

Screening and Identification of The 16S rRNA Sequence Phylogeny of Fibrinolytic Bacteria in Shrimp Paste

Skринing dan Identifikasi Filogeni Urutan 16S rRNA Bakteri Fibrinolitik di Petis Udang

Maharani Puspita Sari¹⁾, Achmad Toto Poernomo^{1)*}, Amiruddin Prawita¹⁾

¹⁾Department of Pharmaceutical Science, Faculty of Pharmacy, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

*Corresponding author

E-mail: achma-t-p@ff.unair.ac.id

Article History:

Received: April 12, 2022; Revised: May 22, 2022; Accepted: June 29, 2022; Online: June 30, 2022

ABSTRACT

Petis was one of the fermentation products made with marine creatures such as fish or shrimp. Fibrinolytic enzymes in some fermentation foods from marine creatures were discovered. Screening of bacteria that produced fibrinolytic enzymes used six petis samples from different home industries. The isolation of samples was performed using the Skim Milk Agar proteolytic test and fibrin plate test. Identification of the bacteria was performed with a gram staining test and 16S rRNA sequencing method. The sample was diluted with NaCl 0.9% up to 10^{-7} , then inoculated on the SMA media and incubated at 37°C for 24 hours. All samples showed proteolytic activity, indicated by a clear zone around the colony. Seventeen proteolytic bacterial isolates were tested for fibrinolytic activity with fibrin plates and then incubated at 37°C for 24 hours. The seventeen isolates showed positive results for fibrinolytic activity, with the highest fibrinolytic index being P3c. The P3c bacterial isolate was identified using 16S rRNA gene sequencing. The result of the identification revealed that the bacteria with strong fibrinolytic activity was *Bacillus flexus*.

Keywords: Fibrinolytic Enzyme, Petis, Screening, Identification, *Bacillus flexus*

ABSTRAK

Petis merupakan salah satu produk fermentasi yang terbuat dari hewan laut seperti ikan atau udang. Enzim fibrinolitik pada makanan fermentasi dari hewan laut sudah banyak ditemukan. Penapisan bakteri penghasil enzim fibrinolitik menggunakan enam petis dari industri rumah tangga yang berbeda. Isolasi sampel diperoleh dari uji proteolitik pada media Skim Milk Agar dan uji fibrinolitik dengan fibrin plate. Identifikasi bakteri ditunjukkan dengan pewarnaan Gram dan metode sekuensing 16S rRNA. Sampel dilarutkan dalam NaCl 0,9% sampai pengenceran 10^{-7} lalu diinokulasikan pada media SMA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Seluruh sampel memiliki aktivitas proteolitik yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona jernih disekitar koloni bakteri. Terdapat tujuh belas isolat bakteri proteolitik yang digunakan untuk uji aktivitas fibrinolitik dengan metode fibrin plate lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Ketujuh belas isolat menunjukkan hasil positif terhadap aktivitas fibrinolitik dengan indeks fibrinolitik terbesar pada bakteri P3c. Isolat bakteri P3c diidentifikasi menggunakan metode sekuensing sekuensing gen 16S rRNA. Hasil dari identifikasi, bakteri yang memiliki aktivitas fibrinolitik terbesar adalah *Bacillus flexus*.

Kata kunci : Enzim Fibrinolitik, Petis, Penapisan, Identifikasi, *Bacillus flexus*

PENDAHULUAN

Enzim fibrinolitik merupakan protease serin atau metalloprotease yang mengkatalisis hidrolisis protein. Fibrin merupakan komponen protein utama pada gumpalan darah yang terbentuk dari fibrinogen oleh trombin. Fibrin dapat membentuk bekuan yang menjadi faktor risiko utama untuk stroke dan infark miokard. Enzim fibrinolitik berpotensi menghambat terjadinya pembentukan trombus (gumpalan darah) dengan menghidrolisis fibrin (Chang et al., 2012). Penggunaan enzim fibrinolitik sebagai pengobatan trombosis yang banyak digunakan adalah urokinase (UK) dan streptokinase (SK), namun pengobatan tersebut harganya

mahal, hanya cocok diberikan melalui injeksi dan memiliki efek samping pendarahan (Yuan et al., 2012).

