

KARAKTERISASI BAKTERI LIPOLITIK *Bacillus* sp. PADA WADI ORGAN PENCERNAAN IKAN SIDAT (*Anguilla* sp.)

[Characterization of Lipolytic Bacteria *Bacillus* sp. in Wadi of Digestive Organs of Sidat Fish (*Anguilla* sp.)]

Vicky Mahendra Nurzhulian¹⁾ Ayu Rahmawati Sulistyningtyas²⁾ Stalis Norma Ethica^{3)*}

- ¹⁾ Program Studi DIV Analisis Kesehatan, Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Semarang
²⁾ Program Studi DIII Analisis Kesehatan, Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Semarang
³⁾ Program Studi Magister Ilmu Laboratorium Klinis, Sekolah Pascasarjana, Universitas Muhammadiyah Semarang

*email: norma@unimus.ac.id

Diterima 25 November 2021/ Disetujui 3 Januari 2022

ABSTRACT

One of the leading enzymes having the potential to donate profit of billions of dollars in food and health sector is lipase. Lipase can be produced from microorganisms including bacteria. Lipolytic bacteria can be found in the digestive tract of fish. This study aims to obtain lipolytic bacteria from the wadi fermentation products of digestive organs of Sidat Fish (*Anguilla* sp.) and to identify bacterial species based on the 16S rRNA gene sequence. Samples of wadi fermentation products of fish digestive organs were serially diluted and cultured on Nutrient Agar (NA). The purified bacterial isolates were microscopically identified and tested for their lipolytic activity using Tween-80 agar media. Bacterial isolates with the highest lipolytic index were subjected to bacterial identification based on the 16S rRNA gene using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. The results showed that from the prepared wadi samples, five bacterial isolates coded WFAD-1 to WFAD-5 (WFAD stands for Wadi Fermentation of *Anguilla* sp. Digestive organs) could be obtained. Of these 5 isolates, two of them, WFAD-1 and WFAD-3, were capable of producing lipase and in particular, WFAD-1 had the highest lipolytic index of 2.95. BLAST analysis result on the amplified 16S rRNA gene of WFAD-1 isolate revealed a similarity level 85.79% and query coverage of 61% with *Bacillus velezensis*. Based on microscopic and molecular identification results, the lipolytic isolate WFAD-1 can be categorized into the genus *Bacillus*. As conclusion, *Bacillus* sp. WFAD-1 isolated from wadi fermentation product of digestive organs of ikan sidat has a potential as a source of bacterial lipase.

Keywords: Sidat fish, wadi fermentation, lipase, intestine organ, *Anguilla* sp.

ABSTRAK

Salah satu enzim utama berpotensi menyumbang keuntungan miliaran rupiah di bidang pangan dan kesehatan adalah lipase. Lipase dapat dihasilkan dari mikroorganisme termasuk bakteri. Bakteri lipolitik dapat ditemukan di saluran pencernaan ikan. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri lipolitik pada produk fermentasi wadi organ pencernaan ikan Sidat (*Anguilla* sp.) dan mengidentifikasi spesies bakteri tersebut berdasarkan urutan gen 16S rRNA. Sampel hasil fermentasi wadi organ pencernaan sidat diencerkan bertingkat lalu dikultur pada media Nutrient Agar (NA). Isolat bakteri yang telah dimurnikan diidentifikasi secara mikroskopis dan diuji aktivitas lipolitiknya menggunakan media agar Tween-80. Isolat bakteri dengan indeks lipolitik tertinggi diidentifikasi berdasarkan gen 16S rRNA dengan metode Polymerase Chain Reaction (PCR). Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari sampel wadi yang telah dibuat, dapat diperoleh lima isolat bakteri yang diberi kode WFAD-1 hingga WFAD-5 (WFAD singkatan dari Wadi Fermentation of *Anguilla* sp. Digestive organ). Dari 5 isolat tersebut, dua di antaranya yaitu WFAD-1 dan WFAD-3 mampu menghasilkan lipase dan khususnya WFAD-1 memiliki indeks lipolitik tertinggi yaitu 2,95. Hasil analisis BLAST pada produk amplifikasi gen 16S rRNA isolat WFAD-1 menunjukkan tingkat kemiripan 85,79% dan cakupan *query* 61% dengan *Bacillus velezensis*. Berdasarkan hasil identifikasi mikroskopis dan molekuler, WFAD-1 lipolitik dapat dikategorikan dalam genus *Bacillus*. Sebagai kesimpulan, *Bacillus* sp. WFAD-1 yang diisolasi dari produk fermentasi wadi organ pencernaan ikan sidat berpotensi sebagai sumber lipase bakterial.

Kata kunci: Ikan sidat, fermentasi wadi, lipase, organ pencernaan, *Anguilla* sp.

PENDAHULUAN

Kemampuan enzim yang unik dan spesifik mendorong penggunaannya dalam proses industri yang dikenal dengan istilah teknologi enzim (Susanti dan Fibriana, 2017). Salah satu enzim terkemuka dan berpotensi menyumbangkan dana miliaran dolar, yaitu enzim lipase (Zheng, 2018). Salah satu keunggulan enzim lipase dibandingkan enzim lainnya adalah ketahanan terhadap suhu, pH, dan zat kimia terlarut. Sayangnya, produksi enzim lipase dalam pasar global masih tergolong rendah dibandingkan enzim lainnya, yaitu sebesar kurang dari 10% (Guerrand, 2017). Hal ini disebabkan biaya yang dikeluarkan untuk memproduksi golongan enzim ini sangat tinggi (Verma dkk., 2012).

