

**ISOLASI BAKTERI PENGHASIL ENZIM PROTEASE
BACILLUS MEGATERIUM IROD3 DARI ONCOM
MERAH PASCA FERMENTASI 72 JAM**

**Dhea Ayu Lestari¹, Sakti Imam Muchlissin², Ana Hidayanti Mukaromah¹,
Sri Darmawati¹, Stalis Norma Ethica³**

¹D4 Health Analytst Study Program, Faculty of Nursing and Health Sciences, Universitas Muhammadiyah Semarang, Indonesia

Email: Dheaayu211@gmail.com ciciekdarma@unimus.ac.id

²Faculty of Fisheries and Marine Sciences, Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia

Email: muchlissin@outlook.com

³D3 Health Analyst Study Program, Faculty of Nursing and Health Sciences, Universitas Muhammadiyah Semarang, Indonesia

Email:ana_hidayati@unimus.ac.id , norma@unimus.ac.id

Abstract

Protease enzyme has function to hydrolyze peptide bonds in proteins into simpler molecules to digest by the body which important to food industry. One of effort to increase the production of protease enzymes is looking for new sources of protease particularly from bacterial groups. The purpose of this study was to obtain an isolate of protease-producing bacteria found on post-fermentation oncom 72 hours, and to identify the protease-producing bacteria based on the analysis of 16S rRNA gene. Isolation and purification process of bacterial colony was carried out on Nutrient Agar medium with spread technique, production test of protease enzyme was performed using Selective Skim Milk Agar. The process of Molecular identification process was carried out through analysis of 16S rRNA gene fragment sequences which were amplified using Polymerase Chain Reaction (PCR) method, and continued by sequencing. The result of bacteria isolation was found one isolate which has proteolytic activity in Skim Milk Agar medium which has clear zone diameter of 78.00 mm. A similarity analysis based on the 16S rRNA gene sequence showed that IROD3 (Indonesian Red Oncom Day-3) has 99% similarity level with the 16S rRNA gene fragment of Bacillus megaterium strain CS17 (access code Genbank: MG430224.1).

Keywords: *Molecular identification, proteolytic bacteria, 16S rRNA gene, Bacillus megaterium*

I. Pendahuluan

Enzim adalah molekul protein kompleks yang dihasilkan oleh sel hidup dan bekerja sebagai katalisator dalam berbagai proses kimia di dalam tubuh. Salah satu kelompok enzim yang banyak digunakan dalam industri pangan adalah enzim protease yang berfungsi menghidrolisis ikatan peptida pada protein menjadi molekul lebih sederhana seperti oligopeptida dan asam amino (Fatoni dan Lestari, 2008).

Kebutuhan protease mencapai 60-65% dari pasar dunia enzim, hal ini menunjukkan pentingnya industri enzim tersebut, (Melliawati dan Rahmani, 2016; Firlani dkk., 2015). Di Indonesia kebutuhan akan enzim protease juga semakin meningkat namun kebutuhan ini masih tergantung pada produksi impor. Salah satu cara usaha untuk mengantisipasi ketergantungan terhadap produksi impor tersebut perlu adanya usaha untuk memproduksi enzim protease.(Naiola dkk., 2011; Akhdiya, 2017).

Pentingnya protease dan tingginya daya jual enzim ini membuat pencarian sumber-sumber protease yang baru sangat diperlukan salah satunya melalui proses fermentasi. Salah

satu pemanfaatan teknologi fermentasi adalah dalam industri pangan diantaranya adalah oncom (Afifah, 2014).

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk analisis deteksi bakteri dengan menggunakan teknik PCR. Teknik ini digunakan untuk menelaah profil DNA gen 16S rRNA (Aris dkk., 2011). Penggunaan analisis gen penyandi 16S rRNA dapat sebagai penanda molekuler yang identik pada semua bakteri. Sifat spesifik dari 16S rRNA yang khas ini dimiliki oleh setiap spesies bakteri. Oleh karena itu, gen yang mengkode pembentukan 16S rRNA bisa dijadikan alat identifikasi species bakteri tertentu. Penggunaan metode analisis gen 16S rRNA sebagai acuan identifikasi bakteri secara molekuler memiliki keunggulan, dimana gen ini relative konstan dan tidak berubah dalam jangka waktu yang sangat lama atau dengan kata lain laju mutasinya sangat kecil (Faradiska, 2012).

