

ARTIKEL PENELITIAN

Karakterisasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri Asam Laktat Diisolasi dari Ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singkarak Berpotensi Sebagai Probiotik

Heppy Setya Prima¹, Niken¹, Fatridha Yansen²

1. Program Studi Teknologi Laboratorium Medis Stikes Syedza Saintika, Padang, Sumatera Barat; 2. Program Studi Farmasi Universitas Sumatera Barat

Korespondensi: Heppy Setya Prima; Heppysetya94@gmail.com

Abstrak

Tujuan: Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengidentifikasi isolat bakteri asam laktat dari ikan inaktif (*Mystacoleucus padangensis*) dari Danau Singkarak Bilih dan mengevaluasi potensi probiotiknya. Setiap jenis bakteri asam laktat memiliki efek probiotik yang berbeda. Oleh karena itu, seleksi dan identifikasi diperlukan untuk mendapatkan strain probiotik yang baik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui bakteri asam laktat yang terkandung dalam billfish tertentu (*Mystacoleucus padangensis*) melalui pengujian biokimia dan dilanjutkan melalui pengujian molekuler. **Metode:** Penelitian ini merupakan penelitian kualitatif deskriptif untuk mengetahui bakteri asam laktat tertentu pada ikan bilih (*Mystacoleucus padangensis*). BAL dilakukan menggunakan media isolasi selektif Man ROGOSA Sharpe Agar. Seleksi dilakukan dengan pengamatan morfologi dan pewarnaan Gram. Sifat biokimia dan jenis fermentasi juga diuji. **Hasil:** Untuk mewujudkan potensinya sebagai probiotik, hasilnya adalah: Metode identifikasi molekuler menggunakan gen penanda 16S rRNA digunakan dalam identifikasi bakteri asam laktat pada penelitian ini. **Kesimpulan:** Berdasarkan hasil analisis dengan menggunakan BLAST, ditemukan bahwa jenis isolat bakteri fermentasi Ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) kode sampel IB1, 99,86% mirip dengan *Lactobacillus fermentum*. **Kata kunci:** , *Lactobacillus fermentum*, ikan bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singkarak, Probiotik

Abstract

*This study aims to isolate and identify lactic acid isolates from Lake Singkarak Bilih Fish (*Mystacoleucus padangensis*) which have not been utilized and evaluate their probiotic potential. Each species of lactic acid bacteria has different probiotic effects, so it requires selection and assistance to obtain good probiotic strains. The purpose of this bacterial research was to determine for sure the lactic acid contained in Bilih Fish (*Mystacoleucus padangensis*) using biochemical tests and followed by molecular tests. Methods: This research is a qualitative exploratory descriptive study to determine certain lactic acid bacteria contained in Bilih Fish (*Mystacoleucus padangensis*). BAL was performed using de Man ROGOSA Sharpe Agar erroneous isolation media. Selection was carried out by observing the morphology and gram staining. Furthermore, testing of biochemical properties and types of handling were carried out. To see its potential as a probiotic, Results: Identification of lactic acid bacteria in this study using the molecular assistance method with the 16S rRNA marker gene. Conclusion: Based on the results of the analysis using BLAST, it was found that the type of pacifying bacteria isolate Bilih fish (*Mystacoleucus padangensis*) sample code IB1, 99.86% similar to *Lactobacillus fermentum*. **Keywords:** *Lactobacillus fermentum*, bilih fish (*Mystacoleucus padangensis*) Singkarak Lake, Probiotics*

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat (BAL) baru-baru ini menjadi topik diskusi di bidang kesehatan, industri makanan, sains, peternakan dan pertanian. LAB banyak digunakan dalam fermentasi berbagai hewan, ikan dan sayuran, karena bertindak sebagai pengawet dan memiliki manfaat kesehatan dan kecantikan. BAL memiliki senyawa metabolit yang sangat berguna untuk mempertahankan umur simpan produk tanpa membahayakan kualitas produk aslinya. Menurut (Mountzouris et al., 2010), BAL merupakan jenis mikroorganisme yang termasuk dalam kategori aman (food quality microorganism) dan baik untuk kesehatan (GRAS/Generally Recognized As Safe).

BAL juga memiliki sifat fungsional yang positif bagi kesehatan manusia yaitu sebagai probiotik. Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang apabila dikonsumsi dalam jumlah yang cukup dapat memberikan manfaat kesehatan bagi inangnya (FAO, 2001). (Furri, 2008) menjelaskan bahwa probiotik adalah suplemen makanan mikroba hidup yang dapat menggantikan komposisi dan metabolisme mikroba usus alami dan mengatur reaktivitas sistem kekebalan tubuh, yang memiliki efek menguntungkan bagi kesehatan.

Potensi BAL harus diisolasi dan diperiksa untuk BAL, identifikasi morfologi, karakterisasi biokimia, identifikasi DNA molekuler dan pemurnian untuk digunakan sebagai kandidat probiotik untuk perawatan kesehatan umum (Purwati et al., 2010). LAB potensial telah diidentifikasi dan dikarakterisasi baik secara molekuler maupun konvensional dan dipatenkan dengan nilai aplikasi tinggi di berbagai bidang ilmiah.

