

AKTIVITAS PROTEASE EKSTRASELULER BAKTERI YANG DIISOLASI DARI LIMBAH CAIR INDUSTRI TAHU

Wiwi Kusumasari*, Ana Indrayati, Lukito Mindi Cahyo

Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

*Email : 25195888a@mhs.setiabudi.ac.id

ABSTRAK

Limbah tahu yang dibuang ke lingkungan perairan, berdampak buruk terhadap kualitas air di sekitar tempat pembuangan limbah cair tahu. Produksi enzim industri saat ini didominasi oleh protease. Protease dalam bidang farmasi mendukung penyerapan protein di saluran pencernaan, sebagai bahan aktif kosmetik. Penelitian ini bertujuan mengisolasi, mengidentifikasi bakteri penghasil protease air limbah tahu, mengetahui kadar protein total dan indeks aktivitas enzim dari 5 isolat bakteri penghasil protease. Bakteri air limbah tahu diisolasi dengan media Skim Milk Agar dipilih 5 isolat bakteri yang menghasilkan zona bening paling lebar, karakter koloni yang berbeda, diidentifikasi uji morfologi, uji pewarnaan gram, dan uji biokimia. Lima isolat dibuat suspensi bakteri diisolasi ekstrak kasar protease dan dilakukan penetapan kadar protease dengan metode Bicinchoninic Acid, dilakukan uji aktivitas protease. Lima koloni bakteri menunjukkan koloni 1 dan koloni 2 termasuk bakteri Gram positif, koloni 3, 4 dan 5 termasuk bakteri Gram negatif. Nilai kadar protein total pada limbah cair industri tahu kelima koloni tersebut berturut-turut: 219,93; 833,267; 421,267; 81,267; dan 38,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Uji aktivitas proteolitik yang paling tinggi yaitu pada sampel 2 sebesar 2,13.

Kata kunci: Kasein, Limbah cair tahu, Protease, Indeks aktivitas enzim

ABSTRACT

Tofu waste that is discharged into the aquatic environment has a negative impact on the quality of the water around the tofu liquid waste disposal site. Industrial enzyme production is currently dominated by proteases. Proteases in the pharmaceutical field support the absorption of proteins in the digestive tract, as active cosmetic ingredients. This study aims to isolate, identify protease-producing bacteria from tofu wastewater, determine the total protein content and enzyme activity index of 5 isolates of protease-producing bacteria. Tofu wastewater bacteria were isolated with Skim Milk Agar medium. 5 bacterial isolates were selected which produced the widest clear zones, different colony characters, identified by morphological tests, gram staining tests, and biochemical tests. Five isolates were made into a bacterial suspension isolated from crude protease extract and the protease level was determined using the Bicinchoninic Acid method, and the protease activity was tested. Five bacterial colonies showed that colony 1 and colony 2 included Gram positive bacteria, colonies 3, 4 and 5 included Gram negative bacteria. The value of total protein content in the tofu industrial wastewater from the five colonies respectively: 219.93; 833,267; 421,267; 81,267; and 38.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. The highest proteolytic activity test was in sample 2 of 2.13.

Keywords: Casein, Tofu wastewater, Protease, Enzyme Activity index

PENDAHULUAN

Industri tahu selain dapat meningkatkan perekonomian masyarakat, dapat juga berdampak negatif karena terjadi pencemaran lingkungan dari limbah yang dihasilkan¹⁾.

tempat pertumbuhan bakteri karena memiliki kandungan nutrisi yang lengkap, salah satu jenis enzim yang sangat populer penggunaannya adalah enzim protease³⁾.

Limbah tahu dapat menjadi

Berdasarkan hasil uji penghasil enzim protease dari air limbah tahu,

diperoleh 2 isolat bakteri dengan morfologi berbeda, yaitu STW (*Soil Tofu Waste*) 1 dan STW (*Soil Tofu Waste*) 2⁵⁾. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri penghasil protease. Isolat bakteri murni yang didapat dikarakterisasi untuk menentukan jenis bakteri dan mengamati morfologi bakteri mulai dari bentuk, tepi, dan permukaan koloni bakteri penghasil protease ekstraseluler, serta mendapatkan kadar protein total dengan metode BCA dan mengukur diameter zona bening yang dibagi dengan diameter kertas cakram untuk mengetahui nilai indeks aktivitas enzim dari isolat bakteri penghasil protease.

