

---

## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PROBIOTIC CANDIDATE LACTIC ACID BACTERIA (LAB) FROM SHRIMP PASTE (*Mysis relicta*) BASED ON 16S rRNA GENE

**Rahmat Wahyudi Putra, Resti Fevria**

Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Science, Universitas Negeri Padang

email: rahmatwahyudiputra09@gmail.com

**Abstrack.** Terasi is one of the fermented product of shrimp or fish which is often used as food seasoning by the people. Terasi is also a source of Lactic Acid Bacteria (LAB) which has the potential as a culture for probiotic starters. Probiotics are dietary supplements containing live microbes that profitable to their hosts. This study aimed to identify probiotic lactic acid bacteria isolated from terasi of shrimp based on the 16S ribosomal ribonucleic acid (rRNA) gene sequence. LAB isolation from terasi was done by pour plate method using selective medium, MRSA (Man Rogosa Sharpe Agar). The identification of LAB in this study used a method of molecular with a marker gene of 16S rRNA. A total of 3 isolates were obtained from the isolation process. All LAB isolates are rod (Basil) positive Gram bacteria, negative catalase. Two isolates (TR 1 and TR 2) were identified as *Enterococcus faecalis*. While one more isolate (TR 3) were identified as *Weissella cibaria*.

**Keywords:** terasi, lactic acid bacteria, probiotic, 16S rRNA



This is an open access article distributed under the Creative Commons 4.0 Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, a reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. ©2021 by author.

---

### 1. PENDAHULUAN

Indonesia kaya akan makananan fermentasi tradisional yang dibuat dari bahan berupa produk pertanian dan dari hasil laut. Terasi merupakan salah satu produk bioteknologi konvensional yang diproses melalui fermentasi udang atau ikan yang digunakan oleh masyarakat Indonesia sebagai bahan penyedap makanan. Proses pembuatan terasi terjadi akibat adanya aktifitas enzim dari mikroorganisme indigen dari udang atau ikan itu sendiri (Sumanti 1988). Fermentasi pada pembuatan terasi merupakan fermentasi yang terjadi secara alami tanpa penambahan starter sehingga mikroba yang tumbuh sangat bervariasi. Peranan bakteri asam laktat dalam proses fermentasi pada pembuatan terasi sangatlah penting karena dapat memproduksi asam-asam organik yang tidak saja memberi rasa yang khas pada produk namun juga menghasilkan substrat dengan pH rendah sehingga menghambat pertumbuhan bakteri dan menunda terjadinya pembusukan.

Menurut Afrianto dan Liviawaty (2005), terasi merupakan suatu produk hasil fermentasi ikan atau udang yang mengalami perlakuan penggaraman. Penggunaan garam yang tinggi pada proses fermentasi akan menyebabkan tumbuhnya bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat (BAL) banyak ditemukan pada produk fermentasi dan telah dilaporkan banyak berfungsi sebagai probiotik. Definisi probiotik menurut FAO/WHO adalah mikroorganisme hidup yang bila diberikan dalam jumlah yang cukup memberikan manfaat kesehatan pada inangnya (Araya *et al.* 2002). Menurut Fuller (1989), probiotik merupakan suplemen makanan mengandung mikroba hidup yang dapat menguntungkan inangnya. Beberapa manfaat probiotik yaitu mempertahankan mikroflora bermanfaat dalam saluran pencernaan, menghambat pertumbuhan bakteri patogen, meningkatkan aktifitas enzim pencernaan, menurunkan aktivitas enzim bakterial dan produksi amonia, menetralkan enterotoksin dan menstimulus sistem kekebalan (Jin *et al.* 1998).

Beberapa penelitian mengenai isolasi dan identifikasi bakteri dalam produk terasi sudah pernah dilakukan oleh Munaroh (2013) yang memperoleh enam isolat berupa gram positif, katalase negatif, non-motil dan bersifat homofermentatif serta heterofermentatif. Setiawan, *et al.* (2014) menemukan beberapa bakteri pada terasi udang seperti *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Erishipelothrix* sp., *Neisseria* sp., *Listeria* sp., dan *Corynebacterium* sp.. Penelitian lain, Gaffar (2018) mendapatkan enam isolat bakteri yang bersifat gram positif, lima berbentuk batang dan satu berbentuk bulat. Baru-baru ini Resti (2019) berhasil mengisolasi 12 isolat bakteri asam laktat dari sauerkraut berupa gram negatif, katalase negatif dan berbentuk batang.

