

Isolasi Bakteri *Bacillaceae* untuk Memenuhi Kebutuhan Bahan Praktikum di Laboratorium Teknologi Rekayasa Pangan

Isolation of Bacillaceae Bacteria as Learning Materials in the Food Engineering Technology Laboratory

Wahyu Setyaji Dwiantara ^{1*}, Widya Rahmawati ¹

¹ Jurusan Teknologi Pertanian, Politeknik Negeri Jember

* wahyu.sd@polije.ac.id

ABSTRAK

Mikroorganisme atau mikroba perlu dipelajari di Program Studi Teknologi Rekayasa Pangan (TRP). Salah satu manfaatnya adalah dalam melakukan pengendalian mikroba yang merugikan. Tidak hanya itu, penggunaan mikroba yang bermanfaat, terutama pada makanan juga dapat digali. Penelitian ini bertujuan mendapatkan isolat bakteri *Bacillaceae* untuk melengkapi bahan praktikum di Laboratorium TRP. Ada dua sampel yang digunakan untuk isolasi yaitu sampel tanah dan susu. Isolasi dilakukan dengan metode sebar pada media *nutrient agar* (NA), kemudian koloni tunggal yang tumbuh ditumbuhkan kembali dengan metode gores. Pewarnaan gram dilakukan pada kultur murni yang didapatkan. Kemudian, isolat yang berbentuk batang dan gram positif dilakukan pengamatan morfologi koloni di NA miring, uji katalase dan hidrolisis pati serta diidentifikasi secara molekuler. Hasilnya, hanya isolat D4-02 yang berbentuk batang dan gram positif. Isolat tersebut berasal dari sampel tanah. Kemampuan dalam hidrolisis pati dan penguraian hidrogen peroksida dimiliki oleh D4-02. Hasil identifikasi secara molekuler menunjukkan bahwa D4-02 memiliki kesamaan dengan *Priestia megaterium* NBRC 15308 dengan persentase kemiripan sebesar 99,93%. Isolat ini dapat digunakan untuk kegiatan praktikum di Laboratorium seperti saat melakukan pengamatan morfologi mikroskopis mikroba sebagai contoh bakteri gram positif berbentuk batang.

Kata kunci — *Bacillaceae*, *Priestia megaterium*, tanah, susu

ABSTRACT

Microorganisms or microbes are needed to be studied in the Food Engineering Technology Study Program. For example, how to control harmful microbes. Not only that, but also the uses of beneficial microbes, especially in food, can also be explored. This study aims to obtain *Bacillaceae* bacterial isolates to complete the learning materials in our Laboratory. There were two samples used for isolation, those were soil and milk samples. Isolation was carried out by spread-plate method on nutrient agar (NA), then the single colonies grown were reinoculated by streak method. Gram staining was performed on the pure cultures obtained. After that, rod-shaped and gram-positive isolates were observed for colony morphology in NA slant, catalase test, starch hydrolysis test and molecular identification. As a result, only D4-02 isolate was rod-shaped and gram-positive. The isolate was derived from soil samples. The ability to hydrolyze starch and decompose hydrogen peroxide is owned by D4-02. Molecular identification results show that D4-02 has similarity with *Priestia megaterium* NBRC 15308 with a similarity percentage of 99.93%. This isolate can be used for learning material in the laboratory such as when observing microscopic morphology of microbes as an example of gram-positive rod-shaped bacteria.

Keywords — *Bacillaceae*, *Priestia megaterium*, soil, milk

1. Pendahuluan

Mikroorganisme atau mikroba perlu dipelajari di Program Studi Teknologi Rekayasa Pangan (TRP). Pengetahuan ini bermanfaat dalam melakukan pengendalian mikroba yang merugikan dan penggunaan mikroba yang bermanfaat, terutama pada makanan. Beberapa mata kuliah di Program Studi TRP yang mempelajari mikroba adalah Mikrobiologi Pangan, Analisa Pangan Terpadu, Higiene & Sanitasi, Teknik Bioproses dan Bioteknologi Pangan. Tidak hanya dipelajari secara teoritis, mikroba juga digunakan dalam kegiatan praktikum seperti identifikasi bakteri, pengendalian mikroba dan rekayasa genetika mikroba.

Laboratorium TRP belum memiliki koleksi kultur mikroba. Selama ini, kebutuhan kultur mikroba dipenuhi dengan cara isolasi dari suatu sampel secara langsung saat praktikum. Sampel yang digunakan adalah sayur, roti berjamur dan daging mentah. Akibatnya, kultur mikroba yang digunakan tidak menentu sehingga hasil praktikum juga sering tidak sesuai dengan harapan. Masalah lain yang muncul adalah mikroba yang didapatkan hanya mewakili sebagian kecil kelompok mikroba.