Keberadaan beberapa strain BAL telah terbukti memiliki efek probiotik pada manusia. BAL dapat diisolasi dari produk hewani dan nabati seperti susu, ikan dan lain-lain. Salah satunya adalah ikan bilih (*Mystacoleucus padangensis*). Ikan bilih di Danau Singkarak merupakan sumber protein hewani potensial yang perlu dikembangkan karena dagingnya memiliki kandungan gizi. Kandungan gizi daging ikan bilih yaitu protein 13,02%, kandungan magnesium. Ikan bilih segar 0,18%, kandungan fosfor ikan bilih segar 1,2%, kadar air ikan bilih segar 75,62%, kadar abu ikan bilih segar 6,4%, ikan bilih segar juga mengandung kalsium (Permata & Murtius, 2015). Mengingat kandungan gizi daging ikan bilih yang tinggi bagi kesehatan manusia, maka ikan bilih merupakan pilihan yang tepat untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai penghasil probiotik.

Menurut studi pendahuluan penulis, ikan bilih (*Mystacoleucus padangensis*) dari Danau Singkarak mengandung BAL. Potensi probiotik dengan memanfaatkan BAL dari ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singkarak merupakan salah satu bahan pangan yang dapat memperkuat daya tahan tubuh manusia, khususnya pada masa new normal di masa pandemi Covid-19. Tidak semua jenis bakteri dapat digolongkan sebagai probiotik, namun ada beberapa jenis bakteri yang dapat digolongkan sebagai probiotik. Untuk dijadikan sebagai probiotik, bakteri ini harus memiliki sifat yang aman untuk dikonsumsi, dapat bertahan hidup di saluran pencernaan, dan bersifat non-patogen. BAL merupakan bakteri gram positif yang keduanya dapat digunakan secara luas sebagai probiotik pada manusia dan ternak. Bakteri yang

termasuk dalam LAB antara lain *Lactobacillus* dan *Weissella* serta famili *Streptococcus*, terutama *Leuconostoc*, *Pediococcus* dan *Streptococcus*.

METODE

1. Fermentasi Ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singakarak

Fermentasi Ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singakarak yang dilakukan di beberapa daerah di Danau Singakarak berdasarkan survey yang dilakukan :



Gambar 1. Proses Fermentasi Ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singakarak oleh Masyarakat

2. Isolasi BAL fermentasi Ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singakarak

Secara singkat, 1 ml ikan Ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singakarak yang telah difermentasi diencerkan ke dalam 9 ml MRS dan divortex. Kemudian dipindahkan ke dalam anaerobic jar dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24

jam menggunakan inkubator. Hasil pengenceran 10^{-1} diambil sampel sebanyak 1 ml, dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml MRS broth lalu divortex. Hasil pengenceran ini disebut pengenceran 10^{-2} . Pengenceran dilakukan sampai pembuatan pengenceran 10^{-7} . Sebanyak 100 μ l sampel hasil pengenceran 10^{-7} ditebarkan di atas cawan petri yang berisi agar MRS. Inokulum disimpan menggunakan wadah anaerobik. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 48 jam menggunakan inkubator. Satu koloni BAL dipindahkan ke agar MRS untuk pemurnian koloni dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam [13].

3. Karakterisasi isolat BAL Ikan Budu Sumatera Barat

Karakterisasi morfologi dilakukan secara makroskopis dengan menginokulasi kultur BAL pada MRS Agar untuk melihat bentuk, warna dan diameter isolat BAL. Selanjutnya, karakterisasi morfologi dilanjutkan secara mikroskopis melalui pewarnaan Gram, untuk melihat bentuk sel dan warnanya. Sedangkan karakterisasi biokimia dilakukan melalui uji katalase dan uji tipe fermentasi (Purwati et al. 2005).

4. Isolasi dan karakterisasi 16S rRNA bakteri asam laktat P(3HB) Ikan Budu

Identifikasi dilakukan dengan amplifikasi PCR gen 16s rRNA menggunakan primer 8F (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) dan 15R (AAG GAG GTG ATC CAR CCG CA) selama 30 siklus serta genome sequencing. Hasil amplifikasi PCR dimurnikan dan diproses menggunakan Software BioEdit. LAB diidentifikasi menggunakan NCBI BLASTN di <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Diferensiasi menggunakan satu set empat primer berbasis gen recA para F (GTC ACA GGC ATT ACG AAA AC), R (CAG TGG CGC GGT TGA TAT C), pForw (50-CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA-30) dan pREV (TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC). Produk PCR dari

multipleks PCR dielektroforesis dalam 2% (w v-1) gel agarose 1% TAE [15].