METODE PENELITIAN

ALAT DAN BAHAN

Alat-alat yang digunakan meliputi cawan petri, tabung reaksi, pipet tetes, pipet volume, wadah jar steril, jarum Ose, botol steril, neraca analitik, kertas perkamen, sendok, lampu spiritus, autoklaf, inkubator, *laminar air flow*, gelas ukur, batang pengaduk, Erlenmeyer, *beaker glass*, *obyek glass*, kertas cakram, lemari pendingin, shaker, alat sentrifugasi, oven, mikropipet, mikrotip, tabung *microcentrifuge*, vortex, pinset, vial, pH meter, spidol, *magnetic stirrer*, mikroskop, jangka sorong, spektrofotometer Uv-Vis.

Bahan sampel pada penelitian ini ialah air limbah tahu yang didapat di daerah Ngemplak, Jawa Tengah. Bahan kimia dan media yaitu Gram A (pewarna kristal violet), Gram

B (Lyugol iodine), Gram C (alkohol), Gram D (pewarna safranin), *malachite green*, cat nigrosin, enzim protease, aquadest, Amonium sulfat, NaCl, NaOH, H₂O₂, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, *Bovine Serum Albumin* (BSA) dan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) pH 7.4, media *Skim Milk Agar* (SMA), *Nutrient Agar* (NA), *Brain Heart Infusion* (BHI), *Sulfide Indole Motility* (SIM), KIA (*Kliger Iron Agar*), LIA (*Lysine Iron Agar*) dan citrat.

Semua proses pengerjaan dilakukan dengan aseptis didalam ruang steril, *laminar air flow*²⁾. Media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit⁴⁾.

Pengambilan Sampel

Air limbah tahu diambil di industri tahu wilayah Ngemplak, Kabupaten Boyolali, Jawa Tengah. Air limbah tahu berwarna kuning keruh, sebanyak 300 ml sampel air diambil secara aseptis dari bagian dalam wadah penampungan limbah cair industri tahu, dimasukkan ke dalam botol steril dan diletakkan ke dalam *cool box* yang berisi *gel ice*.

Isolasi Bakteri dari Air Limbah

Tahu

Sebanyak 100 µL sampel diinokulasikan ke dalam 10 ml medium BHI dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Satu sampai dua ose koloni digoreskan pada medium SMA. Biakan diinkubasi pada suhu 37°C, 24-48 jam dan diamati terbentuknya zona bening pada tiap koloni. Bakteri diinkubasi pada suhu 37°C karena pada

suhu inilah bakteri mengalami fase pertumbuhan pada fase stasioner⁷⁾. Lima isolat bakteri dipilih dengan diameter zona bening lebar dan karakter morfologi yang berbeda tiap isolatnya. Tiap isolat dimurnikan dengan cara digoreskan pada media NA dengan sistem kuadran 4.

Identifikasi Bakteri dari Air Limbah Tahu

Uji Morfologi

Morfologi bakteri dengan pengamatan makroskopis yaitu memperhatikan bentuk koloni, permukaan koloni, dan tepi koloni pada media *Nutrient Agar* (NA).

Pewarnaan Gram

Masing-masing isolat bakteri diambil sebanyak 1-2 ose dan diletakkan pada objek kaca. Selanjutnya apusan obyek kaca ditetesi dengan Gram A \pm 1 menit, dicuci dengan air mengalir, ditetesi dengan Gram B \pm 1 menit, dan dicuci. Lalu ditetesi dengan Gram C \pm 1 menit lalu bilas, dan ditetesi lagi dengan Gram D biarkan selama \pm 1 menit lalu bilas. Amati pada kaca objek di bawah mikroskop. Bakteri dikatakan Gram-negatif apabila berwarna merah di bawah mikroskop. Bakteri dikatakan Gram-positif ketika berwarna ungu di bawah mikroskop⁸⁾.