Penelitian ini bertujuan mendapatkan isolat bakteri *Bacillaceae* untuk melengkapi bahan praktikum di Laboratorium TRP. Isolasi bakteri ini adalah lanjutan dari penelitian sebelumnya. Pada penelitian sebelumnya telah didapatkan dua spesies bakteri koliform yang merupakan bakteri gram negatif yaitu *Klebsiella pneumoniae* dan *Pseudocitrobacter faecalis* [1]. *Bacillaceae* merupakan kelompok bakteri gram positif. Secara mikroskopis bakteri ini berbentuk batang [2]. Bakteri ini banyak ditemukan di tanah [3]. *Bacillaceae* dikatakan sebagai penghasil enzim protease yang paling penting. Enzim protease banyak diaplikasikan dalam pengolahan makanan, produksi peptida bioaktif dan bahan tambahan pada deterjen [4].

2. Metodologi

2.1. Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan untuk isolasi bakteri *Bacillaceae* berasal dari sampel tanah dan

susu. Pengambilan sampel tanah diadaptasi dari Suryadi et al. (2015) [5]. Sampel tanah diambil di dalam area kampus utama Politeknik Negeri Jember. Sampel tanah yang diambil berada 30 cm di dekat tanaman dengan kedalaman 5-10 cm. Sebanyak 40 gram sampel tanah diambil dan disimpan dalam botol steril. Sampel susu yang dijadikan sampel adalah susu segar yang dijual di sekitar kampus utama Politeknik Negeri Jember.

2.2. Isolasi Bakteri

Empat puluh gram sampel tanah dicampur dengan 360 ml larutan NaCl 0,85% (faktor pengenceran 10^{-1}). Dibuat pengenceran berseri hingga faktor pengenceran 10^{-4} . Isolasi dilakukan dengan metode sebar pada medium *Nutrient Agar (NA)(oxoid)* untuk pengenceran 10^{-2} hingga 10^{-4} . Sampel susu diisolasi dengan metode yang sama. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 24 jam [6]. Koloni tunggal yang tumbuh diinokulasi ulang dengan metode gores pada medium NA hingga diperoleh kultur murni.

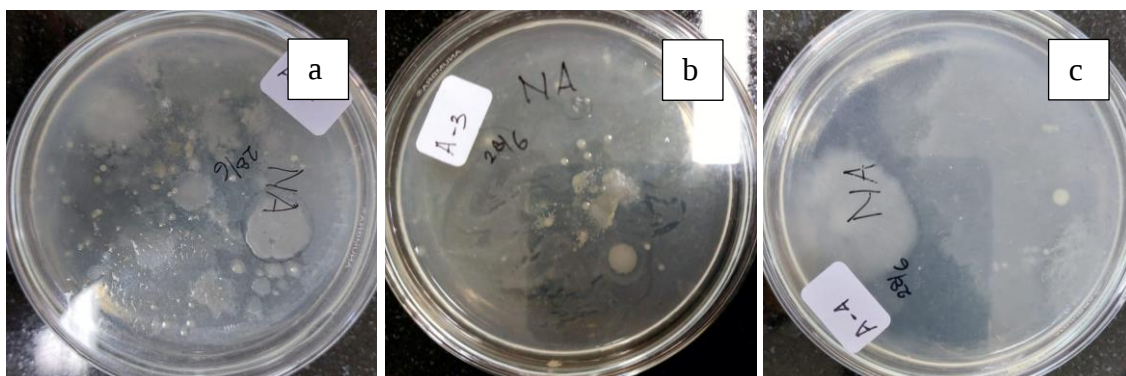
2.3. Identifikasi Bakteri

Kultur murni yang didapat ditumbuhkan di medium NA miring pada tabung reaksi. Diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Dilakukan pewarnaan gram terhadap semua isolat. Isolat yang berbentuk batang dan gram positif dilakukan pengamatan morfologi koloni di NA miring, uji katalase dan hidrolisis pati sesuai dengan metode dari Cappuccino & Welsh (2019) [7] dan diidentifikasi secara molekuler melalui pengurutan DNA bakteri (gen 16S *rRNA*) di PT. Genetika Science Indonesia.

