeyer 250ml, kemudian masukkan aquades 50ml dan bahan 0,5 gram *yeast extract*, 1 gram pepton, 1 gram NaCl, 1,5 gram agar dan homogenkan dengan *magnetic stirrer*, setelah homogen kemudian tambahkan 50ml aquades dan homogenkan kembali. Hal tersebut bertujuan agar media yang dibuat homogen dan tidak menggumpal pada dasar erlenmeyer. Kemudian media yang sudah di homogenkan ditutup kapas dan dilapisi lagi dengan aluminium foil dan di sterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm (Kurniasari, 2005).

Penanaman Sampel pada Media LBA

Pada tahapan penanaman sampel hal pertama yang dilakukan adalah mempersiapkan LAF (*Laminar Air Flow*) yang sudah disinari UV selama kurang lebih 30 menit agar kondisi LAF lebih aseptis. Setelah LAF siap digunakan media LBA (*Luria Bertani Agar*) dan alat-alat yang sudah selesai di sterilisasi di letakkan pada LAF. Media dibiarkan hingga hangat kuku sehingga tidak terlalu panas dan tidak terlalu dingin

karena ketika media tersebut dingin maka akan cepat menggejel sehingga tidak dapat di tuang pada cawan petri, setelah media hangat kuku media dituang pada cawan petri yang masing-masing untuk ke tiga cawan ±20ml kemudian dibiarkan sampai menggejel.

Pada preparasi sampel, sampel yang digunakan adalah tanaman mangrove jenis *Sonneratia alba* bagian akar, batang dan daun. Tanaman mangrove dibersihkan dan dipotong kecil-kecil ±1,5cmx1,5cm, masing-masing sampel sebanyak 5 potong dan dicuci menggunakan air untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada sampel. Kemudian rendam potongan sampel pada wadah yang berisi etanol 70% selama 20 detik. Lalu potongan sampel yang sudah direndam etanol 70% dikeringkan dengan menggunakan tissue steril. Kemudian potongan sampel diletakkan pada permukaan media LBA pada cawan petri yang sudah menggejel, letakkan sampel secara hati-hati dengan menggunakan pinset steril. Isolasi dilakukan pada LAF (*Laminar Air Flow*), yang bertujuan untuk pengkondisian aseptis kemudian disimpan selama 24 jam dengan suhu 37°C di dalam inkubator (Prihanto *et al.*, 2011).

Isolasi Bakteri

Pada tahap isolasi bakteri ambil cawan petri yang sudah diinkubasi, kemudian ambil bakteri yang berkoloni baik pada media LBA. Setelah itu dilakukan isolasi pada masing-masing sampel bakteri dengan metode *streak kuadran* pada media LBA yang baru, goresan pada media dilakukan 3 kali dengan membentuk pola zig-zag. Jarum ose digunakan untuk menggores isolat kemudian goreskan secara zig-zag pada media baru dibagian pertama. Kemudian jarum ose difiksasi pada bunsen dan digunakan untuk menggores sisi kedua setelah jarum ose ditempelkan pada sisi pertama. Begitu pula pada goresan ketiga, diteruskan dari goresan kedua. Sehingga di dapatkan koloni yang tumbuh secara terpisah dari koloni lain atau disebut dengan isolat murni. Setelah selesai cawan dibungkus dengan plastik wrap untuk meminimalisir adanya kontaminasi dari luar. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Pelczar dan Chan, 2005).

Inokulasi pada Agar Miring

Isolat murni yang tumbuh pada media LBA secara *streak kuadran*, dilakukan inokulasi pada tabung reaksi yang berisi media LB berbentuk agar miring. Inokulasi dilakukan dengan cara jarum ose difiksasi pada Bunsen kemudian ditempel pada isolat murni dan digores secara zig-zag pada agar miring kemudian tabung reaksi ditutup dengan plastik wrap yang bertujuan untuk meminimalisir adanya kontaminasi dari luar kemudian diinkubasi selama 24 jam. Penggunaan agar miring yaitu untuk mempermudah penggoresan isolat koloni. Dilakukan dengan cara memiringkan media yang bertujuan untuk memperluas permukaan pada media yang ditumbuhi oleh koloni. Selain itu, memudahkan peneliti untuk

melihat hasil dari penanaman bakteri tersebut. (Damayanti dan Ika, 2010)

Skrining Bakteri Penghasil Enzim Gelatinase

Untuk skrining bakteri penghasil gelatinase dilakukan dengan cara menyiapkan bahan media gelatin berupa *nutrient* gelatin yaitu *beef extract* 3g/liter, pepton 5g/liter, gelatin 120g/liter dengan pelarut 40ml aquades untuk 3 tabung reaksi, kemudian *nutrient* dan aquades dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Setelah itu panaskan media di hot plate dan diaduk dengan spatula agar homogen dan tunggu media sampai mendidih. Kemudian media *nutrient* gelatin dimasukan ke tiap masing-masing tabung reaksi sebanyak \pm 10ml, tabung reaksi ditutup dengan kapas dan aluminium foil, lalu diikat dengan tali agar tidak berantakan. Setelah itu disterilisasi selama 15 menit dengan suhu 121°C dengan tekanan 1 atm. Kemudian dilakukan pengambilan bakteri dari kultur murni menggunakan jarum loop, lalu dimasukkan kedalam media *nutrient* gelatin pada bagian tengah media cair. Inokulasi dilakukan di *Laminar Air Flow*. Bakteri yang sudah diinokulasi ke media gelatin disimpan di dalam etalase dengan suhu 27°C selama \pm 3 hari. Setelah ditunggu selama \pm 3-7 hari amati dengan cara tabung reaksi yang berisi isolat bakteri di simpan ke dalam lemari es dengan suhu 4°C.