Sejalan dengan perkembangan ilmu dan teknologi, saat ini telah tersedia beberapa metode yang dapat digunakan untuk menganalisis komunitas mikroba yang terdapat pada habitat tertentu. Salah satu adalah melalui analisis gen 16S rRNA. Alasan penggunaan sekuen gen 16S rRNA adalah karena bersifat universal, *highly conserved*, dan ada di semua bakteri. Dengan demikian gen 16S rRNA telah banyak digunakan untuk mendeteksi dan mengkaji keragaman genetik kelompok bakteri pada suatu habitat (Drancourt *et al.*, 2000). Oleh sebab itu, penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi BAL dari terasi berdasarkan gen 16S rRNA. Informasi ini akan menjadi dasar penelitian lebih lanjut tentang peran BAL sebagai agen probiotik dalam menentukan kualitas terasi dan perannya dalam kesehatan.

## **2. BAHAN DAN METODE**

Isolat bakteri asam laktat yang digunakan pada penelitian ini diisolasi langsung dari terasi udang (*Mysis relicta*) yaitu isolat Tr 1, isolat Tr 2 dan isolat Tr 3. Masing-masing isolat diberikan perlakuan yang sama yaitu pengamatan makroskopik, pewarnaan gram, uji biokimia dan uji molekuler. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif yang didasarkan

pada hasil identifikasi bakteri dengan menggunakan gen 16S rRNA sebagai gen penanda. Hasil isolasi dan identifikasi disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.

## **Tahap Penelitian**

### **a. Isolasi bakteri**

Isolasi bakteri asam laktat dilakukan dengan menggunakan suspensi bakteri pada pengenceran  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  dan pengenceran  $10^{-6}$  yang diambil sebanyak 1 ml dengan mikropipet ke masing-masing cawan petri, lalu dengan metode *pour plate* tuangkan media MRS Agar steril ke dalam cawan petri tersebut. Selanjutnya diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 2 – 7 hari. Hasil isolasi BAL ditandai dengan adanya zona bening “*halo*”. Hasil isolasi lalu dimurnikan pada medium MRS agar.

### **b. Amplifikasi gen 16s rRNA**

Prosedur ini dikerjakan pada sampel DNA yang telah diisolasi dengan membuat campuran *master mix* (untuk satu reaksi) yaitu masing-masing 7  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, 1  $\mu\text{L}$  Kod Fx Neo (Toyobo), 1  $\mu\text{L}$  masing masing primer *forward* dan *reverse*, 5  $\mu\text{L}$  DNA *template*, 10  $\mu\text{L}$  2mM dNTP mix dan 25  $\mu\text{L}$  2x PCR buffer kemudian diamplifikasi pada PCR thermal cycler (Takara). Siklus suhu yang digunakan adalah denaturasi awal  $94^{\circ}\text{C}$  selama 2 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus yang terdiri atas denaturasi  $58^{\circ}\text{C}$  selama 10 detik, penempelan primer (*annealing*) pada  $53^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, dan elongasi pada  $68^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit 30 detik. Reaksi ditutup dengan elongasi akhir  $68^{\circ}\text{C}$  selama 7 menit.

### **c. Deteksi Produk PCR (Elektroforesis)**

Gel agarose 1% dibuat dengan mencampurkan 0,5 g serbuk agarose ke dalam 50 ml TAE buffer. Panaskan pada *microwave* selama 6 menit hingga gel kelihatan homogen dan berwarna bening. Setelah itu tambahkan 2  $\mu\text{L}$  sybr safe DNA jika sudah tidak terlalu panas tuangkan pada cetakan gel elektroforesis dengan jumlah sisir 12 sumur. Kemudian marker DNA Ladder 100 bp dimasukkan sebanyak 5  $\mu\text{L}$  ke dalam sumur pertama. Produk PCR diambil 3  $\mu\text{L}$  dimasukkan ke dalam sumur berikutnya yang terendam dalam tangki yang berisi TAE buffer. Elektroforesis dilakukan selama 28 menit dengan voltase 100 volt. Hasil elektroforesis selanjutnya dicek dengan UV illuminator. Hasil positif jika terdapat pita DNA yang sejajar dengan marker 1500 bp.