Enzim lipase dapat diproduksi dari mikroorganisme, hewan, dan tumbuhan. Kelebihan mikroorganisme sebagai sumber enzim lipase karena stabil pada pH netral atau basa, memiliki lama generasi yang pendek, dapat dimanipulasi secara genetik, dan biaya produksi yang lebih rendah (Lee dkk., 2015). Aplikasi enzim lipase telah diterapkan di bidang industri makanan, detergen, kertas, kosmetik, sebagai bioremediasi bagi lingkungan, dan dunia kesehatan. Bagi dunia kesehatan lipase digunakan untuk biosensor penyakit pankreatitis akut, agen bakterisida terhadap *Mycobacterium tuberculosis*, dan digunakan untuk sintesis obat Iovastatin, yaitu obat untuk menurunkan kadar kolesterol (Verma dkk., 2012). Keanekaragaman hayati Indonesia memberi peluang temuan sumber enzim baru untuk mengembangkan produksi enzim lipase (Ervina dkk., 2020; Arifiani & Ethica, 2018).

Wadi merupakan salah satu makanan tradisional berbahan dasar ikan yang berasal dari Kalimantan Tengah. Pembuatan wadi menerapkan prinsip fermentasi dengan penambahan lumu dan garam. Lumu merupakan bahan pendukung untuk pertumbuhan beberapa spesies bakteri, baik bakteri kontaminan maupun bakteri menguntungkan. Kelompok bakteri menguntungkan tersebut setelah dilakukan penelitian bersifat amilolitik, proteolitik, dan lipolitik (Dewi dkk., 2018; 2017).

Ikan sidat (*Anguilla* sp.) adalah salah satu komoditas perikanan bernilai ekonomis tinggi yang berpotensi untuk dikembangkan di Indonesia (Dzikri dkk., 2020). Kandungan protein ikan sidat tergolong tinggi karena berkisar antara 15-20%. Kandungan nutrisi

protein yang tinggi dalam ikan sidat dapat dimanfaatkan oleh manusia untuk pemenuhan kebutuhan gizi. Kandungan nutrisi dalam ikan sidat ditentukan oleh spesies, usia, jenis kelamin, pakan ikan, dan kondisi habitat ikan. Saat ini ikan sidat mentah telah menjadi komoditi ekspor bahan pangan bagi Indonesia (Nafsiyah dkk., 2018)

Binatang akuatik seperti ikan sidat adalah bagian yang sering dikolonisasi oleh bakteri, khususnya pada saluran pencernaan dan insangnya. Sementara bagian kulitnya jarang dikolonisasi oleh bakteri karena bagian ini berhubungan langsung dengan air (Lestari dkk., 2016). Saluran pencernaan ikan merupakan bagian yang digemari bakteri karena bagian tersebut kaya akan nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan. Keberadaan bakteri di dalam saluran pencernaan ikan laut dan air tawar telah banyak diteliti. Organ pencernaan ikan dapat ditemukan bakteri penghasil enzim ekstraseluler, meliputi amilase, selulase, protease, dan lipase. Kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim-enzim tersebut didasarkan pada jenis makanan yang dikonsumsi oleh ikan. Bakteri lipolitik dapat ditemukan pada saluran pencernaan ikan omnivora dan karnivora (Das dkk., 2014).

Saat ini identifikasi bakteri lipolitik dapat dilakukan dengan metode berbasis biologi molekuler, di mana metode tersebut dinilai cepat serta memiliki spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi. Metode tersebut yaitu analisis sekuen gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA memiliki bagian yang lestari dan pada setiap organisme gen tersebut dapat ditemukan. Oleh karena itu, gen 16S rRNA dapat digunakan dalam PCR dan analisis sekuen (Fazri dkk., 2019; Islami dkk., 2019). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri lipolitik yang terdapat pada produk fermentasi wadi organ pencernaan ikan sidat berdasarkan sekuen Gen 16S rRNA.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Sampel berupa produk fermentasi wadi dibuat dari organ pencernaan ikan sidat segar seberat 0,5 g yang dipotong-potong dengan gunting steril. Potongan sampel kemudian dicampur dengan garam koser dan lumu untuk menghasilkan wadi. Tween-80 digunakan sebagai bahan utama atau substrat pada media selektif untuk pertumbuhan bakteri lipolitik. Alat utama berupa 1 set thermacylcer dan elektroforesis dengan merek

Biorad digunakan dalam analisis *Polymerase Chain Reaction*. Sepasang primer yang digunakan dalam amplifikasi gen 16S rRNA bakteri lipolitik hasil isolasi adalah 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan primer 1492R (5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3'). Piranti bioinformatika BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool - nucleotide*) digunakan dalam analisis sekuen produk amplifikasi gen 16S rRNA (Ethica & Raharjo, 2014).

Metode

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Muhammadiyah Semarang pada bulan Mei-Juni 2021. Tahap pertama penelitian adalah pembuatan produk wadi yang dibuat dari lumu. Lumu disiapkan dengan cara menyangrai beras dan ditumbuk hingga halus. Organ pencernaan ikan sidat dicuci hingga bersih dan dicampur dengan garam koser dengan perbandingan 1:1 hingga merata. Organ pencernaan tersebut didiamkan dalam toples yang tertutup selama ± 24 jam. Organ pencernaan dicuci kembali, kemudian dicampur dengan lumu hingga merata. Organ pencernaan tersebut didiamkan kembali dalam toples yang tertutup selama 7-10 hari (Restu, 2018; Waty dkk., 2019).