Identifikasi Mikroorganisme dengan *Microbact* 12A/E-24E

Pewarnaan Gram

Uji pewarnaan gram dilakukan untuk mengetahui bentuk sel bakteri serta membedakan gram positif dan gram negatif. Prosedur pewarnaan gram adalah: diambil sedikit isolat bakteri kemudian ambil 1 ose Nafis steri 0,9% dan dihomogenkan di atas *object glass*, kemudian difiksasi sampai kering. Kemudian ditetesi kristal violet yang berfungsi sebagai pewarna primer dan didiamkan selama 30 menit kemudian dibilas dengan aquades, kemudian ditetesi iodin didiamkan selama 30 dan dibilas dengan aquades, selanjutnya ditetesi dengan aseton alkohol dan didiamkan tidak boleh lebih dari 7 detik kemudian dibilas dengan aquades dan terakhir ditetesi safranin, ketika ditetesi aseton alkohol, bakteri gram negatif akan melunturkan kristal violet dan mengikat safranin, diamkan selama 30 detik kemudian dibilas dengan aquades selanjutnya gram yang telah terwarnai diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x (Lay, 1994).

Uji *Microbact* system

Identifikasi bakteri juga dapat dilakukan dengan menggunakan *microbact* system. Untuk pengujian bakteri gram positif bisa digunakan GNB 12B, sedangkan GNB 12A diabaikan. Untuk uji bakteri gram negatif menggunakan 1 set yaitu GNB 12A/B/E 24E. Cara menggunakan *microbact* system yang pertama dilakukan adalah melakukan uji oksidasi untuk menentukan jenis *microbact* system yang

digunakan, isolat bakteri yang akan diidentifikasi diambil sedikit dengan menggunakan jarum ose, kemudian ditempatkan pada kertas oksidase (*Bactident Oxidase Kit*) dan diamati perubahan warnanya selama 60 detik, apabila timbul warna ungu menunjukkan oksidase positif, maka harus memakai *microbact* MB-12A + MB-12B atau *microbact* 24E. Apabila tidak berwarna menunjukkan oksidasi negatif. Maka bisa memakai *microbact* MB-12A saja atau bisa juga MB 12A+MB 24E (Oxoid, 2013).

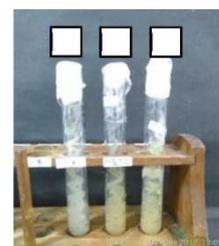
HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri dari Mangrove

Penelitian ini mendapatkan hasil bakteri yang diisolasi dari endofit (akar, batang dan daun) mangrove jenis *Sonneratia alba* yang dapat tumbuh dan berkembang dengan baik pada media uji LBA (*Luria Bertani Agar*). Bakteri yang tumbuh dapat dilihat pada Gambar 1. Kemudian koloni bakteri dimurnikan dengan metode *streak plate* secara kuadran pada media LBA. *Streak plate* secara kuadran bertujuan untuk mendapatkan bakteri yang murni atau terpisah koloninya. Bakteri yang tumbuh pada *streak plate* dapat dilihat pada Lampiran 4. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Pelczar dan Chan (1986), *streak kuadran* bertujuan untuk mendapatkan suatu biakan murni tanpa adanya kontaminasi dari mikroorganisme yang lain yang tidak diinginkan. Isolat yang terdapat pada cawan kemudian dipindahkan pada agar miring. Hal tersebut dilakukan bertujuan untuk menyimpan isolat bakteri sehingga dapat digunakan dalam jangka waktu yang lama. Peremajaan dilakukan secara berkala. Peremajaan bertujuan untuk mengaktifasi isolat bakteri dan mengoptimalkan pertumbuhan bakteri tersebut. Isolat bakteri pada agar miring dapat dilihat pada Gambar 2. Pengamatan morfologi makroskopik koloni bakteri endofit dilakukan dengan mengamati karakteristik berupa: bentuk, tepi, elevasi dan warna. Hasil pengamatan morfologi bakteri endofit dicantumkan pada Tabel 1.



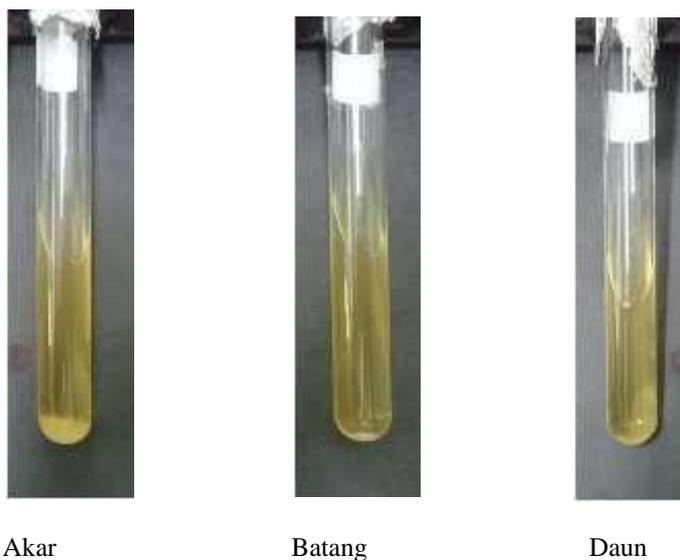
- a : Akar *S. alba* dari Sendang Biru
 b : Batang *S. alba* dari Sendang Biru
 c : Daun *S. alba* dari Sendang Biru



