

PENAPISAN BAKTERI PROTEOLITIK YANG BERSIMBIOSIS DENGAN
ALGA *Gracillaria* sp.

(*Screening of the Proteolytic Bacteria Symbiont with Algae Gracillaria sp.*)

Riorifki Kabense¹, Elvy L. Ginting², Stenly Wullur², Nickson J. Kawung², Fitje
Losung², Jhon L. Tombokan²

¹Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam
Ratulangi, Jl. Kampus Unsrat Bahu, Manado 95115 Sulawesi Utara, Indonesia

²Staf Pengajar pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi,
Jl. Kampus Unsrat Bahu, Manado 95115, Sulawesi Utara, Indonesia

Corresponding Authors: riorifikabense@gmail.com

ABSTRACT

Marine algae are abundant natural resources in Indonesia but have not been optimally utilized. Utilization of seaweed is still limited as food ingredients such as *Gracillaria* sp. cultivated as an industrial export material. Algae *Gracillaria* sp. his life is symbiotic with a variety of types of bacteria. The aim of the study was to isolate and screening the protease activity of the symbiotic bacteria of *Gracillaria* sp. This study succeeded in isolating 4 different bacteria based on morphological characteristics. The four isolates were S.G.,1, S.G.2, S.G.3 and S.G.,4. Isolate S.G. 1 had the ability to produce ptotease with a proteolytic index of 1.5.

Keywords : *Gracilaria* sp., Protease, Symbiont Bacteria

ABSTRAK

Alga laut merupakan sumberdaya alam yang melimpah di Indonesia tetapi belum optimal dimanfaatkan oleh masyarakat. Pemanfaatan rumput laut masih terbatas sebagai bahan makanan seperti *Gracillaria* sp. dibudidayakan sebagai bahan ekspor industri karajinan. Alga *Gracillaria* sp. hidupnya bersimbion dengan beraneka ragam jenis bakteri. Tujuan penelitian adalah untuk mengisolasi dan menguji aktivitas protease bakteri simbion alga *Gracillaria* sp. Penelitian ini berhasil mengisolasi 4 bakteri yang berbeda berdasarkan karakteristik morfologi. Keempat bakteri tersebut adalah S.G., 1 S.G., 2 S.G., 3 dan S.G., 4 Isolasi bakteri S.G., 1 memiliki kemampuan menghasilkan ptotease dengan Indeks proteolitik sebesar 1,5.

Kata Kunci : Bakteri simbion, *Gracillaria* sp. protease

PENDAHULUAN

Alga laut merupakan sumberdaya alam yang melimpah di perairan Indonesia tetapi belum optimal dimanfaatkan oleh masyarakat. Pemanfaatan alga *Gracillaria* sp. masih sangat terbatas dalam bidang industri makanan, pupuk tanaman, bahan pembuatan kertas, cat, bahan kosmetik, produksi hidrokoloid seperti agar dan alginate, serat, bahan obat-obatan

seperti antibiotik, antikoagulan, antihipertensi, pengurangan kolesterol, dan insektisida (Kawung *et al.*, 2017). Alga *Gracillaria* sp. sendiri hidupnya bersimbion dengan beraneka ragam jenis bakteri laut (Chen dan Duan, 2000; Gerung, 2004).

Bakteri berasal dari kata bahasa latin yaitu bacterium, bakteri memiliki jumlah spesies mencapai ratusan ribu dibandingkan dengan mahluk hidup lain

di bumi. Bakteri yang bersimbiosis dengan alga memiliki potensi diantaranya mampu menghasilkan enzim hidrolase seperti protease. Penelitian ini ingin mengisolasi bakteri simbiosis pada alga *Gracillaria* sp. dan menguji kemampuan dari bakteri tersebut dalam menghasilkan protease.

METODE PENELITIAN

Alga *Gracillaria* sp. diambil dari perairan Tongkaina Sulawesi Utara (Gambar 1). Alga *Gracillaria* sp. dipotong lalu dimasukkan ke dalam plastik yang berisi air laut, kemudian dibawa ke Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasitika Laut FPIK Unsrat untuk dianalisis lebih lanjut.

Identifikasi Alga Laut

Sampel alga yang telah diambil kemudian diidentifikasi berdasarkan morfologi dengan memperhatikan bentuk dan warna dari sampel tersebut. Identifikasi dilaksanakan berdasarkan panduan Oseana, Volume XV, Nomor 4: 147-155.