5. BLAST and phylogenetic analysis

Analisis filogenetik dilakukan berdasarkan metode yang dipublikasikan [16]. Data pengurutan dikumpulkan menggunakan Perangkat Lunak BioEdit, diubah menjadi format FASTA dan kemudian dianalisis menggunakan BLAST di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/cgi>. Analisis filogenetik dilakukan dengan memasukkan sekuens DNA ke dalam Clustal W2 di <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>

HASIL DAN PEMBAHASAN

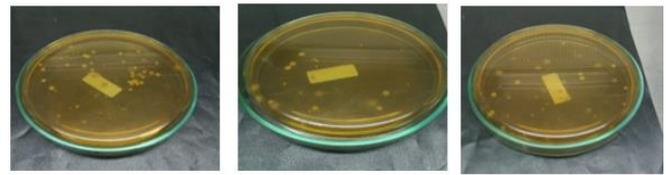
1. Total koloni Bakteri Asam Laktat Ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singakarak

Penghitungan koloni bakteri asam laktat dilakukan dengan menggunakan Quebec colony counter untuk mengetahui jumlah koloni BAL ikan bilih (*Mystacoleucus padangensis*) dari Danau Singakarak. Jumlah total koloni BAL tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Total Koloni Bakteri Asam Laktat Ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singakarak

Lokasi Pengambilan Sampel	Sampel	Total Bakteri Asam Laktat (x 10 ⁶ CFU/g)
Nagari Guguk Malalo	IB 1	64
Nagari Simawang	IB 2	27
Nagari Singkarak	IB 3	44

Penghitungan total bakteri asam laktat (BAL) bertujuan untuk mengetahui jumlah koloni bakteri asam laktat pada ikan bilih (*Mystacoleucus padangensis*) dari Danau Singakarak. Setelah mengkulturkan bakteri asam laktat pada agar MRS (Mann Ragosa Sharp), dilakukan penghitungan untuk mengetahui jumlah total koloni BAL ikan bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singakarak seperti terlihat pada Gambar 2.



IB 1

IB 2

IB 3

Bila jumlah koloni BAL (*Mystacoleucus padangensis*) yang ditemukan di Danau Bilih Singkarak tinggi, maka *Danau Bilih Singkarak (Mystacoleucus padangensis)* lebih baik. Berdasarkan hasil penelitian pada Tabel 1 bahwa jumlah koloni BAL pada ikan Bilih Danau Singkarak (*Mystacoleucus padangensis*) dapat dihitung dengan 10⁶ pengenceran, terlihat bahwa koloni bakteri asam laktat yang paling banyak didapatkan dari isolat IB 1. 64 x 10⁶ cfu/g dan terendah pada isolat IB 2 yang hanya mencapai jumlah total koloni BAL sebesar 27 x 10⁶ cfu/g. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh pengaruh kondisi lingkungan di lokasi pengambilan sampel dimana Lokasi Pengambilan Sampel IB 1 yaitu Nagari Guguk Malalo memiliki kepadatan penduduk yang rendah dan tidak ada pasar tradisional dibandingkan dengan Lokasi Pengambilan Sampel IB2 dan IB 3. Keberadaan pasar tradisional di lokasi tersebut tempat pengambilan sampel mencemari habitat ikan Bilih, dimana masyarakat langsung membuang limbah rumah tangga dan pasar ke Danau Singkarak dan tempat tinggal ikan Bilih masing-masing.

Jumlah koloni BAL ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) di Danau Singkarak memenuhi kriteria FAO/WHO (2002) karena BAL yang dihasilkan sebagai pakan probiotik adalah 10⁶-10⁸ CFU/g. Warna putih kekuningan merupakan warna BAL yang diperoleh dari isolat BAL pada media MRS agar. Hasil ini sesuai dengan penelitian (Syukur, dan Hidayat, 2005) yang menghasilkan koloni BAL berwarna putih kekuningan pada agar MRS.

2. Identifikasi Morfologi Isolat BAL

Identifikasi penelitian ini dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis, hasil pengamatan secara mikroskopis dengan mikroskopis dari penelitian ini dapat dilihat dari Tabel 2.

Tabel 2. Karakteristik morfologi isolat BAL ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singakarak

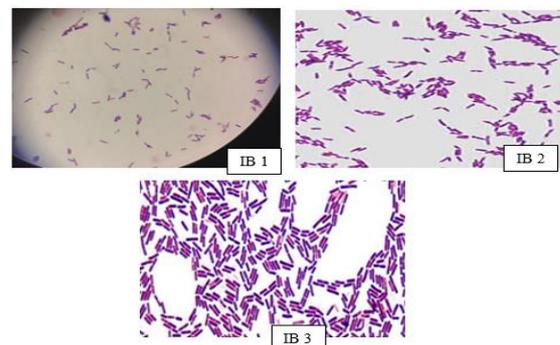
Isolat	Identifikasi Makroskopis				
	Warna	Bentuk	Ukuran	Pinggir	Permukaan
IB 1	Putih-krem	Bulat	2,5 mm	Rata, halus	Licin, cembung
IB 2	Putih krem	Bulat	2,0 mm	Rata, halus	Licin, cembung
IB 3	Putih krem	Bulat	2,8 mm	Rata, halus	Licin, cembung

Berdasarkan Tabel 2 terlihat secara makroskopik (bentuk, ukuran dan warna) pada isolat ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) dari Danau Singakarak, seluruh koloni berwarna putih krem, halus dan cembung pada media MRS agar. Hasil ini sesuai dengan penelitian (Purwati et al., 2005) yang menemukan bahwa koloni hasil isolasi BAL akan menghasilkan koloni putih kekuningan pada media agar MRS. Selain itu, setelah pengamatan makroskopis, dilakukan pengamatan mikroskopis terhadap morfologi bakteri.