Uji Secara Biokimia

Media SIM (*Sulfida Indol Motility*)

Kultur murni diinokulasikan ke media dengan ditusukkan lalu diinkubasi 37°C selama 18-24 jam. Positif sulfida jika medium menjadi warna hitam. Positif indole ketika

terdapat cincin warna merah sesudah reagen kovac ditambahkan, Uji motilitas positif bila terdapat pertumbuhan bakteri menyebar pada medium⁹⁾.

Media KIA (*Kliger Iron Agar*)

Kultur bakteri murni diinokulasikan ke dalam media dengan cara ditusukkan dan digores, lalu diinkubasi dengan suhu 37°C selama 18-24 jam. Bagian berwarna merah (disimbolkan sebagai K), bagian berwarna kuning (disimbolkan sebagai A), pembentukan gas (disimbolkan sebagai G +), positif sulfida jika terbentuk warna hitam dalam media (ditulis sebagai S +).

Media LIA (*Lysine Iron Agar*)

Kultur bakteri murni diinokulasi dengan cara tusukan dan goresan kemudian diinkubasi 18-24 jam pada 37°C. Berwarna coklat (dilambangkan dengan R), ungu (dilambangkan sebagai K), kuning (dilambangkan sebagai A), dan berwarna hitam (dilambangkan sebagai S +).

Media Sitrat

Kultur bakteri murni ditusuk dan digores pada media, diinkubasi pada 37°C dengan waktu 18-24 jam. Reaksi positif bila timbul warna biru¹⁰⁾.

Uji Katalase

Biakan murni bakteri diambil satu ose dan dioleskan ke atas kaca objek lalu ditetesi larutan hidrogen peroksida 3%. Reaksi positif bila gelembung gas di atas kaca objek¹¹⁾.

Uji Koagulase

Uji ini menginokulasi isolat bakteri menggunakan ose dan

menempatkan dalam 1 ml plasma kelinci yang dimasukkan pada tabung reaksi steril lalu diinkubasi dalam waktu 24 jam dengan suhu 37°C. Reaksi koagulan positif apabila adanya gumpalan seperti gel dalam tabung¹¹⁾.

Ekstraksi Enzim Isolat Bakteri

Ekstraksi enzim dengan 2% suspensi bakteri diinokulasi ke dalam 100 ml media *Brain Heart Infusion* lalu diaduk dengan *shaker*. Media diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Ekstraksi enzim disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm, suhu 4°C selama 60 menit untuk memisahkan sel dan supernatan¹²⁾. Hasil ekstraksi enzim disimpan di dalam kulkas 24 jam.

Pemurnian Parsial Ekstrak Kasar Protease

Endapan ekstrak enzim kasar dipresipitasi dengan garam amonium sulfat 80%. Campuran disimpan dalam lemari es pada suhu $\pm 4^\circ\text{C}$ selama 24 jam. Campuran berikutnya disentrifugasi pada 5000 rpm selama 60 menit pada suhu 4°C. Pelet hasil sentrifugasi ditimbang dan pelet yang diperoleh dilarutkan (diresuspensi) menggunakan 1 x PBS (*Phosphate Buffer Saline*) dengan perbandingan 1 : 2 mL PBS¹³⁾.

Penetapan Kadar Protein Total

Metode BCA (*Bicinchoninic Acid*)

Pembuatan larutan stok BSA dengan encerkan isi satu ampul Standar Albumin (BSA) ke dalam beberapa botol bersih. Setiap 1 ml ampul Standar Albumin 2,0 mg/ml cukup untuk menyiapkan satu set standar encer untuk

kedua rentang kerja yang disarankan. Selanjutnya persiapan reagen kerja dan microplate sampel terhadap rasio working reagen. Ukur absorbansi mendekati 562 nm pada pembaca pelet.

