

**ISOLASI DAN SKRINING ACTINOMYCETES ENDOFITIK PADA AKAR
MANGROVE YANG BERPOTENSI MENGHASILKAN ENZIM HIDROLITIK
(ISOLATION AND SCREENING OF ENDOPHYTIC ACTINOMYCETES
POTENTIALLY PRODUCING HYDROLYTIC ENZYME)**

Stormy Vertygo¹⁾

Program Studi Teknologi Pakan Ternak, Jurusan Peternakan

Politeknik Pertanian Negeri Kupang

Corresponding author : svertygo91@gmail.com

Abstrak

Actinomycetes termasuk kelompok mikroorganisme prokariotik yang telah lama dimanfaatkan dalam berbagai bidang industri karena kemampuannya untuk menghasilkan metabolit primer dan sekunder yang sangat beragam. Di alam, kelompok mikroorganisme ini paling banyak hidup di tanah namun telah berhasil diisolasi pula dari dalam tubuh makhluk hidup sebagai organisme endofitik. Pada penelitian ini, isolasi Actinomycetes Endofitik telah berhasil dilakukan dari perakaran Mangrove yang hidup di perairan pantai Oesapa, kota Kupang. Proses isolasi menghasilkan 3 isolat Actinomycetes Endofitik, yaitu: isolat A11, A12 dan A2, yang kemudian dilanjutkan ke tahapan skrining untuk melihat kemampuan katalitiknya dalam mendegradasi substrat selulosa, amilum, lipid dan protein. Berdasarkan hasil uji skrining, ketiga isolat memiliki minimal salah satu dari enzim hidrolitik yang diujikan sehingga berpotensi dikembangkan sebagai imbuhan pakan ternak (*feed additive*). Isolat A11 menunjukkan hasil uji positif terhadap enzim Amilase yang tinggi dan juga terhadap enzim Lipase. Isolat A12 menunjukkan hasil uji positif terhadap enzim Amilase yang tinggi dan juga terhadap enzim Lipase dan Protease, sedangkan isolat A2 mengandung semua enzim hidrolitik yang diujikan. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan juga kontribusi bagi pengembangan komoditas peternakan di daerah Nusa Tenggara Timur (NTT) sesuai dengan program yang dicanangkan oleh Kementerian Pertanian dan Pemerintah Provinsi NTT misalnya melalui pengembangan produk pakan ternak berkualitas yang memanfaatkan sumber daya lokal.

Kata Kunci: Actinomycetes Endofitik, Enzim Hidrolitik, Imbuhan Pakan Ternak, Perakaran Mangrove.

ABSTRACT

Actinomycetes are a group of prokaryotic microorganisms that have long been used in various industrial fields because of their ability to produce very diverse primary and secondary metabolites. In nature, this group of microorganisms mostly lives in the soil but has also been isolated from living organisms as endophytic organisms. In this study, the isolation of Endophytic Actinomycetes has been successfully carried out from the roots of the mangroves that live in the coastal waters of Oesapa, Kupang city. The isolation process resulted in 3 isolates of Endophytic Actinomycetes, namely: isolates A11, A12 and A2, which then proceeded to the screening stage to see their catalytic ability in degrading cellulose, starch, lipid and protein substrates. Based on the results of the screening test, the three isolates had at least one of the tested hydrolytic enzymes and thus could be potentially developed as feed additives. Isolate A11 showed a positive test result to high amylase enzyme and also to lipase enzyme. A12 isolate showed a positive test result for high amylase enzyme and also for lipase and protease enzymes, while isolate A2 contains all the hydrolytic enzymes tested. The results of this study are expected to provide information and also contribute to the development of livestock commodities in the East Nusa Tenggara (NTT) area in accordance with the program launched by the Ministry of Agriculture and the NTT Provincial Government, for example through the development of high quality animal feed products that utilize local resources.