Gambar 2. Isolat Bakteri

Tabel 1. Karakteristik Morfologi Bakteri Endofit pada Mangrove *Sonneratia alba*

No	Isolat	Bentuk	Tepi	elevasi	Warna	Pertumbuhan Agar Miring	Keterangan
1	A.SASB	Bulat	Halus	Cembung	Putih Susu	<i>Spreading</i>	Tidak Berlendir
2	B.SASB	<i>Irregular</i>	Tidak Rata	Cembung	Putih Kekuningan	<i>Spreading</i>	Tidak Berlendir
3	C.SASB	Bulat	Tidak Rata	Cembung	Putih Kekuningan	<i>Spreading</i>	Tidak Berlendir



Gambar 3. Hasil Pengamatan Gelatinase A.SASB (akar); B.SASB (batang); D.SASB (daun)

Tabel 2. Isolat Bakteri Penghasil Gelatinase

No	Kode	Pertumbuhan pada medium skrining
1.	A.SASB	++ (2ml)
2.	B.SASB	+ (1ml)
3.	D.SASB	+++ (3ml)

Keterangan: (+): Aktivitas enzim gelatinase sedikit (1ml); (++) : Aktivitas enzim gelatinase banyak (2ml); (+++): Aktivitas enzim gelatinase banyak sekali (3ml)

Skrining Bakteri Penghasil Gelatinase

Sebanyak 3 isolat sudah diisolasi dari endofit mangrove *Sonneratia alba*. selanjutnya masing-masing isolat tersebut diinokulasikan pada media skrining gelatinase dengan cara melakukan uji gelatinase. Media ini berfungsi untuk penapisan atau skrining bakteri yang dapat menghasilkan enzim gelatinase. Apabila isolat bakteri ini positif (+) gelatinase maka akan terjadi perubahan dengan cairnya mediagelatin yang menghasilkan enzim gelatinase, adapun hasil pengamatan gelatinase dapat dilihat pada Gambar 11. Sedangkan untuk pengamatan pertumbuhannya dapat dilihat pada Tabel 5.

Dari hasil pengujian uji gelatinase, kami menggunakan ± 10 ml pada setiap tabung reaksi dan didapatkan hasil bahwa pada masa inkubasi selama ± 3 hari yang mempunyai tingkat kecairan yang banyak sekali (3ml) dengan sudut kemiringan 45°C yaitu pada daun dari mangrove *Sonneratia alba* dengan kode D.SASB. Sedangkan untuk kode A.SASB yaitu kode untuk batang dari mangrove *Sonneratia alba* memiliki tingkatan kecairan banyak saja (2ml) dengan sudut kemiringan 45°C. Dan untuk tingkat kecairan yang paling sedikit (1ml) dengan sudut kemiringan 45°C yaitu pada kode B.SASB yaitu kode batang dari mangrove *Sonneratia alba*. Sehingga

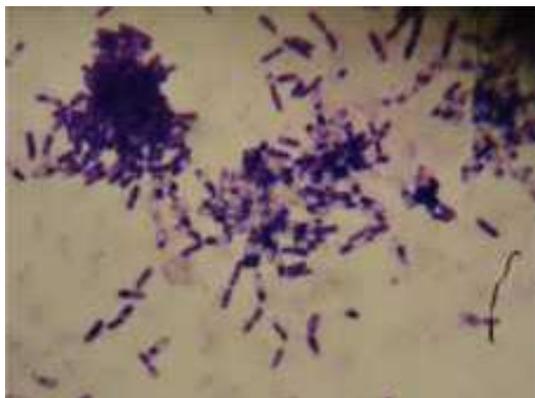
didapatkan urutan aktivitas hasil gelatinase yang paling banyak yaitu kode D.SASB (daun), banyak A.SASB (akar), sedikit B.SASB (batang). Dari tabel diatas bahwa tabung D.SASB (daun) dapat digunakan untuk identifikasi mikroorganisme dengan uji *microbact*.

Identifikasi Mikroorganisme

Identifikasi Pewarnaan Gram

Berdasarkan hasil uji pewarnaan gram pada isolat D.SASB termasuk bakteri gram positif. Setelah diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x karakteristik berbentuk basil dan berwarna ungu. Uji pewarnaan gram dilakukan untuk mengetahui sel bakteri dari pewarnaan dan bentuknya. Sel bakteri berwarna ungu berarti bakteri tersebut termasuk ke dalam bakteri gram positif, bakteri yang mengikat kompleks zat warna kristal ungu untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 4.

Bakteri gram positif mempunyai kandungan lipid yang rendah yaitu hanya sebesar 1- 4 %. Apabila dibandingkan dengan bakteri gram negatif (11 – 22 %). Bakteri gram positif juga hanya memiliki satu lapis membran peptidoglikan yang tebal. Membran peptidoglikan ini mudah larut oleh etanol (Pelczar dan Chan, 1986).