Uji Aktivitas Protease

Protease hasil isolasi dari isolat bakteri diuji aktivitas proteasenya menggunakan difusi kertas cakram. Prinsip metode difusi cakram adalah sampel yang diuji direndam dengan cakram kemudian cakram diletakkan diatas media pembedihan agar padat yang telah dituangkan supernatan tiap isolat²⁷⁾. Proses perendaman kertas cakram dilakukan ± 15 menit¹⁴⁾. Kemudian menggunakan pinset ditumbuhkan dan diinkubasi pada media SMA di suhu 37°C selama 24-48 jam. Diameter zona bening dan kertas cakram diukur dengan jangka sorong dengan satuan milimeter²⁸⁾. Pengukuran replikasi sebanyak 3 kali lalu dirata-rata. Aktivitas protease isolat bakteri ditentukan dengan menghitung Indeks Aktivitas Enzim (IAE) yaitu diameter zona bening(mm) dibagi dengan diameter kertas cakram.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Dari Air Limbah

Tahu

Isolasi bakteri dari air limbah industri tahu dilakukan secara aseptik pada media *Brain Heart Infusion* (BHI). Setelah itu, dipindah pada media *Skim Milk Agar* (SMA), untuk melihat zona bening pada masing-masing koloni.

Bakteri yang menghasilkan enzim protease akan mendegradasi protein menimbulkan zona bening di sekitar koloni pada media SMA⁵.

Lima isolat bakteri dipilih yang memiliki diameter zona bening paling lebar dan berbeda morfologi di tiap isolatnya. Koloni-koloni bakteri yang tumbuh hasil isolasi selanjutnya dimurnikan dengan metode penggoresan kuadran di media NA dan dilakukan berulang yaitu pada penelitian ini dilakukan dua kali sampai didapatkan koloni bakteri murni yang tunggal.

Identifikasi Bakteri dari air limbah industri tahu

Hasil identifikasi bakteri dengan melakukan pengamatan pada makroskopis berikut.

Tabel 1. Hasil Identifikasi Secara Makroskopis Bakteri dari Air Limbah Industri Tahu

Koloni	Bentuk	Tepi	Warna
1	Oval	Rata	Putih susu
2	Bulat	Rata	Putih susu
3	Oval tak beraturan	Berlekuk	Putih susu
4	Bulat tak beraturan	Berlekuk	Putih susu
5	Bulat	Rata	Putih susu

Tabel 2. Hasil Pewarnaan Gram Bakteri Dari Air Limbah Industri Tahu

Koloni	Bentuk	Warna	Gram
1	Batang	Ungu	Positif
2	Batang	Ungu	Positif
3	Batang	Merah	Negatif
4	Batang	Merah	Negatif
5	Batang	Merah	Negatif

Terdapatnya warna ungu pada hasil pengecatan gram menunjukkan hasil pengecatan gram positif yang terdiri dari dua lapisan yaitu peptidoglikan yang tebal dan membran dalam. Lapisan peptidoglikan inilah yang mengikat zat

warna kristal violet¹⁶. Warna merah dari hasil pewarnaan gram pada Gram negatif berkaitan pada penetesan kristal violet menyebabkan kristal ungu mewarnai seluruh permukaan sel bakteri Gram negatif.

Hasil koloni 1 dan koloni 2 memberikan hasil positif untuk uji katalase yang ditandai dengan terbentuknya gelembung gas yang menunjukkan adanya pembentukan gelembung oksigen¹⁷. Hasil uji koagulase pada koloni 1 dan koloni 2 positif, hal ini ditunjukkan dengan adanya gumpalan seperti gel pada tabung reaksi.

Tabel 3. Uji Secara Biokimia Bakteri Gram Negatif

Uji	Koloni 3	Koloni 4	Koloni 5
SIM	--+	---	---
KIA	K/A S-	K/A S-	K/A S-
LIA	R/R	R/R	R/R
Sitrat	-	-	-

Ket:

SIM (---): Tidak adanya warna hitam, tidak ada lingkaran merah, dan tidak ada pertumbuhan

SIM (--+): Tidak ada warna hitam, tidak ada lingkaran merah dan ada pertumbuhan

KIA: Lereng media merah, dasar media kuning, dan tidak ada warna hitam

LIA: Lereng media coklat dan dasar media warna coklat.