Penelitian Afifah 2014 tentang Protease Fibrinolitik dari Mikroba Pangan Fermentasi Oncom Merah dan tempe Gembus diperoleh hasil 16 isolat yang berasal dari oncom merah segar, 11 isolat berasal dari oncom merah yang telah mengalami perlakuan pemanasan 80°C selama 15 menit isolat tumbuh pada media skim milk agar (SMA) yang berpotensi menghasilkan protease, lalu didapatkan 2 isolat terbaik dan dilakukan uji identifikasi molekuler berdasarkan gen 16S rRNA dan isolat dari oncom merah teridentifikasi sebagai *Bacillus licheniformis* (96%) dan isolat tempe gembus sebagai *Bacillus pumilus* (97%).

Penelitian ini perlu dilakukan karena pada penelitian sebelumnya isolasi bakteri pada oncom segar, sedangkan pada kondisi pasca fermentasi belum pernah dilaporkan. Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan penelitian tentang Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Pada Oncom Merah Pasca Fermentasi 72 Jam dan Identifikasi Molekuler Bakteri Berbasis Gen 16S rRNA. Hal ini dimaksudkan untuk mengetahui adanya bakteri penghasil protease dan jenis bakteri apa yang terdapat pada oncom pasca fermentasi 72 jam.

2. Kajian Literatur

Enzim protease merupakan enzim golongan hidrolase yang akan memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana, seperti menjadi oligopeptida pendek atau asam amino, dengan reaksi hidrolisis pada ikatan peptida. Enzim ini diperlukan oleh semua makhluk hidup karena bersifat esensial dalam metabolisme protein (Poliana, 2007). Enzim protease dapat diisolasi dari hewan, tanaman serta mikroorganisme seperti bakteri dan jamur. Penggunaan mikroorganisme untuk produksi enzim, khususnya protease mempunyai beberapa kelebihan, diantaranya mudah diproduksi dalam skala besar, waktu produksi relatif pendek serta dapat diproduksi secara berkesinambungan dengan biaya yang relatif rendah. (Naiola dan Widhyastuti, 2002).

Oncom Merah merupakan makanan produk fermentasi yang berasal dari Jawa Barat, Indonesia. Oncom Merah mempunyai sumber gizi dan kandungan protein yang tinggi karena adanya proses fermentasi dan bisa dimanfaatkan oleh tubuh serta relatif murah dengan proses pembuatannya mudah. Oncom merah dihasilkan oleh kapang *Neurospora sitophila* yang mempunyai strain jingga. Kapang oncom merah dapat mengeluarkan enzim lipase dan protease yang aktif selama proses fermentasi. Kadar protein pada oncom 13 gram/100g oncom. (Sarwono, 2010; Nuraini dkk., 2015)

Bakteri merupakan organisme yang mempunyai penyebaran terluas di alam. Bakteri memiliki kemampuan berperan dalam proses penguraian dan dekomposisi. Bakteri mempunyai potensi besar untuk dikembangkan dalam industri bioteknologi. Potensi tersebut berhubungan dengan kemampuan kemampuan yang dimilikinya seperti amilolitik, proteolitik, lipolitik, antibiosis, selulolitik, dan sebagainya (Hatmanti, 2000). Bakteri proteolitik adalah bakteri yang mampu mendegradasi protein, karena memproduksi enzim protease ekstraseluler. Protease merupakan enzim proteolitik yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein (Puspitasari dkk., 2012).

Polymerase Chain Reaction atau PCR adalah suatu metode enzimatik untuk amplifikasi DNA dengan cara *in vitro*. Amplifikasi DNA pada PCR dapat dicapai bila

menggunakan primer oligonukleotida yang disebut amplimers. Primer DNA suatu sekuens oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA. PCR memungkinkan dilakukannya pelipatgandaan suatu fragmen DNA. Umumnya primer yang digunakan pada PCR terdiri dari 20-30 nukleotida. DNA template (cetakan) yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan dan berasal dari patogen yang terdapat dalam spesimen klinik. Enzim DNA polimerase merupakan enzim termostabil Taq dari bakteri termofilik *Thermus aquaticus*. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) menempel pada ujung 3' primer ketika proses pemanjangan dan ion magnesium menstimulasi aktivasi polimeras (Handayo, 2000).

3. Metode Penelitian

Desain penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dengan objek penelitian adalah Isolat bakteri pada oncom merah pasca fermentasi 72 jam Laboratorium Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro Semarang pada bulan April-Mei 2018. Data yang digunakan dalam penelitian ini merupakan data primer. Data hasil penelitian diolah secara tabulasi dan disajikan dalam bentuk narasi deskriptif.