### **d. Sekuensing DNA**

Produk PCR dari sampel yang menunjukkan hasil elektroforesis yang positif dikirim ke Macrogen Singapura dengan *automated DNA sequencer* (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystem, USA) untuk dilakukan sekuensing DNA.

#### e. Analisis Fragmen Gen 16S rRNA

Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan menggunakan BLAST urutan nukleotida yang utuh dari hasil sekuensing gen 16S rRNA dengan data base yang tersedia pada situs [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

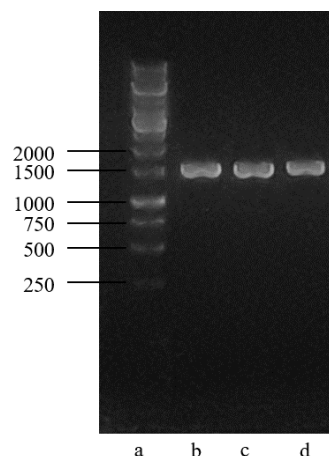
#### Isolasi Bakteri Asam Laktat

Isolasi merupakan tahap awal sebelum dilakukannya karakterisasi bakteri pada terasi udang rebon (*Mysis relicta*). Koloni yang tumbuh terdiri dari berbagai sel mikroba yang berkumpul menjadi satu. Tahap isolasi menggunakan medium Man Rogosa Sharpe Agar karena medium ini merupakan medium selektif yang mampu menumbuhkan dan memelihara BAL secara langsung. Oleh karena itu medium ini baik untuk pertumbuhan BAL, namun tidak untuk kapang dan khamir.

Isolasi dilakukan selama 3 hari untuk mendapatkan bakteri asam laktat. Berdasarkan hasil pemurniaan didapatkan 3 isolat BAL yang diisolasi dari terasi udang (*Mysis relicta*) dengan mengamati bentuk morfologi koloni bakteri.

#### Amplifikasi Gen 16S rRNA

Sampel yang telah diekstraksi kemudian diamplifikasi dengan metode PCR untuk memperbanyak fragmen-fragmen DNA. Proses PCR ini akan mengamplifikasi fragmen DNA dengan target gen 16S rRNA. Berdasarkan hasil visualisasi elektroforesis (Gambar 1.) dari 3 isolat BAL menunjukkan bahwa kualitas DNA yang teramplifikasi dengan sangat baik dan berada pada ukuran 1500 bp.



Gambar 1. Hasil Amplifikasi Gen 16S rRNA dengan Primer 27F dan 1492R

Primer yang digunakan yaitu primer spesifik gen 16S rRNA 27F (*reverse*) dan 1492R (*forward*) yang bersifat universal sehingga dapat mengamplifikasi *gen 16S rRNA* semua bakteri termasuk bakteri asam laktat yang diisolasi dari terasi udang. Primer

tersebut juga digunakan oleh Barus (2017) untuk mengamplifikasi DNA bakteri asam laktat dari fermentasi tapai singkong. Proses amplifikasi dilakukan untuk memperoleh proses sekuensing (Perdana, 2011). Menurut Aris (2013), pemilihan Dna ribosom untuk tujuan identifikasi organisme didasarkan secara fungsional dan evolusioner. DNA ribosom memiliki sifat homolog dari berbagai organisme yang berbeda, molekul tersebut memiliki struktur dan sukuens nukleotida yang sangat konservatif. Molekul tersebut sangat banyak di dalam sel, sehingga cocok untuk uji statistik (melihat perbedaan sekuen pada organisme yang berbeda). Maka untuk melihat perbedaan sekuen antara satu bakteri dengan bakteri lainnya diperlukan teknik sekuensing.

Sekuensing DNA bertujuan untuk menentukan urutan nukleotida arginin (A), sitosin (C), guanin (G) dan timin (T) pada molekul DNA. Sekuen yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan data sekuen yang terdapat pada GenBank dengan melakukan BLAST-N (*Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide*). Metode ini bekerja dengan prinsip menjajarkan sekuen. BLAST dilakukan pada situs [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) dengan pilihan database gen 16 ribosomal DNA sekuen.