Uji SIM (*Sulfida Indol Motility*), bertujuan mengetahui pembentukan sulfida, pembentukan indol, serta motilitas bakteri. Positif sulfida jika medium menjadi warna hitam. Prinsip reduksi sulfur yaitu bakteri dapat mereduksi sulfur menjadi *hydrogen sulfide*, *hydrogen sulfide* akan bereaksi dengan zat besi (Iron) menjadi *ferric sulfide* yang mengendap berwarna hitam. Positif indole ketika terdapat cincin warna merah sesudah reagen *kovac*

ditambahkan. Uji motilitas positif bila terdapat pertumbuhan bakteri menyebar pada medium ataupun terbentuk kekaburan yang menyebar dari garis menusuk pada medium⁹⁾.

Uji KIA, bertujuan menguji fermentasi karbohidrat yaitu laktosa dan glukosa, serta sulfida. Kemampuan bakteri mengubah dekstrosa dan laktosa serta kemampuan memproduksi hidrogen sulfida merupakan dasar untuk mengetahui jenis bakteri dari pertumbuhannya dalam media ini¹⁸⁾. Hasil yang sama antara koloni 3, koloni 4 dan koloni 5 didapat dari uji KIA yaitu ketiga koloni berwarna merah pada lereng media KIA. Dasar media berwarna kuning yang artinya isolat bakteri memfermentasi karbohidrat, ketiga koloni tersebut mengubah dekstrosa dan laktosa tetapi tidak dapat memproduksi H₂S sehingga tidak terbentuk warna hitam pada media.

Uji LIA, *Lysine Iron Agar* untuk identifikasi mikroba penghasil enzim yang mampu mendeaminasi lisin dan memproduksi gas H₂S¹⁹⁾. Hasil dari ketiga koloni sama, yaitu lereng media terbentuk warna coklat dan dasar media berwarna coklat sehingga dilambangkan R/R, hal ini menunjukkan bahwa koloni 3, koloni 4 dan koloni 5 tidak mampu memecah lisin serta tidak terbentuk endapan berwarna hitam artinya tidak mampu memproduksi sulfida (H₂S).

Uji Sitrat, uji ini bertujuan mengetahui kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon.

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

Ekstraksi Enzim Isolat Bakteri

Ekstraksi enzim disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 60 menit pada suhu 4°C, masing-masing disentrifugasi dengan volume 100 ml. Sentrifugasi bertujuan mendapatkan ekstrak kasar enzim mengendapkan sel bakteri. Sentrifugasi dilakukan pada suhu 4°C untuk meminimalkan terdenaturasinya enzim selama proses isolasi agar aktivitas enzim yang ada didalamnya tidak mengalami penurunan ataupun rusak⁶⁾. Hasil supernatan dan endapan dari kelima koloni berbeda, hal ini dapat karena proses pemisahan dari sentrifugasi dengan sistem pemisahan berdasarkan ukuran dan berat molekul. Filtrat yang disentrifugasi akan menghasilkan dua bagian yaitu endapan (pelet) dan supernatan. Enzim yang diisolasi terdapat di supernatan dan endapan ekstraksi adalah kontaminan atau zat pengotor²⁰⁾.

Pemurnian Parsial Ekstrak Kasar Protease

Pemurnian parsial ekstrak kasar protease dengan prestipitasi. Prestipitasi bertujuan memisahkan enzim di dalam sel dari senyawa yang tidak diinginkan atau pengotor. Pemurnian parsial ekstrak kasar enzim pada penelitian ini menggunakan garam ammonium sulfat dengan konsentrasi 80%. Penambahan garam amonium sulfat dengan

konsentrasi tinggi karena kadar garam yang rendah meningkatkan kelarutan protein karena ion berinteraksi dengan gugus bermuatan pada permukaan protein dan mempengaruhi gaya elektrostatik kuat ²¹⁾.