Alat dan bahan yang digunakan yaitu: cawan petri, tabung reaksi, jarum ose, autoklaf, inkubator, gelas ukur, beker glass, spatula, timbangan analitik, pipet tetes, lampu spiritus, mikropipet, mesin PCR (thermalcycler), Electrophoresis chamber, UV transiluminator, Nano Drop, rotator, sentrifugator, vortex dan tabung, media Brain Heart Infusion (BHI), media Nutrient Agar, media Skim Milk Agar, buffer lysis, Chelex (Biorad), aquades steril, phenol, kloroform, Phosphate-buffered saline (PBS), ddH₂O, NaCl, Kit isolasi DNA bakterisaponin 0,5 %, gel agarosa, dan loading dye, Primer set (27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3) dan 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')),

Sampel oncom merah pasca fermentasi 72 jam dihancurkan sampai halus, ditimbang 1 g dan dimasukkan ke dalam NaCl fisiologis. Lakukan pengenceran dari tabung 10⁻¹ sampai 10⁻⁵. Masing-masing tabung di ambil satu mata ose lalu ditanam di media *Nutrient agar* (NA) dan diinkubasi 24 jam pada temperatur 37°C, kemudian lakukan pengamatan terhadap morfologi koloni dan pewarnaan gram. Koloni yang terpisah dan terunik diambil dan digoreskan kembali pada media NA sampai mendapatkan isolat murni (koloni tunggal). Koloni yang telah murni kemudian digoreskan pada medium *Skim Milk Agar* (SMA) lalu diinkubasi 24 jam dengan temperatur 37°C dan diamati terbentuknya zona jernih pada media.

Isolat bakteri yang terpilih dari isolat terbaik (isolat yang telah murni) di dalam BHI disentrifuge kemudian diambil 1 ml dan dimasukkan ke mikrotube isi 50 - 100 µl ddH₂O dan 1 ml saponin 0,5% dalam *Phospate Buffer lysis* (PBS) 1x lalu diinkubasi 24 jam pada temperatur 4 °C. Campuran yang telah diinkubasi lalu disentrifugasi dengan kecepatan 12000 RPM selama 10 menit, buang supernatan lalu masukkan 1 ml PBS 1x disentrifuge dengan kecepatan 12000 RPM selama 5 menit Tambahkan 100 µl ddH₂O dan 50 µl dari 20% Chelex 100 (kocok terlebih dahulu, pastikan kristal chelex tercampur dengan baik) homogenkan, masukkan ke waterbath dengan temperatur 55 °C selama 10 menit dan vortex selama 5 menit. Sentrifuge dengan 12000 RPM selama 5 menit. Kemudian Supernatan dipindahkan ke microtube steril dan disimpan di -20°C.

Pemeriksaan Konsentrasi DNA dilakukan menggunakan Nano drop spektrofotometer (Thermo Scientific). Kemurnian DNA dan konsentrasi DNA dihitung menggunakan rasio OD 260/280 dan 260/230. DNA dikatakan murni jika memiliki rasio OD260/OD280 antara 1,8 sampai 2,0. (Promega, 2012; Ethica dkk., 2014).

Proses amplifikasi menggunakan Go Taq green mastermix (Promega). Primer yang digunakan adalah primer universal 27 F (5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3) dan 1492 R (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Sebanyak 25 µl campuran reaksi PCR mengandung GoTaq Green Master Mix (12,5 µl), primer 27 F (1 µL), primer 1492 R (1 µL), DNA template (1 µl) dan ddH₂O (9.5 µl). Reaksi PCR menggunakan pengoptimalan terdiri dari denaturasi awal pada 95°C selama 1 menit, kemudian diikuti oleh 35 siklus denaturasi

pada 95°C untuk 30 detik setiap siklus, annealing pada 50°C selama 1 menit, ekstensi pada 72°C selama 1 menit, dan diikuti dengan ekstensi akhir di 72°C selama 7 menit. Hasil PCR diperiksa menggunakan gel agarosa 1% elektroforesis Produk PCR (1500bp) divisualisasikan melalui elektroforesis pada 1% dari gel agarose dengan ethidium bromide yang langsung ditambahkan ke gel dan dibaca menggunakan UV transiluminator (Darmawati kk., 2014; Ethica dkk., 2014).