Tabung reaksi steril sebanyak 6 buah diisi dengan NaCl fisiologis masing-masing sebanyak 4,5 ml. Sampel dimasukkan ke dalam tabung tanpa pengenceran dan dihomogenkan. Pengenceran secara bertingkat dilakukan dari seri 10-1 hingga 10-5, lalu diinokulasikan pada media Nutrient Agar (NA). Media NA diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Sabrina dkk., 2018). Morfologi koloni diamati dan pewarnaan Gram dilakukan untuk mengamati morfologi sel. Koloni-koloni bakteri dipisahkan berdasarkan perbedaan karakteristik makroskopik dan mikroskopik, dipurifikasi pada media NA baru dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Rau dkk., 2018; Safitri dkk., 2018). Isolat bakteri yang telah murni diuji aktivitas lipolitiknya pada media agar Tween-80 secara *dotting* dan diinkubasi selama 48 jam pada

suhu 37°C. Zona kalsinasi di sekitar koloni bakteri diukur diameternya dengan jangka sorong dan indeks lipolitiknya dihitung (Rizky dkk., 2017; Ilesanmi dkk., 2020).

Isolat bakteri dengan indeks lipolitik tertinggi dilakukan ekstraksi DNA menggunakan protokol dan reagen Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit GBB100 (Geneaid). Tahap preparasi sampel dalam protokol kit dilakukan dengan penambahan Gram+ Buffer (berisi lisozim) dan Proteinase K. Tahap lisis sel dilakukan dengan penambahan *buffer*. Tahap pengikatan DNA dilakukan dengan penambahan etanol absolut dalam *GD Column*. Tahap pencucian DNA dilakukan dengan penambahan W1 Buffer dan Wash Buffer. Tahap elusi dilakukan dengan penambahan *Elution Buffer*. Ekstrak DNA genomik bakteri diukur kemurnian dan konsentrasinya dengan alat spektrofotometer NanoDrop pada λ260 nm dan λ280 nm (Pambudiono dkk., 2016).

Formulasi PCR disiapkan dalam microtube 0,2 ml yang terdiri dari : 6 µl DNA genomik (1,32 ng/µl); masing-masing 2 µl primer 27F dan 1492R (10 µM); 12,5 µl GoTaq® Green Master Mix; dan 2,5 µl NFW (*Nuclease Free Water*). *Microtube* dimasukkan ke dalam alat *thermocycler*. *Thermocycler* diprogram sebagai berikut: pra-denaturation pada 95°C selama 4 menit, *denaturation* pada 95°C selama 30 detik, *annealing* pada 55°C selama 30 detik, *extention* pada 72°C selama 2 menit, dan *final extention* pada 72°C selama 10 menit. Hasil PCR diamati pada gel elektroforesis agarosa 2% (Ethica dan Raharjo, 2014).

Produk PCR dikirimkan ke PT Indolab Utama, Jakarta Barat untuk dilakukan proses sekuensing gen 16S rRNA dengan metode Sanger. Software Geneious digunakan untuk memperoleh sekuen konsensus yang berasal dari hasil sekuensing. Sekuen konsensus tersebut dicek dengan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) untuk mencari kesamaan sekuen 16S rRNA dari bakteri lain yang tersimpan dalam database GenBank (Ethica dan Raharjo, 2014; Untu dkk., 2015).

Tabel 1. Karakteristik Makroskopik Isolat Bakteri

Kode	Bentuk	Warna	Ukuran (mm)	Konsistensi	Elevasi	Tepi
WFAD-1	<i>circular</i>	putih	4	kasar	<i>umbonate</i>	<i>erose</i>
WFAD-2	<i>circular</i>	putih	2	halus	<i>convex</i>	<i>entire</i>
WFAD-3	<i>circular</i>	krem	2	halus	<i>flat</i>	<i>entire</i>
WFAD-4	<i>circular</i>	kuning	3	halus	<i>flat</i>	<i>entire</i>
WFAD-5	<i>punctiform</i>	putih	0,5	halus	<i>flat</i>	<i>entire</i>

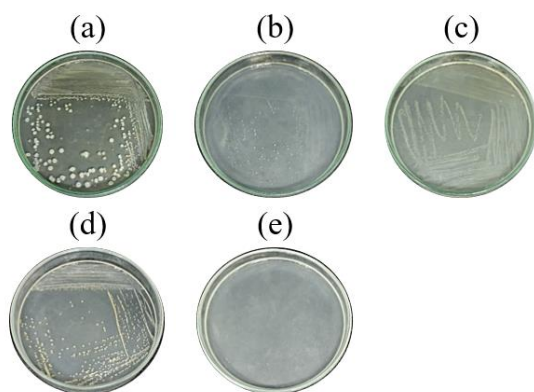
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan sampel berupa produk fermentasi wadi organ pencernaan ikan sidat (*Anguilla* sp.). Proses fermentasi berlangsung selama tujuh hari setelah proses penggaraman. Karakteristik dari produk fermentasi wadi organ pencernaan ikan sidat: berwarna coklat, berbau asam khas beras, dan tekstur lunak sedikit berair. Produk fermentasi wadi organ pencernaan ikan sidat ditunjukkan oleh Gambar 1.