Hasil identifikasi mikroskopis Bakteri Asam Laktat (BAL) dengan metode pewarnaan Gram menunjukkan bahwa isolat BAL yaitu IB 1, IB 2 dan IB 3 yang diisolasi dari ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) dari Danau Singakarak merupakan Bakteri berbentuk batang. . -positif. (basil) (Gambar 3). Bakteri gram positif dicirikan oleh kemampuan BAL untuk berikatan dengan kompleks kristal violet-iodine dan memberikan warna ungu. Hal yang sama dikemukakan oleh (Syukur & Purwati, 2013) bahwa kristal violet bersifat basa sehingga dapat mengikat sel mikroorganisme yang bersifat asam. Ketika dicuci dengan etanol, bakteri gram positif

masih berikatan dengan kompleks kristal violet-iodine, memberikan warna ungu.

Ketika dilakukan pewarnaan Gram, didapatkan bahwa semua isolat ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) asal Danau Singakarak berbentuk Gram positif dan berbentuk batang, hal ini sesuai dengan hasil pewarnaan Gram isolat BAL ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) sesuai dengan Danau Singakarak ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Pewarnaan Gram Isolat Ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*)

Hasil pewarnaan Gram yang diperoleh untuk masing-masing isolat adalah untuk bakteri Gram positif (+). Pengamatan di bawah mikroskop dengan perbesaran 4000X menunjukkan bakteri berbentuk batang (bacilli) dan menyerap warna violet kristal violet. Menurut (Jawetz, 2005), pewarnaan Gram bakteri dibagi menjadi dua bagian yaitu bakteri gram negatif berwarna merah muda dan bakteri gram positif berwarna ungu. Perbedaan penyerapan warna disebabkan oleh perbedaan peptidoglikan dan permeabilitas membran organisme gram positif dan gram negatif.

3. Uji Katalase

. Uji katalase dilakukan pada isolat BAL untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim katalase atau tidak, serta toleransi isolat terhadap oksigen. Hasil uji katalase isolat BAL Ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singakarak dapat dilihat pada Tabel 3.

Berdasarkan Tabel 3, semua isolat penelitian mendapatkan hasil negatif (-). Pengamatan dilakukan untuk mencari ada tidaknya gelembung gas pada isolat yang ditetesi hidrogen peroksida (H₂O₂).

Tabel 3. Uji katalase isolat BAL Ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singkarak

No.	Isolat	Katalase
1.	IB 1	Negatif
2.	IB 2	Negatif
3.	IB 3	Negatif

BAL tidak menghasilkan enzim katalase, yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen, dan terkait dengan kemampuan BAL yang hanya membutuhkan sedikit oksigen untuk hidup. Hasil penelitian ini sama dengan (Ibrahim et al., 2015) juga ditemukan katalase negatif pada isolat BAL dari mangga. (Desniar et al., 2012) juga mengamati bakteri asam laktat katalase negatif yang diisolasi dari becakam. Semua isolat tidak membentuk gelembung gas O₂ setelah H₂O₂ turun, menunjukkan katalase negatif.

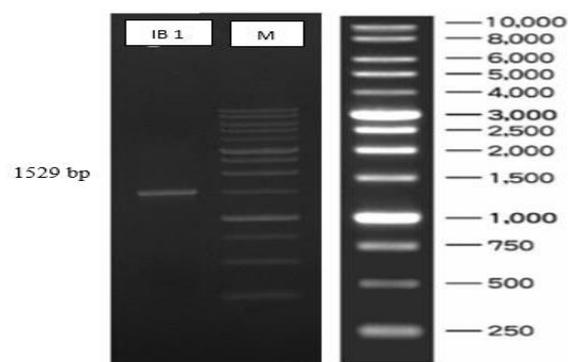
4. Identifikasi Isolat Bakteri Asam Laktat dari Ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singkarak dengan 16S rRNA

a. Hasil Amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR

Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa aktivitas PCR berhasil mengamplifikasi regio gen 16S rRNA isolat BAL dari ikan bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singkarak. Hal ini terlihat dari munculnya fragmen produk PCR 1529 bp, yang merupakan ukuran yang diharapkan saat menggunakan kombinasi primer 27F AGAGTTTGATCCTGGCTGAG arah maju dengan primer 1492 R GTTTACCTTACGACTT arah mundur.

Amplifikasi gen 16S rDNA terhadap DNA genom bakteri asam laktat dilakukan untuk mengkonfirmasi keberhasilan proses isolasi DNA genom. Produk PCR dari gen 16S rRNA kemudian digunakan untuk mengidentifikasi bakteri asam laktat hasil isolasi. (Kramer et al., 2003) menyatakan bahwa gen 16S rDNA adalah gen yang mengkode 16S rRNA pada bakteri. Gen ini memiliki beberapa sekuens yang dilestarikan dan beberapa sekuens yang bervariasi menurut eubacterium, sehingga sekuens nukleotida dari gen 16S rDNA dapat digunakan untuk mengidentifikasi bakteri. (Sukur & Purwati, 2013) menyatakan bahwa elektroforesis sering digunakan untuk menentukan berhasil atau tidaknya suatu reaksi PCR, yang prinsip dasarnya adalah pemisahan molekul protein berdasarkan ukuran berat molekul dengan arus listrik. Hasil elektroforesis produk PCR terisolasi BAL yang diperoleh ditunjukkan pada Gambar 4.

