



REPUBLIK INDONESIA
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA

SERTIFIKAT PATEN

Menteri Hukum dan Hak Asasi Manusia atas nama Negara Republik Indonesia berdasarkan Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten, memberikan hak atas Paten kepada:

Nama dan Alamat Pemegang Paten

: LPPM UNIVERSITAS DIPONEGORO
Gedung WidyaPuraya,
Jl. Prof Soedarto SH,
Tembalang Semarang 50275
INDONESIA

Untuk Inovasi dengan Judul

: BAKTERI *Virgibacillus salarius* YANG MEMPRODUKSI δ -Karoten DAN PROSES PRODUKSI δ -Karoten TERSEBUT

Inventor

: Dr. dr. Sri Achadi Nugraheni, M.Kes.
Prof. Dr. Ocky Karna Radjasa
Lia Kusmita, S.Si, M.Si.
Miftahuddin Majid Khoeri, S.Kel, M.Si.

Tanggal Penerimaan

: 19 November 2013

Nomor Paten

: IDP000053115

Tanggal Pemberian

: 31 Agustus 2018

Perlindungan Paten untuk inovasi tersebut diberikan untuk selama 20 tahun terhitung sejak Tanggal Penerimaan (Pasal 22 Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten).

Sertifikat Paten ini dilampiri dengan deskripsi, klaim, abstrak dan gambar (jika ada) dari inovasi yang tidak terpisahkan dari sertifikat ini.



a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL

Dr. Freddy Harris, S.H., LL.M., ACCS.
NIP. 196611181994031001

Deskripsi

BAKTERI *Virgibacillus salarius* YANG MEMPRODUKSI δ -Karoten DAN PROSES PRODUKSI δ -Karoten TERSEBUT

5 Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berhubungan dengan strain baru mikroba / bakteri simbion yang berasosiasi dengan salah satu invertebrata pada ekosistem terumbu karang, yaitu nudibranch *Jorunna funebris*. Bakteri yang sesuai invensi ini dinamakan *Virgibacillus salarius TG* yang dapat memproduksi pigmen δ -Karoten.

Latar Belakang Invensi

Vitamin A adalah zat organik kompleks yang tidak dapat dibentuk oleh tubuh sendiri, tetapi sangat dibutuhkan walaupun jumlah yang dibutuhkan tidak banyak, karena itu harus didatangkan dari makanan yang masuk ke tubuh. Prekursor vitamin A sangat dibutuhkan karena prekursor vitamin A merupakan senyawa pro vitamin A yang akan diubah oleh tubuh menjadi vitamin A. Ketersediaan prekursor vitamin A di dunia kesehatan diperlukan terus menerus. Berbagai macam penyakit termasuk penyakit tropis seperti

tuberculosis, infeksi saluran pernafasan, infeksi saluran pencernaan dan sebagainya sangat membutuhkan vitamin A sehubungan dengan fungsinya dalam diferensiasi sel terutama sel epitel mukosa yang biasanya bersentuhan langsung dengan

5 agen penyakit (Almatsier, 2001). Selama ini provitamin A yang ada sebagian besar adalah bentuk kimia dari bahan buatan sehingga persediaan prekursor vitamin A (karotenoid) yang alami dirasa perlu, karena lebih aman dan menyehatkan. Karotenoid merupakan salah satu pigmen yang dapat

10 dihasilkan oleh tumbuh-tumbuhan termasuk tumbuh-tumbuhan laut yang merupakan potensi alam luar biasa di Indonesia.

Pigmen karotenoid adalah contoh senyawa bioaktif yang banyak ditemukan pada organisme laut seperti rumput laut, terumbu karang, alga dan bakteri. Karotenoid, yang

15 merupakan pigmen pemberi warna kuning-merah dan sering digunakan sebagai pewarna makanan (Bauernfied, 1981). Bauernfeind (1981) serta Britton dan Goodwin (1982) telah memanfaatkan karotenoid dalam bidang kesehatan.