Gambar 1. Produk fermentasi wadi organ pencernaan ikan Sidat

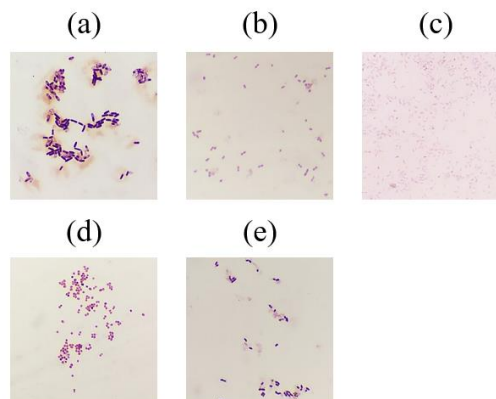
Dari sampel diperoleh lima isolat bakteri berbeda setelah dikultur pada media *Nutrient Agar* (NA). Kelima isolat tersebut diberi kode WFAD-1, WFAD-2, WFAD-3, WFAD-4, dan WFAD-5. WFAD merupakan singkatan dari *Wadi Fermentation of Anguilla* sp. *Digestive organs*. Karakteristik makroskopik seluruh isolat bakteri ditunjukkan pada Gambar 2 dan Tabel 1.



Gambar 2. Hasil kultur bakteri isolat wadi organ pencernaan ikan Sidat pada Media NA (a) WFAD-1, (b) WFAD-2, (c) WFAD-3, (d) WFAD-4, dan (e) WFAD-5

Masing-masing isolat bakteri dengan kode WFAD-1, WFAD-2, WFAD-3, WFAD-4, dan WFAD-5 dilakukan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengidentifikasi karakteristik mikroskopik, sifat Gram, dan memastikan bahwa sel-sel bakteri sejenis.

Karakteristik mikroskopik dari lima isolat bakteri dapat ditunjukkan oleh Gambar 3 dan Tabel 2.

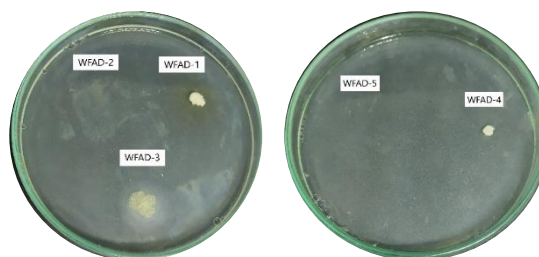


Gambar 3. Hasil Pewarnaan Gram Isolat Bakteri (a) WFAD-1, (b) WFAD-2, (c) WFAD-3, (d) WFAD-4, dan (e) WFAD-5

Tabel 2. Karakteristik Mikroskopik Isolat Bakteri

Kode	Bentuk	Susunan	Gram
WFAD-1	basil berspora	berderet	positif
WFAD-2	kokus	duplo	positif
WFAD-3	basil	soliter	negatif
WFAD-4	kokus	bergerombol	positif
WFAD-5	kokus	duplo	positif

Lima isolat bakteri yang telah murni pada media NA diuji aktivitas lipolitiknya secara kualitatif dengan media agar Tween-80. Isolat bakteri yang bersifat lipolitik akan membentuk zona kalsinasi di sekitar koloni bakteri yang tampak sebagai kiral tak terlarut. Isolat bakteri WFAD-1 dan WFAD-3 dapat tumbuh pada media agar Tween-80 dan mampu membentuk zona kalsinasi. Indeks lipolitik dari isolat bakteri WFAD-3 memiliki nilai sebesar 2,08 sedangkan isolat bakteri WFAD-1 memiliki nilai indeks lipolitik sebesar 2,95 dan merupakan indeks lipolitik tertinggi. Hasil pengujian aktivitas lipolitik dari kelima isolat bakteri dapat diamati pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil Uji Aktivitas Lipolitik bakteri isolate wadi produk organ pencernaan ikan Sidat pada Media Agar Tween-80

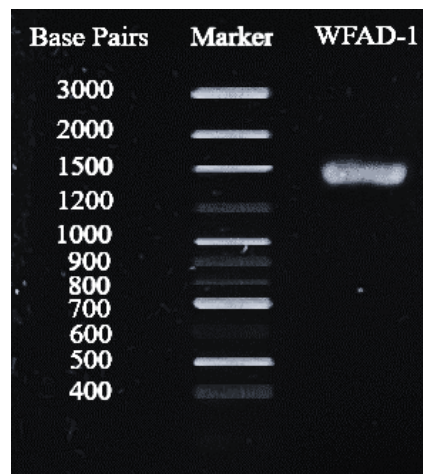
Penelitian yang terkait dengan isolasi bakteri proteolitik untuk mencari sumber baru enzim lipase telah banyak dilakukan. Namun produk enzim lipase bakteri tidak semuanya dapat diklasifikasikan dalam kelompok *food-grade* karena diisolasi dari limbah. Sebagai contoh Arifiani & Ethica (2018) serta Purwaningrum dkk. (2021) melaporkan bakteri proteolitik yang berasal dari limbah biomedis. Dalam penelitian tersebut dilaporkan adanya bakteri lipolitik namun indeks lipolitiknya tidak diinformasikan. Mazhar dkk. (2018) melaporkan sejumlah strain bakteri lipolitik *Bacillus cereus* yang diisolasi dari tanah menggunakan media tributyrin yang memiliki rentang nilai indeks lipolitik 0,53 – 1,97. Rizky dkk. (2017) juga telah melaporkan sejumlah isolat bakteri penghasil lipase pada wadi, dengan rentang nilai indeks lipolitik sebesar 1,51-1,94. Rentang nilai indeks lipolitik ini lebih rendah dibandingkan yang diperoleh dari penelitian ini (2,95). Isolasi bakteri lipolitik pada organ pencernaan ikan lele dilaporkan oleh Kurniasih dkk. (2014), namun indeks lipolitik bakteri yang diperoleh tidak diukur. Penelitian Sarastiti dkk. (2020) juga berhasil mengisolasi bakteri lipolitik dari organ pencernaan udang namun pada penelitian tersebut pengamatan zona lipolitik hanya dilakukan secara kuantitatif