Gambar 4. Hasil elektroforesis PCR isolate BAL asal Ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singkarak (M = Marker, IB1 = Isolat BAL Ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singkarak)



Pendekatan molekuler untuk menganalisis hubungan genetik LAB adalah perbandingan urutan RNA ribosom. Teknik ini digunakan dengan adanya database sekuens nukleotida gen 16S rRNA, yang dapat digunakan untuk membandingkan hasil sekuens nukleotida. Karena

merupakan molekul yang relatif kecil, 16S rRNA dapat diurutkan secara langsung tanpa perlu mengkloning ampikon PCR yang dihasilkan. Menurut (Chagnaud et al., 2001), amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan primer maju (strain spesifik) yang dirancang berdasarkan wilayah spesifik BAL lain dari gen 16S rRNA.

```
AAGATGGCTCTCGCTACTCTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGTAATGGCTACCAA  
GGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGCCCACTACTCTACG  
GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAAGAAAGG  
GTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACGTATGAGAGTAACCTGTTACATACGTTGACGGTATTT  
AACCAGAAAGTACCGGCTAACTACGTGCCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTT  
ATTGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTAAAGCCTTCGGCTAACCCGAGAAGTGC  
ATCGAAACTGGATAACTTGAAGTGCAGAAGAGGTTAGTGGAACTCCATGTTAGCGGTGGAATGCGTATGAT  
ATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGCTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTGAAAGCATTACGGT  
AGCGAACAGGATTAGATACCTCGTGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGTAGGTGTTGGAGGTTCCGCC  
CTTCAGTCCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCGCGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAA  
TTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCGAGTCT  
TGACATCTTGGCCCAACCTAGAGATAGGGCGTTTCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCTGC  
GTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCCGCAACCTTGTACTAGTTGCCAGCATT  
AATTTGGGCACTAGTGAAGTGCAGCTGCGGTGACAAACCGGAGGAGGTGGGACGACTCAGATCATGCCC  
CTTATGACCTGGGCTA
```

Gambar 5. Hasil sekuensing nukleotida isolat BAL dari Ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singkarak (IB1)

Hasil yang didapat pada penelitian (Gambar 5) menunjukkan hasil amplifikasi DNA 1429 bp pada gel agarosa. Hal ini mengindikasikan bahwa primer spesifik yang digunakan pada penelitian mampu mengidentifikasi bakteri hingga ke tingkat strainnya. Keunggulan dari teknologi identifikasi BAL berbasis gen 16S rRNA hanya dapat dilakukan jika informasi sekuen nukleotida dari bakteri target telah diketahui. Sekuen genom beberapa bakteri dapat digunakan untuk menilai evolusi dan divergensinya, membandingkan analisis sekuens gen 16S rRNA menjadi metode yang sangat penting dalam klasifikasi mikroorganisme dan organisme eukarotik sebagai refleksi hubungan evolusioner alami atau filogeni (Madigan et al., 2010).

b.

Analisis Sekuen Gen 16S rRNA Isolat dari Ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singkarak

Hasil sekuensing isolat IB1 dibandingkan dengan data *Gene Bank* menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) untuk mengetahui homologi sekuen yang dilakukan online pada website NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Sequence Assembly >CONTIQ_IB1

Berdasarkan hasil analisis BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) memperoleh isolat bakteri IB 1 dari ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) dari Danau Singkarak dengan kemiripan 99,61% dengan *Lactobacillus fermentum* strain 12042 16S. Hal ini menunjukkan bahwa isolat bakteri BAL pada billfish (*Mystacoleucus padangensis*) di Danau Singkarak memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Lactobacillus fermentum* strain 12042 16S dengan persentase identitas sebesar 99,61 menurut penelitian Hagstrom et al. (20000). ,(2000).) menunjukkan bahwa isolat dengan kesamaan urutan rRNA lebih dari 97° 16S dapat mewakili spesies yang sama.

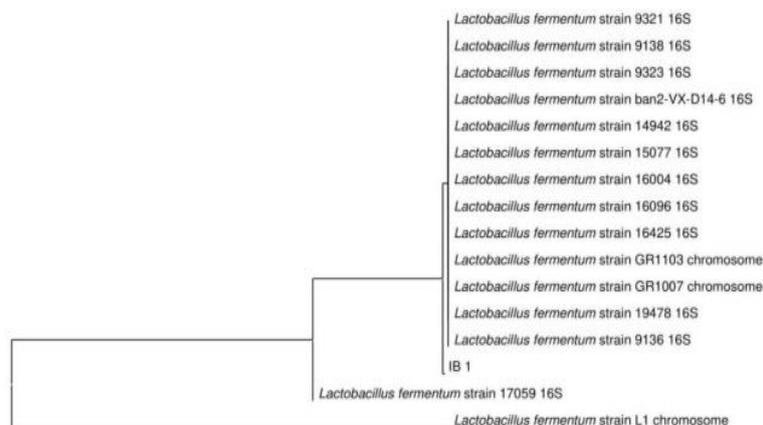
Sementara itu, kesamaan urutan antara 93% dan 97° dapat mewakili identitas bakteri pada tingkat genus tetapi berbeda spesies. Menurut (Madigan & Martinko, 2010), urutan urutan gen 16S rRNA pada satu spesies hanya memiliki perbedaan 3%, atau dapat dikatakan bahwa urutan homolognya $\geq 97\%$, yang sesuai dengan urutan homolog dengan . nilai $\geq 97\%$ sesuai dengan setidaknya 70% hibridisasi untuk dua ekspresi bakteri yang terkandung dalam spesies tersebut. Hasil analisis BLAST penelitian menunjukkan bahwa sekuen menggunakan isolat gen 16S rRNA IB1 ditunjukkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil BLAST isolate BAL Ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singkarak (IB1)