Tabel 1. Hasil Identifikasi Gen 16S rRNA Isolat Bakteri Asam Laktat dari Terasi Udang Menggunakan Program BLAST

		Hasil BLAST			Isolat Bakteri Asam Laktat	
Deskripsi		Query Cover	E Value	Kemiripan	Isolat	Jenis Bakteri
<i>Enterococcus faecalis</i> (LC511025.1)		100%	0.0	100%	Tr 1	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> (LC511025.1)		100%	0.0	100%	Tr 2	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Weissella cibaria</i> (MN720515.1)		100%	0.0	100%	Tr 3	<i>Weissella cibaria</i>

Berdasarkan (tabel 1.) hasil analisis sekuen dengan menggunakan program BLAST, sekuen gen 16S rRNA pada isolat Tr 1, Tr 2 memiliki skor maksimum masing-masing 1075 dan 1282 yang dibandingkan dengan sekuen *Enterococcus faecalis* dengan e-value 0.0, kemiripan 100%.

Stackbrandt dan Gobel (1995) menyatakan bahwa suatu spesies bakteri dapat dikatakan sama apabila memiliki homologi dari atau sama dengan 97%. Isolat Tr 1, Tr 2 dan Tr 3 memiliki nilai *query cover* dan kemiripan 100% dengan *Enterococcus faecalis*, sedangkan isolat Tr 3 memiliki nilai *query cover* dan kemiripan dengan *Weissella cibaria*. Membaca hasil BLAST tersebut parameter yang paling penting adalah *query cover* karena menilai dalam persen sekuen dalam *database* menutupi *query*, yang memastikan apakah sampel tertutup semuanya oleh sekuen. Presentase yang dapat diterima minimal 95%,

kecuali untuk sekuen yang bacaanya lebih rendah diberlakukan minimal 75% (Narita, *et al.*, 2012).

Analisis sekuen gen 16S rRNA menunjukkan 2 isolat yaitu isolat Tr 1 dan Tr 2 memiliki kemiripan terdekat dengan *Enterococcus faecalis*, sedangkan isolat Tr 3 memiliki kemiripan terdekat dengan *Weissella cibaria*. Genus *Enterococcus* dan *Weissella* ini juga ditemukan oleh beberapa peneliti yang mengisolasi bakteri asam laktat dari berbagai habitat. Penelitian yang dilakukan oleh Putri, *et al.*, (2018), juga mengidentifikasi *Enterococcus faecalis* dari vagina wanita subur. Selanjutnya, penelitian yang dilakukan Barus (2017), Rambitan (2018) dan Malik (2010) juga berhasil mengidentifikasi *Weissella cibaria* masing-masing dari tapai singkong, kol merah dan dari beberapa minuman yang mengandung komposisi berupa santan dan gula merah.

*Enterococcus faecalis* merupakan bakteri yang tidak membentuk spora, tidak bergerak, mempunyai ukuran diameter 0,5-1  $\mu\text{m}$ , terdiri dari rantai pendek, berpasangan, atau bahkan tunggal. Dinding sel bakteri ini terdiri dari 40% peptidoglikan. *Enterococcus faecalis* adalah bagian dari flora usus normal. *Enterococcus* pada awalnya diklasifikasi sebagai *Streptococcus Group D*, karena mereka memiliki antigen dinding sel Grup D. *Enterococcus* juga mampu berkembang dalam kisaran pH 4,8-9,6 (Putri, 2018).

#### 4. Kesimpulan

Hasil analisis gen 16S rRNA bakteri asam laktat yang diisolasi dari terasi udang (*Mysis relicta*) menunjukkan 2 isolat (Tr 1 dan Tr 2) teridentifikasi sebagai bakteri *Enterococcus faecalis*. Sedangkan 1 isolat Tr 3 teridentifikasi sebagai bakteri *Weissella cibaria*.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, E dan E. Liviawaty. 2005. Pengawetan dan Pengolahan Ikan. Yogyakarta: Kanasius.
- Araya M, Morelli L, Reid G, Sanders ME, Stanton C. 2002. Report of a Joint FAO/WHO Working 12 Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canada.
- Aris, M., Sukenda, E. Haris, M.F. Sukadi, M. Yuhana, 2013. Identifikasi Molekular Bakteri Patogen Dan Desain Primer PCR (Molecular Identification Of Pathogenic Bacteria And PCR Specific Primer Design). *Jurnal Budidaya Perairan*. 1(43-50)
- Barus, Tati., Saint Chalista, Bibiana Widiyati Lay. 2017. Identifikasi dan Keragaman Genetik Bakteri Asam Laktat dari Tapai Singkong berdasarkan Sekuen Gen 16S rRNA. *Biota*. Vol 2(46-52)

