



Isolasi dan Identifikasi Bakteri Proteolitik *Bacillus cereus* strain IRPMD-3 pada Rusip Udang Windu (*Penaeus monodon*) Berdasarkan Gen 16S rRNA

Isolation and Identification of Proteolytic Bacterium Bacillus cereus strain IRPMD-3 in Windu Shrimp (Penaeus monodon) Rusip Based on 16S rRNA Gene Sequences

Afra Anisah Purwadi¹, Sri Darmawati², Ayu Rahmawati Sulistyanningtyas², Stalis Norma Ethica³,

¹Program Studi DIV Teknologi Laboratorium Medis Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang

²Program Studi DIII Teknologi Laboratorium Medis Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang

³Program Studi Magister Sains Laboratorium Medis Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang

Corresponding author: wawanisah2@gmail.com

Riwayat Artikel: 25 September, 2019; Diterima: 28 September 2019; Diterbitkan: 2 Oktober, 2019

Abstrak

Enzim protease berperan penting dalam bidang pangan dan kesehatan, khususnya dalam proses pembuatan pengawet non-formalin. Sumber-sumber penghasil protease baru perlu dicari. Rusip merupakan produk fermentasi udang yang mengandung protein tinggi sehingga berpeluang sebagai sumber bakteri penghasil protease. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi bakteri proteolitik yang terdapat pada rusip udang windu pasca fermentasi 72 jam dan mengidentifikasi bakteri berdasarkan sekuen gen 16S rRNA. Proses isolasi dan purifikasi koloni bakteri dilakukan menggunakan media *Nutrient Agar*. Uji penghasilan enzim protease dilakukan pada media *Skim Milk Agar*. Proses identifikasi molekuler dilakukan melalui analisis sekuen gen 16S rRNA bakteri yang diamplifikasi dengan metode PCR. DNA hasil amplifikasi berukuran 1500 bp kemudian disekuensing. Berdasarkan hasil penjejakan sekuen dengan *DNA Baser Assembler* dan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) diketahui gen 16S rRNA strain RPM3.B yang diperoleh mempunyai tingkat kemiripan 99.80% dengan gen 16S *ribosomal RNA* isolat bakteri *Bacillus cereus* strain Sihong-668-3. Kesimpulannya, strain RPM3.B merupakan bakteri penghasil enzim protease yang potensial dan diberi nama *Bacillus cereus* strain IRPMD-3 (*Indonesian Rusip Penaeus monodon Day-3*).

Kata kunci: Isolasi bakteri, identifikasi molekuler, bakteri proteolitik, gen 16S rRNA, rusip udang

Abstract

Protease enzymes play an important role in the field of food and health, especially in the making process of non-formalin preservatives. New sources of protease-producing need to be sought. Rusip is a fermented shrimp product containing high protein, so that it has the potential as a source of protease-producing bacteria. The purpose of this study was to isolate proteolytic bacteria found in 72 hours post-fermentation shrimp rusip and to identify the obtained bacterium based on 16S rRNA gene sequence. The bacterial colony isolation and purification process was carried out using *Nutrient agar* media with spread technique. Protease enzyme production tests were performed on *skim milk agar media*. The molecular identification process was carried out through analysis of 16S rRNA bacterial gene amplified by the PCR method. The amplified DNA sized 1500 bp was then sequenced. Based on the results of sequence alignment with *DNA Baser Assembler* and BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) it is known that the 16S rRNA strain RPM3.B gene obtained has a similarity level of 99.80% with that of the *Bacillus cereus* strain Sihong-668-3. In conclusion, the RPM3.B strain is a potential protease enzyme producing bacterium and was named as *Bacillus cereus* strain IRPMD-3 (*Indonesian Rusip Penaeus monodon Day-3*).