Keywords: *Endophytic Actinomycetes, Hydrolytic Enzymes, Animal Feed Additives, Mangrove Roots*

PENDAHULUAN

Actinomyetes merupakan salah satu kelompok mikroorganisme yang telah lama diketahui dan dikembangkan potensinya dalam produksi berbagai metabolit sekunder. Meskipun termasuk ke dalam kingdom Monera yang bersifat prokariotik, bakteri ini memiliki sifat pertumbuhan filamen berupa hifa dan memproduksi spora sehingga mirip dengan mikroorganisme eukariotik dari kelompok jamur (fungi) (Aghamirian & Ghiasian, 2009). Berbagai metabolit sekunder yang telah berhasil diekstraksi dari kelompok mikroorganisme ini di antaranya: senyawa antibakteri, antivirus, antifungi, antikarsinogen, antifibrotik, antimalaria, antialga, neuritogenik dan neuroprotektif, anti-inflamasi dan juga antioksidan (Aghamirian & Ghiasian, 2009; Berezin *et al.*, 2019). Selain itu, metabolit primer yang dihasilkan berupa eksoenzim hidrolitik, juga sangat penting dimanfaatkan dalam berbagai bidang industri, misalnya industri makanan dan minuman, kosmetik, deterjen, pakan, medis, kertas, tekstil dan *Biorefinery* (Dewi *et al.*, 2017). Actinomycetes penghasil enzim hidrolitik paling banyak berasal dari genus *Streptomyces* dan juga beberapa berasal dari genus *Microbispora*, *Cellulomonas*, dan *Thermobifida*. Berbagai enzim yang disekresikan meliputi: selulase, xylanase, amilase, protease, keratinase, kitinase, pektinase, lipase, fitase (Mukhtar *et al.*, 2017).

Mikrohabitat Actinomycetes tersebar pada berbagai ekosistem dan bahkan di dalam tubuh makhluk hidup. Akan tetapi, proporsi paling banyak terdapat di dalam ekosistem darat (tanah). Bahkan sering dianggap bahwa aroma tanah yang khas khususnya ketika hujan dan juga aroma air berasal dari metabolit sekunder yang dihasilkan oleh Actinomycetes. Saat ini telah banyak kelompok Actinomycetes yang berhasil diisolasi dari dalam tubuh makhluk hidup (endofitik) dengan tujuan memperoleh senyawa bioaktif baru yang memiliki fungsi yang lebih efektif (Ravikumar *et al.*, 2011). Sistem perakaran tumbuhan termasuk salah satu sumber utama dalam penjelajahan Actinomycetes Endofitik yang mencakup lebih dari 1000 spesies yang telah berhasil diidentifikasi. Beberapa spesiesnya berasal dari genus *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* dan *Bacteroides*, sedangkan tumbuhan yang menjadi inang berasal dari spesies *Triticum aestivum*, *Ophiopogon japonicus* ker-Gawler, *Sonchus asper*, *Helleborus orientali*, *Musa paradisiaca*, *Camellia sinensis*, dan juga dari kelompok Pteridophyta dan Mangrove (Matsumoto & Takahashi, 2017).