Telah ditemukan beberapa agen trombolitik yang efektif berasal dari mikroorganisme dapat menghasilkan enzim fibrinolitik. Agen trombolitik tersebut diperoleh dari berbagai makanan ataupun minuman fermentasi (Mahajan et al., 2012). Mikroorganisme pada makanan fermentasi yang dapat menghasilkan enzim fibrinolitik antara lain *Bacillus natto* pada natto Jepang, *Bacillus amyloliquefaciens* pada douchi China, *Bacillus sp. KA38* pada jeot-gal Korea (Kotb, 2012), *Bacillus weihenstephanensis* pada shrimp paste Vietnam (Anh et

Cite this as Sari, M. P., Poernomo, A.T., and Prawita, A. (2022) 'Screening and Identification of The 16S rRNA Sequence Phylogeny of Fibrinolytic Bacteria in Shrimp Paste', *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi*, 9(1), pp. 22-26. DOI: 10.20473/bikfar.v9i1.40899



Copyright: ©2022 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International (CC BY-SA) license

al., 2015). Indonesia memiliki berbagai macam makanan fermentasi, salah satunya adalah petis. Petis merupakan produk hasil samping dari ikan, udang, ataupun daging. Petis berbentuk kental seperti pasta, berwarna coklat tua sampai hitam, memiliki rasa manis, asin, maupun pedas manis (Wahdiniati et al., 2016). Umumnya petis digunakan sebagai bumbu masakan atau penyedap rasa dan bahan baku pembuatan sambal (Prmono et al., 2008). Petis memiliki kesamaan dengan jeotgal Korea dan shrimp paste Vietnam yaitu terbuat dari ikan ataupun udang, namun belum ditemukan bakteri penghasil enzim fibrinolitik pada petis.

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan dan Metode

Bahan yang digunakan petis dari pasar tradisional maupun non tradisional, media NaCl 0,9%, Nutrient Agar (NA), Skim Milk Agar (SMA), dan fibrin. Alat yang digunakan timbangan analitik (Sartorius), inkubator (Memmert), vortex (Thermo Scientific), mikropipet Socorex®, mikropipet Appendorf®, sengkeli (Öse), Laminar Air Flow (LAF), autoklaf HL – 340 Series Vertical Type Steam sterilisizer, lemari pendingin, alat gelas, dan jangka sorong.

Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel petis dilakukan dengan metode purposive sampling. Petis diperoleh dari pasar tradisional maupun non tradisional yang berada di daerah Surabaya Pusat dan Sidoarjo. Sampel yang digunakan yaitu enam petis dari industri rumah tangga yang berbeda. Sampel diberi kode P1, P2, P3, P4, P5, dan P6.

Preparasi Sampel

Sampel ditimbang sebanyak 10 g dan dimasukkan kedalam 50 mL NaCl 0,9% pada labu Erlenmeyer. Lalu dikocok menggunakan vortex dan diamkan sampai endapan dan supernatan terpisah. Dilakukan pengenceran terhadap supernatan sampai pengenceran 10⁻⁷ dengan menggunakan NaCl 0,9%. Pengenceran dilakukan dengan memipet 1 mL sampel menggunakan mikropipet lalu ditambahkan pada tabung berisi 9 mL NaCl 0,9% sehingga diperoleh pengenceran 10⁻¹. Larutan pengenceran 10⁻¹ diambil 1 mL dan ditambahkan pada tabung berisi 9 mL NaCl 0,9% sehingga diperoleh pengenceran 10⁻² dan diulangi sampai diperoleh pengenceran 10⁻⁷.