Keywords : Bacterial isolation, molecular identification, proteolytic bacteria, 16S rRNA gene, shrimp rusip



PENDAHULUAN

Kebutuhan enzim untuk industri dalam negeri dapat mencapai 2500 ton per tahun. Hampir 99% masih mengimpor enzim dari beberapa Negara seperti Cina, India, Jepang dan sebagian dari Eropa sehingga. Indonesia pada tahun 2015 mengimpor enzim senilai 187,5 milyar dan diperkirakan akan terus meningkat tiap tahunnya. Oleh karena itu, Menristekdikti meresmikan fasilitas unit produksi enzim BPPT (Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi) yang bekerja sama dengan PT. Petrosida Gresik berdasarkan Siaran Pers Kemristekdikti Nomor 37/SP/HM/BKKP/IV/2017. Hingga saat ini unit tersebut merupakan satu-satunya fasilitas unit produksi enzim dan pertama di Indonesia (Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, 2015).

Beberapa jenis enzim yang telah dikembangkan yaitu protease dan xilanase. Protease berguna untuk menguraikan protein didalam tubuh. Selain itu, protease juga dimanfaatkan dalam bidang kesehatan yang digunakan untuk proses pembuatan chitosan (pengawet non-formalin) (Lingewati, 2012). Bakteri merupakan satu mikroorganisme penghasil enzim terbanyak karena pertumbuhannya cepat (Melliawati *et al*, 2016). Kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim protease dapat diketahui dengan mengisolasi bakteri pada medium susu skim (Safitri, 2018). Isolasi bakteri penghasil enzim protease dapat dilakukan dari produk olahan fermentasi misalnya rusip.

Rusip terbuat dari udang atau ikan teri yang difermentasi dengan garam dan gula aren (Koesoemawardani, 2015). Udang digunakan sebagai bahan dasar pembuatan rusip karena memiliki protein yang cukup tinggi. Udang merupakan salah satu hasil laut terbanyak yang ada di Indonesia. Proses fermentasi dipembuatan rusip, terjadi degradasi protein oleh bakteri proteolitik menjadi asam amino dan peptida lalu diubah menjadi komponen lainnya dan menghasilkan produk berbentuk pasta atau cairan (Hanafiarti, 2015). Degradasi protein menjadi senyawa lebih kecil pada proses fermentasi dapat membentuk enzim protease. Adapun kandungan protein pada rusip ialah sebanyak 17,1 g (Sastra, 2008).

Metode deteksi molekular yang digunakan ialah *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Metode ini banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisa genetik. Metode ini digunakan untuk memperbanyak DNA dan juga sebagai penanda molekular (Hasibuan, 2015; Lestari dkk., 2018; Ethica dkk., 2013). Teknik PCR gen 16S rRNA penting dalam identifikasi organisme karena sifat gen yang spesifik dan khas serta dimiliki oleh setiap bakteri.

Menurut Faradiska (2012), penggunaan gen 16S rRNA mempunyai keunggulan yaitu sifatnya yang tetap dan tidak berubah dalam jangka waktu yang lama serta tingkat mutasinya yang kecil. Identifikasi molekular bakteri proteolitik pada rusip udang windu belum pernah dilaporkan sebelumnya. Oleh karena itu, perlu dilakukannya penelitian mengenai isolasi dan identifikasi molekular bakteri proteolitik pada rusip udang windu. Diharapkan dari penelitian ini dapat diperoleh sumber enzim protease baru dari kelompok bakteri penghasil protease. Hal ini, agar Indonesia tidak lagi mengimpor enzim dari luar negeri dan memanfaatkan potensi biodiversitas.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif. Objek penelitian yaitu bakteri penghasil enzim protease yang terdapat pada rusip udang windu pasca fermentasi 72 jam. Penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro pada bulan Mei – Agustus 2019.

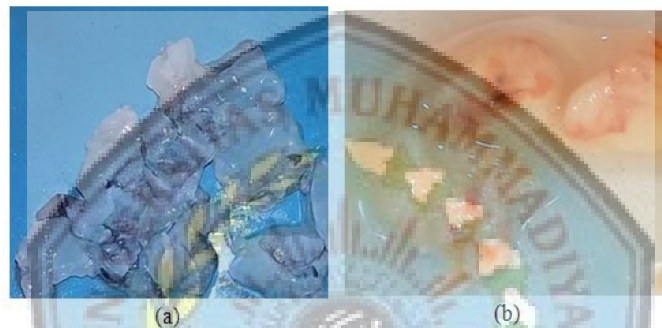
Alat yang digunakan adalah cawan petri, mikropipet, autoklaf, oven, *hot plate*, tabung reaksi, rak tabung, gelas ukur, laminar, lampu spirtus, ose jarum, pinset, neraca analitik,

mikrotube, waterbath, vortex, termal cyler, cetakan gel agarose, alat elektroforesis, power supply, ultraviolet transilluminator, dan tabung endprof.