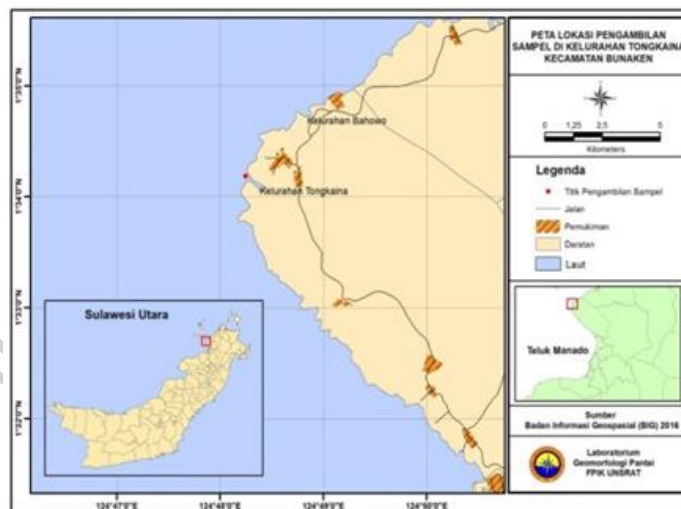
Pembuatan Media Kultur

Media *Nutrient Broth* (NB)

Media cair dipreparasi dengan cara melarutkan 0,3 gram *Nutrient Broth* ke dalam 30 ml aquades (1%). Kemudian distribusikan media NB ke dalam tabung masing-masing 6 ml. Media selanjutnya disterilisasi menggunakan autoclave dengan suhu 121 °C selama ± 60 menit.

Media *Nutrient Agar* (NA)

Sebanyak 0,5 *Nutrient Broth* (1%) dan 2 g agar (2%) dilarutkan dalam 25 ml aquadest ditambah 25 ml air laut kemudian di *autoclave* pada suhu 121°C selama ± 60 menit. Secara aseptik media dituang ke dalam cawan petri steril secara merata, kemudian dibiarkan mengeras. Setelah mengeras dan dingin, dibungkus menggunakan plastic pembungkus dan letakan di inkubator selama 24 – 48 jam untuk memastikan tidak terkontaminasi.



Gambar 1. Peta Lokasi Pengambilan Sampel alga laut

Kultur, Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Simbiosis

Kultur Bakteri pada Media Cair

Setiap sampel Alga *Gracillaria* sp. dicuci dengan menggunakan air laut steril, dengan cara masukkan air laut steril ke dalam cawan petri steril

kemudian alga laut dibilas. Setelah dibilas, dengan teknik aseptik rumput laut dihomogenisasi dengan mencampurkan 100 ml air laut steril di dalam ependorf kemudian digerus menggunakan mortar. Sampel kemudian diinokulasi ke dalam media

NB. Inokulasi dilakukan dengan cara mengambil satu lup sampel rumput laut yang telah dihomogeniskan dan kemudian dimasukkan kedalam media. Kemudian di inkubasi pada suhu 37° selama ± 24 – 48 jam. Adanya pertumbuhan bakteri setelah di inkubasi, ditandai dengan kekeruhan dari media.

Kultur Bakteri pada Media Agar

Bakteri yang bertumbuh pada media NB kemudian diinokulasi ke dalam media *Nutrient Agar* (NA) dengan menggunakan metode cawan gores. Selain itu, dilakukan pengenceran sampel untuk kemudian diinokulasikan ke dalam media NA dengan metode penyebaran. Media yang telah diinokulasikan dengan bakteri ataupun sampel hasil pengenceran kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Damati pertumbuhan bakteri dan dikarakterisasi morfologi bakteri berhasil di isolasi dengan mengacu pada bentuk, warna, tepian dan elevasi koloni bakteri (Lebofe, 2012).

Media Skim Milk.

Media skim milk agar dipreparasi dengan melarutkan 1 g *Nutrient Broth* (1%), 2 g agar (2%), dan 2 g skim milk (2%) ke dalam 100 ml aquades kemudian di sterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 60 menit. Setelah disterilisasi, secara aseptik media dituang ke dalam cawan petri yang telah steril secara merata hingga semua permukaan cawan petri telah dipenuhi media. Setelah itu media didinginkan hingga mengeras, diletakan ke dalam inkubator selama 24 jam untuk memastikan media dalam keadaan steril dan tidak terkontaminasi.

Uji Aktivitas Protease

Setiap isolat bakteri ditotolkan pada media skim milk. (Susanti, 2003). kemudian diinkubasi selama 24 - 48 jam pada suhu 37°C. Adanya aktivitas enzim protease kemudian diamati dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri setelah diinkubasi.

Besarnya kemampuan bakteri dalam menghasilkan protease dapat ditandai dengan indeks proteolitik. indeks proteolitik yaitu perbandingan antar diameter zona bening dengan diameter koloni untuk memperoleh isolat potensial (Dewi, 2008). Indeks proteolitik diperoleh dengan berdasarkan Suryadi *et al.*, (2013) sebagai berikut:

$$IP = \frac{D. \text{ Zona Bening}}{D. \text{ Koloni.}}$$

Berasarkan hasil identifikasi alga dengan cara membandingkan morfologi dari alga laut dengan buku identifikasi Oseana, Vol. XV, No. 4: 147-155 diperoleh jenis rumput laut *Gracillaria* sp.