- Drancourt, M., Bollet, C. dan Carlioz, A. 2000. 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(3623-3630)
- Fevria, R., & Hartanto, I. (2019). Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria (*Lactobacillus* sp) from Sauerkraut with the addition of Cayenne Pepper. *Bioscience*, 3(2), 169-175.
- Fevria, R., & Hartanto, I. (2019). Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria (*Lactobacillus* sp) from Sauerkraut with the addition of Cayenne Pepper. *Bioscience*, 3(2), 169-175.
- Fuller, R. 1989. A Review Probiotic in Man and Animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66(365-378)
- Gaffar, Affan. 2018. Isolasi jenis-jenis bakteri pada terasi udang rebon (*Mysis relicta*) di Kecamatan Jerowaru Kabupaten Lombok Timur. *Skripsi*. UIN Mataram. Mataram.
- Jin, L.Z., Y.W. HO, N. Abdullah and S. Jalaludin. 1998. Probiotic in poultry : modes of action. *World's Poult. Sci. J.* 53(351 – 368)
- Malik, A., Ajitya Kurnia Hermawati, Mahardhika Hestinintyas. Atiek Soemiati. Maksum Radji. 2010. Isolasi Dan Skrining Molekuler Bakteri Asam Laktat Pembawa Gen Glukansukrase dari Makanan dan Minuman Mengandung Gula. *Makara Sains*. Vol 14 (63-68)
- Munaroh T. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Pada Terasi dan Aktivitas Antibakterinya. *Skripsi*. UGM. Yogyakarta.
- Narita, V., A.L., Arum, S. Isnaeni M., N.Y. Fawzya, 2012. Analisis Bioinformatika Berbasis WEB untuk Eksplorasi Enzim Kitosanase Berdasarkan Kemiripan Sekuens. *Jurnal Al-Azhar Indonesia Seri Sains Dan Teknologi*. 1(197-203)
- NCBI (National Center for Biotechnology Bioinformation), 2015. The BLAST sequence analysis tool. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. (Diakses 27 Desember 2019, pukul 20.00 WIB)
- Perdana, A.B. 2011. Studi Keanekaragaman Genetik Bakteri dari Usus Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Melalui Teknik Metagenom Sequence-Based. *Skripsi*. UI. Depok.
- Putri, Yessi Widya, Andani Eka Putra, Bobby Indra Utama. 2018. Identifikasi Dan Karakteristik Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Vagina Wanita Usia Subur. *Jurnal kesehatan andalas*. Vol 7 (20 - 25)
- Rambitan, Grisella., Johanis J Pelealu, Trina E Tallei. 2018. Isolation and Identification Lactic Acid Bacteria from Red Cabbage (*Brassica oleracea* L.) Fermentation as Potential Probiotic. *Jurnal Bioslogos*. Vol 8 (33-37)

- Setiawan, A.T.A., Andi N.A., Rafitah H. 2014. Isolasi dan Karakterisasi Terasi Bakteri Pada Terasi Udang Rebon (*Mysis relicta*) dari Bontang Kuala, Bontang. *Jurnal Ilmu Perikanan Tropis*. 20(23-28)
- Stackebrandt, E., and B.M. Goebel, 1995. A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence analysis in The Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44(846-849)
- Syamsurizal, S., Handayani, D., Kadri, H., & Badriyya, E. (2019). Genotyping SNP rs7903146 TCF7L2 gene for detection T2DM in Indonesian melayu ethnic Genotyping SNP rs7903146 TCF7L2 gene for detection T2DM in Indonesian melayu ethnic. *Journal of Physics: Conference Series*, 1317, 1–8. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1317/1/012090>
- Syamsurizal, & Kadri, H. (2018). Genotyping SNP Rs12255372 TCF7L2 Gene Using Three-Primer ARMS-PCR for Detection T2DM n Indonesian Batak Ethnic. *Journal of Physics: Conference Series*, 1040(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1040/1/012003>
- Sumanti DM. 1988. Identifikasi dan Sifat-Sifat Bakteri Halofilik yang Diisolasi dari Produk Fermentasi Jeroan Ikan Cakalang. *Tesis*. IPB. Bogor.