

Karakterisasi Enzim Protease Kecap Ikan Komersial

Chrisela Lumentut, Audy Denny Wuntu, Harry Steven Julius Koleangan, Rosalinda Zeniona Maarebia, Maureen Kumaunang*

*Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Sam Ratulangi*

*Corresponding author: maureenkumaunang@unsrat.ac.id

Abstrak

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui Kecap ikan merupakan produk bahan makanan hasil olahan melalui proses fermentasi yang dibuat dari ikan maupun limbah ikan. Protease merupakan enzim yang berfungsi menghidrolisis ikatan peptida menjadi oligopeptida dan asam amino. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas dan karakteristik protease dalam kecap ikan. Uji aktivitas protease dilakukan dengan menggunakan metode Anson. Karakterisasi protease dilakukan terhadap parameter suhu, pH, serta pengaruh ion logam dan pelarut organik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas protease kecap ikan adalah sebesar 5381,34 U/mL, sedangkan aktivitas spesifiknya adalah 4,99 U/mg. Suhu 80 0C menunjukkan aktivitas protease tertinggi sebesar 4981,41 U/mL. pH optimum diperoleh pada pH 6 sebesar 5381,34 U/mL. Ion logam Mn^{2+} serta pelarut organik n-heksana, mampu meningkatkan aktivitas protease. Selain itu, protease kecap ikan menunjukkan kestabilan dalam rentang suhu 30 0C sampai 80 0C sedangkan kestabilan pH ditunjukkan pada rentang pH 3 sampai pH 10.

Kata kunci : kecap ikan; protease; uji aktivitas; metode anson.

Characterization of Protease from Commercial Fish Sauce

Abstract

Fish sauce is a food product that is processed through a fermentation process made from fish and fish waste. Protease is an enzyme that functions to hydrolyze peptide bonds into oligopeptides and amino acids. The purpose of this study was to determine the activity and characteristics of proteases in fish sauce. The protease activity test was carried out using the Anson method. The protease characterization was carried out on the parameters of temperature, pH, and the effect of metal ions and organic solvents. The results showed that the protease activity of fish sauce was 5381.34 U/mL, while the specific activity was 4.99 U/mg. A temperature of 80 0C showed the highest protease activity of 4981.41 U/mL. The optimum pH was obtained at pH 6 of 5381.34 U/mL. The metal ion Mn^{2+} and the organic solvent n-hexane were able to increase protease activity. In addition, the fish sauce protease showed stability in the temperature range of 30 0C to 80 0C while the pH stability was shown in the pH range of 3 to pH 10.

Keywords : fish sauce; proteases; activity test; anson method.

PENDAHULUAN

Dua pertiga wilayah Indonesia berupa lautan, sehingga Indonesia disebut negara kepulauan. Dengan kondisi geografis ini, Indonesia memiliki potensi perikanan yang cukup besar. Sumber daya perikanan melimpah perlu adanya diversifikasi pengolahan ikan yang dapat menghasilkan nilai tambah. Ikan merupakan salah satu bagian dalam sektor perikanan yang kaya protein dan banyak dikonsumsi masyarakat karena mudah didapat dan harganya pun relatif murah. Karena sifat fisik ikan cepat mengalami pembusukan, maka perlu dilakukan pengawetan dan pengolahan, salah satunya adalah melalui proses fermentasi.

Kecap ikan merupakan produk bahan makanan hasil olahan melalui proses fermentasi yang dibuat dari ikan maupun limbah ikan. Kecap ikan berupa cairan berwarna coklat bening hasil hidrolisis dari ikan yang diberi tambahan garam. Ada beberapa kandungan yang ada dalam kecap ikan, salah satunya kandungan gizi misalnya karbohidrat, lemak, protein, mineral, vitamin, dan serat. (Husma *et al.*, 2019). Produk ini biasanya digunakan sebagai penguat rasa atau pengganti garam pada beberapa masakan, (Park *et al.*, 2000). Selain itu, kecap ikan mempunyai rasa dan bau yang khas yang diyakini merupakan hasil aktivitas protease (Peralta *et al.*, 2005).

Protease merupakan enzim yang berfungsi menghidrolisis ikatan peptida menjadi oligopeptida dan asam amino. Protease merupakan salah satu enzim industri yang paling penting dan memiliki nilai komersial mencapai 60% dari total penjualan enzim seluruh dunia serta banyak digunakan dalam industri pengolahan makanan, detergen dan farmasi (Uyar *et al.*, 2011). Protease memegang peran utama didalam banyak fungsi hayati, mulai dari tingkat sel, organ sampai organisme, yaitu dalam melangsungkan reaksi metabolisme, fungsi regulasi dan reaksi-reaksi yang menghasilkan sistem berantai untuk menjaga homeostatis normal maupun kondisi patofisiologis abnormal serta proses kematian sel terencana (Rao *et al.*, 1998).