Uji Aktivitas Proteolitik pada Media SMA

Larutan pengenceran 10⁻⁷ diambil 1 mL dengan mikropipet dan disebarkan pada media lempeng SMA (susu skim 10% b/v ditambah 1,5% b/v agar). Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Aktivitas proteolitik ditunjukkan dengan terbentuknya zona jernih disekitar koloni bakteri (modifikasi Sneha et al. 2014).

Kultur Bakteri Proteolitik pada Media NA

Kultur dilakukan dengan mengambil 1 ose isolat bakteri proteolitik, kemudian digoreskan secara aseptik pada media slant NA. Lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Isolat bakteri yang diperoleh disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C.

Uji Aktivitas Fibrinolitik pada Media Fibrin

Isolat bakteri proteolitik ditambahkan dengan 9 mL NaCl 0,9% dan dikocok dengan vortex sehingga terbentuk suspensi bakteri. Transmittan suspensi bakteri diukur sebesar 25% menggunakan spektrofotometer visible pada panjang gelombang 580 nm. Kemudian membuat lubang berdiameter 6 mm dengan pelubang steril pada media lempeng fibrin yang telah ditambahkan methylene blue (0,3% b/v fibrin dan 1,7% b/v agar dalam larutan dapar fosfat pH 7,8). Lalu ditambahkan 20 µL isolat bakteri serta kontrol positif yaitu nattokinase dan kontrol negatif yaitu NaCl 0,9% pada lubang tersebut. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Bakteri yang mempunyai aktivitas fibrinolitik akan memberikan zona jernih di sekitar koloni. Aktivitas fibrinolitik ditentukan dengan mengukur indeks aktivitas enzim yaitu membandingkan diameter zona jernih dengan diameter lubang. Pengukuran diameter menggunakan jangka sorong. Isolat bakteri dengan indeks fibrinolitik terbesar dipilih untuk dilakukan identifikasi (modifikasi Ashipala & He, 2008).

Identifikasi Bakteri secara Mikroskopis dan Makroskopis

Identifikasi mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan Gram. Gelas objek dibersihkan dengan alkohol 70% dan diberi aquadest, dipanaskan diatas nyala api. Biakan bakteri diambil satu ose secara aseptik, kemudian diratakan di atas objek glass dan difiksasi diatas nyala api. Kemudian ditetaskan larutan kristal violet, didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir lalu dikeringkan. Setelah itu ditetaskan larutan lugol, didiamkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Dicuci dengan alkohol selama 30 detik, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya ditetaskan larutan safranin, diamkan selama 2 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Kemudian diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran kuat. Bakteri Gram positif menghasilkan warna ungu dan bakteri Gram negatif menghasilkan warna merah. Diamati bentuk sel bakteri tersebut bulat (coccus), batang (basil), atau bergelombang (spiral) (Hastuti et al., 2007). Identifikasi secara makroskopis dilakukan dengan menumbuhkan koloni bakteri pada media NA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian dilihat bentuk, warna, tepian, dan elevasi koloni.

Amplifikasi Gen 16S rRNA

Amplifikasi 16S rRNA menggunakan metode PCR dengan primer universal. Reaksi PCR yaitu denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, tahap annealing pada suhu 55°C selama 1 menit, dan tahap elongasi suhu 72°C selama 10 menit. Hasil PCR dielektroforesis menggunakan gel agarosa 1% dalam dapar Tris Acetate EDTA (TAE). Volume sampel yang dielektroforesis yaitu 5 µL. DNA standard yang digunakan adalah promega DNA ladder 1kb. Kemudian gel agarosa direndam dalam larutan etidium bromide (EtBr) dan dilihat dibawah sinar UV menggunakan UV transilluminator.

Identifikasi Bakteri dengan Metode 16S rRNA

DNA hasil purifikasi dikirim ke laboratorium Macrogen Korea untuk dilakukan sekuensing 16S rRNA. Hasil sekuensing dianalisis dengan program Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) yang tersedia pada situs

NCBI. Kemudian alignment divisualisasi dengan program ClustalW. Pohon filogenetik dibuat dengan program MEGA X.