Penelitian ini berhasil mengisolasi 4 isolat bakteri simbiosis alga *Gracillaria* sp. Keempat bakteri tersebut memiliki karakteristik yang berbeda berdasarkan bentuk, warna, elevasi dan tepian. Adapun karakteristik morfologi keempat isolat bakteri tersebut disajikan pada (tabel 1). Ginting, *dkk* (2019) berhasil mengisolasi 5 isolat bakteri dari alga merah yang menyerupai *Portieria* sp dan 5 isolat bakteri dari alga merah menyerupai *Gracillaria* sp. Empat isolat bakteri juga berhasil diisolasi oleh Wantania *dkk* dari spons *Facaplysinopsis* sp. dan 6 isolat dari spons *Agelas* sp. Isolat bakteri ini juga diisolasi berdasarkan karakteristik morfologinya.

Kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim protease yang dapat diketahui dengan cara menumbuhkan bakteri pada media susu Skim Milk Agar (SMA). Setelah bakteri ditumbuhkan pada media SMA selama 24 jam pada suhu 37°C, zona bening yang terbentuk disekitar koloni bakteri diamati. Penggunaan suhu pada 37°C, dan waktu inkubasi 24 jam tersebut dikarenakan bakteri alga *Gracillaria* sp. termasuk bakteri mesofilik yang mampu tumbuh baik pada kisaran suhu 20 °C - 40 °C dan memiliki suhu pertumbuhan optimum 37°C. Sedangkan digunakan

waktu 24 jam karena keempat bakteri tersebut memiliki pertumbuhan yang cepat pada media *Skim Milk Agar* (SMA) sehingga pada waktu 24 jam tersebut diperkirakan bakteri sudah masuk pada

fase eksponensial, selain itu pada waktu inkubasi diatas 20 jam, bakteri-bakteri lain (bakteri susu) mulai muncul dan terkontaminasi media, sehingga dapat mengganggu pengamatan.



Gambar 2: Alga *Gracillaria* sp. (Dokumentasi Pribadi, 2019)

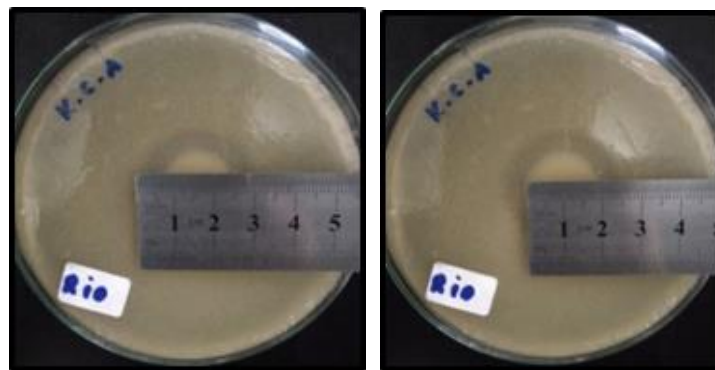
Tabel 1. Karakterisasi Morfologi Isolat Bakteri dari Alga *Gracillaria* sp.

Kode Isolat	Karakteristik Koloni			
	Bentuk	Warna	Elevai	Tepian
S.G.1	Circular	Putih	Convex	Smooth,entire
S.G.2	Rhizoid	Coklat	Convex	Lobate
S.G.3	Filamentous	Putih	Plateu	Smooth,entire
S.G.4	Circular	Putih	Convex	Flat,raised margin

Kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim protease yang dapat diketahui dengan cara menumbuhkan bakteri pada media susu *Skim Milk Agar* (SMA). Setelah bakteri ditumbuhkan pada media SMA selama 24 jam pada suhu 37°C, zona bening yang terbentuk disekitar koloni bakteri diamati. Penggunaan suhu pada 37°C, dan waktu inkubasi 24 jam tersebut dikarenakan bakteri alga *Gracillaria* sp. termasuk bakteri mesofilik yang mampu tumbuh baik pada kisaran suhu 20 °C - 40 °C dan memiliki suhu pertumbuhan optimum 37°C. Sedangkan digunakan waktu 24 jam karena keempat bakteri tersebut memiliki pertumbuhan yang cepat pada media *Skim Milk Agar* (SMA) sehingga pada waktu 24 jam tersebut diperkirakan bakteri sudah masuk pada fase eksponensial, selain itu pada waktu inkubasi diatas 20 jam, bakteri-bakteri lain (bakteri susu) mulai muncul dan terkontaminasi media, sehingga dapat mengganggu pengamatan.