Beberapa penelitian menunjukkan adanya aktivitas protease dari mikroorganisme yang diisolasi dari produk pangan laut terfermentasi seperti dalam terasi udang (Kumaunang *et al.*, 2019; Udomsil *et al.*, 2005), udang air tawar (Sriket *et al.*, 2011), dan pada kecap ikan (Udomsil *et al.*, 2010).

Berdasarkan uraian di atas maka peneliti tertarik untuk meneliti aktivitas dan karakteristik enzim protease dalam kecap ikan.

METODOLOGI PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 4 bulan di Laboratorium Kimia Lanjut dan Laboratorium Farmasi Lanjut Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi, Manado.

Alat dan Bahan

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang pengaduk, blender, kertas saring, erlenmeyer, gelas piala, gelas ukur, labu takar, pengaduk magnet, pH meter, pipet mikro, pipet tetes, sentrifus, sudip, tabung reaksi, termometer, timbangan digital, vortex, *water bath*, spektrofotometer UV-VIS.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kecap ikan komersial, aquades, *Bovine Serum Albumin* (BSA), buffer Na-Fosfat 0,1 M, buffer NaHCO₃-NaOH 0,1 M, *Ethylene Diamine Tetra-Acetic Acid* (EDTA), *Bovine Serum Albumin* (BSA), larutan Folin Ciocalteu, larutan kasein 0,65 %, larutan Na₂CO₃ 500 mM, NaCl, reagen Bradford, Trichloroacetic Acid (TCA) 10%, tirosin.

Prosedur Penelitian

Preparasi sampel

Sebanyak 1 mL sampel kecap ikan ditambahkan masing-masing dengan 9 mL larutan NaCl dan didiamkan selama 2 jam, setelah itu campuran disaring dengan kertas saring, kemudian disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 3000 rpm hingga terbentuk dua lapisan yaitu supernatan dan residu. Selanjutnya supernatan yang didapatkan digunakan sebagai ekstrak protease.

Ekstraksi Kulit Buah Pangi

Sebanyak 750 g kulit buah pangi diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan etanol sebanyak 1200 mL selama 3 x 24 jam. Selanjutnya disaring dan dipekatkan filtratnya dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator*. Ekstrak kental yang diperoleh dimasukkan dalam oven pada suhu 40°C selama 2 hari.

Uji Aktivitas Protease

Uji aktivitas enzim protease dilakukan dengan menggunakan metode Anson yang dimodifikasi (Cupp-Enyard, 2008). Sebanyak 65 µL larutan kasein 0,65% (b/v) dicampurkan dengan ekstrak enzim sebanyak 13 µL kemudian divortex dan diinkubasi pada temperatur ruang selama 10 menit. Ke dalam campuran ditambahkan 65 µL TCA 10% (b/v), kemudian divortex dan diinkubasi selama 20 menit, lalu divortex kembali selama 10 menit. Selanjutnya 125 µL dari campuran dipindahkan ke tabung yang baru dan ditambahkan 313 µL larutan Na₂CO₃ 500 mM dan 63 µL larutan Folin Ciocalteu 50%, kemudian divortex kembali, dan diinkubasi dalam ruang gelap selama 30 menit. Selanjutnya ditambahkan 2.500 µL akuades kemudian divortex. Larutan dibaca absorbansinya pada 660 nm. Sebagai standar digunakan tirosin dalam berbagai konsentrasi (0, 10, 20, 50 dan 100 µg/mL). Aktivitas protease (U/mL) dinyatakan dalam unit aktivitas yaitu satu unit (U) menunjukkan jumlah enzim yang dapat menghidrolisis substrat dan menghasilkan warna setara dengan 1 µmol produk tirosin setiap menit pada kondisi percobaan.

Selanjutnya aktivitas enzim protease dapat ditentukan dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Unit/mL} = (\mu\text{mol tirosin} \times \text{volume reaksi}) / (\text{volume sampel} \times \text{waktu inkubasi} \times \text{volume uji})$$

Keterangan:

Unit/mL : aktivitas enzim

Volume reaksi : volume total reaksi (enzim, kasein, TCA) (mL)