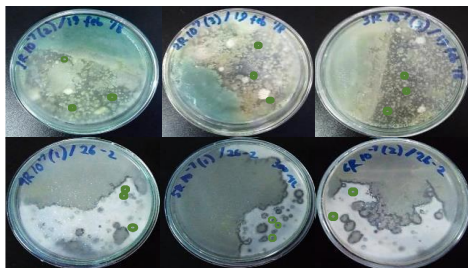
Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif serta ditampilkan dalam bentuk foto maupun tabel. Analisis positif uji aktivitas proteolitik dan fibrinolitik ditunjukkan dengan terbentuknya zona jernih disekitar koloni bakteri. Indeks fibrinolitik diperoleh dari perbandingan diameter zona jernih dengan diameter lubang. Analisis identifikasi bakteri dilakukan secara makroskopis, mikroskopis, dan sekuensing gen 16S rRNA.

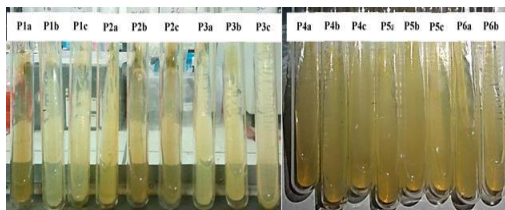
HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Aktivitas Proteolitik

Uji aktivitas proteolitik dilakukan secara kualitatif untuk mengetahui adanya aktivitas degradasi protein yang dihasilkan oleh bakteri. Media yang digunakan adalah SMA tinggi kasein. Kasein merupakan protein, sehingga bakteri yang menghasilkan enzim proteolitik akan memutus ikatan peptida pada kasein menjadi asam amino dan terbentuk zona jernih disekitar koloni bakteri. Seluruh sampel petis memberikan hasil positif pada uji aktivitas proteolitik, kemudian diambil tiga koloni bakteri



Gambar 1. Hasil Uji Aktivitas Proteolitik Sampel P1, P2, P3, P4, P5, Dan P6 Pengenceran 10-7 Dengan Metode Spread Plate Pada Media Skim Milk Agar



Gambar 2. Kultur Bakteri Proteolitik Sampel P1, P2, P3, P4, P5, Dan P6 Pada Media Slant NA

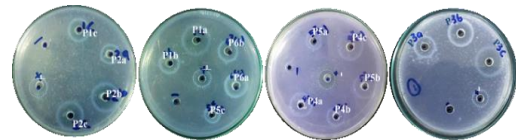
proteolitik pada masing-masing sampel. Terdapat tujuh belas koloni bakteri proteolitik untuk dikultur pada media slant NA ([Gambar 1](#)).

Kultur Bakteri Proteolitik

Bakteri yang memiliki aktivitas proteolitik dibiakkan pada media slant NA dan diinkubasi selama 24 jam. Isolat bakteri yang diperoleh disimpan dalam lemari pendingin sebagai stok dan digunakan untuk uji aktivitas fibrinolitik ([Gambar 2](#)).

Uji Aktivitas Fibrinolitik

Uji aktivitas fibrinolitik dilakukan pada media fibrin untuk mengetahui adanya aktivitas fibrinolitik yang dihasilkan oleh bakteri proteolitik ([Gambar 3](#)). Aktivitas fibrinolitik ditunjukkan dengan terbentuknya zona jernih disekitar lubang sehingga bakteri memiliki kemampuan

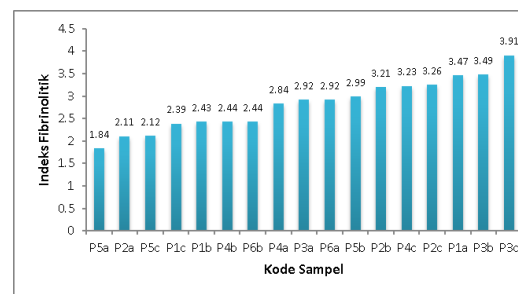


Gambar 3. Hasil Uji Aktivitas Fibrinolitik dengan Metode Well Diffusion Pada Media Fibrin

untuk mendegradasi fibrin. Penambahan methylene blue pada media bertujuan agar zona jernih yang terbentuk terlihat jelas. Kemudian dihitung indeks fibrinolitik melalui perbandingan diameter zona jernih dengan