Terumbu karang Indonesia merupakan salah satu sumber

20 daya hayati laut dangkal yang memiliki daya pesona, karena kekayaan dan keanekaragamannya paling lengkap di dunia. Namun meningkatnya eksplorasi yang berlebihan dalam rangka perburuan senyawa aktif metabolit sekunder dari biota

penyusun ekosistem terumbu karang, khususnya invertebrata laut (karang lunak, karang, moluska, arthropoda, tunicata, sponge) mengakibatkan terganggunya dan menurunnya kualitas lingkungan yang sangat merugikan bagi keseimbangan ekosistem terumbu karang. Apabila perburuan tersebut tetap dibiarkan tanpa mencari solusi alternatif lain, maka ekosistem terumbu karang Indonesia akan mengalami kepunahan lebih cepat.

Beberapa penemuan tentang senyawa bioaktif baru untuk antibiotik, sumber pigmen, kosmetik, enzim dan lainnya banyak diperoleh dari bahan kimia produk alami biota penyusun ekosistem terumbu karang (Burgess, et al. 2003 ; Radjasa and Sabdono, 2003; Radjasa et al, 2007a,b,d). Kurang dari 2% mikrobial baru diperkirakan berhasil diisolasi dari lingkungan laut sebagai kultur murni. Dilaporkan juga bahwa terdapat asosiasi mikroorganisme dengan organisme laut yang juga mensintesa metabolit sekunder seperti organisme inangnya termasuk mensintesa pigmen karotenoid (Proksch et al, 2002 ; Burgess, et al. 2003). Hal ini dapat dijadikan salah satu solusi alternatif pengganti penghasil pigmen karotenoid.

Dengan mengidentifikasi strain bakteri simbiosis dan pigmen yang dihasilkan akan memberikan pilihan alternatif

di bidang kesehatan untuk menghasilkan biopigmen alami yang dapat dimanfaatkan bidang kesehatan, khususnya sebagai sumber anti oksidan alami. Bakteri simbion ini dapat disimpan dan dikembang biakkan beribu kali dalam waktu 5 singkat secara in vitro. Pigmen karoten dapat diproduksi dalam jumlah banyak serta dalam waktu tidak terlalu lama, tanpa harus mengambil lagi invertebrata inangnya di perairan laut, sehingga akan semakin sedikit eksploitasi terhadap invertebrata terumbu karang yang akan dilakukan 10 dan tentunya akan lebih efisien dalam hal waktu, dana dan tenaga.

Bakteri simbion penghasil pigmen terutama δ -Karoten dan proses produksi δ -Karoten dari pembiakan bakteri yang mengandung pigmen tersebut belum banyak di publikasikan. 15 Beberapa invensi tentang produksi δ -Karoten yang sudah ada antara lain dikemukakan oleh Qiong Cheng, Pierre E. Rouviere, Wonchul Suh dengan nomor paten WO2004056975 A2 tentang Peningkatan produksi karotenoid dalam bakteri melalui integrasi kromosom dan Qiong Cheng, Luan Tao dengan 20 nomor paten EP 1446491 A1 (WO2003044205A1) tentang cara pembuatan karotenoid asimetris. Keduanya berbeda secara teknis dengan invensi ini.

Tujuan dari invensi ini adalah menyediakan bakteri *Virgibacillus salarius TG* yang menghasilkan δ -Karoten dan proses produksi δ -Karoten dengan inkubasi bakteri tersebut, pemecahan pigmen bakteri dan ekstraksi.

5

Uraian Singkat Invensi

Sesuai invensi ini disediakan suatu bakteri *Virgibacillus salarius TG* yang menghasilkan δ -Karoten, bakteri tersebut memiliki susunan basa parsial 16s rDNA isolat bakteri sebagai berikut:

10

```

CCAGGGAACCCACTCGTAGCAGTTTGATCCTGGCTCAGGAGCATATCCTCTTCG
GAGGTGACGCCTGTGGAACGAGCGGGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCT
GCCTGTAAGATTGGGATAACCCCGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATACTT
TTCGTTGCATAACGAGAAGTTGAAAGGCGGCTTTTAGCTGTCACTTACAGATGG
15  GCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGC
GTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA
GCAACGCCGCGTGAGTGATGAAAGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTCAGGA
AGAACAAGTGCCGTTTCGATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTGACCAGAAAGCC
20  CCGG

```

20

Proses produksi dengan beberapa tahap yaitu menginkubasi atau mengkultur bakteri pada media Mac Conkay, melakukan penanaman bakteri hasil kultur pada media Mac Conkay cair,

memisahkan pelet bakteri dan media cair dengan sentrifuge, melakukan pemecahan pigmen dengan cara sonifikasi dan ekstraksi pigmen δ -Karoten dengan pelarut aseton metanol.