Penentuan Kadar Protein

Pembuatan kurva standar protein dilakukan dengan mengikuti metode Bradford (1976) menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai protein standar. Larutan stok protein BSA 1 mg/mL dibuat dengan mencampurkan sebanyak 0,1 g BSA dilarutkan ke dalam akuades steril sebanyak 100 mL. Konsentrasi protein BSA selanjutnya dibuat dari 0 sampai 1.000 µg/mL dari larutan stok protein BSA 1 mg/mL hingga diperoleh konsentrasi 0; 125; 250; 500; 750 dan 1.000 µg/mL. Pengukuran konsentrasi protein dilakukan dengan mengambil sebanyak 0,1 mL dari masing-masing konsentrasi standar protein BSA kemudian ditambah dengan 0,5 mL reagen Bradford. Campuran diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Selanjutnya ditambahkan 2.400 µL akuades kemudian divortex, nilai absorbansinya dibaca pada panjang gelombang 595 nm. Blanko yang digunakan adalah konsentrasi standar protein BSA 0 µg/mL (tanpa BSA). Kurva standar protein BSA diperoleh dengan menentukan hubungan konsentrasi protein BSA dengan nilai absorbansi ($\lambda=595$ nm).

Kadar protein sampel dilakukan dengan cara yang sama, yaitu sebanyak 0,1 mL ekstrak enzim ditambahkan dengan 0,5 mL reagen Bradford, diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Selanjutnya ditambahkan 2.400 µL akuades kemudian divortex dan dibaca absorbansinya pada 595 nm.

Penentuan Aktivitas Spesifik Protease

Aktivitas spesifik enzim protease (U/ μ g) ditentukan melalui perbandingan aktivitas protease dalam setiap bobot protease terhadap kadar protein (Sugioyono *et al.*, 2003).

Karakterisasi Protease

Penentuan Suhu Optimum dan Stabilitas Protease pada Berbagai suhu

Penentuan pengaruh suhu terhadap aktivitas protease ditentukan pada varietas suhu yaitu 30, 40, 50, 60, 70, dan 80 oC dengan larutan substrat kasein 0,65% (b/v). Prosedur pengujian aktivitas protease pada berbagai suhu dilakukan dengan prosedur yang sama dengan pengukuran aktivitas protease menggunakan metode Anson yang dimodifikasi.

Stabilitas protease pada berbagai suhu diukur dengan cara sebagai berikut: ekstrak enzim diinkubasi dengan larutan substrat kasein 0,65% (b/v) selama 60 menit, pada berbagai suhu (30, 40, 50, 60, 70, dan 80 oC). Setelah inkubasi, ekstrak enzim diukur aktivitasnya menggunakan metode Anson yang dimodifikasi.

Penentuan pH Optimum dan Stabilitas Protease pada Berbagai pH

Penentuan pH optimum ekstrak protease ditentukan pada kisaran pH 3-10, pada suhu 30 oC, dengan larutan substrat kasein 0,65% (b/v). Untuk mengatur pH ekstrak digunakan HCl 0,1 M dan NaOH 0,1 M. Prosedur penentuan aktivitas protease pada variasi pH dilakukan dengan prosedur yang sama dengan penentuan aktivitas protease menggunakan metode Anson yang dimodifikasi.

Stabilitas protease pada berbagai pH diukur dengan cara sebagai berikut: ekstrak enzim dengan larutan substrat kasein 0,65% (b/v) diinkubasi selama 60 menit pada berbagai pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, dan 10). Setelah inkubasi, ekstrak enzim diukur aktivitasnya menggunakan metode Anson yang dimodifikasi.

Pengaruh Ion Logam

Pengaruh ion logam terhadap aktivitas protease ditentukan dengan cara menambahkan ion logam ke dalam larutan sampel saat uji aktivitas pada suhu 30 oC dan pH 6. Larutan ion logam yang digunakan adalah 10 mM larutan Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , dan Zn^{2+} . Selanjutnya diuji aktivitasnya menggunakan metode Anson yang dimodifikasi.

Pengaruh Pelarut Organik

Pengaruh pelarut organik terhadap aktivitas protease ditentukan dengan cara menambahkan pelarut organik ke dalam larutan sampel saat uji aktivitas pada suhu 30 oC dan pH 6. Larutan yang digunakan adalah etanol, etil asetat, n-heksan, dan petroleum eter. Selanjutnya diuji aktivitasnya menggunakan metode Anson yang dimodifikasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Aktivitas