Pada penelitian ini, Actinomycetes Endofitik diisolasi dari perakaran Mangrove yang tumbuh di daerah pantai Oesapa, Kupang. Pengisolasian ini dilakukan untuk memperoleh kelompok Actinomycetes Endofitik yang memiliki kemampuan menghasilkan enzim hidrolitik. Enzim hidrolitik yang di-skrining mencakup 4 jenis yaitu: Selulase, Amilase, Lipase dan Protease. Manfaat utama dari penelitian ini akan lebih difokuskan aplikasinya dalam dunia peternakan yaitu sebagai bahan informasi dan juga referensi bagi pelaku industri terutama industri peternakan yang bergerak dalam bidang pengolahan pakan. Pengolahan pakan merupakan salah satu aspek yang sangat penting dalam manajemen pemeliharaan ternak. Suatu pakan yang baik tidak hanya memperhatikan aspek palatabilitas ('tingkat kesukaan') namun juga aspek ketersediaan nutrisi bagi pertumbuhan dan perkembangan ternak yang optimal. Seringkali untuk semakin meningkatkan ketersediaan nutrisi dalam pakan, zat-zat tambahan dapat diberikan yang di antaranya juga berupa enzim. Kelompok zat ini dikenal dengan istilah imbuhan pakan (*feed additives*). Dengan demikian, tujuan utama penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan menskrining Actinomycetes Endofitik pada akar mangrove yang berpotensi menghasilkan enzim hidrolitik untuk dikembangkan sebagai imbuhan pakan ternak (*feed additive*). Diharapkan agar hasil penelitian ini dapat mendukung program Kementerian Pertanian dan juga Pemerintah Provinsi Nusa Tenggara Timur (NTT) dalam memajukan komoditas peternakan di daerah NTT melalui pengembangan pakan ternak yang mengutamakan pemanfaatan bahan lokal termasuk dari aspek imbuhan pakan yang digunakan.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Pengambilan sampel akar Mangrove dilakukan pada daerah pantai Mangrove di daerah Oesapa, Kota Kupang, sedangkan isolasi Actinomycetes Endofitik sekaligus skrining Enzim Hidrolitik dilakukan di Laboratorium Teknologi Pakan Ternak, Politeknik Pertanian Negeri Kupang.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini di antaranya cawan petri untuk penanaman isolat dalam media, oven inkubator yang digunakan untuk inkubasi isolat, jarum ose untuk pengambilan isolat secara aseptik, pinset dan pisau *cutter* untuk memotong bagian akar Mangrove, labu Erlenmayer, pemanas (*hot plate*) dan *magnetic stirrer* yang digunakan dalam pembuatan media, autoklaf untuk sterilisasi alat dan juga bahan dan *Laminair Airflow*. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ISP2 Agar, larutan NaCl fisiologis 0,9%, larutan iodine, larutan natrium hipoklorit 1%, NaCl 1 M, tepung pati, susu skim, *Carboxymethyl cellulose* (CMC), pewarna Rhodamine-B, pewarna Congo-Red.

Metode Dan Teknik Penelitian

Penelitian ini bersifat deskriptif, di mana hasil penelitian yang diperoleh merupakan data kualitatif berupa isolat Actinomycetes Endofitik murni serta hasil skrining akan kemampuannya dalam menghasilkan empat jenis enzim hidrolitik yang diujikan yaitu: Selulase, Amilase, Lipase dan Protease.

Akar Mangrove yang merupakan sumber pengisolasian Actinomycetes Endofitik di-sampling secara acak di perairan pantai Mangrove, Oesapa, kota Kupang dan ditempatkan dalam wadah steril. Jenis akar yang diambil berasal dari akar lateral yang berukuran kecil sehingga lebih mudah untuk disayat. Prosedur isolasi akan mendapatkan isolat Actinomycetes Endofitik murni yang kemudian dilanjutkan ke tahapan skrining enzim hidrolitik. Tahapan ini akan menyeleksi isolat Actinomycetes Endofitik penghasil minimal salah satu dari keempat enzim hidrolitik yang diujikan. Setelah tahapan skrining, isolat akan diamati karakteristik morfologi koloninya dalam media agar termasuk pewarnaan Gram (*Gram staining*) pula.

Prosedur Penelitian

1) Pengambilan Sampel

Sampel cabang akar Mangrove dipotong secara aseptis menggunakan pisau *cutter* dan ditempatkan ke dalam wadah plastik steril berisi larutan NaCl fisiologis 0,9% (Hidayatullah, 2019).

2) Persiapan Alat dan Bahan

Semua alat dan media yang digunakan selama pengerjaan teknis di Laboratorium disteril menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit (untuk media) dan selama 30 menit (untuk alat) (Tille, 2017).

3) Tahap Isolasi

- a) Sampel cabang akar Mangrove disteril permukaannya menggunakan larutan natrium hipoklorit 1% selama 60 detik (Sauer & Burroughs, 1986).
- b) Sampel akar disayat kemudian permukaan dalamnya ditempatkan pada permukaan media ISP2.
- c) Media yang mengandung sampel kemudian diinkubasi dalam oven inkubator pada suhu ruang ($\pm 27^{\circ}\text{C}$) selama 3 hari.