Pemeriksaan hasil sekuens dilakukan dengan menggunakan MEGA 7.0, kemudian hasil dimasukkan ke program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) untuk membuat homologi dari bakteri yang terkait erat dalam database bank gen *National Center Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Ethica dkk., 2014)

4. Hasil Penelitian

Oncom merah pasca fermentasi selama 72 jam dimana Oncom merah yang dibeli dari penjual di pasar lalu difermentasi dengan cara dipotong dengan pisau yang telah disterilkan dan dibungkus dengan plastik wrapping kemudian didiamkan selama 72 jam pada suhu ruangan. Diperoleh bahwa warna oncom yang awalnya orange berubah menjadi orange kecoklatan dan oncom merah pasca fermentasi 72 menjadi lebih bau dan lebih menyengat.

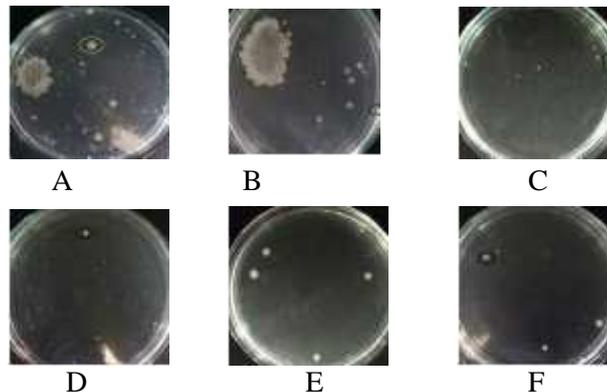


Oncom Merah segar Oncom merah pasca Fermentasi 72 jam
Gambar 1. Tampilan Oncom Merah pasca fermentasi 72 jam

4.2. Isolasi Bakteri

4.2.1 Morfologi Koloni Bakteri

Hasil Morfologi koloni ini di dapatkan dari oncom merah pasca di fermentasi 72 jam diperoleh sebanyak 6 isolat bakteri murni yang memiliki morfologi koloni yang berbeda satu sama lain ditunjukkan oleh Gambar 2.



Gambar 2. Morfologi koloni bakteri yang teramati pada berbagai pengenceran.
(A).IROD3 1(B).IROD3 2 (C). IROD3 3 (D). IROD3 4(E). IROD3 5 (F).IROD3 6

Koloni yang diperoleh mempunyai bentuk berbeda yaitu bulat, oval/lonjong, dengan ukuran besar, sedang dan kecil. Bentuk tepian koloni rata. Karakteristik elevasi semua bakteri cembung dengan konsistensi tidak berlendir dan berlendir. Sebanyak 6 koloni bakteri dengan bentuk koloni yang berbeda lalu dilakukan purifikasi yang bertujuan agar didapatkannya isolat murni dengan bentuk sel yang seragam.

Populasi bakteri tumbuh dengan cepat ketika mereka disertakan dengan gizi dan kondisi lingkungan yang memungkinkan mereka untuk berkembang. Melalui pertumbuhan ini, berbagai jenis bakteri kadang-kadang menghasilkan koloni yang khas dalam penampilan.

Morfologi koloni merupakan salah satu cara untuk dapat mengidentifikasi bakteri dengan cara mengamati ciri ciri koloni yang tumbuh.(Mastang, 2016)

4.2.2 Pewarnaan Gram

Uji selanjutnya dilakukan pewarnaan gram terhadap sel sel bakteri yang telah diisolasi dan diamati menggunakan mikroskop, tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Mikroskopik Koloni Bakteri dengan Pewarnaan Gram

Kode Isolat Bakteri	Hasil Pewarnaan Gram
IROD3 1	Basil Gram Positif
IROD3 2	<i>Coccus</i> Gram Negatif
IROD3 3	<i>Coccus</i> Gram Positif
IROD3 4	<i>Coccus</i> Gram Positif
IROD3 5	<i>Coccus</i> Gram Positif
IROD3 6	Basil Gram Negatif