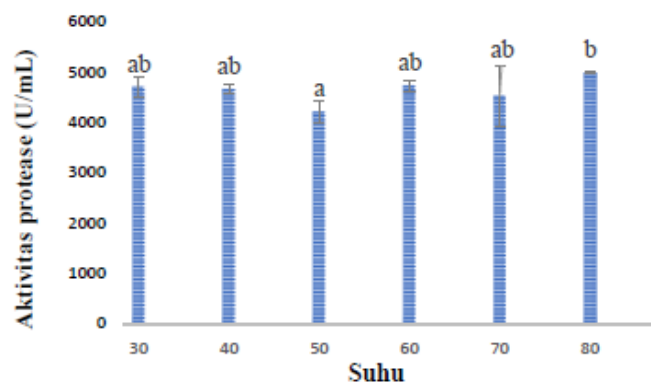
Menurut Briani *et al.*, (2014), pengukuran aktivitas protease bertujuan untuk mengetahui berapa banyak enzim protease pada kecap ikan. Hal tersebut sesuai yang dinyatakan Simanjorang *et al.*, (2012), bahwa penambahan enzim protease pada kecap ikan dapat terjadinya peningkatan kadar air oleh adanya perombakan-perombakan yang terjadi selama proses hidrolisis. Dalam penelitian uji aktivitas dan karakterisasi protease, digunakan tiga jenis kecap ikan (KL, RG, dan IM). Pada Tabel 1. dapat dilihat aktivitas protease tertinggi pada kecap ikan KL sebesar 5381,34 karena aktivitas protease tertinggi terdapat pada kecap ikan KL, maka untuk pengujian selanjutnya menggunakan kecap ikan KL.

Penentuan kadar protein dan aktivitas spesifik enzim protease pada kecap ikan

Aktivitas spesifik enzim diperoleh dengan membandingkan unit aktivitas enzim dengan kadar protein dari tiap-tiap enzim. Aktivitas spesifik menyatakan jumlah unit enzim per mg protein atau besarnya aktivitas enzim per jumlah protein yang terkandung dalam campuran enzim yang diuji. Aktivitas spesifik enzim protease yang di peroleh pada penelitian ini adalah 4,99 U/mL. Aktivitas spesifik enzim menunjukkan kemurnian suatu enzim. Semakin tinggi aktivitas spesifik enzim, maka semakin tinggi pula tingkat kemurnian enzim tersebut. Hal ini disebabkan kahilangan protein nonenzim pada beberapa tahap pemisahan yang dilalui dalam pemurnian enzim (Wijaya, 2002).

Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim protease pada kecap ikan

Uji pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim dilakukan untuk mengetahui kondisi optimum enzim dalam mendegradasi substrat. Setiap enzim memiliki aktivitas maksimum pada suhu tertentu, aktivitas enzim akan semakin meningkat dengan bertambahnya suhu sehingga suhu optimum tercapai. Kenaikan suhu di atas suhu optimum akan menyebabkan aktivitas enzim menurun (Beahaki, 2008).



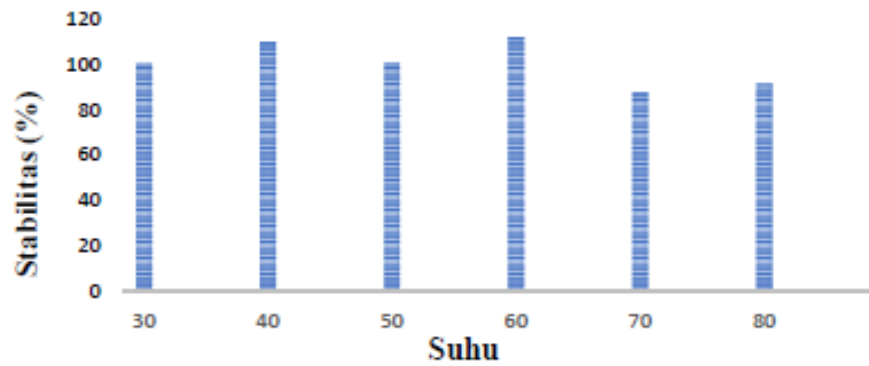
Gambar 1. Pengaruh suhu terhadap aktivitas protease pada kecap ikan

Aktivitas enzim optimum pada suhu 30 0C dengan aktivitas 4703,32 U/mL sedangkan pada suhu 40 0C sampai 50 oC terjadi penurunan, aktivitas enzim secara berurutan sebesar 4660,82 U/mL dan 4206,33 U/mL. Rendahnya aktivitas enzim pada kedua temperatur tersebut dibandingkan temperatur optimum, disebabkan rendahnya energi aktivasi yang tersedia. Temperatur lingkungan yang meningkat di sekitar enzim akan menyebabkan putusnya ikatan hidrogen, ikatan ion sehingga struktur tersier enzim berubah, yang menyebabkan struktur lipatan enzim membuka pada bagian permukaan sehingga sisi aktif enzim berubah mengakibatkan terjadi penurunan aktivitas enzim (Whitaker, 1994).

Berdasarkan Gambar 1, pada suhu 60 oC sampai 80 0C terjadi kenaikan, aktivitas enzim sebesar 4736,51 U/mL, 4525,83 U/mL, dan 4981,41 U/mL. Kenaikan temperatur yang lebih tinggi dapat merusak struktur enzim sehingga fungsi kerja enzim dapat berkurang (Pakpahan, 2009).