Setelah disimpan semalaman dilakukan sentrifugasi pada 5000 rpm selama 1 jam pada suhu 4°C. Hasil sentrifugasi didapat yaitu pelet, lalu pelet diresuspensi menggunakan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) dengan perbandingan 1:2 mL PBS. Penambahan larutan dapar pada pemurnian protein untuk menjaga pH lingkungan, sehingga meminimalkan denaturasi dan inaktivasi protein enzim ²²⁾.

Penetapan Kadar Protein Total

Bovine Serum Albumin (BSA) adalah protein yang umum digunakan sebagai standard penetapan kadar protein. Kurva standar BSA tersebut diperoleh absorbansi yang menjadi sumbu y serta konsentrasi BSA yang menjadi sumbu x.

Tabel 4. Hasil nilai absorbansi seri konsentrasi larutan BSA (Bovine Serum Albumine)

Penelitian ini didapat kurva standar BSA menunjukkan bahwa kurva *slope* positif dengan gradien garis

Konsentrasi (µg/µL)	Absorbansi
25	0,017
125	0,096
250	0,187
500	0,316
750	0,486
1000	0,614
1500	0,915
2000	1,062

mendekati 1, yaitu $r = 0,9885$. Nilai R^2 pada gambar untuk melihat pengaruh

nilai konsentrasi terhadap nilai absorbansi. Regresi linier yang diperoleh adalah nilai $a = 0,0447$, nilai $b = 0,0005$. Sehingga, persamaan garis $y = a + bx$ dan diperoleh persamaan $y = 0,0447 + 0,0005x$.

Tabel 5. Hasil penetapan kadar protein total Metode BCA

Sampel	Kadar Protein (µg/µL)	X ± SD
1	219,93	219,93 ± 5,03
2	833,27	833,27 ± 543,90
3	421,27	421,27 ± 180,28
4	81,27	81,27 ± 16,77
5	38,60	38,60 ± 12,00

Hasil penetapan kadar protein total pada penelitian dari kelima sampel berbeda. Pengaruh konsentrasi amonium sulfat tertinggi terhadap pengendapan protein adalah semakin tinggi konsentrasi amonium sulfat yang ditambahkan, maka semakin banyak protein yang mengendap. Protein yang mengendap semakin banyak menyebabkan kadar protein semakin tinggi²³⁾.

Uji Aktivitas Protease

Pengujian aktivitas enzim protease dengan metode difusi kertas cakram yang berdiameter 6 mm. Uji aktivitas protease dengan difusi kertas cakram yang direndam oleh masing-masing koloni, lalu ditumbuhkan dan diinkubasi pada media SMA.

Pengujian aktivitas protease menggunakan media SMA sebagai sumber protein. Kadar kasein pada media ini cukup tinggi sehingga medium SMA berwarna putih kekuningan atau putih tulang.

Tabel 6. Hasil uji aktivitas protease

Koloni	Indeks Aktivitas Enzim (IAE)	Rata-rata
--------	------------------------------	-----------

	1	2	3	
1	1,96	1,98	1,97	1,97
2	2,06	2,09	2,23	2,13
3	1,95	2,11	2,24	2,10
4	1,95	1,95	1,95	1,95
5	1,95	1,96	1,96	1,96
K+	1,98	2,29	2,44	2,24
K-	-	-	-	-

Keterangan: K+ = Enzim Protease

K- = Phosphate Buffer Saline (PBS)

Bakteri proteolitik yang tumbuh pada media SMA akan membentuk zona bening disekitar koloni, karena terjadi hidrolisis kasein oleh protease yang dihasilkan bakteri proteolitik tersebut²⁴⁾. Data dari kelima tersebut yang memiliki indeks aktivitas enzim tertinggi adalah sampel kedua, hal ini merupakan nilai IAE yang paling tinggi yang mendekati dengan kontrol positif. Selanjutnya koloni 3 memiliki IAE cukup besar yaitu 2,10 mm. Koloni 1, koloni 5 dan 4 memiliki indeks aktivitas enzim yang tidak jauh berbeda dan koloni 4 merupakan indeks aktivitas enzim yang paling kecil. Kategori Indeks Proteolitik rendah yaitu jika kurang dari 2,1, kemudian kategori sedang yaitu apabila 2,1-3,1, selebihnya dikategorikan proteolitik tinggi (Ahmad dkk, 2013).