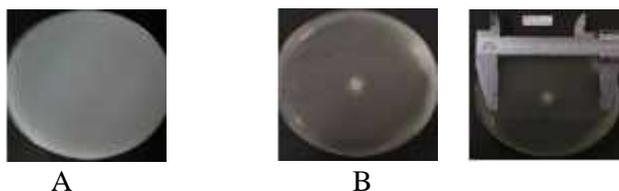
Berdasarkan Tabel 1 hasil pewarnaan bakteri pada 6 koloni memiliki bentuk yang berbeda yaitu coccus dan basil lalu diperoleh 4 koloni Gram positif yaitu IROD3 1, IROD3 3, IROD3 4 dan IROD3 5 serta diperoleh 2 koloni Gram negatif (-) yaitu IROD3 2 dan IROD3 6 Dari pengamatan morfologi dan pewarnaan gram dipilih satu isolat terunik yaitu isolat IROD3 1 dengan kreteria bakteri telah murni dan tidak bercampur dengan bakteri lain, Basil Gram Positif, berbentuk bulat, berwarna putih, tepian rata, elevansi cembung, berlendir dan berukuran besar untuk dilanjutkan ke uji enzimatis.

Ketika sel bakteri ditambahkan dengan pewarna kristal violet yang berwarna ungu, maka sel bakteri akan menyerap pewarna tersebut. Interaksi antara sel bakteri dengan kristal violet akan semakin kuat dengan ditambahkan lugol. Ketika dicuci dengan alkohol, bakteri Gram positif akan tetap mengikat kompleks kristal violet-lugol sehingga menjadi berwarna ungu. Sedangkan bakteri Gram negatif akan kehilangan kompleks kristal violet lugol karena lapisan peptidoglikan pada bakteri Gram negatif lebih tipis sehingga menjadi tidak berwarna. Ketika ditambahkan dengan safranin yang berwarna merah maka bakteri Gram negatif akan menyerapnya sedangkan bakteri Gram positif tidak akan menyerap pewarna lagi. Pewarnaan Gram pada bakteri ini didasarkan pada tebal atau tipisnya lapisan peptidoglikan di dinding sel dan banyak sedikitnya lemak pada membran sel bakteri. (Hidayat, 2011).

Koloni bakteri hasil purifikasi kemudian dilakukan pewarnaan Gram untuk diamati morfologi sel-sel bakteri penyusunnya menggunakan mikroskop optik yang bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri merupakan kelompok Gram-positif dan Gram-negatif. Pada penelitian ini dipilih 1 isolat terunik yaitu IROD3 1 yang merupakan bakteri basil Gram-positif, berbentuk bulat dengan ukuran sel relatif besar.

4.2.3 Uji Enzimatis

Hasil uji penghasilan enzim proteolitik pada media skim milk agar pada oncom pasca fermentasi 72 jam, ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Aktivitas proteolitik Isolat bakteri
(A).Media Skim Milk Agar Steril, (B). Isolat IROD3 1

Berdasarkan penelitian ini dari satu isolat terunik yaitu IROD3 1 yang dapat tumbuh dalam media Skim Milk Agar dan memiliki potensi menghasilkan protease yang ditandai dengan kemampuannya dalam menghasilkan zona bening 78,00 mm pada media Skim Milk Agar. Media SMA akan mengukur kadar asam amino sebagai produk hidrolisis protein dari susu skim karena mengandung kasein yang merupakan substrat yang baik untuk mengisolasi bakteri enzim protease. Kemampuan bakteri dalam menghidrolisis protein yang membentuk zona jernih merupakan penghasil protease yang dihasilkan oleh bakteri proteolitik terjadi karena adanya aktivitas protease yang memutuskan ikatan peptida dari kasein dalam susu skim. (Mahdiyah, 2015).

Adanya kemampuan dalam menghasilkan zona bening pada media SMA sebesar 78,00 mm menunjukkan aktivitas proteolitik bakteri yang baik. Berdasarkan penelitian jika bakteri menghasilkan zona bening sebesar 12,00 mm atau lebih, berarti bakteri tersebut mempunyai kemampuan menghasilkan enzim protease yang besar (Ethica dkk., 2014).

Berdasarkan Morfologi Koloni, Pewarnaan bakteri dan uji enzimatik diperoleh isolat bakteri Gram Basill-positif, berbentuk bulat dan besar dan dapat menghasilkan protease yaitu isolat IROD3 1.