Stabilitas enzim protease pada berbagai suhu

Temperatur sangat erat berhubungan dengan energi aktivitas dan kestabilan enzim. Peningkatan temperatur dapat menyebabkan peningkatan kecepatan reaksi dan secara bersamaan meningkatkan kecepatan inaktivasi enzim (Stauffer, 1989).



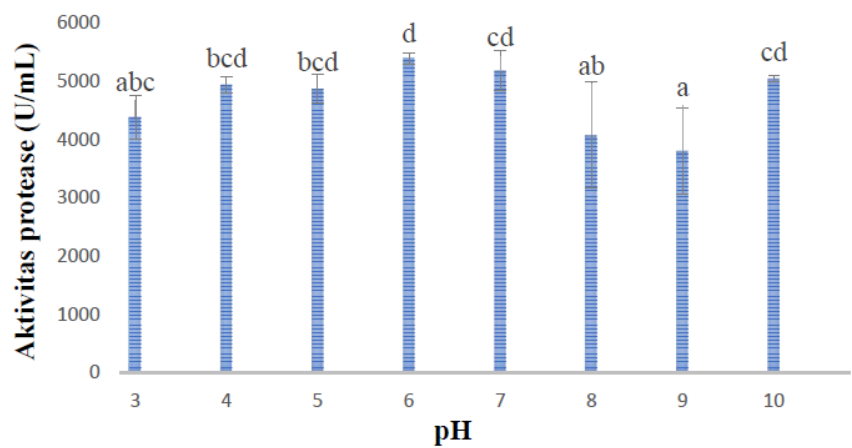
Gambar 2. Pengaruh suhu terhadap stabilitas protease

Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim protease pada kecap ikan

Pada Gambar 2 stabilitas enzim protease terhadap suhu menunjukkan bahwa protease dari kecap ikan ini relatif stabil pada berbagai suhu (30, 40, 50, 60 dan 80) hanya terjadi penurunan pada suhu 70 °C tetapi masih relatif stabil karena kestabilannya mencapai diatas 80 %. Apabila dilihat dari keadaan diatas, maka enzim protease dari kecap ikan memiliki daya tahan yang cukup tinggi terhadap panas. Menurut Naz (2002).

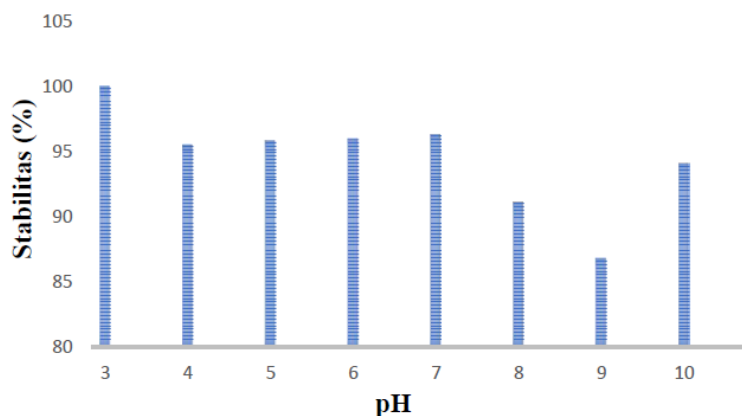
pH berpengaruh terhadap kecepatan aktivitas enzim dalam mengkatalis suatu reaksi. Hal ini disebabkan konsentrasi ion hidrogen mempengaruhi struktur dimensi enzim dan aktivitasnya. Setiap enzim memiliki pH optimum di mana pada pH tersebut struktur tiga dimensinya paling kondusif dalam mengikat substrat.

Dapat dilihat pada Gambar 3 menunjukan pH optimum 6,0 yaitu sebesar 5381,34 u/mL. Penurunan aktivitas enzim dari pH 8,0 sampai pH 9,0 sebesar 4079,69 u/mL dan 3800,45 u/mL. Menurut Mueda (2015), adanya penurunan pH disebabkan meningkatnya produksi asam organik terutama asam laktat.