3. Pembahasan

Habitat *Bacillaceae* tersebar luas. Bakteri ini berbentuk batang dan gram positif ukuran dengan 0,5-2,5×1,2–10 μm . Jenis bakteri ini ditemukan di tanah, air dan makanan fermentasi non-susu [8]. Martinez et al. (2017) [9] berhasil mengisolasi *Bacillus licheniformis* dari susu mentah dan susu pasteurisasi. Pada penelitian ini, sampel yang digunakan adalah sampel tanah dan susu. Sampel tanah diambil di sekitar Laboratorium TRP sedangkan susu didapatkan dari Toko G Fresh Milk.



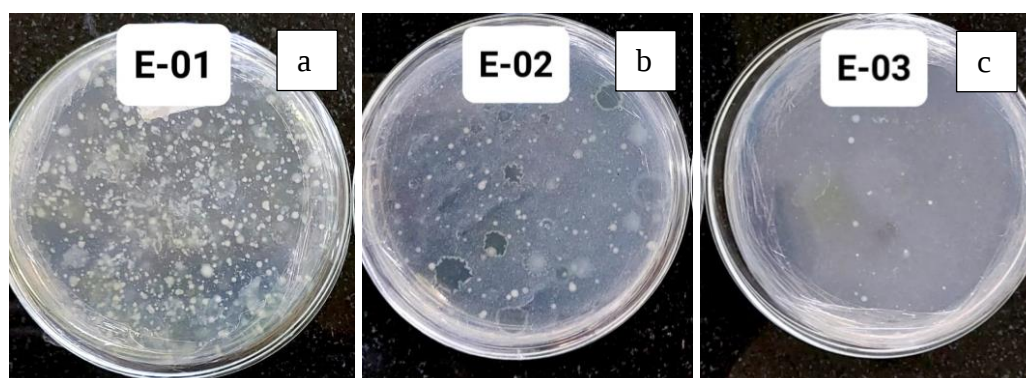


Keterangan: a. pengenceran 10^{-2}
b. pengenceran 10^{-3}
c. pengenceran 10^{-4}

Gambar 1. Hasil isolasi sampel tanah dengan metode spread

Terlihat adanya pertumbuhan bakteri dari sampel tanah dan sampel susu yang digunakan. Pada sampel tanah, pertumbuhan bakteri masih terdapat hingga pengenceran 10^{-4} (Gambar 1). Bakteri di tanah berperan dalam menyediakan nutrisi penting untuk tanaman [10]. Jumlah dan jenis bakteri pada tanah sangat dipengaruhi oleh iklim [11]. Pada sampel susu, bakteri tumbuh

hingga pengenceran 10^{-3} (Gambar 2). Jumlah total bakteri pada sampel susu yang digunakan diperkirakan tidak lebih dari standar susu pasteurisasi (SNI 3951-2018) yaitu sebesar 10^4 koloni/ml. Proses pemanasan susu pada suhu $71,1^{\circ}\text{C}$ selama 15 detik dapat merusak sebagian besar sel vegetatif bakteri [12].



Keterangan: a. pengenceran 10^{-1}
b. pengenceran 10^{-2}
c. pengenceran 10^{-3}

Gambar 2. Hasil isolasi sampel susu dengan metode *spread*

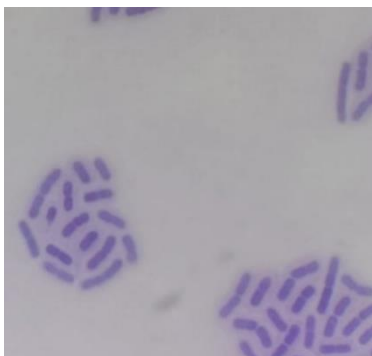
Dari hasil isolasi dengan metode spread, koloni tunggal yang terbentuk diinkolulasi kembali dengan metode gores untuk mendapatkan isolat murni bakteri. Didapatkan empat isolat dari sampel tanah yaitu D2-01, D3-02, D4-02 dan D5-01 sedangkan dari sampel susu didapatkan dua isolat yaitu E3-01 dan E3-02. Selanjutnya dilakukan pewarnaan gram terhadap tujuh isolat yang didapatkan untuk mengetahui bentuk dan jenis gramnya. Hasil

pewarnaan gram isolat bakteri dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil pewarnaan gram isolat bakteri

No	Isolat	Bentuk	Gram
1	D2-01	Bulat	Positif
2	D3-02	Bulat	Negatif
3	D4-02	Batang	Positif
4	D5-01	Batang	Negatif
5	E3-01	Bulat	Positif
6	E3-02	Bulat	negatif

Hanya isolat D4-02 yang memiliki bentuk batang dan gram positif (Gambar 3) seperti *Bacillaceae*. Maka dari itu hanya isolat D4-02 yang dilakukan pengamatan morfologi koloni, uji katalase uji hidrolisis pati dan identifikasi molekuler. Hasil pengamatan morfologi koloni, uji katalase uji hidrolisis pati dapat dilihat pada Gambar 4. Secara molekuler, isolat D4-02 teridentifikasi sebagai *Priestia megaterium* NBRC 15308 (nomor akses NR_112636.1) dengan persentase kemiripan sebesar 99,93%. Dengan hasil ini, Laboratorium TRP telah memiliki dua isolat bakteri gram negatif dengan bentuk batang [1] dan satu isolat bakteri gram positif berbentuk batang. Isolat ini dapat digunakan untuk kegiatan praktikum di Laboratorium seperti saat melakukan pengamatan morfologi mikroskopis mikroba.