No	Description	Query Cover (%)	Acession Number	Percent Ident (%)
1	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain: 2325 16S	100	MT064784.1	99,61
2	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain:1731 16S	100	MT597591.1	99,61
3	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain: 241 16S	100	MT573006.1	99,61
4	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain: 8956 16S	100	MT539061.1	99,61
5	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain: 3740 16S	100	MT538595.1	99,61
6	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain: Loa49 16S	100	MW020294.1	99,61
7	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain: SH3 16S	100	MW897963.1	99,61
8	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain: 15114 16S	100	MW866955.1	99,61
9	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain: 17061 16S	100	MW527166.1	99,61
10	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain: 12042 16S	100	MW116557.1	99,61

Berdasarkan Tabel 5 menunjukkan kemiripan 99,61% dengan urutan genom dan substrain *Lactobacillus*. Konsisten dengan pernyataan (Claverie & Notredame, 2006) bahwa suatu sequence dapat disebut

homolog jika kemiripannya lebih besar dari 70%, analisis dilakukan dengan BLAST dan kemudian divisualisasikan dengan tools aplikasi MEGA v7.0, seperti sebelumnya. selaras dengan bioedit.



Gambar 6. Konstruksi Pohon Filogenetik Sampel Ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singkarak (IB 1)Konstruksi pohon filogenetik menggunakan metode Construct/Test Neighbor Joining Tree dan Model Kimura 2 menggunakan software MEGA v.7.0

Dari hasil visualisasi filogenetik terlihat bahwa pada penelitian yang diisolasi dari ikan bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singkarak berkerabat secara apomorfik dengan *Lactobacillus fermentum* 12042 16S, dengan (Hidayat et al., 2006) karakternya bersifat apomorfik dan

plesiomorfik. Karakter apomorfik adalah karakter yang berubah-ubah dan diwariskan dan terjadi dalam kelompok, sedangkan karakter sinapomorfik adalah karakter yang diwariskan dan terjadi dalam kelompok monofiletik.

Berdasarkan hasil PCR (polymerase chain reaction) dan analisis BLAST, isolat bakteri IB 1 Ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Singkarakjärvi ditemukan 100% mirip dengan *Lactobacillus*. Strain Fermentm 12042 16S. Menurut (Claverie & Notredame, 2006) suatu sekuen dapat disebut homolog jika menunjukkan kemiripan lebih dari 70%, sedangkan sekuens yang memiliki kemiripan antara 93% dan 97° dapat mewakili identitas bakteri pada tingkat genus. tetapi berbeda jenis. Silsilah yang diperoleh menunjukkan hubungan yang erat antara bakteri *Lactobacillus fermentum*. Pola yang sangat jelas diamati dimana sampel bakteri membentuk kelompok monofiletik dengan strain L. fermtum 12042 16S. Ini membuktikan keandalan hubungan yang sangat erat antara bakteri ini dari nenek moyang yang sama. Analisis yang dilakukan dengan BLAST kemudian divisualisasikan menggunakan tools aplikasi MEGA v7.0 yang sebelumnya terlebih dahulu dibandingkan dengan bioedit. Isolat IB1 dapat dikatakan sebagai spesies dari genus *Lactobacillus*. (Syukur & Purwati, 2013) menyatakan bahwa bakteri dari genus *Lactobacillus* termasuk dalam kelompok bakteri “bakteri asam laktat” dan paling sering digunakan sebagai agen probiotik karena produk akhir dari metabolisme asam laktat berasal dari fermentasi gula dan merupakan bakteri anaerob. . umum dalam makanan fermentasi seperti yogurt, keju, acar, kimchi, dan kaldu. Meskipun beberapa galur berkerabat dekat, kemampuannya untuk tumbuh dan berkembang di lingkungan tertentu bergantung pada habitat aslinya. Dari sini dapat disimpulkan bahwa *Lactobacillus fermentum* dapat digunakan sebagai probiotik. (Mount et al., 2004) menyatakan bahwa selain keamanan pangan yang harus aman dan bermutu

tinggi, produk pakan ikan juga harus memenuhi kriteria ASUH (aman, sehat, utuh dan halal). (Sunaryanto & Marwoto, 2013) menyatakan bahwa *Lactobacillus plantarum* telah menunjukkan sifat sebagai agen probiotik yang dapat bertahan dalam kondisi asam dan menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif.