Bahan yang digunakan adalah sampel rusip udang windu, NaCl fisiologis, dH₂O, kapas dan kasa, solate dan solate wrap, aluminium foil, kertas label, media *Skim Milk Agar, aquades, Nuclease free water (NFW)*, Promega Kit, Etanol absolut 70%, TE Buffer, DNA Template (solate DNA genom /total), PCR Master Mix (Promega), Primer Forward 27F 16S rRNA, Primer Reverse 1492R 16S rRNA, gel agarose, Loading dye, Larutan *Tris Borat EDTA*, media *Nutrient Agar*, dan *Ethidium Bromida*.

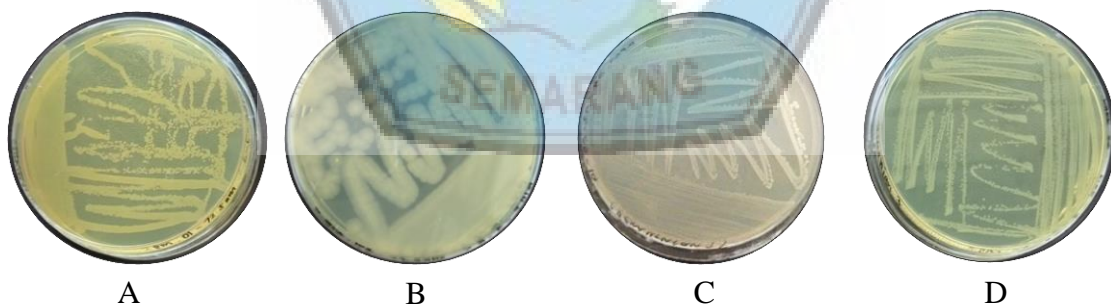
HASIL

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah rusip yang telah difermentasi selama seminggu dan diperpanjang waktu fermentasinya selama 3 hari (72 jam). Didapatkan perubahan karakteristik pada rusip udang yaitu bau rusip lebih asam dan menyengat serta warna udang yang tampak kemerahan (matang). Rusip udang windu pasca fermentasi 72 jam dan diambil supernatannya. Hasil fermentasi tersebut dapat dilihat pada gambar 1



Gambar 1. (a) Udang windu sebelum fermentasi (b) Rusip udang windu pasca fermentasi 72 jam

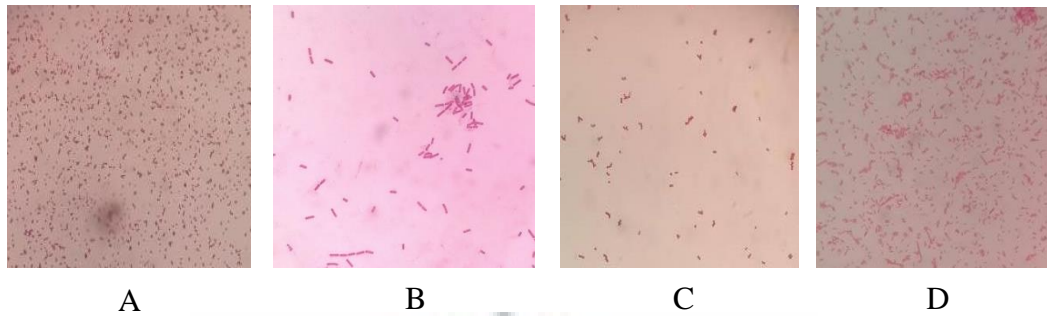
Didapatkan 4 koloni bakteri dari rusip udang windu fermentasi 72 jam dengan morfologi koloni yang berbeda. Morfologi masing-masing koloni dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil Isolat Bakteri, A) Isolat RPM3.A, B) Isolat RPM3.B, C) Isolat RPM3.C dan D) Isolat RPM3.D.