5 Uraian Singkat Gambar

Untuk memudahkan pemahaman mengenai inti invensi ini , selanjutnya akan diuraikan perwujudan invensi melalui gambar-gambar terlampir.

Gambar 1, adalah foto Elektroforesis PCR 16S rDNA, dengan
10 keterangan M adalah marker dan kode 4 adalah bakteri SNZ1.

Gambar 2, adalah hasil analisis homologi sekuen isolat SNZ1 dengan menggunakan BLASTdatabase. Simbol | menunjukkan nukleotida yang identic.

Gambar 3, adalah skema pohon filogenetik isolat SNZ1
15 (*Virgibacillus salarius*) yang diisolasi dari *Jorunna funebris* Pohon filogenetik menunjukkan tingkat kekerabatan isolat dengan *Virgibacillus salarius* AN-sR35.

Gambar 4, adalah pola spektra hasil KCKT pigmen Bakteri SNZ1 pada panjang gelombang 472 nm.

20

Uraian Lengkap Invensi

Isolasi bakteri dilakukan dengan metoda sebaran. Langkah pertama sampel invertebrada dimasukkan ke dalam cawan petri

steril yang sebagian berisi air laut steril. Selanjutnya dilakukan pemotongan terhadap permukaan jaringan dan hanya bagian dalam dari sampel yang akan digunakan.

Selanjutnya dilakukan seri pengenceran terhadap sampel
5 tersebut. Dari masing-masing cawan petri tersebut diambil 10 ml sampel dengan pipet steril, kemudian dimasukkan ke dalam labu erlemeyer berisi 90 ml air laut steril dan akan diperoleh pengenceran sampel sebesar 10^{-1} . Dari pengenceran 10^{-1} tersebut diambil 1 ml sampel dengan pipet steril dan
10 dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml air laut steril dan akan diperoleh pengenceran 10^{-2} . Demikian selanjutnya sehingga akan diperoleh pengenceran sampel 10^{-3} ; 10^{-4} ; dan 10^{-5} .

Dari masing-masing seri pengenceran tersebut, selanjutnya
15 diambil 1 ml sampel dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril yang dituangi media agar Zobell 2216E. Cawan petri tersebut kemudian diinkubasikan pada suhu 30°C selama 2 hari. Koloni bakteri berwarna yang tumbuh pada permukaan agar tersebut, kemudian dipisahkan dengan teknik goresan
20 (*streak method*) sehingga diperoleh isolat bakteri berwarna yang berasosiasi dengan invertebrata.

Isolat bakteri (kode SNZ1) diuji PCR untuk mengetahui strain bakteri tersebut. Hasil pengecekan terhadap PCR 16S

rDNA yang menunjukkan hasil positif dengan terdapatnya berkas DNA dengan panjang basa yang sesuai yaitu sekitar 1.500 bp, disajikan pada gambar 4. Marker DNA (M) mempunyai panjang basa berturut-turut dari bawah ke atas adalah 500, 5 1.000, 2.000, 4.000, 10.000 (gambar 1). Dari hasil sekuensing didapatkan susunan basa parsial 16s rDNA isolat bakteri sebagai berikut : SNZ1 (490 nukleotida) (gambar 2)

```

      CCAGGGAACCCACTCGTAGCAGTTTGATCCTGGCTCAGGAGCATATCCTCTTCGGAG
      GTGACGCCTGTGGAACGAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAA
10  GATTGGGATAACCCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATACTTTTCGTTGCATAAC
      GAGAAGTTGAAAGGCGGCTTTTAGCTGTCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCT
      AGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
      GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT
      TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAAGTTTTTCGGAT
15  CGTAAAACTCTGTTGTCAGGAAGAACAAGTGCCGTTTCGATAGGGCGGCACCTTGACGGT
      ACCTGACCAGAAAGCCCCGG