Hasil penelitian ini berbeda dengan (Dhiva, 2020) dari Bekasiam, Sumatera Selatan, yaitu *Pediococcus acidilactici*. Pada penelitian (Aljabar, 2018) tentang isolasi BAL dari acar rebung, Musi Rawas Utara menemukan BAL spesies *Pediococcus pentosaceus* dan *Enterococcus avium* sebagai hasil suksesi. Bakteri yang ditemukan berbeda, karena jenis ikan yang difermentasi juga berbeda dengan ikan segar yang digunakan, juga bahan fermentasi dan cara fermentasi yang berbeda, sehingga bakteri yang ditemukan juga berasal dari spesies yang berbeda. *Lactobacillus brevis* WD19 diperoleh dari isolat susu kambing asal Aljazair dalam penelitian (Ali, 2011). Hasil penelitian ini sangat berbeda dengan (Yusra, 2014) dimana genom isolat Budukala yang mengandung gen 16S rRNA diisolasi dari *Bacillus cereus* strain HRV22 dan penelitian (Wikandari et al., 2012) mengarah pada identifikasi Bakteri asam laktat Bekasam yaitu *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pentosus* dan *Pediococcus pentosaceus*.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis dengan menggunakan BLAST, ditemukan bahwa jenis isolat bakteri fermentasi Ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) kode sampel IB1, 99,86% mirip dengan *Lactobacillus fermentum*.

DUKUNGAN FINANSIAL

Penelitian ini didukung oleh Laboratorium Bioteknologi Universitas Andalas Padang, Program Studi Teknologi laboratorium Medis Stikes Syedza Saintika dan Prodi Farmasi Universitas Sumatera Barat

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, A. 2014. Bioteknologi Dasar Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin. Unhas Press. Makasar.
- Ahmed Z, Wang Y, Cheng Q, Imran I. 2010. *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, from production to their application: an overview. *Afr J Biotechnol* 9:2843-2850.
- Aljabar. 2018. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Asinan Rebung Asal Musi Rawas Utara. Skripsi. Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya.
- Antara, N. S., Dibia, I. N. dan Aryanta, W. R. 2009. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Susu Kuda Bima. *Agritech*. 29(1) : 1 – 9
- Azhar, 1993. Studi ekologi ikan Bilih (*Mysatcoleucus padangensis* BLKR) di Danau Singkarak [tesis]. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor. 132 hlm.
- Bron, P. A., C. Grangette, A. Meroenier, W. M. De Vos and M. Kleerebezem. 2004. Identification of *Lactobacillus plantarum* genes that are induced in the gastro-intestinal tract of mice. *Journal of Bacteriology*. 186: 5721-5729
- Chagnaud, Patrice, *et al.* Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 44.2: 139-148.
- Chou, Lan-Szu; Weimer, Bart. Isolation and characterization of acid-and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 1999, 82.1: 23-31.
- Clarridge, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infection Disease. *Clinical Microbiology Reviews* 17 (4): 840 – 862.
- Depson, R. 2012. Identifikasi Molekuler dan Pengaruh Pemberian Potensial Probiotik Bakteri Asam Laktat (BAL) asal Dadih Terhadap Kolesterol Daging Itik Bayang Sumber Daya Genetik Sumatera Barat. [Tesis]. Pascasarjana Universitas Andalas. UNAND, Padang
- Desniar., I. Rusmana., A. Suwanto., dan N. R. Mubarik. 2012. Senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat asal bekasam. *Jurnal Akuatika* Vol. III No.2. Hal. 135-145.
- Dowell dan Karen. 2008. *Molecular Phylogenetics: An Introduction to Computational Methods and Tools for Analyzing Evolutionary Relationships*. Orono: University of Maine.
- FAO/WHO. 2001. Joint Expert Consultation on Evaluation of Gealth and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk With Live Lactic Acid Bacteria.
- Farnworth, E R *et al.* 2007. "Growth of Probiotic Bacteria and Bifidobacteria in a Soy Yogurt
- Furri, M. 2008. "Differences in the Confluence of Mesial Canals in Mandibular Molar Teeth with Three or Four Root Canals." *International endodontic journal* 41(9): 777–80.
- Hagstrom, A., J. Pinhassi and U. L. Zweifel. 2000. Biogeographical Diversity Among Marine Bacterioplankton. *Aquat. Microb. E Col.* 21:231-244.

UCAPAN TERIMA KASIH

Tidak ada.

KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak ada.