Gambar 4. Hasil Pewarnaan Gram Isolat D.SASB

Microbact System

Setelah dilakukan uji pewarnaan gram dan diketahui bahwa isolat bakteri merupakan jenis bakteri gram negatif, maka dilakukan tahap identifikasi bakteri dengan menggunakan *microbact system*, sebelum dilakukan uji *microbact system* dilakukan uji oksidase terlebih dahulu, apabila uji oksidase yang telah dilakukan hasilnya positif maka menggunakan *microbact 24E*, dan apabila hasil dari uji oksidase tersebut negatif maka menggunakan *microbact 12E* (Murtiningsih, 1997)

Hasil bakteri dari endofit daun mangrove *Sonneratia alba*, bahwa bakteri tersebut memiliki uji oksidase negatif, sehingga pada uji *microbact system* ini menggunakan *microbact 212A/E*. pada uji tersebut akan dilakukan uji meliputi uji motilitas, oksidase, spora, nitrat, lysine, ornithin, H₂S, glukosa, manitol,

xylosa, ONPG, indole, V-P, sitrat, TDA, gelatin, moalonat, inositol, rhamnosa, sukrosa, lactose, arabinosa, adonitol, raffinosa, salicin, arginin, katalase, koagulase, hemolisa, starch hydrolysis, casein hydrolysis. Dengan hasil identifikasi yang menyebutkan bahwa bakteri dari endofit akar mangrove *Sonneratia alba* adalah spesies *Paenibacillus alvei*.

Spora

Pada uji spora isolat D.SASB hasilnya negatif (tidak berspora), tidak sesuai dengan penelitian Cohen *et. al.*, (2000) dan Djorjevic *et. al.*, (2000) hasilnya positif, *Paenibacillus alvei* memiliki spora. Spora merupakan mekanisme pertahanan diri dari mikroorganisme lain. Dinding spora pada bakteri bersifat impermeabel, tetapi zat-zat warna dapat diserap ke dalamnya dengan jalan pemanasan preparat. Sifat impermeabel ini mencegah dekolonisasi spora oleh alkohol bila diperlakukan dalam waktu yang sama seperti pada dekolonisasi sel-sel vegetatif (Irianto, 2006). Lapisan pada luar spora merupakan penahan yang baik terhadap bahan kimia, sehingga spora sukar untuk diwarnai. Spora pada bakteri dapat diwarnai dengan dipanaskan. Pemanasan menyebabkan lapisan luar spora mengembang, sehingga zat warna dapat masuk (Lay, 1994).

Oksidase

Pada uji oksidase isolat D.SASB hasilnya negatif, tidak sesuai dengan penelitian Cohen *et. al.*, (2000) dan Djorjevic *et. al.*, (2000) hasilnya positif, *Paenibacillus alvei* menghasilkan oksidase ditandai dengan berubahnya sumbu yang telah berisi kit menjadi warna biru hal ini menandakan adanya enzim oksidase pada bakteri. Menurut Jawetz *et al.* (2008), beberapa organisme menghasilkan enzim oksidase yang berperan dalam mengkatalisis proses oksidasi dan reduksi elektron.

Motilitas

Pada uji motilitas isolat D.SASB hasilnya negatif, tidak sesuai dengan penelitian Cohen *et. al.*, (2000) dan Djorjevic *et. al.*, (2000) hasilnya positif, *Paenibacillus alvei* bergerak dengan berkerumun dan migrasi kolektif kelompok bakteri dan vortisitas seperti *P. vortex*. Menurut Pelczar dan Chan (1986), pengujian terhadap motilitas bakteri untuk mengetahui ada tidaknya pergerakan sel tersebut.

Nitrat

Pada uji nitrat isolat D.SASB hasilnya negatif, sesuai dengan penelitian Cohen *et. al.*, (2000) dan Djorjevic *et. al.*, (2000) hasilnya negatif, *Paenibacillus alvei* dapat mengubah nitrat menjadi nitrit. Nitrat merupakan unsur yang mudah sekali terbawa air dan masuk ke saluran air, sungai, air tanah. Nitrat dapat diubah menjadi nitrit oleh bakteri (Yuliasuti, 2006).

Lysin

Pada uji *lysin* isolat D.SASB hasilnya positif, sesuai dengan dengan penelitian Cohen *et. al.*, (2000) dan Djorjevic *et. al.*, (2000) hasilnya positif, *Paenibacillus alvei* dapat mengubah sumur *test kit* dari ungu menjadi kuning dan kembali ke ungu. Lysin adalah suatu asam diamino monokarboksilat. Lysin dapat memberikan amino kepada asam amino lain, tetapi tidak dapat dibentuk lisin kembali artinya tidak dapat terjadi proses reaminasi setelah lisin mengalami reaksi deaminasi (Poedjiadi, 1994).

Ornithin

Pada uji Ornithin isolat D.SASB hasilnya negatif, tetapi pada penelitian Cohen *et. al.*, (2000) dan Djorjevic *et. al.*, (2000) tidak dilakukan uji ornithin, Uji ornithin bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mengurai ornitin (asam amino) menjadi amino. Hasil positif jika media berwarna ungu dan hasil negatif jika warna berubah menjadi kuning atau kekuningan (Usman, 2015).

H₂S

Pada uji H₂S isolat D.SASB hasilnya negatif, tetapi pada penelitian Cohen *et. al.*, (2000) dan Djorjevic *et. al.*, (2000) tidak dilakukan uji H₂S. Bakteri yang menghasilkan desulfurase yang diinokulasikan pada media yang kaya sistein akan membentuk H₂S serta menghasilkan senyawa FeS yang berwarna hitam (Lay, 1994).