Berdasarkan Gambar 2. dapat diketahui bahwa mayoritas bentuk koloni bakteri yang ditemukan adalah bulat namun ditemukan pula koloni yang berbentuk tidak rata pada isolat RPM3.B. Berdasarkan karakteristik warna, koloni yang berwarna putih lebih mendominasi dibandingkan warna kuning (RPM3.A) dan abu-abu transparan (RPM3.D). Hampir semua isolat mempunyai tepi rata/licin, elevasi cembung dan konsistensi mukoid kecuali isolat RPM3.B yang mempunyai tepi tidak rata dengan elevasi rata/datar dan konsistensi yang kering.

Isolat bakteri diidentifikasi karakteristik dan jenisnya berdasarkan pewarnaan Gram. Hasil pewarnaan gram koloni bakteri yang diamati di bawah mikroskop optik dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil Pewarnaan Gram, A) Isolat RPM3.A, B) Isolat RPM3.B, C) Isolat RPM3.C dan D) Isolat RPM3.D.

Berdasarkan gambar 3. diketahui bahwa karakteristik koloni pada pewarnaan Gram adalah bakteri Gram-negatif dan Gram-positif untuk isolat RPM3.B dengan bentuk koloni bakteri basil pada isolat RPM3.B dan RPM3.D dan kokus pada isolat RPM3.A dan RPM3.C. Isolat bakteri kemudian diuji penghasilan enzim proteasenya untuk mengetahui kemampuan bakteri tersebut. Hasil uji terhadap isolat bakteri dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil uji penghasilan enzim protease

Berdasarkan hasil uji penghasilan enzim protease yang ditunjukkan Gambar 4 dapat diketahui bahwa isolat RPM3.B dan RPM3.D mampu mendegradasi protein yang berada dalam media susu skim sehingga menimbulkan zona bening pada permukaan media. Terbentuknya zona bening protease ini membuktikan bahwa kedua isolat yang diperoleh dari penelitian ini merupakan bakteri penghasil enzim protease (Ethica, 2018). Diketahui bahwa diameter zona bening isolat RPM3.B adalah 13,00 mm dan RPM3.D adalah 15 mm. Kemampuan kedua isolat dalam mendegradasi protein dapat dilihat dari nilai indeks hidrolisis protein seperti pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Nilai Indeks Hidrolisis Protein

Hasil uji kuantitas ekstrak DNA genom dari isolat RPM3.B dapat dilihat pada tabel 2 berikut:

Tabel 2. Hasil Uji Kuantitas Ekstrak DNA genom

NO	Kode sampel	Nucleic Acid Conc	A260	A280	260/280
1.	RPM3.B	115.4 ng/μl	0.085	0.039	2,16

Setelah diketahui kemurniannya, maka dilakukan amplifikasi DNA. Kemudian divisualisasikan dengan menggunakan gel elektroforesis sehingga dapat diketahui kualitas genomnya. Hasil amplifikasi dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Pita DNA: M (Marker), S (Sampel) RPM3.B

DISKUSI

Penelitian ini menggunakan sampel rusip udang windu (*Penaeus monodon*) pascafermentasi 72 jam. Penelitian ini dimulai dengan memfermentasi udang windu yang telah dibersihkan dan diolah selama kurang lebih 7 hari dan diperpanjang waktu fermentasinya selama 3 hari (72 jam). Hal ini dilakukan untuk mengetahui keberagaman bakteri penghasil protease yang terdapat pada sampel rusip udang windu dengan campuran gula aren dan garam. Penambahan garam pada pembuatan rusip bertujuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk. Selain garam, gula aren juga ditambahkan kedalam rusip untuk dapat digunakan

No	Kode Isolat	Indeks Hidrolisis Protein
1.	RPM3.B	1.083
2.	RPM3.D	1.071



mikroorganisme sebagai sumber energi (Hermawan, 2019).

Sampel rusip udang windu pasca fermentasi diambil 1 ml dan diencerkan dengan NaCl fisiologis 9ml pada tingkat pengenceran 10^{-1} kemudian dilakukan pengenceran bertingkat hingga 10^{-5} . Hasil dari pengenceran tersebut kemudian ditanam pada media NA. Pengenceran sampel dilakukan dengan tujuan agar koloni bakteri yang tumbuh diharapkan tidak bertumpuk sehingga dapat diamati morfologinya dengan jelas. Empat koloni bakteri yang tumbuh dan tampak berbeda diambil untuk dipurifikasi. Purifikasi bakteri dilakukan agar didapatkan isolat murni dari bakteri yang telah diisolasi selain itu juga dapat dijadikan *stock*.