Isolat bakteri WFAD-1 diekstrak DNA genomnya dan hasilnya berupa sampel DNA genomik bakteri sebanyak 50 µl. Sampel DNA genomik bakteri selanjutnya diukur kemurniannya menggunakan alat spektrofotometer NanoDrop pada λ260 nm dan λ280 nm. Hasil pengukuran kemurnian sampel DNA genomik bakteri dapat diamati pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Pengukuran Kemurnian Sampel DNA Genomik Bakteri

Sample ID	Konsentrasi	A260	A280	A260/280
WFAD-1	1,32 ng/µl	0,026	0,008	1,923

Sampel DNA genomik bakteri dengan konsentrasi 1,32 ng/µl digunakan sebagai *DNA template* untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA dengan metode PCR. Primer 27F dan 1492R digunakan dalam proses amplifikasi gen 16S rRNA yang akan menghasilkan amplicon berukuran ~1500 bp. Amplicon *di-run* pada alat elektroforesis gel agarosa 2% untuk mengetahui apakah amplicon tersebut memiliki panjang spesifik ~1500 bp dibandingkan dengan marker. Hasil dari *running* elektroforesis gel agarosa 2% dapat ditunjukkan oleh Gambar 5.



Gambar 5. Hasil Elektroforesis Gel Agarosa 2%

Hasil sekuensing yaitu urutan basa nukleotida primer *forward* dan *reverse* gen 16S rRNA berupa file dengan format ab1. File tersebut dikonversikan menjadi format fasta agar dapat dilakukan proses *editing*. Pensejajaran hasil pembacaan primer *forward* dan *reverse* dengan *software* Geneious menghasilkan sekuen konsensus dengan panjang 1557 bp. Sekuen konsensus tersebut kemudian dicek dengan program BLAST yang dapat diakses melalui website <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa sekuen gen 16S rRNA isolat bakteri WFAD-1 memiliki nilai kemiripan tertinggi sebesar 85,79% dan *query coverage* sebesar 61% dengan sekuen spesies bakteri *Bacillus velezensis*.

DISKUSI

Isolasi bakteri diawali dengan pengenceran bertingkat sampel yang bertujuan untuk mengurangi jumlah mikroorganisme yang tersuspensi di dalam cairan. Koloni bakteri dari pengenceran sampel dilakukan purifikasi yang bertujuan untuk memperoleh koloni-koloni bakteri tunggal terpisah yang murni (Fitriani dkk., 2016). Koloni bakteri dapat dikatakan murni apabila koloni tersebut memiliki morfologi yang sama karena berasal dari pembelahan satu sel. Morfologi koloni tersebut didasarkan pada bentuk, warna, ukuran, konsistensi, elevasi, dan tepi (Restuati dan Gultom, 2012).

Isolat bakteri hasil purifikasi dilakukan pewarnaan Gram untuk mengetahui sifat Gramnya dan memastikan bahwa isolat terdiri dari satu jenis sel bakteri yang seragam. Bakteri Gram-positif berwarna ungu karena memiliki struktur dinding sel yang tebal dan mengandung

sedikit lapisan lipid pada membran selnya. Kompleks kristal violet-iodin terbentuk karena pemberian cat Gram A dan Gram B yang mewarnai seluruh permukaan bakteri. Pemberian cat Gram C yang berisi etanol 96% akan mengakibatkan denaturasi protein pada dinding sel bakteri Gram-positif, sehingga pori-pori mengecil dan kompleks kristal violet-iodin yang berwarna ungu dapat dipertahankan. Bakteri Gram-negatif memiliki banyak lapisan lipid pada membran selnya, sehingga etanol 96% akan melarutkan lipid tersebut. Pori-pori bakteri Gram-negatif akan membesar dan zat warna kristal violet mudah terlepas. Pemberian cat Gram D yang berisi safranin berwarna merah menjadi zat pewarna utama bagi bakteri Gram-negatif (Mubarak dkk., 2016).

Masing-masing isolat bakteri dilakukan uji aktivitas lipolitik dengan media agar Tween-80. Isolat bakteri yang bersifat lipolitik akan membentuk zona buram (kalsinasi) di sekitar koloni bakteri. Zona tersebut dapat terbentuk karena isolat bakteri mampu menghasilkan enzim lipase untuk menghidrolisis Tween-80 menjadi asam lemak. Asam lemak tersebut akan berikatan dengan ion kalsium yang berasal dari penggunaan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dalam media. Kompleks asam lemak dengan ion kalsium tersebut teramati sebagai endapan putih keruh di sekitar koloni bakteri (Mazhar dkk., 2018).