ONPG

Pada uji ONPG isolat D.SASB hasilnya positif, tidak sesuai dengan penelitian Cohen *et. al.*, (2000) pada penelitiannya tidak diuji dan sesuai dengan penelitian Djorjevic *et. al.*, (2000) hasilnya positif. Enzim β-galaktosidase dapat menghidrolisis ONPG (o-nitrophenyl-galactopyranoside) (Arrizal *et al.*, 2013).

Indol

Pada uji indol isolat D.SASB hasilnya positif, sesuai dengan penelitian Cohen *et. al.*, (2000) dan Djorjevic *et. al.*, (2000) hasilnya positif. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya cincin warna merah pada garis pemisah, sedangkan tidak terbentuknya cincin merah antara media dan reagen menunjukkan hasil negatif. Hasil positif pada uji indol menunjukkan bahwa bakteri mengandung enzim triptofanase yang merupakan katalis pengurai gugus indol yang terkandung dalam asam amino triptofan (Ulfa *et al.*, 2016).

Urease

Pada uji urease isolat D.SASB hasilnya positif, tetapi tidak sesuai dengan penelitian Cohen *et. al.*, (2000) pada penelitiannya tidak diuji dan sesuai dengan penelitian Djorjevic *et. al.*, (2000) hasilnya positif, *Paenibacillus alvei* dapat menghasilkan enzim urease. Uji urease bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri mengubah urea menjadi amoniak. Hasil positif

ditunjukkan dengan adanya perubahan warna media dari warna kuning menjadi merah muda (Ulfa *et al.*, 2016).

V-P (Voges Proskauer)

Pada uji V-P D.SASB hasilnya positif, sesuai dengan penelitian Cohen *et. al.*, (2000) dan Djorjevic *et. al.*, (2000) hasilnya positif, VP adalah tes yang digunakan untuk mendeteksi asetoin dalam kultur cair bakteri. Uji ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam membentuk asetil metil karbinol (asetoin) dari hasil fermentasi glukosa. Setelah diinkubasi, pada media ditambahkan α naphthol 5% dan KOH 40% Jika setelah ditambahkan α naphthol 5% dan KOH 40% terjadi perubahan warna media menjadi merah, berarti bakteri dapat membentuk asetoin, sedangkan jika hasil negatif maka tidak terjadi perubahan warna media. (Ulfa *et al.*, 2016).

Sitrat

Pada uji sitrat isolat D.SASB hasilnya positif, tidak sesuai dengan penelitian Cohen *et. al.*, (2000), hasilnya negatif dan sesuai dengan penelitian Djorjevic *et. al.*, (2000), hasilnya positif. Pengujian ini bertujuan untuk melihat kemampuan bakteri dalam menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Hasil positif akan ditunjukkan dengan adanya perubahan warna media dari hijau menjadi biru. Hal ini disebabkan karena penggunaan sitrat oleh bakteri menyebabkan asam menghilang dari biakkan sehingga terjadi peningkatan pH dan mengubah warna media dari hijau menjadi biru.

TDA (Tryptophan Deaminase)

Pada uji TDA isolat D.SASB hasilnya negatif, tetapi pada penelitian Cohen *et. al.*, (2000) dan Djorjevic *et. al.*, (2000), tidak dilakukan uji TDA. Bakteri tidak memiliki enzim *tryptophan deaminase*, sehingga tidak dapat membentuk asam *indolepyruvate* dari triptofan yang menghasilkan warna coklat dengan adanya *ion ferric* dari *TDA reagent*, ini merupakan suatu reaksi negatif (Arrizal *et al.*, 2013).

Fermentasi gula – gula

Isolat D.SASB hasilnya positif pada glukosa, rhamnosa, xylosa, dan arabinosa. Hasil negatif pada manitol, inositol, malonat, sukrosa, laktosa, adonitol tidak sesuai dengan penelitian Cohen *et. al.*, (2000), pada penelitiannya tidak diuji dan sesuai dengan penelitian Djorjevic *et. al.*, (2000), hasilnya positif pada glukosa, *Paenibacillus alvei* dapat mendegradasi karbohidrat menjadi glukosa. Umumnya bakteri menggunakan sumber karbon yang paling sederhana untuk difermentasikan. Tidak tersedianya sumber gula sederhananya membuat bakteri memanfaatkan sumber gula yang lebih kompleks untuk difermentasikan (Yousef dan Clastrom, 2003)

Gelatin

Pada uji gelatin isolat D.SASB hasilnya positif, sesuai dengan penelitian Cohen *et. al.*, (2000) dan Djorjevic *et. al.*, (2000), hasilnya positif, *Paenibacillus alvei* dapat menghidrolisis gelatin. Gelatin akan terurai oleh mikrobia yang mensintesis enzim proteolisis. Larutan gelatin bersifat cair pada suhu ruang atau suhu kamar dan padat apabila berada di dalam refrigerator, apabila gelatin sudah dihidrolisis oleh mikroba maka akan tetap bersifat cair (Hadioetomo, 1993).

Salicin

Pada uji salicin isolat D.SASB hasilnya negatif, tidak sesuai dengan penelitian Cohen *et. al.*, (2000) dan Djorjevic *et. al.*, (2000), hasilnya positif. Isolat tersebut tidak dapat menghidrolisis asam amino salicin. Salicin sebagai sumber energi, kemampuan bakteri untuk memfermentasi galaktosa dan mannose, serta kemampuan bakteri untuk tumbuh pada media yang mengandung NaCl 6 % (Nitimulyo, 2005).