Koloni bakteri yang telah dipurifikasi kemudian dicat dengan pengecatan Gram untuk mengetahui kelompok bakteri tersebut. Hasil dari pewarnaan Gram diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100X. Hal ini dilakukan bertujuan agar didapatkan bakteri yang seragam. Bakteri dipurifikasi kembali jika koloni bakteri tersebut tidak seragam. Berdasarkan hasil pengecatan Gram yang dilakukan terhadap 4 isolat, semua isolat tersebut adalah kelompok bakteri Gram negatif dengan sifat koloni kokus dan basil.

Penelitian dilanjutkan dengan uji kemampuan penghasil enzim protease terhadap 4 isolat yang ada. Berdasarkan hasil uji tersebut diketahui bahwa isolat RPM3.B dan RPM3.D mempunyai aktivitas proteolitik ditandai dengan timbulnya zona bening disekitar bakteri. Diameter zona bening dari kedua isolat tersebut diukur kemudian dihitung nilai indeks hidrolisis protein tersebut. Kemampuan hidrolisis protein dari bakteri proteolitik didapatkan dari hasil bagi diameter zona bening terhadap diameter koloni isolat bakteri pada media SMA (Hastuti *et al*, 2017). Berdasarkan hasil nilai Indeks Hidrolisis Protein dari kedua isolat tersebut isolat RPM3.B memiliki nilai lebih tinggi dari isolat RPM3.D dan hal ini menunjukkan bahwa isolat tersebut mampu mendegradasi protein dengan baik jika dibandingkan dengan isolat lainnya.

Isolat terpilih diekstrak DNANYa dan dilakukan uji kuantifikasi terhadap ekstrak DNA genom tersebut. Kuantifikasi ekstrak DNA genom dilakukan berdasarkan prinsip absorbansi menggunakan NanoDrop spektrofotometer. Hal ini perlu dilakukan agar dapat diketahui volume isolat hasil ekstraksi DNA tersebut. Berdasarkan hasil yang didapatkan, nilai rasio konsentrasi DNA pada panjang gelombang 260/280 adalah 2,16. Nilai ini berada diatas nilai standar yaitu antara rasio 1,8-2,0. Hal ini dapat disebabkan oleh sampel DNA yang tidak murni. Sisa-sisa etanol atau adanya sisa kandungan metabolit sekunder bakteri yang diekstrak dapat menjadi penyebab ekstrak DNA tidak murni. Namun, menurut Harun (2018) isolat DNA dapat digunakan sebagai template PCR selama visualisasi ekstrak DNA masih menunjukkan pita yang tebal.

Hasil PCR tersebut dianalisis sekuennya oleh pihak ketiga yaitu 1st BASE Malaysia. Berdasarkan hasil tersebut didapatkan urutan nukleotida gen 16S rRNA. Hasil tersebut kemudian di analisis urutan nukleotidanya untuk mengetahui tingkat kemiripan terhadap gen 16S rRNA yang telah terdaftar di GenBank. Hasil pensejajaran gen 16S rRNA strain RPM3.B adalah 99.80% mirip dengan gen 16S *ribosomal* RNA isolat bakteri *Bacillus cereus* strain Sihong-668-3. Dengan demikian, isolat bakteri penghasil enzim protease yang diperoleh dalam penelitian ini dapat diberi nama *Bacillus cereus* IRPMD-3 (Indonesian Rusip *Penaeus monodon* Day-3).

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil isolasi koloni bakteri terdapat 4 koloni bakteri yang morfologinya berbeda.



2. Hasil seleksi penghasiian enzim protease dua diantaranya menunjukkan aktifitas proteolitik karena menghasilkan zona bening pada media susu skim yaitu RPM3.B dan RPM3.D dengan indeks hidrolisis protein sebesar 1,083 dan 1,071.
3. Hasil identifikasi isolat bakteri RPM3.B yang memiliki indeks hidrolisis proteolitik tertinggi menunjukkan tingkat kemiripan 99.80% dengan bakteri *Bacillus cereus* strain Sihong-668-3 sehingga isolat bakteri diberi nama *Bacillus cereus* IRPMD-3 (*Indonesian Rusip Penaeus monodon* Day-3).