```

Identifikasi jenis strain bakteri simbion dari invertebrata nudibranch *Jorunna funebris* dilakukan dengan analisis homologi dari BLAST *searching* menunjukkan bahwa 20 isolat bakteri memiliki persentase kesamaan tertinggi dengan *Virgibacillus salarius strain AN sR35*. Hasil uji molekuler menunjukkan bahwa isolat SNZ1 adalah *Virgibacillus salarius strain AN sR35* ribosomal RNA gene

dengan tingkat kekerabatan sebesar 98 % (tabel 1). Pohon kekerabatan ditampilkan pada gambar 3. Lebih khusus bakteri sesuai invensi ini dinamakan *Virgibacillus salarius TG* karena merupakan isolat mikroba dari Perairan Tanjung Gelam (TG) kepulauan Karimun Jawa Kabupaten Jepara, Indonesia. Strain bakteri *Virgibacillus salarius TG* sesuai invensi disimpan di Laboratorium TERPADU Universitas Diponegoro Jalan Prof. Soedarto, Tembalang Semarang.

Tabel 1. Hasil penelusuran sekuen DNA isolat bakteri dengan sistem BLAST.

Kode Bakteri	Panjang	Kekerabatan Terdekat	Homologi	No. Akses
SNZ1	490	<i>Virgibacillus salarius strain AN sR35</i>	98 %	AB523716.1

Identifikasi pigmen karotenoid bakteri laut dilakukan dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Perkembangan KCKT merupakan suatu terobosan untuk analisis karotenoid, salah satunya adalah dengan menggunakan detektor PDA (*Photo Diode Array*). KCKT yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan detektor PDA. Pada KCKT dengan detektor UV-tampak konvensional, pengukuran hanya dapat dilakukan pada satu panjang gelombang, sehingga untuk menentukan komposisi suatu sampel pada banyak panjang gelombang harus dilakukan pengukuran berulang-ulang. Hal

ini berbeda dengan KCKT detektor PDA, pengukuran dapat dilakukan pada banyak panjang gelombang secara simultan, sehingga dapat diperoleh komposisi suatu sampel pada rentang panjang gelombang yang diinginkan. Keunggulan lain, rentang panjang gelombang dapat menghasilkan pola spektra dari puncak-puncak yang diperoleh sehingga secara kualitatif dapat ditentukan tanpa harus menganalisis marker.

Hasil pola spektra yang akan diperoleh dicocokkan dengan literatur yang sudah ada. Salah satu bakteri dengan kode SNZ1 terdapat 1 jenis pigmen yang berdasarkan literatur teridentifikasi sebagai δ -karoten, karena mempunyai serapan yang sama. Pola spektra yang terbentuk berdasarkan hasil KCKT yang disajikan pada Gambar 4 mempunyai puncak gelombang 472 nm. Pola spektra yang terbentuk menunjukkan pigmen tersebut cenderung sama dengan pola spektra pigmen golongan karotenoid jenis δ -Karoten. Hasil KCKT yang diperoleh dihitung dengan 3 kali pengulangan, maka diperoleh nilai rata rata pigmen pada ekstrak kasar bakteri SNZ1, yang dikelompokkan dalam karotenoid kelas δ -Karoten sebesar 85% (tabel 2).

Tabel 2. Identifikasi pigmen bakteri berdasarkan serapan maksimum hasil KCKT

No	Kode Bakteri	Jenis Pigmen	RT	Serapan maksimum		Literatur
				Hasil Penelitian	Literatur	
1.	SNZ1	δ -karoten	7,84	441, 471, 504	440, 470, 503	Rodriguez -Amaya, 2001

Proses produksi pigmen δ -Karoten dilakukan pertama dengan cara inkubasi atau kultur bakteri pada media Mac Conkay padat. kultur pada media Mac Conkay padat dilakukan selama 3 (tiga) hari dalam inkubator. Kemudian dari kultur tersebut diambil bakterinya dan dibiakkan lebih lanjut pada media Mac Conkay cair sebanyak 1000 ml. Penanaman di Mac Conkay cair dilakukan selama 1 (satu) sampai 2 (dua) minggu sampai tumbuh banyak. Pemisahan pelet bakteri dan media cair dilakukan dengan sentrifuge selama 5 (lima) sampai 10 (sepuluh menit). Setelah pelet diambil kemudian dilakukan pemecahan pigmen dengan sonifikasi selama 3 (tiga) sampai 5 (lima) menit, Terakhir dilakukan ekstraksi pigmen menggunakan pelarut aseton : metanol dengan perbandingan tujuh banding tiga (7:3), sehingga didapatkan ekstrak δ -Karoten yang siap dipergunakan untuk uji coba selanjutnya.