4.3 Identifikasi Molekuler Bakteri

4.3.1 Ekstraksi DNA Bakteri

Hasil uji ekstraksi DNA bakteri dilakukan dari kultur bakteri IROD3 1 sebagai cetakan untuk tahap amplifikasi PCR. DNA genom isolat bakteri dari isolat terpilih yang telah terbukti mempunyai aktivitas proteolitik diisolasi langkah awal untuk mengidentifikasi bakteri tersebut secara molekuler. Analisis secara molekuler yang melibatkan DNA genom bakteri diperlukan untuk mengkaji lebih jauh tentang keberadaan dan regulasi gen-gen tersebut. Hasil yang diperoleh dari isolasi DNA genom pada isolat IROD3 1 dilakukan Uji Kuantitas DNA menggunakan Nano Drop spektrofotometer (*Thermo Scientific*) dan uji Kualitas DNA dengan menggunakan teknik elektroforesis.

4.3.2 Uji Kuantitas dan Uji Kualitas Ekstrak DNA

Uji Kuantitas DNA dilakukan secara spektrofotometri pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm sehingga diperoleh nilai kemurnian dan konsentrasi DNA hasil isolasi. Hasil pengukuran dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 2. Hasil Pengukuran Konsentrasi DNA Genom

Sampel	A260	A280	A260/A280	Unit	Factor
IROD3	-0,182	-0,136	1,34	ng/μl	50

Berdasarkan hasil uji kuantitas DNA yang diperoleh ekstrak DNA dari sampel DNA IROD3 1 dengan konsentrasi 1.34 ng/μl. Uji kualitas ekstrak DNA dilakukan untuk mengukur kemurnian DNA terhadap kontaminan. Nilai maksimal DNA dapat diserap dengan panjang gelombang 260 nm sedangkan nilai maksimal residu protein atau fenol dapat diserap dengan panjang gelombang 280 nm. DNA dikatakan murni jika memiliki rasio OD260/OD280 antara 1,8 sampai 2,0 (Sambrook dan Russel, 2001).

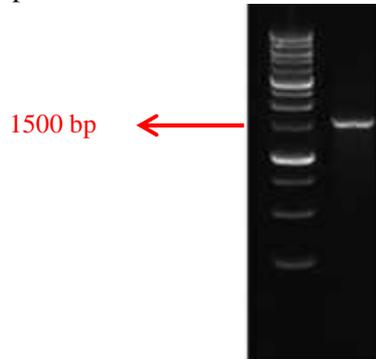
Pada penelitian ini didapatkan nilai 1,34 ng/μl dimana jika rasio OD 260/280 nm kurang dari 1.8 menunjukkan adanya kemungkinan ekstrak DNA masih terkontaminasi protein. Namun, visualisasi pada ekstrak DNA masih menunjukkan pita yang tebal, maka isolat DNA dapat digunakan sebagai templat. (Nicholl, 1996).

Uji Visualisasi terhadap ekstrak DNA genom sampel bakteri IROD3 1 dilakukan dengan metode elektroforesis gel agaros 1%. Uji ini dilakukan untuk mengetahui kualitas DNA yang diperoleh. Berdasarkan uji kualitas DNA terlihat adanya genom DNA bakteri

yang ditunjukkan dengan adanya pita yang berpendar dengan menggunakan sinar UV dengan demikian diperoleh isolat genom DNA.

4.3.4 Amplifikasi Fragmen Gen 16S rRNA dengan Metode PCR

Hasil amplifikasi gen 16S rRNA dari isolat bakteri yang diuji dengan elektroforesis ditunjukkan pada Gambar 13.



Gambar 11. Hasil amplifikasi PCR fragmen 16S rRNA isolat IROD3 1
(a) Marker = 1500 bp, (b) IROD3 1

DNA genomik yang telah diisolasi dan diekstraksi dari isolat IROD3 1 kemudian dianalisis dengan metode PCR untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA menggunakan Go Taq *green* mastermix (Promega) dan primer universal 27 F dan 1492 R untuk gen 16S rRNA yang dapat mengamplifikasi gen 16S rRNA sepanjang 1500 bp. Hasil amplifikasi dilakukan elektroforesis dengan agarosa 1% dan divisualisasi dengan sinar UV.

Hasil uji amplifikasi gen 16S rRNA (Gambar 13) menunjukkan pita DNA marker dengan ukuran \pm 1500 bp sejajar dengan produk amplifikasi gen 16S rRNA isolat bakteri IROD3 1 dengan demikian dapat dikatakan gen 16S rRNA bakteri hasil isolasi dapat diamplifikasi. Hal ini juga menunjukkan bahwa primer yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA sudah spesifik untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA. Primer 27F dan 1492R merupakan dua primer yang biasa digunakan untuk identifikasi gen 16S rRNA bakteri, untuk menentukan spesies bakteri, maka hasil produk amplifikasi DNA yang diperoleh perlu disekuensing untuk mengetahui urutan nukleotida penyusunnya (Akhdiya, 2017).