Tabel 1. Hasil Perhitungan Indeks Fibrinolitik

Kode Sampel	Rata-rata Indeks Fibrinolitik ±
P1 a	3,47±0,05
P1 b	2,43±0,12
P1 c	2,39±0,01
P2 a	2,11±0,11
P2 b	3,21±0,11
P2 c	3,26±0,08
P3 a	2,92±0,62
P3 b	3,49±0,26
P3 c	3,91±0,30
P4 a	2,84±0,06
P4 b	2,44±0,06
P4 c	3,23±0,77
P5 a	1,84±0,60
P5 b	2,99±0,65
P5 c	2,12±0,13
P6 a	2,92±0,10
P6 b	2,44±0,20



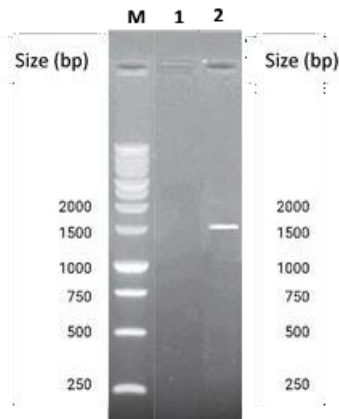
Gambar 4. Hasil Uji Aktivitas Fibrinolitik dengan Metode Well Diffusion Pada Media Fibrin

diameter lubang. Isolat bakteri P3c memiliki indeks fibrinolitik terbesar yaitu 3,91 dapat dilihat pada [Tabel 1](#) dan [Gambar 4](#) yang terpilih untuk diidentifikasi.

Identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Gram menunjukkan bakteri P3c merupakan Gram negatif dengan bentuk basil. Sedangkan identifikasi makroskopis menunjukkan koloni berwarna putih kusam, bentuk koloni bulat, tepian tidak rata dan elevasi rata ([Gambar 5](#) dan [Gambar 6](#)).



Gambar 6. Hasil Identifikasi Makroskopis Bakteri P3c Pada Media NA



Gambar 7. Hasil PCR Bakteri P3c Setelah Dielektroforesis

Keterangan :
 M = DNA marker
 1 = Kontrol negatif
 2 = Bakteri P3c

Amplifikasi Gen 16S Rrna

Proses amplifikasi dilakukan pada DNA yang telah diisolasi dengan metode boiling lysis. Amplifikasi 16S rRNA menggunakan metode PCR dengan primer universal. Hasil PCR dielektroforesis dan dilihat dibawah sinar UV. Hasil elektroforesis menunjukkan pita DNA bakteri P3c berada pada panjang 1500 bp yang tampak sejajar dengan pita DNA marker ([Gambar 7](#)). Sehingga panjang DNA bakteri P3c sudah sesuai dengan panjang komponen 16S rRNA yaitu sekitar 1500-1600 bp.

Identifikasi Bakteri dengan Metode 16S rRNA

Hasil PCR disekuensing untuk memperoleh sekuen penyandi 16S rRNA ([Gambar 8](#)). Sekuen 16S rRNA bakteri P3c dianalisis menggunakan program BLAST pada situs NCBI. Hasil BLAST menunjukkan bakteri P3c memiliki kecocokan tertinggi dengan *Bacillus flexus* sebesar 96% ([Tabel 2](#)). Kemudian dianalisis dengan pohon filogenetik dan terlihat bahwa bakteri P3c memiliki kekerabatan dengan *Bacillus flexus* strain Ha karena keduanya berada di cabang yang sama ([Gambar 9](#)).