Arginin

Pada uji arginin isolat D.SASB hasilnya negatif, sesuai dengan penelitian Cohen *et. al.*, (2000) dan Djorjevic *et. al.*, (2000), hasilnya positif. Isolat tersebut tidak dapat menghidrolisis asam amino arginin. Arginin termasuk asam amino non esensial kelompok dua atau kadang disebut sebagai asam amino semi esensial dengan rumus kimia $C_6H_{14}O_2N_4$. Di samping berfungsi dalam sintesis protein dan perantara siklus urea, arginin merupakan substrat pembentukan NO dan sintesis fosfokreatin, juga sebagai prekursor glutamat, prolin, dan putresin melalui pembentukan ornitin. Arginin merupakan salah satu komponen penting dalam regulasi fungsi makrofag sebagai antibakteri dan antitumor. Arginin merupakan sumber NO yang mempunyai aktifitas antimikroba, karena bersifat toksik terhadap bakteri (Sukmanityas, 2003).

Katalase

Pada uji katalase isolat D.SASB hasilnya negatif, sesuai dengan penelitian Cohen *et. al.*, (2000), hasilnya negatif tetapi tidak sesuai dengan penelitian Djorjevic *et. al.*, (2000), hasilnya positif, *Paenibacillus alvei* dapat menghasilkan katalase. Katalase adalah enzim yang mengkatalisasikan penguraian hidrogen 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 (Lay, 1994).

Koagulase

Pada uji koagulase isolat D.SASB hasilnya negatif, tidak sesuai dengan penelitian Cohen *et. al.*, (2000) dan Djorjevic *et. al.*, (2000), tidak diuji. Isolat tersebut tidak menghasilkan enzim koagulase. Enzim koagulase adalah suatu enzim yang dapat menggumpalkan plasma yang mengandung oksalat

atau sitrat. Enzim koagulase berikatan dengan protrombin yang terdapat dalam plasma, bersama-sama keduanya menjadi aktif secara enzimatik dan mengubah fibrinogen menjadi fibrin (Jawetz *et al.*, 2008).

Hemolisa

Pada uji hemolisa isolat D.SASB hasilnya beta, tidak sesuai dengan penelitian Cohen *et. al.*, (2000) dan Djorjevic *et. al.*, (2000), tidak diuji. Hasil dari pengujian karakter hemolisis diketahui bahwa menunjukkan reaksi lisis yang bersifat β -hemolisis (Nawangsih *et al.*, 2004).

Starch Hidrolysis

Pada uji nitrat isolat D.SASB hasilnya positif, sesuai dengan penelitian Cohen *et. al.*, (2000) dan Djorjevic *et. al.*, (2000), hasilnya positif, *Paenibacillus alvei* dapat menghidrolisis pati. Pada hidrolisis pati, enzim yang berperan adalah α -amilase yang bekerja memutuskan ikatan dengan konfigurasi α pada pati. Hidrolisis pati oleh enzim α -amilase terbagi dalam dua jalur, yaitu hidrolisis amilosa dan hidrolisis amilopektin (Wahyuni *et al.*, 2004).

Casein Hydrolysis

Pada uji nitrat isolat D.SASB hasilnya positif, sesuai dengan penelitian Cohen *et. al.*, (2000), dan tidak sesuai dengan penelitian Djorjevic *et. al.*, (2000), tidak diuji. *Paenibacillus alvei* dapat menghidrolisis kasein. Penguraian asam amino kasein oleh enzim protease yang dihasilkan bakteri proteolitik terjadi karena adanya aktivitas protease yang memutuskan ikatan peptida dari kasein dalam susu skim (Lay, 1994). Dari uji-uji diatas bahwa isolat D.SASB merupakan spesies hal ini terdapat kesamaan sesuai dengan penelitian Cohen *et. al.*, (2000), *P. alvei* adalah bakteri motil. Membentuk spora, bakteri dapat tumbuh di bawah kondisi aerobik atau anaerobik (anaerob fakultatif). Sifat tambahan *P. alvei* Adalah pembengkakan sporangium, yang terletak di terminal atau daerah subterminal; Mereka memberikan hasil positif pada reaksi VP dan pH 4.6 -5,2 dalam kaldu VP, bakteri tersebut dapat menghidrolisis pati dan kasein. Serta diperkuat dengan penelitian Djorjevic *et. al.*, (2000), *P. alvei* memberikan hasil positif pada uji dibawah ini adalah salicin, ribosa, adonitol, galaktosa, glukosa, mannose, N-acetylglucosamine, amigdalin, arbutin, selobiosa, melibiose, sukrosa, , raffinosa, starch, katalase, indol dan gentiobiosa.

Paenibacillus alvei

Klasifikasi *Paenibacillus alvei* menurut Ash *et al.* (1994), sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Order	: Bacillales
Family	: Paenibacillaceae
Genus	: Paenibacillus
Species	: <i>Paenibacillus alvei</i>

Menurut Cohen *et al.*, (2000), *Paenibacillus alvei* adalah bakteri motil yang membentuk spora. Bakteri tersebut memberikan hasil yang bervariasi pada uji gram. Bakteri dapat tumbuh di bawah kondisi aerob atau anaerob (anaerob fakultatif), dapat tumbuh pada suhu sedang (mesofil, tidak tumbuh pada suhu >45°C) dan dalam konsentrasi garam sedang (tidak tumbuh dalam 7% NaCl). Sifat tambahan *P. alvei* adalah: pembengkakan sporangium, yang terletak di

terminal atau daerah subterminal; Mereka memberikan hasil positif pada reaksi VP dan pH 4,6 -5,2 dalam media VP, dapat menghidrolisis Pati dan kasein.