KESIMPULAN

Lima koloni bakteri menunjukkan bahwa koloni 1 dan koloni 2 termasuk bakteri golongan Gram positif, sedangkan koloni 3, koloni 4 dan koloni 5 termasuk golongan bakteri Gram negatif yang masing-masing koloni memiliki morfologi dan hasil uji biokimia yang berbeda. Nilai kadar protein total pada limbah cair industri tahu dari kelima koloni tersebut

berturut-turut yaitu 219,93; 833,267; 421,267; 81,267; dan 38,6 µg/µL. Hasil dari kelima sampel aktivitas proteolitik yang paling tinggi dan termasuk kategori sedang yaitu pada sampel 2 sebesar 2,13 dan sampel 3 sebesar 2,10 untuk sampel 1, sampel 4 dan 5 memiliki nilai indeks aktivitas enzim yang kecil, termasuk kategori rendah berturut-turut yaitu sebesar 1,97; 1,95; 1,96.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya yang diberikan, Dr. Ana Indrayati, M.Si. dan Lukito Minda Cahyo, SKG,MPH selaku dosen pembimbing, beserta seluruh staff pengajar Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Kedua orang tua, sahabat, dan semua pihak yang membantu.

DAFTAR PUSTAKA

1. Matilda, F., Biyatmoko, D., Rizali, A., dan Abdullah, A. 2016. Peningkatan Kualitas Efluen Air Limbah Industri Tahu Pada Sistem Lumpur Aktif Dengan Variasi Laju Alir Menggunakan Arang Aktif Kayu Ulin (*Eusideroxylon zwageri*). *EnviroScienteeae, Multimedia Indonesia*, Jakarta. 12(3): 207-215.
2. Febrianti, D, R, Niah, R, Novia, A, 2020, Antibakteri Kumpai Mahung (*Eupatorium inulifolium* H.B&K) terhadap *Salmonella typhi*. *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*. 3(2): 253-260).
3. Nascimento, W.C.A. and Martins, M.L.L. 2006. Studies on stability of protease from *Bacillus* sp. and its compatibility with commercial detergent, Brazilia. *Microbiol.* 37:307-311.
4. Azzahra, F, Padmasari, D, Adhiarta,