4.1.8 Hasil Sekuensing

Uji Sekuensing dilakukan untuk menentukan urutan nukleotida pada fragmen DNA yang terdeteksi dari hasil visualisasi DNA yang teramplifikasi dalam proses PCR menggunakan mesin sekuensing DNA otomatis (Fatimawali, 2013). Penentuan urutan DNA (sekuensing) dilakukan melalui jasa komersial *1st Base DNA Sequencing, Malaysia*.

Pada penelitian ini, hasil sekuensing yang diperoleh dari *1st Base DNA Sequencing* ditampilkan pada lampiran 2. Urutan basa nitrogen yang diperoleh oleh sekuensing di dengan program BLAST memiliki tingkat kemiripan 99% dengan fragmen gen 16S rRNA isolat bakteri *Bacillus megaterium* strain CS17 yang terdaftar di Genbank (Kode akses Genbank: MG430224.1). Sehingga isolat diberi nama *Bacillus megaterium* IROD3 (*Indonesian Red Oncom Day-3*).

Nama spesies *Bacillus megaterium* berasal dari nama latin untuk binatang besar dan spesies tersebut salah satu dari golongan Eubacteria terbesar karena ukurannya yang sangat besar, sekitar 100 kali lebih besar *E. coli*. *B. megaterium* termasuk dalam bakteri Gram-positif, bakteri berbentuk batang dan membentuk endospora. Bakteri ini memiliki ciri-ciri spora oval/ silindris, fakultatif anaerob, menghidrolisis gula dan kasein serta mempunyai dinding spora yang tipis. *B. megaterium* ditemukan dalam tanah dan dianggap saprofit. Pada

penelitian ini bakteri *B. megaterium* dapat ditemukan pada sampel oncom salah satunya bisa terjadi karena kontaminasi atau pencemaran (Heryani, 2012).

B. megaterium digolongkan bakteri mesofilik yaitu memiliki temperatur optimum untuk pertumbuhan berkisar antara 25- 37°C. *B. megaterium* juga diketahui mampu bertahan dalam beberapa kondisi lingkungan yang ekstrim seperti gurun karena kemampuannya membentuk spora (Madigan, 2000; Vary dkk.,2007).

Adapun klasifikasi taksonomi *Bacillus megaterium* adalah sebagai berikut
Kingdom : Bacteria

Filum : Firmicutes

Kelas : Bacilli

Ordo : Bacillales

Famili : Bacillaceae

Genus : *Bacillus*

Spesies : *Bacillus megaterium* (Honig dalam Madigan, 2000).

B. megaterium dianggap bakteri non-patogenik. Bakteri ini telah sering digunakan di laboratorium dan digunakan sebagai organisme industri yang mampu menghasilkan berbagai protein dan sumber bioremediasi. *B. megaterium* merupakan bakteri yang penting dalam karena merupakan sebuah kloning host dan diinginkan menghasilkan variasi besar enzim (Vary dkk., 2007).

Menurut penelitian yang dilakukan Heryani (2012) berdasarkan analisis indeks proteolitik diketahui bakteri *B. Megaterium* ini mampu menghidrolisis media SMA dan menghasilkan protease. Indeks proteolitik yang dihasilkan *B. Megaterium* lebih tinggi dari yang di hasilkan oleh *Micrococcus Luteus*. Indeks proteolitik dan jumlah sel yang lebih tinggi akan menghasilkan aktivitas enzim yang lebih baik. Dengan demikian, bila jumlah sel bakteri *B. megaterium* diperbanyak, maka aktivitas protease yang dihasilkannya akan semakin meningkat, sehingga diharapkan dapat memenuhi kebutuhan enzim protease dalam skala yang besar.

5. Simpulan

5.1 Kesimpulan

Isolat bakteri yang telah diisolasi dari sampel oncom merah pasca fermentasi 72 jam, terdapat satu isolat bakteri yaitu isolat IROD3, yang memiliki aktivitas protease ditandai dengan terbentuknya zona bening berdiameter 78 mm di sekeliling koloni bakteri pada media Skim Milk Agar. Proses identifikasi molekuler fragmen gen 16S rRNA bakteri strain IROD3 hasil isolasi memiliki kemiripan 99% dengan fragmen gen 16S rRNA bakteri *Bacillus megaterium*. Dengan demikian strain IROD3 teridentifikasi secara molekuler sebagai *Bacillus megaterium* IROD3 (*Indonesian Red Oncom Day-3*).