4) Tahap Purifikasi

- a) Mikroorganisme yang tumbuh di sekitaran permukaan dalam akar Mangrove diseleksi terhadap Actinomycetes Endofitiknya, yang ditandai dengan permukaan koloni yang kasar

atau tidak rata, dapat menghasilkan pigmen, pertumbuhan berfilamen dan dapat mengeluarkan aroma yang khas (Joseph *et al.*, 2021; Ortenberg & Telsch, 2003).

- b) Koloni yang tumbuh kemudian diambil secara aseptis menggunakan jarum ose dan diinokulasikan ke media agar yang baru (media ISP2).
- c) Metode inokulasi dilakukan dengan metode *streak* kuadran.
- d) Media diinkubasi dalam oven inkubator pada suhu ruang ($\pm 27^{\circ}\text{C}$) selama 3 hari.
- e) Purifikasi dilakukan hingga mendapatkan koloni yang konsisten karakteristik morfologinya.

5) Tahap Skringing

- a) Skringing terhadap enzim Selulase (Gohel *et al.*, 2014)
 - 1. Tiap isolat diinokulasikan pada media ISP2 + 1% CMC.
 - 2. Media diinkubasi dalam oven inkubator pada suhu ruang ($\pm 27^{\circ}\text{C}$) selama 3 hari.
 - 3. Setelah inkubasi, media digenangi larutan Congo-red 1% selama 15 menit.
 - 4. Media dibilas sebanyak 3x menggunakan NaCl 1 M.
 - 5. Isolat dikatakan menghasilkan enzim selulase bila terbentuk zona bening di sekitar koloni.
- b) Skringing terhadap enzim Amilase (Luang-In *et al.*, 2019)
 - 1. Tiap isolat diinokulasikan pada media ISP2 + 1% pati.
 - 2. Media diinkubasi dalam oven inkubator pada suhu ruang ($\pm 27^{\circ}\text{C}$) selama 3 hari.
 - 3. Setelah inkubasi, media digenangi larutan iodine 1% yang menyebabkan media berwarna biru kehitaman.
 - 4. Isolat dikatakan menghasilkan enzim amilase bila terbentuk zona bening di sekitar koloni.
- c) Skringing terhadap enzim Lipase (Pramiadi & Yulianti, 2014)
 - 1. Tiap isolat diinokulasikan pada media ISP2 + 1% minyak zaitun + 0,01% Rhodamine-B.
 - 2. Media diinkubasi dalam oven inkubator pada suhu ruang ($\pm 27^{\circ}\text{C}$) selama 3 hari.
 - 3. Setelah inkubasi, warna koloni isolat diamati.
 - 4. Isolat dikatakan menghasilkan enzim lipase bila koloni berwarna merah karena menyerap pewarna Rhodamine-B.
- d) Skringing terhadap enzim Protease (Alnahdi, 2012)
 - 1. Tiap isolat diinokulasikan pada media ISP2 + 1% susu skim.
 - 2. Media diinkubasi dalam oven inkubator pada suhu ruang ($\pm 27^{\circ}\text{C}$) selama 3 hari.
 - 3. Setelah inkubasi, koloni isolat diamati.
 - 4. Isolat dikatakan menghasilkan enzim protease bila terbentuk zona bening di sekitar koloni.

Teknik Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif kualitatif dengan melakukan karakterisasi morfologi isolat Actinomycetes Endofitik penghasil enzim hidrolitik pada media ISP2 dan termasuk juga dilakukan pewarnaan Gram (Tankeshwar, 2021; Tripathi & Sapra, 2021).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Actinomycetes Endofitik pada Akar Mangrove

Di antara semua mikroorganisme yang tumbuh, 3 isolat berhasil dideteksi sebagai Actinomycetes Endofitik yang terdapat dalam akar Mangrove: isolat A11, A12 dan A2. Koloni isolat ditandai dengan struktur yang kasar mirip tepung, pertumbuhan filamentous, dan memiliki aroma yang khas mirip tanah (Joseph *et al.*, 2021; Ortenberg & Telsch, 2003). Proses isolasi dapat dilihat pada Gambar 1. di bawah.