- K. 2018. Uji Aktivitas Antibakteri Dari Ekstrak Etanol Daun Kembang Sepatu (*Hibiscus rosa sinensis* L.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Streptococcus mutans*. *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*. 1(2): 243-250.
5. Ethica, S.N., Muchlissin, S.I., Saptaningtyas, R., Sabdon, A. 2018. Protease Producers Predominate Cultivable Hydrolytic Bacteria Isolated from Liquid Biomedical Waste, *Asian Journal of Chemistry*, 30(9): 2035-2038.
6. Rakhmawati, A. dan E. Yulianti. 2012. Eksplorasi Bakteri Termofilik Pasca Erupsi Merapi sebagai Penghasil Enzim Ekstraseluler, *Jurnal Penelitian Saintek*. 17(1): 1-12.
7. Niah, R. 2018. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Daun Karamunting (*Melastoma malabathricum* L.) Terhadap *Salmonella typhi*. *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*. 1(1): 113-121.
8. Volk WA. Wheeler M.F. 1988. *Mikrobiologi Dasar*, Jilid II Terjemahan Soenartomo Adisoemarto, Penerbit Erlangga. Jakarta.
9. Afrianti Rahayu, S., dan Muhammad Hidayat Gumilar, M. 2017. Uji Cemar Air Minum Masyarakat Sekitar Margahayu Raya Bandung dengan Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 4(2): 50.
10. Haryati Kristina. 2020. Pengujian Kualitas Mikrobiologi Ikan Ekor Kuning Asap Dari Pasar Youtefa Papua. *JPHPI*. 23 (3): 486-494.
11. Amaliah Zakiyah Z. 2018. Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Limbah Cair Rendaman Kacang Kedelai. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. 5(1): 253 -257.
12. Sulisyoningtyas, R. 2019. Potensi Anti Fotoaging Superoksida Dismutase (SOD) Bakteri *Bacillus cereus* secara *In Vitro* pada Sel Fibroblas 3T3 yang Dipaparkan Sinar Ultraviolet, *Skripsi*, Universitas Setia Budi, Surakarta.
13. Moon-ai, W., P. Niyomploy, R. Boonsombat, P. Sangvanich, dan A. Karnchanatat. 2012. A Superoxide Dismutase Purified from the Rhizome of *Curcuma aeruginosa* Roxb. as Inhibitor of Nitric Oxide Production in the Macrophage-like RAW 264.7 Cell Line, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 166(8): 2138-2155.
14. Tammi A. 2016. Perbandingan daya hambat ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum* walp) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara *in vitro*, *Skripsi*, Bandar Lampung: Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
15. Ethica, S.N. 2018. Bioremediasi Limbah Biomedik Cair. pp 1-158, *Deepublish Publisher*, Yogyakarta, ISBN 978-602-475-503-4.
16. Ernawati. 2010. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat pada Susu Kambing Segar, *Skripsi*, Malang: Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
17. Lay WB. 1994. Analisa Mikroba di Laboratorium, Edisi 1 Jakarta: PT.Raja Grafindo Persada.
18. Suyati. 2010. Identifikasi dan Uji Antibiotik Bakteri Gram Negatif pada Sampel Urin Penderita Infeksi Saluran Kemih (ISK), *Skripsi*, Universitas Negeri Papua Manokwari.
19. Haryani, Y., Chairitifah, dan Rustiana. 2012. Fermentasi Karbohidrat oleh *Salmonella* spp. dari Jajanan Pinggir Jalan. *Jurnal Indonesia Chemia Acta*. 3(1) :23-26.
20. Masruroh, H., Ulla, D.M., Fransisca, S.N, dan Vita, P. 2018. Analisa kadar lemak dalam susu perah sapi menggunakan gaya sentrifugasi, *METANA*. 14: 25-30.
21. Metzler, D. E. 2003. *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells*, *Academic Press, Burlington*.
22. Astuti, W. 2008. Suhu Optimum Protease dari Jahe Merah (*Zingiber officinale* Rosc), *Jurnal Kimia Mulawarman*. 5(2): 1693-5616.
23. Righetti, P. G. dan E. Boschetti, 2013, *Low-Abundance Proteome Discovery*, Elsevier Academic Press, California.
24. Soeka, Y. S. dan Sulistiani. 2014. Karakterisasi Protease *Bacillus subtilis* A1 Inacc B398 yang

- Diisolasi dari Terasi Samarinda. *Berita Biologi*. 13 (2): 203–212.
25. Ahmad, B., Nigar, S., Shah, S.S.A., Bashir, S., Ali, J., Yousaf, S., and Bangash, J.A. 2013. Isolation and Identification of Cellulose Degrading Bacteria from municipal Waste and Their Screening For Potential Antimicrobial Activity. *World Applied Sciences Journal*. 27(11): 1420-1426.
 26. Susilawati, I.O, Umami M.B.& Hesti R. 2015. Analisis Aktivitas Enzim Amilase yang Berasal dari Bakteri Tanah di Kawasan Universitas Jambi, *Prosiding, Semirata bidang MIPA BKS-PTN Barat, Universitas Tanjungpura*, 359-367.
 27. Kumalasari, E, Renita, S, Febrianti, D, R, Niah, R, 2021, Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 70% Daun Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia*, (L.) Merr) Terhadap Pertumbuhan *Candida albicans*. *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*, 4(2): 176-185.
 28. Kumalasari, E, Agustina, D, Novia, A. 2020. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia* Merr.) Terhadap *Escherichia coli*. *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*. 3(1): 75-84.