Gambar 3. Pengaruh pH terhadap aktivitas protease pada kecap ikan

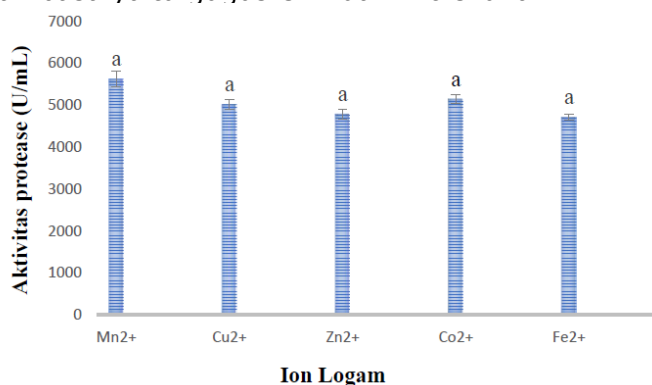
Kestabilan enzim berhubungan dengan ketahanan enzim dalam mempertahankan konformasinya terhadap kondisi lingkungan sehingga tidak merubah kedudukan sisi aktif (Lehninger, 1993). Semakin jauh pH optimum suatu enzim dari kondisi fisiologi suatu organisme, semakin kurang stabil enzim tersebut. Pada kondisi percobaan pendapat bahwa enzim lebih stabil pada pH optimumnya tidak selalu benar, karena aktivitas enzim pada kejenuhan substrat kondisi percobaan tidak sama dengan kondisi fisiologi alamiahnya. Pada Gambar 4 stabilitas enzim protease terhadap pH menunjukkan bahwa protease dari kecap ikan ini relatif stabil pada berbagai pH (3, 4, 5, 6, 7 dan 10). Dan mengalami penurunan pada pH 8 sampai 9 tetapi masih relatif stabil karena kestabilannya mencapai diatas 80 %.



Gambar 4. Pengaruh stabilitas enzim protease pada berbagai pH

Pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim protease pada kecap ikan

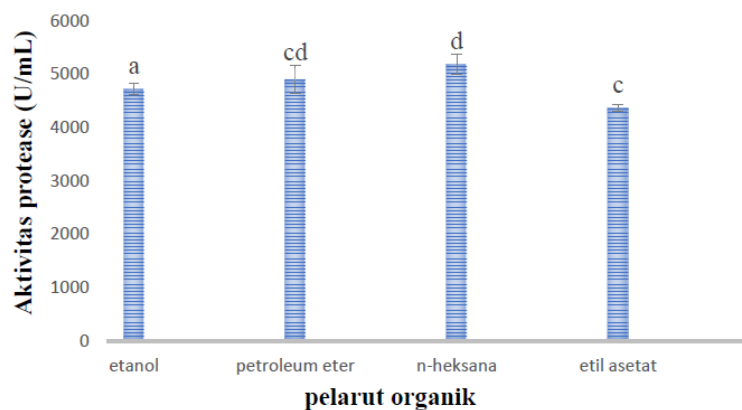
Berdasarkan Gambar 5 menunjukkan aktivitas protease meningkat dengan penambahan Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} dan Fe^{2+} dimana aktivitas relatif masing-masing yaitu sebesar 5022,60, 5144,98, 5626,62, 4784,79, dan 4716,09. Perhitungannya dapat dilihat pada Lampiran 9. Peningkatan aktivitas relatif protease oleh Mn^{2+} menunjukkan bahwa ion logam Mn^{2+} berfungsi sebagai aktivator protease dari kecap ikan. Sedangkan ion logam Fe^{2+} menurunkan aktivitas residu protease sebesar 4716,09. Ion logam berperan dalam aktivitas katalitik protease dan stabilitas konformasi protease (Ogawa *et al.*, 1979). Protease merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis protein. Pada reaksi hidrolisis protein ion logam yang berperan sebagai aktivator membentuk ikatan koordinasi dengan residu asam amino dari protease dan bersifat sebagai akseptor elektron (asam Lewis) sehingga mampu berinteraksi dengan basa yaitu gugus OH^- dari molekul air.



Gambar 5. Pengaruh penambahan ion logam terhadap aktivitas protease pada kecap ikan

Pengaruh pelarut organik terhadap aktivitas enzim protease pada kecap ikan

Adanya pelarut organik dihubungkan dengan adanya kenaikan rigiditas molekul enzim (Russel *et al.*, 1988) yang mana peningkatan rigiditas tersebut akan meningkatkan stabilitas termal. seperti telah dijelaskan diatas, penggunaan pelarut organik telah diketahui menyebabkan meningkatnya rigiditas enzim, yang berarti meningkat pula rigiditas sisi aktif enzim yang bersangkutan. Berdasarkan Gambar 6 menunjukkan aktivitas protease meningkat dengan penambahan pelarut organik etanol, petroleum eter, n heksana dan etil asetat dimana aktivitas relatif masing-masing yaitu sebesar 5722,69, 4901,91, 5190,91 dan 4371,21. Peningkatan aktivitas relatif protease oleh n-heksana menunjukkan bahwa pelarut organik n-heksana sebesar 5190,91 berfungsi sebagai aktivator protease dari kecap ikan. Sedangkan pelarut organik etil asetat menurunkan aktivitas residu protease sebesar 4371,21. Adanya peningkatan keaktifan karena penambahan ion logam tertentu menunjukkan bahwa ion logam diperlukan sebagai komponen dalam sisi aktif enzim. Mekanisme ion logam dapat memperbesar aktivitas enzim yaitu menjadi bagian integral dari sisi aktif, merubah konstanta kesetimbangan dari reaksi enzimatik, merubah muatan listrik, mengusir ion inhibitor, menukar ion yang kurang efektif pada sisi aktif enzim atau substrat Pada konsentrasi tertentu ion logam tertentu dapat bertindak sebagai inhibitor, tetapi dapat juga bertindak sebagai aktivator pada konsentrasi lain (Richardson *et al.*, 1985).