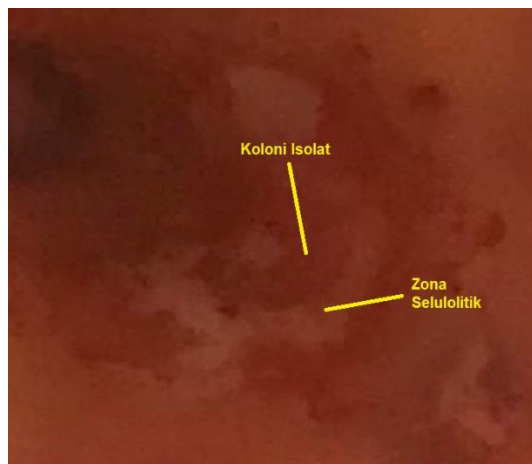


Gambar 1. Sampel akar mangrove yang diinokulasi pada media agar ISP2.

Proses purifikasi dilakukan pada media yang sama (ISP2 agar) sebanyak 2 kali hingga mendapatkan isolat yang benar-benar murni. Metode inokulasi menggunakan teknik *streak plate* pada permukaan media agar dengan mempertimbangkan sifat fisiologis Actinomycetes yang merupakan mikroorganisme aerobik (Mochon *et al.*, 2016).

Skrining Enzim Hidrolitik.

Skrining terhadap enzim Selulase mendapatkan 1 isolat yaitu A2 yang mampu menghasilkan enzim yang dimaksud. Kemampuan katalitik ini ditunjukkan oleh adanya zona bening di sekitar koloni isolat yang ditumbuhkan. Ketika dituangkan dengan larutan Congo-red (CR) 1% pada media agar selama 15 menit, akan terbentuk ikatan hidrogen antara gugus fungsi amino molekul CR dan gugus hidroksil (-OH) dari polisakarida selulosa (Carboxymethyl Cellulose). Ikatan ini kemudian akan memberikan warna merah gelap pada media (Yakupova *et al.*, 2019). Akan tetapi, apabila substrat selulosa terdegradasi (oleh enzim Selulase) maka ikatan ini tidak akan terbentuk, sehingga bila dibilas menggunakan larutan NaCl 1 M, pewarna CR akan larut sehingga terbentuk zona selulolitik yang tampak bening di sekitaran koloni isolat (Gambar 2.).

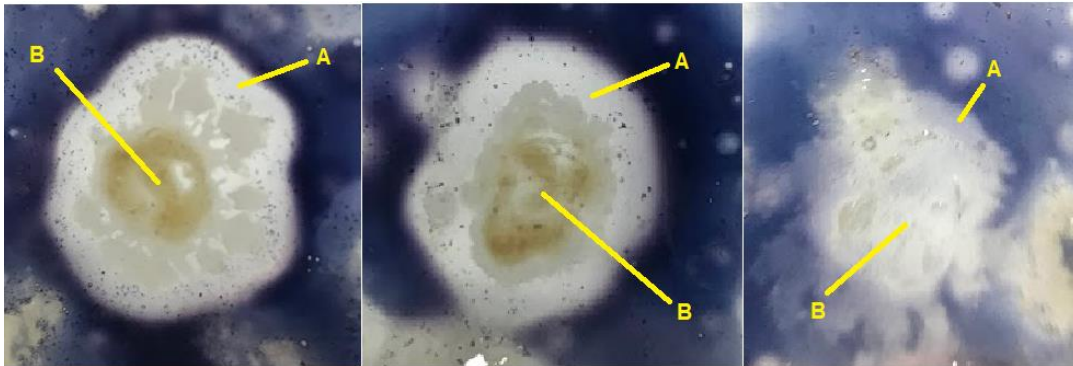


Gambar 2. Hasil Positif Uji Selulase Terhadap Isolat A2.