P. alvei memberikan hasil positif pada uji dibawah ini adalah spora, motilitas, lysine, glukosa, ONPG, indole, V-P, gelatin, malonat, katalase, *starch hydrolysis* dan *casein hydrolysis et. al.*, (Cohen, 2000). Sedangkan menurut Djorjevic *et al.*, (2000), *P. alvei* memberikan hasil positif pada uji dibawah ini adalah salicin, ribosa, adonitol, galaktosa, glukosa, mannose, *N-acetylglucosamine*, amigdalin, arbutin, selobiosa, melibiose, sukrosa, raffinosa, *starch* dan gentiobiosa.

P. alvei merupakan bakteri non patogen. Bakteri ini berguna sebagai agen biokontrol alami pada bahan pangan, jadi aman digunakan untuk keperluan produksi enzim dalam industri pangan atau medis. Belum terdapat penelitian dan laporan bahwa *P. Alvei* mengasilkan enzim gelatinase

Berdasarkan hasil *microbat system* pada isolat D.SASB didapatkan hasil pada Tabel 4

Tabel 4. Hasil *Microbat System* Isolat D.SASB

Uji Biokimia	Isolat D.SASB	Djorjevic <i>et al.</i> , (2000)	Cohen <i>et al.</i> , (2000)
Spora	-	+	+
Oksidase	-	+	-
Motilitas	-	+	+
Nitrat	-	-	-
Lysin	+	+	+
Ornithin	-	Tidak diuji	Tidak diuji
H ₂ S	-	Tidak diuji	Tidak diuji
Glukosa	+	+	+
Manitol	-	Tidak diuji	Tidak diuji
Xylosa	+	-	Tidak diuji
ONPG	+	Tidak diuji	+
Indole	+	+	+
Urease	-	+	Tidak diuji
V-P	+	+	+
Sitrat	-	+	-
TDA	-	Tidak diuji	-
Gelatin	+	Tidak diuji	+
Malonat	-	Tidak diuji	+
Inositol	-	Tidak diuji	-
Rhamnosa	+	-	Tidak diuji
Sukrosa	-	+	Tidak diuji
Lactosa	-	-	Tidak diuji
Arabinosa	+	-	Tidak diuji
Adonitol	-	+	Tidak diuji
Raffinosa	-	+	Tidak diuji
Salicin	-	+	Tidak diuji
Arginin	-	Tidak diuji	-
Katalase	-	+	+
Koagulase	-	-	Tidak diuji
Hemolisa	Beta	Tidak diuji	Tidak diuji
Uji Sensitive	TDK	Tidak diuji	Tidak diuji
Starch hydrolysis	+	+	+
Casein hydrolysis	+	Tidak diuji	+

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini didapatkan bakteri pada endofit tumbuh dengan baik dan dapat menghasilkan enzim gelatinase yang diisolasi dari endofit mangrove *Sonneratia alba* Pantai Sendang Biru, Malang, dari ketiga isolat (A.SASB akar, B.SASB batang, dan D.SASB daun), isolat dengan kode D.SASB daun, mempunyai aktivitas gelatinase paling tinggi dengan konsentrasi cairnya lebih banyak dibandingkan dengan isolat A.SASB akar dan B.SASB batang,

isolat dengan kode D.SASB diuji *microbact* sytem tipe 12A/E mendapatkan hasil uji oksidase negatif dan gelatinase positif serta pewarnaan gram positif. Hal ini menandakan bakteri tersebut termasuk gram positif. Hasil dari uji *microbact* 12 A/E adalah bakteri *Paenibacillus alvei* memiliki bentuk sel *coccus*, warna koloni putih kekuningan, diameter koloni 2,37, tepi koloni tidak rata dan elevasi koloni cembung