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi. 2015. Berita Teknologi Agroindustri & Bioteknologi: Ciptakan Pabrik Enzim Pertama di Indonesia, BPPT Transfer Teknologi Produksi Enzim ke PT Petrosida Gresik. <https://www.bppt.go.id/teknologi-agroindustri-dan-bioteknologi/>. Diakses tanggal 24 April 2019.
- Ethica, S.N., Muchlissin, S.I., Saptaningtyas, R. dan Sabdono, A., (2018). Protease Producers Predominate Cultivable Hydrolitic Bacteria Isolated from Liquid Biomedical Waste, *Asian Journal of Chemistry* 30(9): 2035-2038 DOI: 10.14233/ajchem.
- Ethica, S.N., Hammi, M.K., Lestari, P., Semiarti, E., Widada, J. and Raharjo, T.J., 2013. Amplification of *Azospirillum* sp. JG3 *glpD* gene fragment using degenerate primers generated by web-based tools. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3(3), p.231.
- Faradiska, W. 2012. *Isolasi dan karakteristik bakteri endofit dari akar tanaman kentang (Solamun tuberosum L.) menggunakan primer penanda RAPD. Undergraduate thesis, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.*
- Hanafianti, D. 2015. *Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penghasil Protease Dari Terasi Udang Rebon (Mysis relicta). Skripsi. Universitas Lampung.*
- Harun, A., Muchlissin, S.I., Mukaromah, A.H., Darmawati, S., Ethica, S.N. 2018. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease *Staphylococcus hominis* pada Oncom Merah Pasca Fermentasi 120 Jam. *Seminar Nasional Edusaintek*. 6 Oktober 2018, Semarang. Hal. 23-30.
- Hasibuan, E. 2015. *Peranan Teknik Polymerase Chain Reaction (Pcr) Terhadap Perkembangan Ilmu Pengetahuan. Karya Tulis Ilmiah. Universitas Sumatera Utara.*
- Hastuti *et al.* 2017. Isolasi dan Penentuan Indeks Hidrolisis Protein pada Bakteri Proteolitik dari Tanah Mangrove di Margomulyo Balikpapan. *Proceding Biology Education Conference*. Oktober 2017, Balikpapan. Hal. 265-270.
- Hermawan, Yogi Endi. (2019). *Kajian Pengaruh Penambahan Konsentrasi Gula Aren Cair dan Garam Terhadap Karakteristik Rusip Ikan Rucah. Skripsi.*
- Koesoemawardani, D., Rizal, S., dan Susilowati, R. 2015. Perubahan Sifat Mikrobiologi dan Kimia Rusip dengan Perbedaan Waktu Penambahan Gula Aren Cair. *Prosiding Seminar Agroindustri dan Lokakarya Nasional FKPT-TPI*. 2-3 September 2015, Lampung. Hal. 132-139.
- Lestari, D.A., Muchlissin, S.I., Mukaromah, A.H., Darmawati, S. and Ethica, S.N., 2018. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease *Bacillus Megaterium* IROD3 dari Oncom Merah Pasca Fermentasi 72 Jam. In *Prosiding Seminar Nasional & Internasional* (Vol. 1, No. 1).
- Lingewati, S. 2012. *Skринing dan Isolasi bakteri penghasil enzim protease dari limbah tebu. Undergraduated Thesis. Widya Mandala Catholic University Surabaya.*



- Melliawati, K., *et al.* 2016. Seleksi dan Identifikasi Bakteri Endofit Potensial Penghasil Enzim Protease dari Taman Nasional Gunung Halimun. *Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI*.
- Safitri, R., Muchlissin, S.I., Mukaromah, A.H., Darmawati, S. and Ethica, S.N., 2018. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease *Bacillus Thuringiensis* IROD1 Pada Oncom Merah Pasca Fermentasi 24 Jam. In *Prosiding Seminar Nasional & Internasional* (Vol. 1, No. 1).
- Sastra, W. 2008. Fermentasi Rusip. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor.