Tahap ekstraksi DNA isolat bakteri pada penelitian ini menggunakan metode *spin column*. Proses pengikatan DNA di dalam *GD Column* dapat terjadi karena terdapat membran silika. Partikel silika bermuatan positif akan mengikat DNA bermuatan negatif dan menahannya selama proses sentrifugasi (Ariyanti dan Sianturi, 2019). Nilai kemurnian DNA dihitung dengan cara membagi nilai absorbansi $\lambda 260$ nm dan nilai absorbansi $\lambda 280$ nm. Isolat DNA dikatakan murni apabila rasio absorbansi berada pada rentang 1,8-2,0. Rasio absorbansi yang menunjukkan nilai di bawah 1,8 berarti terdapat kontaminan berupa protein. Rasio absorbansi yang menunjukkan nilai di atas 2,0 berarti terdapat kontaminan berupa RNA (Setiawan dkk., 2021). Gambaran pita DNA menandakan bahwa penelitian ini telah berhasil mengamplifikasi gen 16S rRNA. Keberhasilan amplifikasi fragmen DNA dipengaruhi oleh : *DNA Template*, primer, MgCl_2 , enzim polimerase, suhu, waktu, dan jumlah siklus. Penelitian ini menggunakan kondisi PCR yang tepat, sehingga dihasilkan ampikon yang spesifik (Muhsinin dkk., 2018).

Persentase minimal *query coverage* yang dapat diterima adalah sebesar 95%, kecuali sekuen dengan bacaan yang lebih rendah

diberlakukan minimal 75% (Narita dkk., 2012). Nilai homologi sekuen gen 16S rRNA sebesar <97,5% menunjukkan spesies yang berbeda atau dapat dipertimbangkan sebagai spesies bakteri baru (Akihary dan Kolondam, 2020; Putri dan Nurkanto, 2016). Isolat WFAD-1 memiliki nilai *query coverage* sebesar 61% dan *percent identity* sebesar 85,79%, sehingga tidak dapat dikategorikan sebagai spesies bakteri *Bacillus velezensis*. Nama spesies isolat bakteri WFAD-1 belum dapat ditentukan dan hanya dapat dikategorikan ke dalam genus *Bacillus*. Hasil identifikasi tersebut diperkuat dengan kesamaan morfologi koloni dan sel dari isolat bakteri WFAD-1 yang diperoleh dari penelitian ini yaitu memiliki karakteristik sel berbentuk batang, bersifat Gram-positif, menghasilkan endospora, motil dengan tipe flagel peritrikus, dan bersifat katalase positif. Umumnya koloni bakteri *Bacillus* sp. berwarna putih kekuningan hingga putih suram, permukaannya kering kasar, dan berukuran besar (Purwadi et al., 2020).

Kemampuan produksi protease yang dimiliki *Bacillus* sp. berpotensi untuk dikembangkan dalam industri bioteknologi. Kemampuan *Bacillus* sp. yang telah diketahui antara lain: bersifat aerob atau fakultatif anaerob, memiliki kemampuan enzimatik yang bervariasi, tidak memerlukan faktor penumbuh yang relatif mahal, dan memiliki kisaran suhu pertumbuhan yang luas (Napitupulu dkk., 2019).

KESIMPULAN

Kesimpulan diambil dari hasil dan pembahasan serta mengacu pada tujuan penelitian. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa dari sampel produk fermentasi wadi organ pencernaan ikan sidat (*Anguilla* sp.) diperoleh lima isolat bakteri yang diberi kode WFAD-1 hingga WFAD-5. Dari lima isolat bakteri tersebut yang bersifat lipolitik adalah isolat bakteri WFAD-1 dan WFAD-3. Isolat WFAD-1 memiliki indeks lipolitik tertinggi, yaitu sebesar 2,95 sehingga diidentifikasi secara molekuler. Hasil identifikasi berbasis gen 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat bakteri WFAD-1 masuk dalam *Bacillus* sp. *Bacillus* sp. WFAD-1 pada produk fermentasi wadi organ pencernaan ikan sidat (*Anguilla* sp.) dapat dijadikan sumber alternatif enzim lipase.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih disampaikan kepada institusi Universitas