DAFTAR PUSTAKA

- Arrizal, S., F. Rachmadiarti, dan Yuliani. 2013. Identifikasi Rhizobakteri pada Semanggi (*Marsilea crenata Presl.*) yang Terpapar Logam Berat Timbal (Pb). *Lentera Bio.* 2 (1): 165-169.
- Ash, C., Priest, F. G. Dan Collins, M. D. 1994. *Paenibacillus* gen. nov. and *Paenibacillus polymyxa* comb. nov. In Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 44 (55): 513-515.
- Balan S. S., R. Nethaji, S. Sankar and S. Jayalakshmi. 2012. Production Of Gelatinase Enzyme From *Bacillus* spp Isolated From The Sediment Sample Of Porto Novo Coastal Sites. *Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine.* S1811-S1816.
- Cohen., I, I. G. Ron, E. Ben-Jacob. 2000. From Branching to Nebula Patterning During Colonial Development of The *Paenibacillus alvei* bacteria. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications.* 286: 321-336.
- Djordjevic, S. P. W. A. Forbes, L. A. Smith, And M. A. H. 2000. Genetic and Biochemical Diversity among Isolates of *Paenibacillus alvei* Cultured from Australian Honeybee (*Apis mellifera*) Colonies. *American Society for Microbiology.* 66 (33): 1098-1106
- Gelatin Manufacturers Institute of America.* 2012. *Gelatin Handbook.* Nitta Gelatin Canada, Inc. Canada.
- Hadioetomo, R. S. 1985. Mikrobiologi Dasar-dasar Praktik. Gramedia. Jakarta.
- Hadioetomo, R. S. 1993. Mikrobiologi Dasar dalam Praktek. Gramedia : Jakarta
- Indah , M. 2004. Enzim. Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara: Medan.
- Irianto. K. 2006. Mikrobiologi. Yrama Widya. Bandung.
- Jawetz, E., L. Melnick, E. A. Adelberg. 2007. Mikrobiologi Kedokteran. Salemba Medika. Surabaya.
- Kasi, Y. A., Posangi, J., Wowor, M., Bara, R. 2015. Uji Efek Antibakteri Jamur Endofit Daun Mangrove *Avicennia marina* terhadap Bakteri Uji *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae*. *E-journal Biomedik Unsrat* 3(1): 112-117.
- Katili. 2009. Struktur dan Fungsi Protein Kolagen. *Jurnal Pelangi.* Vol.2(5): 19-25.
- Kurniasari, R. M. 2005. Pengaruh Logam Berat terhadap Pertumbuhan Mikroorganisme Pendegradari Minyak Diesel. [Skripsi]. Bogor: IPB.
- Lay, B.W. 1994. Analisis Mikroba Di Laboratorium. Rajawali Pers. Jakarta.
- Nawangsih, A. A., Tita, W., dan Anisa Y. 2014. Kelimpahan Bakteri Rizosfer Pada Sistem Pht-Biointensif Serta Kemampuan Antagonismenya Terhadap *Sclerotium Rolfsii* Pada Kedelai. *J. HPT Tropika.* 14(2): 110-120.
- Nursal, K. F., Asyari, S., T. D. Sasanti., Imaculata, M. 2006. Formulasi dan Uji Keamanan serta Aktivitas Krim Pati Beras dan Pati Jagung sebagai Tabir Surya. *Majalah Formasi Indonesia,* 3 Nomor. 2.
- Oxoid. 2003. Manual Identification System *Microbact* Gram Negative 12A, 12B, 12E 24E. www.oxoid.com/pdf/uk/M-bact-Gram-Neg.pdf. Diakses Pada tanggal 20 November 2017 pukul 18.15.
- Pelczar, M.J. and E. C. S. Chan. 1986. Dasar- Dasar Mikrobiologi. UI Press. Jakarta.
- Pelczar, M.J. and E. C. S. Chan 2005. Dasar-Dasar Mikrobiologi 1. UI Press. Jakarta.
- Prihanto, A. A., M. Firdaus dan R. Nurdiani. 2011. Endophytic Fungi Isolated from Mangrove (*Rhizophora mucronata*) and Its Antibacterial

Activity on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Food Science and Engineering*. 1: 386-389.

Poedjiadi, A. 1994. Dasar-dasar Biokimia. Universitas Indonesia. Jakarta.

Smith, H. L., dan K. Goodner. 1958. Detection of Bacterial Gelatinase by Gelatin Agar Plate Methods. *Journal of Bacteriology*. 76(6): 662-665.

Smith, J.M. and Van N., H.C. 1987. Introduction to Chemical Engineering Thermodynamics, 4th ed. McGraw-Hill Book Co. New York.

Soeka, Y, S., Sulistiani. 2011. Seleksi Karakteristik dan Identifikasi Bakteri Penghasil Kitinase yang Diisolasi dari Gunung Bromo Jawa Timur. *Jurnal Natur Indonesia*. 13(2): 155-161.

Sukmanityas, H. 2003. *Pengaruh Pemberian L-Arginin Terhadap Respon Imunitas Seluler Mencit BALB/c yang Diinokulasi Salmonella typhimurium*. [Thesis]. Program Pasca sarjana. Universitas Diponegoro. Semarang.

Ulfa, A., E. Suarsini, M. H. Irawati, dan A. Muhdhar. 2016. Isolasi dan Uji Sensitivitas Merkuri pada Bakteri dari Limbah Penambangan Emas di Sekotong Barat Kabupaten Lombok Barat. *Proceeding Biology Education Conference*. 13(1): 793-799.

Ulfah, M. 2011. Pengaruh Konsentrasi Larutan Asam Asetat dan Lama Waktu Perendaman Terhadap Sifat-Sifat Gelatin Ceker Ayam. *Agritech Journal* Vol.31(3): 161-167.

Usman, S. W. 2015. Bakteri Asosiasi Karang yang Terinfeksi Penyakit *Brown Band* (Brb) di Perairan Pulau Barranglompo Kota Makassar. [Skripsi]. Unhas. Makassar.

Wahyuni, S., Lianto, dan Khaeruni, A. 2014. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Manolitikasal Bonggol Pohon Sagu. *Jurnal Agroteknos*. 4(3): 174-179.

Yousef, A. dan C. Carlstrom. 2003. Food Microbiology a Laboratory Manual. A *John Wiley and Son Inc* .New Jersey.

Yuliasuti, S. 2006. Analisa Nitrat dalam Air dengan Menggunakan Nitrat Test Kit. *Temu Teknis Nasional Tenaga Fungsional Pertanian*. 259-260 hlm