Berdasarkan hasil pengamatan setelah bakteri ditumbuhkan selama 24 jam, telah terbentuk zona bening disekitar koloni bakteri yang tumbuh pada media *Skim Milk Agar* (SMA) menunjukkan bahwa substrat protein yang terdapat pada media susu skim telah dipecah menjadi peptide sederhana dan asam amino oleh enzim protease. Bakteri menghasilkan protease ditunjukkan pada (Gambar 1). Besarnya aktivitas protease yang dihasilkan bakteri simbiosis alga *Gracillaria* sp. di tentukan oleh besarnya indeks proteolitik (IP) indeks proteolitik yang diperoleh dengan cara membagi diameter zona bening dengan diameter koloni.

Dari keempat isolat yang diuji, hanya satu isolat menunjukkan kemampuan menghasilkan aktivitas protease yakni isolat S.G., 1 ditandai dengan indeks proteolitik 1, 5 (Tabel 2).



Gambar 3: Penampakan isolat bakteri menunjukkan adanya zona bening pada media yang mengandung *Skim Milk Agar* setelah di inkubasi selama 24 jam.

Tabel 2. Indeks Proteolitik Isolat Bakteri Simbion Alga *Gracillaria* sp.

Kode Isolat Bakteri	Diameter Zona Bening	Diameter Koloni	IP
S.G., 1	3 cm	2 cm	1,5
S.G., 2	-	-	-
S.G., 3	-	-	-
S.G., 4	-	-	-

Berdasarkan Tabel di atas terlihat bahwa isolat bakteri S.G., 1 memiliki aktivitas pemecahan substrat protein dengan indeks IP sebesar 1,5 pada dasarnya semua bakteri mempunyai enzim protease di dalam sel, tetapi tidak semua bakteri mempunyai enzim protease ekstraseluler. Sebagaimana yang dimiliki oleh bakteri alga S.G., 1 mampu memecah protein kasein yang terdapat pada media susu skim menjadi peptide-peptida yang lebih sederhana oleh karena itu enzim protease disebut juga peptidase (Enggel dan Natalia, 2004).

KESIMPULAN

Empat Isolat bakteri berhasil diidolasi dari Alga *Gracillaria* sp. Keempat isolat bakteri tersebut memiliki karakteristik morfologi yang berbeda. Dari keempat isolat tersebut, isolat S.G. 1 memiliki aktivitas protease yang ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri yang tumbuh dengan indeks proteolitik sebesar 1,5.

DAFTAR PUSTAKA

Chen, K.Z. dan Duan, Y., 2000. Competitiveness of Canadian agri-food exports againts competitors in

asia : 1980-97: journal of international Food and Agribusiness Marketing, 11(4).19

Dewi, P.2008. Pemisahan Minyak Atsiri Daun Kemangi (olimum basilirum) Secara KLT dan Aktifitasnya Terhadap Malasezia Fufsur in Vitro, Skripsi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro.

Enggel, J., Meriandini, A. & Natalia, L. 2004. Karakterisasi protease ekstraseluler *Clostridium bifermentans* R14-1-b. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*.9 (1): 9 -12.

Ginting, E. L., Rangan, L., Wantania, L. L., & Wullur, S. (2019). Isolation of Symbiotic Bacteria with Red Algae from Tongkaina Waters, North Sulawesi. *JURNAL ILMIAH PLATAX*, 7(2), 394-400. DOI: <https://doi.org/10.35800/jip.7.2.2019.23728>

Kawung, N J., Mangindaan, R.E.P., Rompas, R.M., Chasanah, M., Kapoyos, M., Abdjul, B., Januar, H.I., Fajarningsih, D, and Sumagando, A. 2017.Cytotoxic Anticancer from New Compound Unsrat-sinularine of Softcoral *Sinularia* Sp. from Bunaken Island,

- Manado, Indonesia. *International Journal of Drug Development and Research*. 9 (3):01-04.
- Leboffe, M. J dan B. E. Pierce. (2012). *Brief Microbiology. Laboratory Theory & Application 2nd Edition*. Englewood: Morton Publishing.
- Moon, S.H. and S.J. Parulekar., 1993, Some Observation on Protease Producing in Continuous Suspension Cultures of *Bacillus firmus*, *Biotech, Bioeng*, 41:43-54.
- Suryadi, Y., T. P. Priyatno, M. Samudra, D. N. Susilowati, N. Lawati dan E. Kustaman. 2013. *J. Agro Biogen*. 9(2):77-84.
- Wantania, L.L., Ginting, E.L., Wullur, S. 2016. Isolasi Bakteri simbion denagn Spons dari Perairan Tongkeina, Sulawesi Utara. *Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi* 3(1): 57-65.145-152.

ejournal.unsrat.ac.id/index.php/platax