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dikemukakan, maka untuk penelitian selanjutnya perlu dilakukan isolasi dan identifikasi bakteri penghasil enzim protease pada produk makanan fermentasi indonesia lainnya, seperti tapai, pekasam dan rusip untuk memperbanyak sumber penghasil enzim protease baru.

6. Referensi

- Afifah D. N. 2014. Protease Fibrinolitik dari Mikroba Pangan Fermentasi Oncom Merah dan tempe Gembus.
- Akhdiya, A. 2017. Isolasi bakteri penghasil enzim protease alkalin termotabil. *Buletin Plasma Nutfah*, 9(2), 38-44.
- Aris, M., Sukenda, S., Harris, E., & Sukadi, M. F. 2013. Molecular identification of pathogenic bacteria and PCR specific primer design. *e-Journal budidaya perairan*, 1(3).

- Darmawati, S. dkk., 2014. Phylogenetic relationship of Gram Negative Bacteria of Enterobacteriaceae Family in the Positive Widal Blood Cultures based on 16S rRNA Gene Sequences. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 19(I), pp.64–70
- 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.
- Ethica, S.N., Nataningtyas, D.R., Lestari, P., Istini, I., Semiarti, E., Widada, J. and Raharjo, T.J., 2013. Comparative evaluation of conventional versus rapid methods for amplifiable genomic DNA isolation of cultured *Azospirillum* sp. JG3. *Indonesian Journal of Chemistry*, 13(3), pp.248-253.
- Ethica, S.N., Semiarti, E., Widada, J., Oedjijono, O. and Joko Raharjo, T., 2017. Characterization of moaC and a nontarget gene fragments of food-borne pathogen *Alcaligenes* sp. JG3 using degenerate colony and arbitrary PCRs. *Journal of Food Safety*, 37(4), p.e12345.2.
- Ethica, S.N. and Raharjo, T.J., 2014. *Detection of genes involved in glycerol metabolism of Alcaligenes sp. JG3* (Doctoral dissertation, Universitas Gadjah Mada).
- Fatoni, A., & Lestari, P. (2012). Isolasi dan Karakterisasi Protease Ekstraseluler dari Bakteri dalam Limbah Cair Tahu. *Jurnal Natur Indonesia*, 10(02).
- Hatmanti, A. 2000. Pengenalan *Bacillus spp. Oseana*, 25(1), 31-41
- Handoyo, D., & Rudiretna, A. 2000. Prinsip umum dan pelaksanaan polymerase chain reaction (PCR)[general principles and implementation of polymerase chain reaction]. *Unitas*, 9(1), 17-29.
- Melliawati, R., Rohmattusolihat, R., Nuryati, N., Rahmani, N., & Yopi, Y. 2016. Seleksi Dan Identifikasi Bakteri Endofit Potensial Penghasil Enzim Protease Dari Taman Nasional Gunung Halimun-(the Selection and Identification of Potential Endophyte Bacteria as Protease Enzyme Producer From Halimun Mount National Park). *Biopropal Industri*, 7(2), 73-82
- Naiola, E., & Widhyastuti, N. 2002. Isolasi, Seleksi Dan Optimasi Produksi Protease Dari beberapa isolat Bakteri
- Polia N., A., Fuaida, U. F., Tiranna, F., Kusuma, A., & Nugroho, T. (2016). Batu bata belanda krenyesinovasi makanan untuk memberdayakan makanan lokal na J dan Mac CAP. 2007. *Industrial enzymes: structure, function, and applications*. Dordrecht: Springer
- Puspitasari, F. D., Shovitri, M., & Kuswyasari, N. D. 2012. Isolasi dan karakterisasi bakteri aerob proteolitik dari tangki septik. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 1(1), E1-E4.
- Sarwano, B. 2010. *Usaha Membuat Tempe dan Oncom*. Jakarta: Penerbit Swadaya
- Sambrook, J.R. and Russel, D.W., 2001. DW 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
- Sarwano, B. 2010. *Usaha Membuat Tempe dan Oncom*. Jakarta: Penerbit Swadaya
- Vary, P. S. et al. "Bacillus megaterium dari tanah bakteri sederhana untuk industri tuan rumah produksi protein." *Terapan Mikrobiologi Bioteknologi*. (2007) 76: 957-967