Gambar 6. Pengaruh penambahan pelarut organik terhadap aktivitas protease pada kecap ikan

KESIMPULAN

Ekstrak etanol kulit buah pangi (*P. edule* Reinw) mengandung flavonoid, saponin, tanin dan steroid. Fraksi air mengandung flavonoid, saponin, tanin dan triterpenoid. Fraksi etil asetat mengandung flavonoid, tanin dan steroid. Fraksi n-heksana mengandung senyawa saponin, tanin dan steroid. Kandungan total fenolik tertinggi terdapat pada fraksi etil asetat yaitu sebesar 69,65 mg/g diikuti oleh ekstrak etanol 33,65 mg/g, fraksi air 26,4 mg/g dan fraksi n-heksana 16,65 mg/g. Kulit buah pangi (*P. edule* Reinw) memiliki aktivitas antioksidan yang kuat hingga sangat kuat. Aktivitas yang kuat terdapat pada fraksi n-heksana dan fraksi air yakni sebesar 66,365 µg/mL dan 62,419 µg/mL, sedangkan aktivitas antioksidan yang sangat kuat terdapat pada ekstrak etanol dan fraksi etil asetat yakni sebesar 49,204 µg/mL dan 6,695 µg/mL. Ekstrak etanol, fraksi air dan fraksi etil asetat kulit buah pangi (*P. edule* Reinw) memiliki aktivitas antibakteri tergolong lemah sedangkan pada fraksi n-heksana tidak memiliki aktivitas antibakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Adawyah, R. 2008. *Pengolahan dan pengawetan ikan*. Bumi aksara: Jakarta.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Journal Analytical Biochemistry*. **72(1-2)**: 248-254.
- Briani, S., Y.S. Darmanto., dan Laras R. 2014. Pengaruh Konsentrasi Enzim Papain dan Lama Fermentasi Terhadap Kualitas Kecap Ikan Rucah. *JPBHP Vol 3(3)*:121-128.
- Burke, PA., Smith, SO., Bachavchin, WW., dan Klivanov, A.M. 1989. Demonstration of structural integrity of an enzyme in organic solvent by solid-state NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **111(90_94)**: 8290-8291.
- Chutmanop J., Chuichulcherm S., Chisti Y., and Srinophakun P., 2008, Protease Production by *Aspergillus oryzae* in solid-state Fermentation using Agroindustrial Substrates. *Journal Chemistry Technol Biotechnol.* **83**:1012-1018.
- Cupp-enyard, C. 2008. Sigma's non-specific protease activity assay-caseinas a substrate. *Journal of Visualized Experiments.* **19(19)**: 1-2.
- Guinn, RM., Skerker, P. S., Kavanaugh, P., dan Clark, D.S. 1991. Activity and flexibility of alcohol dehydrogenase in organic solvents. *Biotech. Bioengng* **37**: 303-308.
- Husma, A., Alwi, K. M., Arifin, W. 2019. Rekayasa teknologi pengolahan ikan tembang (*Sardinella sp*) menjadi beberapa produk komersil dalam rangka meningkatkan nilai jual produk perikanan. *Journal of Indonesia Tropical Fhiseries.* **2(1)**: 1-17.
- Ikram-ul-haq, M. M. J., Khan T.S. and Zafa S. 2005. Cotton Saccharifying Activity of Cellulases Produced by Co-culture of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. *Res. Journal Agric & Biol. Sci.* **1(3)**:241-245.
- Kumaunang, M., Sanchart, C., Suyotha, W., and Maneerat, S., 2019. *Virgibacillus halodenitrificans* MSK-10P, a Potential Protease-producing Starter Culture for Fermented Shrimp Paste (kapi) Production. *Journal of Aquatic Food Product Tecnology.* **28**: 877-890.
- Kurniawan, R. 2008. Pengaruh Konsentrasi Larutan Garam dan Waktu Fermentasi terhadap Kualitas Kecap Ikan Lele. *Jurnal Teknik Kimia* **22**: 35-40.
- Laily, A., Holil, K., Griana, T., Susanti N. 2014. *Petunjuk Praktikum Teknik Instrumentasi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Lehninger, A. L. 1998. Dasar-Dasar Biokimia Jilid 1(Cetakan Kelima). Terjemahan: Thenawijaya, M. dari Principles Of Biochemistry (1982). Jakarta: Erlangga.
- Lopetcharat, K., Park, J. W., and Daeschel, M. A. 2001. Fish sauce Products and Manufacturing. *Journal Food a Reiview International.* **17(1)**: 65-88.
- Mahajan, R.T and Shamnkant, B.B. 2010. Biological Aspects of Proteolytic Enzymes: A Review. India. *Journal Pharm Research.* **3(9)**: 2048-2068.
- Maitimu, C.V., Legowo, A.M., Al-Baarri, A.N. 2012. Parameter keasaman susu pasteurisasi dengan penambahan ekstrak daun aileru (*Wrightia caligria*). *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan.* **1(1)**: 7-11.
- Moon, S.H and Parulekar, S.J. 1993. Some Observation On Protease Producing In Continuous Suspension Cultures of *Bacillus firmus*. *Journal Biotechnology and Bioengineering* **41**: 43-45.
- Mueda, Rose T. 2015. Physico-Chemical and Color Characteristics of Salt Fermented Fish Sauce From anchovy *Stolephorus Commersonii*. *AACL Bioflux Vol 8(4)*: 112-116.
- Nascimento, W.C.A and Martins, M.L.L. 2006. Studies on the stability of protease from *Bacillus sp.* and its compatibility with commercial detergent. *Brazilian Journal of Microbiology* **37**: 307-311.
- Pant G., Anil P., Pavani J.P.V., Sayantan B., Deviram G.V.N.S., Ajay K., Mitali P., Ravi G.P. 2015. Production, Optimization, and Partial Purification of Protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science.* **9**: 50-55.
- Park, J. N. Y., Fukumoto, E., Fujita, T., Tanaka, T., Washio, S., Otsuka, T., Shimizu, K., and Watanabe, H. 2000. Chemical Composition of Fish Sauces Produced in