Muhammadiyah Semarang atas dukungan finansial yang telah diberikan dalam bentuk hibah penelitian internal untuk mendukung pekerjaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Akihary, C.V., Kolondam, B.J., 2020. Pemanfaatan Gen 16S rRNA sebagai Perangkat Identifikasi Bakteri untuk Penelitian-Penelitian di Indonesia. *Pharmacon* 9, 16–22.
- Arifiani, N. and Ethica, S.N., 2018, November. Isolasi Bakteri Penghasil Lipase dan Protease yang Berpotensi sebagai Agen Bioremediasi dari Limbah Biomedis Cair Puskesmas Halmahera Kota Semarang. In *Prosiding Seminar Nasional Mahasiswa Unimus* (Vol. 1). <https://prosiding.unimus.ac.id/index.php/mahasiswa/article/view/156>
- Ariyanti, Y., Sianturi, S., 2019. Ekstraksi DNA Total dari Sumber Jaringan Hewan (Ikan Kerapu) Menggunakan Metode Kit for Animal Tissue. *J. Sci. Appl. Technol.* 3, 40–45.
- Das, P., Mandal, S., Khan, A., Manna, S.K., Ghosh, K., 2014. Distribution of Extracellular Enzyme-Producing Bacteria in the Digestive Tracts of 4 Brackish Water Fish Species. *Turkish J. Zool.* 38, 79–88. <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/134348>
- Dewi, I.S., Hastuti, U.S., Lestari, U., Suwono, H., 2017. The Effects of Kinds of Lumus and the Storage Period on the Quality of Patin Wadi Based on the Results of Nutrient Tests, in: *AIP Conference Proceedings*. AIP Publishing, pp. 0–8. <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.4983430>
- Dewi, I.S., Hastuti, U.S., Lestari, U., Suwono, H., 2018. Consumer Preference Toward Catfish Wadi Based on the Organoleptic Quality Regarding The Types of Lumu in Various Concentration, in: *AIP Conference Proceedings*. AIP Publishing, pp. 0–7.
- Dzikri, M., Shafruddin, D. and Supriyono, E., 2020. Potensi Besar Budidaya Ikan Sidat (*Anguilla* sp.) di Kecamatan Simpenan, Sukabumi. *Jurnal Pusat Inovasi Masyarakat (PIM)*, 2(2), pp.268-274. <https://journal.ipb.ac.id/index.php/pim/article/view/30407>
- Ervina, E., Sumardi, S., Ekowati, C.N. and Rosa, E., 2020. Lipolytic-screening of *Bacillus* genera as Biocontrol candidate In Coffee Plantation. *Jurnal Ilmiah Biologi Eksperimen dan Keanekaragaman Hayati*, 7(1), pp.31-34.
- Ethica, S.N. and Raharjo, T.J., 2014. Detection of genes involved in glycerol metabolism of *Alcaligenes* sp. JG3. Doctoral dissertation, Universitas Gadjah Mada. http://etd.repository.ugm.ac.id/home/detail_pencarian/75357
- Fazri, M., Kartika, A.I., Darmawati, S. and Ethica, S.N., 2019. Isolasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri *Staphylococcus epidermidis* pada Rusip Udang Windu (*Penaeus monodon*) Pasca Fermentasi 24 Jam Berdasarkan Sekuen Gen 16S rRNA. In *Prosiding Seminar Nasional Mahasiswa Unimus* (Vol. 2). <https://prosiding.unimus.ac.id/index.php/mahasiswa/article/view/463>
- Fitriani, Meylina, L., Rijai, L., 2016. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Antibiotik dari Tanah Sawah, in: *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*. pp. 125–132.
- Guerrand, D., 2017. Lipases Industrial Applications: Focus on Food and Agroindustries. *OCL - Oilseeds fats, Crop. Lipids* 24, 0–7. <https://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/pharmacon/article/view/27405>
- Ilesanmi, O.I., Adekunle, A.E., Omolaiye, J.A., Olorode, E.M., Ogunkanmi, A.L., 2020. Isolation, Optimization and Molecular Characterization of Lipase Producing Bacteria from Contaminated Soil. *Sci. African* 8, 1–10.
- Islami, H.N., Sulistyningtyas, A.R., Darmawati, S. and Ethica, S.N., 2019. Isolasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri Proteolitik *Staphylococcus warneri* Strain IRLV2 pada Udang Putih (*Litopenaeus vannamei*) Berdasarkan Sekuen Gen 16S rRNA. In *Prosiding Seminar Nasional Mahasiswa Unimus* (Vol. 2). <https://prosiding.unimus.ac.id/index.php/mahasiswa/article/view/436>
- Kurniasih, T., Lusiastuti, A.M., Azwar, Z.I. and Melati, I., 2014. Isolasi Dan Seleksi Bakteri Saluran Pencernaan Ikan Lele Sebagai Upaya Mendapatkan Kandidat Probiotik Untuk Efisiensi Pakan Ikan. *Jurnal Riset Akuakultur*, 9(1), pp.99-109. <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/jra/article/viewFile/511/517>
- Lee, L.P., Karbul, H.M., Citartan, M., Gopinath, S.C.B., Lakshmi Priya, T., Tang, T.-H., 2015. Lipase-Secreting *Bacillus* Species in an Oil-Contaminated Habitat: Promising