Klaim

1. Suatu bakteri *Virgibacillus salarius* TG yang menghasilkan δ -Karoten dengan kode bakteri SNZ1 disimpan di Laboratorium TERPADU Universitas Diponegoro, memiliki kode susunan basa parsial 16S rDNA yang sudah disimpan di Bank Gen dengan no akses [AB523716.1](#).
2. Suatu proses untuk memproduksi pigmen δ -Karoten dari bakteri tersebut seperti pada klaim 1 dimana memiliki tahapan sebagai berikut:
 - a menginkubasi atau mengkultur bakteri pada media Mac Conkay padat selama 3 (tiga) hari dalam inkubator;
 - b melakukan penanaman bakteri hasil kultur pada tahap a pada media Mac Conkay cair selama 1 (satu) sampai 2 (dua) minggu;
 - c memisahkan pelet bakteri dan media cair dengan sentrifuge selama 5 (lima) sampai 10 (sepuluh menit);
 - d mengambil pelet bakteri dan melakukan pemecahan pigmen dengan sonifikasi selama 3 (tiga) sampai 5 (lima) menit;
 - e melakukan ekstraksi pigmen δ -Karoten menggunakan pelarut aseton : metanol dengan perbandingan tujuh

banding tiga (7:3). Penarikan δ -Karoten dilakukan sampai pelarut berwarna kuning.

5

10

15

20

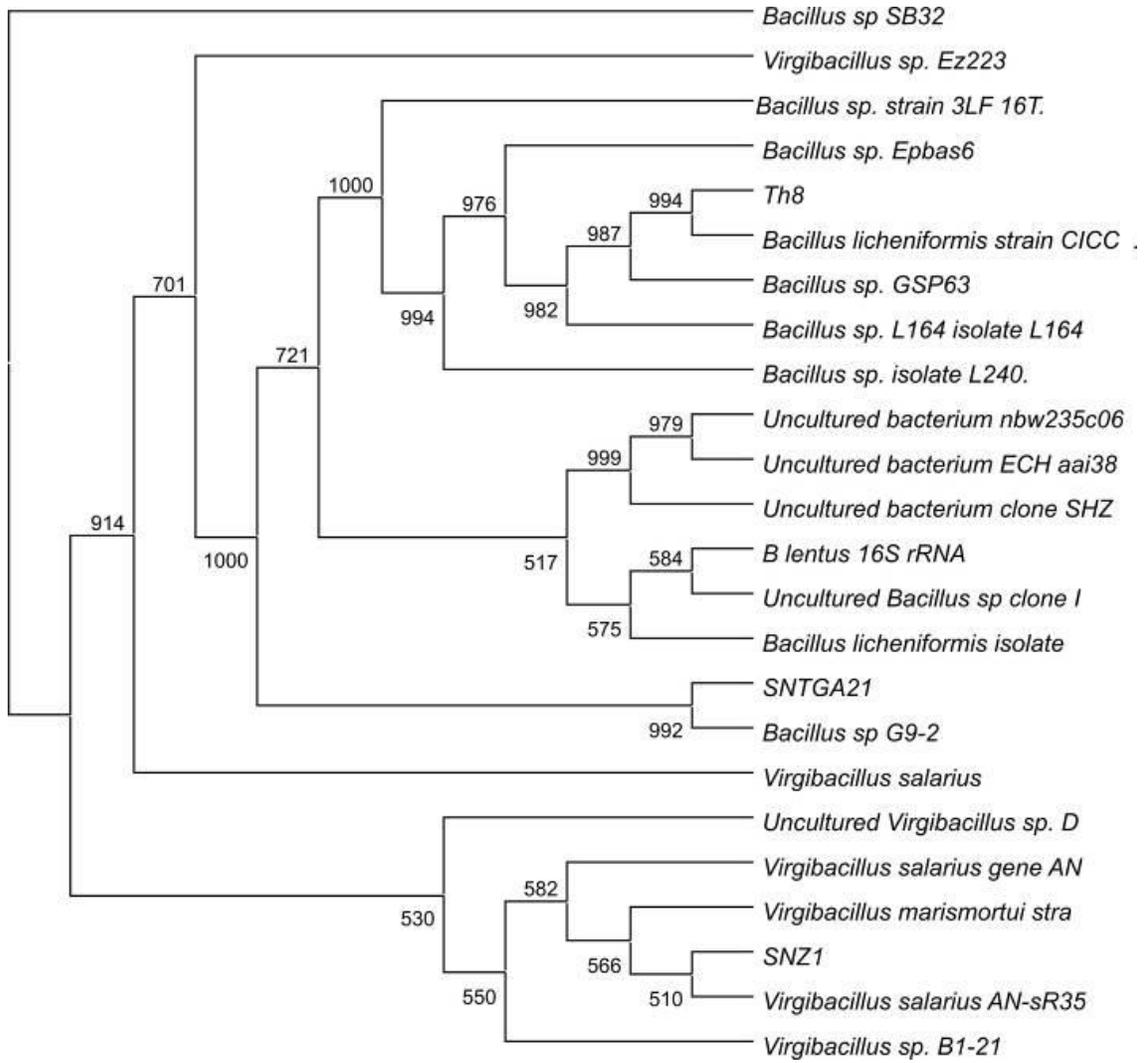
Abstrak**BAKTERI *Virgibacillus salarius* YANG MEMPRODUKSI δ -Karoten
DAN PROSES PRODUKSI δ -Karoten TERSEBUT**