- Handarini, R., E. Saleh dan B. Togatorop. 2008. Produksi burung puyuh yang diberi ransum
- Hou, J. W., Yu, R. C. and Chou, C. C. 2000. Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. *Food Res. Int.* 33:393–397.
- Ibrahim, A., A. Fridayanti., dan F. Delvia. 2015. Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat (BAL) dari buah mangga (*Mangifera indica*). *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 1 (2), 159-163, 2015.
- Khedid, K dan Faid, M. 2006. Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from the One Humped Camel Milk Produced in Morocco. *Microbiology Reseach*. Vol. 164: 81-91.
- Kramer M.F dan D.M. Coen. 2003. Enzymatic amplification of DNA by PCR: Standard Procedures And Optimization. *Current Protocols in Immunology*. John Wiley and Sons, Inc.
- Lade, H. S., M. P. Chitanand, G. Gyananath, T. A. Kadam. 2006. Studies on Some Properties of Bacteriocins Produced by *Lactobacillus* Spesies Isolated from AgroBased Waste. *The Internet Journal of Microbiology*.
- Lee YK, Salminen S. 2009. *Hand Book of Probiotics and Prebiotic*. 2nd Edition. United States of Amerika (US): John Wiley & Sons, Inc.
- Mustopa, A. 2009. Koleksi Protokol Laboratorium Virologi Molekuler. Pusat Penelitian Bioteknologi. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bogor.
- NCBI (National Center for Biotechnology Bioinformation). 2011. The BLAST sequence analysis tool. hlm. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 22 Agustus 2020. pk. 2015.
- Ngatirah, A., E.S. Harmayanti., dan T. Utami. 2000. Seleksi bakteri asam laktat sebagai agensia Probiotik yang berpotensi menurunkan kolesterol. *Prosiding Seminar Nasional Industri Pangan. PATPI (II)*: 63–70.
- Nugroho dan I. G. K. Mayun. 1986. *Beternak Buruh Puyuh*. Eka Offset. Semarang.
- Nuraida, L., S. Winarti, Hana dan E. Prangdimurti. 2011. Evaluasi Invitro Terhadap Kemampuan Isolat Bakteri Asam Laktat Air Susu Ibu untuk Mengasimilasi Kolesterol dan Mendekongugasi Garam Empedu. *J. Teknologi dan Pangan*. 22(1): 46-52.
- Pangastuti, A. 2006. Defenisi Spesies Prokariota Berdasarkan Urutan Basa Gen Penyandi 16s Srna Dan Gen Penyandi Protein. *Biodiversitas* 7 (3): 292 – 296.
- Patriono, E., E. Junaidi, dan F. Sastra. 2010. Fekunditas ikan bilih (*Mystacoleucus padangensis* Blkr.) di muara sekitar Danau Singkarak. *Jurnal Penelitian Sains*. Vol. 13. No. 3(D): 55-58.
- Pelezar, M. J. & E. C. S. Chan. 2007. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Prima, Heppy Setya; RUSFIDRA, Endang Purwati. (2021) Isolation, Characterization and Identification of Molecular Lactic Acid is Isolated from Bilih Fish (*Mystacoleucuspadangensis*) Lake Singkarak Potential as a Probiotic. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 2021, 8581-8596.
- Public Health England. 2014. UK Standards for Microbiology Investigation Catalase Test. Issued by the Standards Unit, Micobiology Services, PHE. *Bacteriology – Test Procedures TP 8* IssueNo: 3 Page: 1-13.
- Purwati, E., S. Syukur, dan Z. Hidayat. 2005. *Lactobacillus sp.* Isolasi dari Bioviphitomega sebagai Probiotik. Di dalam *Proceeding Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia*, Jakarta 24-25 Januari 2005.
- Purwati, E dan Syukur, S. 2006. Peranan Pangan Probiotik Untuk Mikroba Patogen Dan Kesehatan. Dipresentasikan pada *Dharma Wanita*

- Persatuan Propinsi Sumatera Barat, Padang, 8 Agustus 2006.
- Purwati, E. dan S. Syukur. 2010. 1St International Seminar and Workshop Biotechnology Molecular DNA and Their Application In Health or Medical. Rumah Sakit Ananda, Bekasi
- Purwati, E. 2011. Effect of probiotics in *Lactobacillus plantarum* origin blondo on the quality cholesterol egg of layer chicken. Telah diseminarkan pada International Seminar Faculty of Animal Husandry, Universitas Padjajaran, Jatinangor Campus.
- Rakhmadi, A., Allismawati., Yunizardi., & Trisman, A. (2017) Pengaruh Pemberian Probiotik yang Diisolate dari Dadih Kenagarian Air Dingin Kab Solok Terhadap Kualitas Rendang Suir Daging Puyuh Jantan (*Coturnix coturnix japonica*). <http://repo.unand.ac.id/id/eprint/14513>
- Roberfroid, M. B. 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods. *The American journal of clinical nutrition*, 71(6), 1682S-1687S.
- Salminen, S., A.V. Wright., and A. Ouwehand. 2009. Lactic Acid Bacteria Microbiological and Fuctional Aspects. Fourth Edition. CRC Press. ISBN 978-0-82475332-0. Page 1.
- Sulawesty, F *et al.* 2002. "Evaluasi Kondisi Limnologi Danau Singkarak." In *Seminar Nasional Limnologi, Bogor,*.
- Suryani, L. Ambarsari, E. S. Harahap. 2009. Amplifikasi Gen 16s-Rrna Bakteri Termofilik Dari Sumber Air Panas, Gunung Pancar Bogor. *Jurnal Riset Kimia*. Vol. 3, No. 1.
- Syukur, S. dan E. Purwati. 2013. Bioteknologi Probiotik untuk Kesehatan Masyarakat. Penerbit Andi, Yogyakarta.
- Volk, W. A, Dan Wheeler, and F. Margaret. 1993. *Mikrobiologi Dasar*. Jilid 1. Erlangga: 93-233.
- Yusra, F. Azima, Novelina dan Periadnadi. 2014. Isolasi dan Identifikasi Mikroflora Indienous Dalam Budu. *Agritech*, Vol. 34, No. 3.