- Strains to Alleviate Oil Pollution. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–9.
- Lestari, N.W., Budiharjo, A., 2016. Bakteri Heterotrof Aerobik Asal Saluran Pencernaan Ikan Sidat (*Anguilla bicolor bicolor*) dan Potensinya sebagai Probiotik. *Bioteknologi* 13, 9–17.
- Mazhar, H., Abbas, N., Zamir, T., Hussain, Z. and Ali, S.S., 2018. Optimization study of lipolytic enzyme from *Bacillus cereus*, PCSIR NL-37. *Punjab University Journal of Zoology*, 33(2), pp.217-224.
- Mubarak, Z., Chismirina, S., Daulay, H.H., 2016. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Propolis Alami dari Sarang Lebah terhadap Pertumbuhan *Enterococcus faecalis*. *J. Syiah Kuala Dent. Soc.* 1, 175–186.
- Muhsinin, S., Sulastri, M.M., Supriadi, D., 2018. Deteksi Cepat Gen InvA pada *Salmonella* spp. dengan Metode PCR. *J. Sains Farm. Klin.* 5, 191–200. <http://jsfk.ffarmasi.unand.ac.id/index.php/jsfk/article/view/290>
- Nafsiyah, I., Nurilmala, M., Abdullah, A., 2018. Komposisi Nutrisi Ikan Sidat *Anguilla bicolor bicolor* dan *Anguilla marmorata*. *J. Pengolah. Has. Perikan. Indones.* 21, 504–512. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v21i3.24733>
- Napitupulu, H.G., Rumengan, I.F.M., Wullur, S., Ginting, E.L., Rimper, J.R.T.S.L., Toloh, B.H., 2019. *Bacillus* sp. sebagai Agensi Pengurai dalam Pemeliharaan *Brachionus rotundiformis* yang Menggunakan Ikan Mentah sebagai Sumber Nutrisi. *J. Ilm. Platax* 7, 158–169.
- Narita, V., Arum, A.L., Isnaeni, S., Fawzya, N.Y., 2012. Analisis Bioinformatika Berbasis WEB untuk Eksplorasi Enzim Kitosanase Berdasarkan Kemiripan Sekuens. *J. Al-Azhar Indones. Seri Sains dan Teknol.* 1, 197–203. <https://jurnal.uai.ac.id/index.php/SST/article/view/84>
- Pambudiono, A., Suarsini, E., Amin, M., 2016. Isolasi DNA Genom Bakteri Potensial Pengkelat Logam Berat Kadmium dari Limbah Cair Penepungan Agar. *Semin. Nas. Pendidik. dan Sainstek* 103–107. <http://hdl.handle.net/11617/7565>
- Purwadi, A.A., Darmawati, S., Sulistyanyngtyas, A.R. and Ethica, S.N., 2019. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Proteolitik *Bacillus cereus* strain IRPMD-3 pada Rusip Udang Windu (*Penaeus monodon*) Berdasarkan Gen 16S rRNA. In *Prosiding Seminar Nasional Mahasiswa Unimus* (Vol. 2). <https://prosiding.unimus.ac.id/index.php/mahasiswa/article/view/462>
- Purwaningrum, E., Zulaikhah, S.T. and Ethica, S.N., Characterization Of Bacteria From Liquid Clinical Laboratory Waste With Potential As Bioremediation Agent. *World Journal of Pharmaceutical & Lifa Sciences.* 7(9), pp.1626. https://www.wjpls.org/admin/assets/article_issue/69082021/1630407963.pdf
- Putri, A.L., Nurkanto, A., 2016. Keragaman Aktinomisetes Serasah, Sedimen, dan Tanah Pulau Enggano, Bengkulu. *Ber. Biol.* 15, 217–225. https://e-journal.biologi.lipi.go.id/index.php/berita_biologi/article/view/2238
- Rau, C.H., Yudistira, A., Simbala, H.E.I., 2018. Isolasi, Identifikasi secara Molekuler Menggunakan Gen 16S rRNA, dan Uji Aktivitas Antibakteri bakteri Symbion Endofit yang Diisolasi dari Alga *Halimeda opuntia*. *Pharmacon* 7, 53–61.
- Restu, 2018. Pengolahan Wadi Ikan Bawal Air Tawar (*Colossoma macropomum*). *J. Ilmu Hewani Trop.* 7, 70–73. <https://garuda.ristekbrin.go.id/documents/detail/1157360>
- Restuati, M., Gultom, E.S., 2012. Uji Potensi Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons Asal Pulau Ngge (Sibolga) sebagai Sumber Antibakteri. *J. Sainatika* 12, 98–104.
- Rizky, M.Y., Fitri, R.D., Hastuti, U.S., Prabaningtyas, S., 2017. Identifikasi Uji Kemampuan Hidrolisis Lemak dan Penentuan Indeks Zona Bening Asam Laktat pada Bakteri Dalam Wadi Makanan Traditional Kalimantan Tengah. *Bionature* 18, 87–98.
- Sabrina, A.N. and Ethica, S.N., 2018, November. Potensi Bakteri Indigen Penghasil Enzim Protease dan Lipase sebagai Agen Bioremediasi Limbah Biomedis Puskesmas Tlogosari Kulon. In *Prosiding Seminar Nasional Mahasiswa Unimus* (Vol. 1). <https://prosiding.unimus.ac.id/index.php/mahasiswa/article/view/157>
- Safitri, R., Muchlissin, S.I., Mukaromah, A.H., Darmawati, S., Ethica, S.N., 2018. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease *Bacillus thuringiensis* pada Oncom Merah Pasca Fermentasi 24 Jam. *Semin. Nas. Edusainstek FMIPA UNIMUS* 2018 62–69. <https://jurnal.unimus.ac.id/index.php/psn/12012010/article/view/4239>
- Sarastiti, S., Suminto, S. and Sarjito, S., 2019. Identifikasi Molekuler Spesies Bakteri Kandidat Probiotik Yang Diisolasi Dari

- Usus Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) Koleksi Dari Kabupaten Subang, Jawa Barat. *Jurnal Pasir Laut*, 4(1), pp.9-15.
<https://doi.org/10.14710/pasir%20laut.2020.30519>
- Setiawan, A., Sebastian, A., Purwestri, Y.A., 2021. Deteksi Gen Ketahanan Hawar Daun Bakteri Xa21 pada Padi (*Oryza sativa* L.) Hitam dan Merah Lokal Indonesia. *Vegetalika* 10, 120–132.
- Susanti, R., Fibriana, F., 2017. *Teknologi Enzim*, 1st ed. CV ANDI OFFSET, Yogyakarta.
- Untu, P., Rumengan, I.F.M., Ginting, E.L., 2015. Identifikasi Mikroba yang Koeksis dengan *Ascidia Lissoclinum patella* Menggunakan Sekuens Gen 16S rRNA. *J. Pesisir dan Laut Trop.* 2, 23–33.
- Verma, N., Thakur, S., Bhatt, A.K., 2012. Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties (A Review). *Int. Res. J. Biol. Sci.* 1, 88–92.
<http://www.isca.me/IJBS/Archive/v1/i8/15.ISCA-IRJBS-2012-180.pdf>
- Waty, K., Purwijantiningsih, E., Pranata, S., 2019. Kualitas Fermentasi Spontan Wadi Ikan Patin (*Pangasius* Sp.) dengan Variasi Konsentrasi Garam. *J. Biota* 4, 24–32.
- Zheng C. Screening and identification of lipase producing bacterium. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 2018 (Vol. 108, No. 4, p. 042088). IOP Publishing
<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/108/4/042088/pdf>