Gambar 3. Pewarnaan gram isolat D4-02 (berbentuk batang dan gram positif)

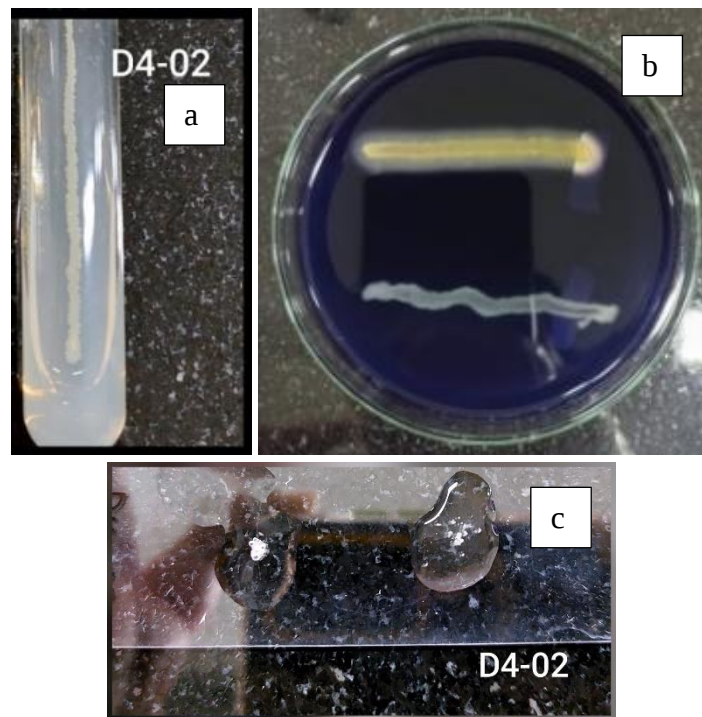
P. megaterium yang sebelumnya dikenal sebagai *Bacillus megaterium* sering ditemukan

pada tanah. Pada daerah rhizosfer tanaman, *P. megaterium* dapat berperan dalam melarutkan fosfor anorganik sehingga meningkatkan pertumbuhan tanaman [13]. Isolat D4-02 yang teridentifikasi sebagai *P. megaterium* juga diisolasi dari tanah. Kemampuan D4-02 dalam melarutkan fosfor organik perlu dilakukan pengujian lebih lanjut. Gupta et al. (2020) [14] mengklarifikasi klasifikasi genus *Bacillus* melalui filogenomik dan mengajukan genus baru yaitu *Priestia*. *B. megaterium* diajukan tergolong genus tersebut.

Tabel 2. Pengamatan morfologi koloni di NA miring

Karakteristik	D4-02
Kelimpahan pertumbuhan	Sedang
Pigmentasi	Kuning
Karakteristik optik	Tidak transparan
Bentuk	Echinulate
Konsistensi	Mengilap

Hasil uji katalase dan hidrolisis pati isolat D4-02 sama dengan yang dilakukan oleh Sura & Hiremath (2019) [15]. D4-02 memiliki enzim katalase yang ditandai dengan munculnya gelembung udara pada larutan H₂O₂ 3% (Gambar 4.c). Gelembung tersebut merupakan gas oksigen hasil penguraian H₂O₂ [7]. Selain enzim katalase, D4-02 juga memiliki enzim amilase. Hal ini terlihat pada hasil uji hidrolisis pati (Gambar 4.b), terdapat zona bening di sekitar bakteri. Pada uji ini, *Klebsiella pneumoniae* yang tidak mempunyai aktivitas hidrolisis pati [7] digunakan sebagai kontrol negatif. Hasil pengamatan morfologi koloni dapat dilihat pada Tabel 2. Pengamatan dilakukan pada karakteristik kelimpahan pertumbuhan, pigmentasi, karakteristik optik, bentuk dan konsistensi [7].