- Southeast and East Asian Countries. *Journal of Food Composition and Analysis*. **14**:113-125.
- Purwaningsih, S. dan Nurhayati. 1995. Pembuatan Kecap Ikan Secara Kombinasi Enzimatis dan Fermentasi dari Jeroan Ikan Tuna (*Thunnus* sp.). *Jurnal Teknologi Hasil Perikanan*. **1(1)**: 1.1995.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Gahtge, M.S., and Deshpande, V.V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Protease. *Journal Microbiology Biology Review*. **62**: 597-635.
- Russel, A.J. dan Klivanov, A.M. 1988. Inhibitorinduced enzyme activation in organic solvents. *J. Biol. Chem.* 263: 11624-11626.
- Sastrohamidjojo, H. 1991. *Spektroskopi*, Liberty. Yogyakarta.
- Simanjourang, E., Nia K dan Zahidah, H. 2012. Pengaruh Penggunaan Enzim Papain dengan Konsentrasi yang Berbeda Terhadap Karakteristik Kimia Kecap Tutut. *Jurnal Perikanan dan Kelautan Vol* **3(4)**: 209-220.
- Srilakshmi, J., Madhavi, J., Lavanya, S., and Ammani, K. 2014. Commercial Potential of Fungal Protease: Past, Present, and Future Prospects. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. **2(4)**:218-234.
- Sugioyono, R., A. J. Lintang, dan R. A. Sabe. 2008. Karakterisasi Protease Bakteri Termofil Mata Air Laut Panas Poso Sulawesi Tengah. *Penelitian Perikanan*. **2(2)**: 156-162.
- Udomsil, N., Rodtong, S., Tanasupawat, S., and Yongsawatdigul, J. 2010. Proteinase-producing halophilic latic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation and their ability to produce volatile compounds. *Int. Journal Food Microbiol.* **141**:186-194.
- Uyar, F., Porsuk, I., Kizil, G., dan Yilmaz, E. 2011. Optimal Conditions for Production of Extracellular Protease from Newly Isolated *Bacillus cereus* Strain. *Journal CA*. **15(5)**: 1-9.
- Wijaya, S. 2002. Isolasi kitinase dari *Scleroderma columnare* dan *Trichoderma harzianum*. *Jurnal Ilmu Dasar*. **3**: 30-35.
- Winarno, F.G. 1992. *Kimia Pangan dan Gizi*. PT Gramedia. Jakarta.