5

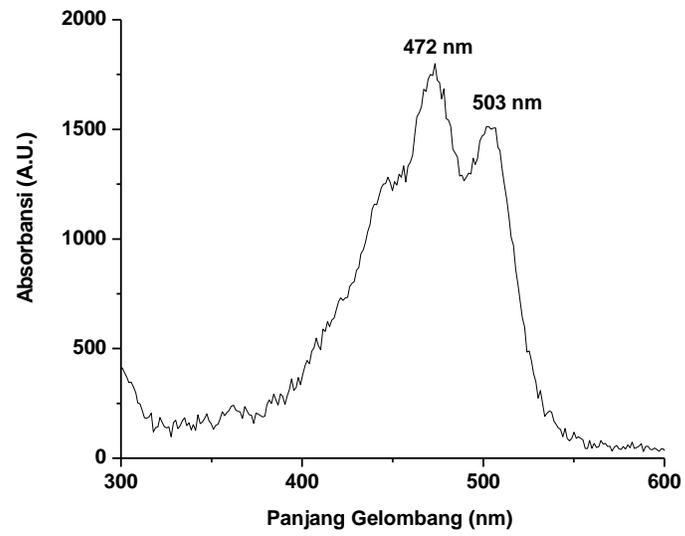
Identifikasi strain bakteri simbion yang berasosiasi dengan salah satu invertebrata pada ekosistem terumbu karang dan jenis karoten yang dihasilkan memberikan pilihan alternatif produk biopigmen yang bermanfaat di bidang kesehatan. Hal tersebut akan mengurangi dampak buruk dan eksploitasi terhadap invertebrata terumbu karang, karena bakteri simbion ini dapat disimpan serta dapat diproduksi beribu kali dalam waktu singkat secara in vitro. Lebih khusus bakteri dalam invensi ini diidentifikasi sebagai bakteri *Virgibacillus salarius* TG karena merupakan isolat mikroba dari Perairan Tanjung Gelam (TG) kepulauan Karimun Jawa Kabupaten Jepara, Indonesia. Hasil identifikasi parsial 1500 pb urutan gen 16S rDNA menunjukkan bahwa mikroba tersebut termasuk *Virgibacillus* strain baru dan memperlihatkan kemiripan dengan spesies yang ada saat ini sebanyak 98 %. Bakteri ini memproduksi pigmen δ -Karoten dapat dimanfaatkan di bidang kesehatan sebagai bahan dasar suplemen antioksidan. Proses produksi pigmen δ -Karoten

20

dilakukan dengan cara pembiakan / kultur bakteri pada media Mac Conkay padat, kemudian diperbanyak di media Mac Conkay cair, pengambilan pelet dengan sentrifuse, pemecahan pigmen dengan sonifikasi dan ekstraksi pigmen dengan menggunakan 5 pelarut aseton : metanol (7:3).



Gambar 3.



Gambar 4.