Keterangan: a. koloni pada NA miring
b. uji hidrolisis pati (bagian atas: D4-02, bagian bawah: *K. pneumoniae*)
c. uji katalase

Gambar 4. Karakteristik D4-02

4. Kesimpulan

Hanya isolat D4-02 yang berbentuk batang dan gram positif. Isolat tersebut berasal dari sampel tanah. Kemampuan dalam hidrolisis pati dan penguraian hidrogen peroksida dimiliki oleh D4-02. Hasil identifikasi secara molekuler menunjukkan bahwa D4-02 memiliki kesamaan dengan *Priestia megaterium* NBRC 15308 dengan persentase kemiripan sebesar 99,93%. Isolat ini dapat digunakan untuk kegiatan praktikum di Laboratorium seperti saat melakukan pengamatan morfologi mikroskopis mikroba sebagai contoh bakteri gram positif berbentuk batang.

5. Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dibiayai oleh DIPA Politeknik Negeri Jember SP DIPA - SP DIPA-023.18.2.677607/2022 17 November 2021, Tahun Anggaran 2022.

6. Daftar Pustaka

- [1] Dwiantara, W. S., Rahmawati, W., & Nursuci, W. K. (2022). Isolasi Bakteri Koliform untuk memenuhi Kebutuhan Bahan Praktikum di Laboratorium Teknologi Rekayasa Pangan. Jurnal Pengembangan
- Potensi Laboratorium, 1(1), 14–21. <https://doi.org/10.25047/plp.v1i1.2981>
- [2] Madigan, M.T., Clark, D.P., Stahl, D. and Martinko, J.M. (2015). Brock biology of microorganisms 14th edition. Benjamin Cummings.
- [3] Saxena, A. K., Kumar, M., Chakdar, H., Anuroopa, N., & Bagyaraj, D. J. (2020). Bacillus Species in Soil as a Natural Resource for Plant Health and Nutrition. Journal of applied microbiology, 128(6), 1583–1594. <https://doi.org/10.1111/jam.14506>
- [4] Contesini, F. J., Melo, R. R. D., & Sato, H. H. (2018). An overview of Bacillus proteases: from production to application. Critical reviews in biotechnology, 38(3), 321–334. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354>
- [5] Suryadi, B. F., Yanuwadi, B., Ardyati, T., & Suharjo (2015). Isolation of Bacillus sphaericus from Lombok Island, Indonesia, and Their Toxicity against Anopheles aconitus. International journal of microbiology, 2015, 854709. <https://doi.org/10.1155/2015/854709>
- [6] Zheng, X., Liu, G., Wang, Z., Wang, J., Zhang, H., & Liu, B. (2020). Bacillus dafuensis sp. Nov., Isolated from a Forest Soil in China. Current microbiology, 77(9), 2049–2055. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02014-2>

- [7] Cappuccino, J. G., & Welsh, C. T. (2019). *Microbiology: A Laboratory Manual*. Pearson Education.
- [8] Jeżewska-Frąckowiak, J., Seroczyńska, K., Banaszczyk, J., Jedrzejczak, G., Żylicz-Stachula, A., & Skowron, P. M. (2018). The promises and risks of probiotic *Bacillus* species. *Acta biochimica Polonica*, 65(4), 509–519. https://doi.org/10.18388/abp.2018_2652
- [9] Martinez, B. A., Stratton, J., & Bianchini, A. (2017). Isolation and genetic identification of spore-forming bacteria associated with concentrated-milk processing in Nebraska. *Journal of dairy science*, 100(2), 919–932. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11660>
- [10] Bar-On, Y. M., Phillips, R., & Milo, R. (2018). The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(25), 6506–6511. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711842115>
- [11] Islam, W., Noman, A., Naveed, H., Huang, Z., & Chen, H. Y. H. (2020). Role of environmental factors in shaping the soil microbiome. *Environmental science and pollution research international*, 27(33), 41225–41247. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10471-2>
- [12] Ryser, E.T. (2016). *Pasteurization of Liquid Milk Products: Principles, Public Health Aspects, Reference Module in Food Science*. Elsevier.
- [13] Huang, F. L., Zhang, Y., Zhang, L. P., Wang, S., Feng, Y., & Rong, N. H. (2019). Complete genome sequence of *Bacillus megaterium* JX285 isolated from *Camellia oleifera* rhizosphere. *Computational biology and chemistry*, 79, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.12.024>
- [14] Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., & Chen, S. (2020). Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(11), 5753–5798. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004475>
- [15] Sura, N. K., & Hiremath, L. (2019). Isolation of *Bacillus megaterium* and its Commercial Importance. *International Journal of ChemTech Research*, 12(4), 30-36. <http://dx.doi.org/10.20902/IJCTR.2019.120405>