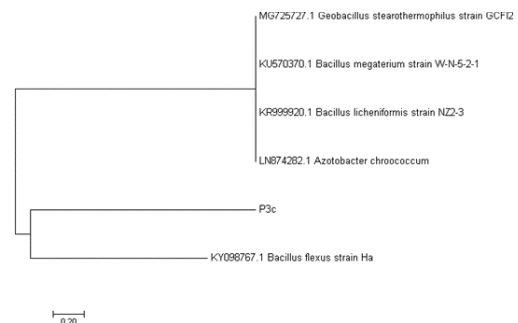
KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa diperolehnya tujuh belas isolat bakteri yang memiliki aktivitas fibrinolitik pada petis dengan aktivitas fibrinolitik terbesar yaitu pada isolat bakteri P3c. Identifikasi isolat bakteri P3c menggunakan sekuensing

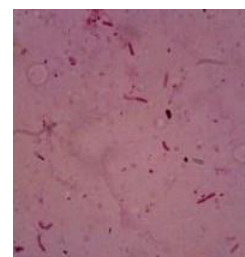
Tabel 2. Hasil BLAST 16s rRNA Bakteri P3c

Kode NCBI	Nama Spesies	Panjang Sekuen (bp)	Persentase Homolog
-	Isolat P3c	1522	96%
KY098767	<i>Bacillus flexus</i>	1404	96%
MG725727	<i>Geobacillus stearothermophilus strain GCF12</i>	1420	96%
KU570370	<i>Bacillus megaterium strain W-N-5-2-1</i>	1416	96%
KR999920	<i>Bacillus licheniformis strain NZ</i>	1443	96%
LN874282	<i>Azotobacter chroococcum</i>	1415	96%

16S rRNA diduga bahwa bakteri P3c adalah *Bacillus flexus*.



Gambar 9. Hasil Identifikasi Mikroskopis Bakteri P3c



Gambar 5. Hasil Identifikasi Mikroskopis Bakteri P3c Berdasarkan Pewarnaan Gram

Journal of Bioscience and Bioengineering,
113(3), pp. 307–314.

DAFTAR PUSTAKA

- Anh, D.B.Q. et al. (2015) 'Isolation and optimization of growth condition of *Bacillus* sp. from fermented shrimp paste for high fibrinolytic enzyme production', *Biological Sciences*, 40(1), pp. 23–28.
- Ashipala, O.K. and He, Q. (2008) 'Optimization of fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* DC-2 in aqueous two-phase system (polyethylene glycol 4000 and sodium sulfate)', *Bioresource Technology*, 99, pp. 4112–4119.
- Chang, C. et al. (2012) 'Purification and biochemical properties of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis*-fermented red bean', *Food Chemistry*, 133, pp. 1611–1617.
- Hastuti, U., Suarsini, E., Rahayu, E. and Ghofur, A. (2007) *Penuntun Praktikum Mikrobiologi dan Parasitologi*. Malang: Universitas Negeri Malang, p. 32.
- Kotb, E. (2012) *Fibrinolytic Bacterial Enzymes with Thrombolytic Activity*. London: Springer.
- Mahajan, P.M., Nayak, S. and Lele, S.S. (2012) 'Fibrinolytic enzyme from newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* ICTF-1: media optimization, purification and characterization',

Pramono, Y.B., Rahayu, E.S. and Utami, T. (2008) 'Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat pada fermentasi petis daging tradisional', *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 33(4), pp. 319–323.

Sneha, S., Das, M.P. and Rebecca, L.J. (2014) 'Isolation and screening of protease producing bacteria from marine waste', *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6, pp. 1157–1159.

Wahdiniati, L., Pantiwati, Y. and Latifa, R. (2016) 'Pemeriksaan kandungan bakteri *Salmonella* sp. dan bakteri *Escherichia coli* pada petis ikan di Pasar Klampis', *Jurnal Pendidikan Biologi Indonesia*, 2(2), pp. 198–205.

Yuan, J. et al. (2012) 'Thrombolytic effects of Douchi fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* LD-8547 in vitro and in vivo', *BMC Biotechnology*, 12(36), pp. 1–3.



Gambar 8. Hasil Electroferogram 16S Rrna Bakteri P3c