Afzal *et al.* (2019) menyebutkan bahwa bakteri endofitik dalam suatu tumbuhan inang awalnya bersemayam di daerah sekitaran akar (rizosfer) yang kemudian mengkolonisasi bagian dalam perakaran secara pasif maupun aktif. Secara aktif akan dilakukan melalui sekresi enzim selulase dan pektinase yang akan menguraikan komposisi dinding sel tumbuhan. Beberapa strain Actinomycetes yang memiliki kemampuan katalitik ini di antaranya berasal dari genus *Streptomyces* dan *Nocardiosis* (Putri & Setiawan, 2019; Song *et al.*, 2020).

Skrining terhadap enzim Amilase memperoleh hasil yang positif untuk ketiga isolat: A11, A12

dan A2 dengan kedua isolat A11 dan A12 menunjukkan aktivitas yang cukup tinggi, terlihat dari terbentuknya zona bening yang lebih besar. Ketika diberikan larutan iodine, media akan berwarna biru dalam keberadaan amilum. Hal ini disebabkan oleh amilum yang terdapat pada media bertindak sebagai donor muatan ion poliodida sedangkan larutan iodine sebagai penerima muatan (Madhu *et al.*, 2016). Reaksi ini kemudian membentuk Kompleks *Charge-Transfer* (CT) yang ketika menyerap panjang gelombang cahaya tertentu akan mengubah warnanya menjadi biru tua yang khas (Saenger, 1984). Namun, jika isolat *Actinomyces* memiliki enzim amilase, maka substrat amilum akan didekomposisi menjadi monomer-monomernya berupa glukosa. Glukosa dan poliodida tidak akan menghasilkan kompleks CT yang mengakibatkan tidak adanya warna (zona bening) di sekitar koloni (Goedecke, 2016). Zona amilolitik berupa zona bening tersebut dapat dilihat pada Gambar 3. berikut.



Gambar 3. Hasil Positif Uji Amilase Terhadap Isolat A11 (kiri), A12 (tengah) dan A2 (kiri). Keterangan: A: zona amilolitik, B: koloni isolat.

Seperti yang telah disebutkan di atas, bakteri endofit dapat pula memasuki tumbuhan inang secara pasif yang dilakukan melalui celah atau retakan pada permukaan bulu akar maupun pada bagian lainnya yang telah dilukai atau dicerderai oleh organisme-organisme lainnya (Afzal *et al.*, 2019). Alasan inilah yang mungkin dapat mengkompensasi ketiadaan kedua isolat ini akan enzim Selulase sehingga tidak diperlukan untuk mendegradasi selulosa untuk penetrasi secara aktif. Terkait keberadaan enzim Amilase-nya, substrat amilum dapat diperoleh dari produk fotosintetik tumbuhan inang yang akan didistribusikan ke seluruh bagian termasuk akar (Hastuti *et al.*, 2015). *Actinomyces* Endofitik yang mengandung enzim Amilase kebanyakan berasal dari genus *Streptomyces* (Ayuningrum *et al.*, 2021).

Ketiga isolat juga menunjukkan kemampuan menghasilkan enzim Lipase yang ditandai dengan perubahan warna pada koloni menjadi warna karena menyerap pewarna Rhodamine-B. Di bawah aktivitas katalitik lipase, asam lemak yang dilepaskan dari hidrolisis lipid akan mengikat Rhodamin-B (Jette & Ziomek, 1994). Hal ini kemudian akan membuat media menjadi lebih tidak berwarna dan koloni menjadi lebih berwarna kemerahan karena adanya Rhodamin-B yang diserap tersebut (Primiadi & Yulianti, 2014). Kebanyakan genus *Streptomyces* diketahui mampu menghasilkan enzim Lipase (Kishore, 2011). Contoh salah satu isolat yang menunjukkan hasil yang positif ditampilkan pada Gambar 4. berikut.



Gambar 4. Hasil Positif Uji Lipase Terhadap Isolat A11.

Substrat lipid yang terkandung dalam akar Mangrove terutama berupa senyawa triterpenoid dan fitosterol, di antaranya: lupeol, β -amyirin dan taraxerol untuk triterpenoid, dan β -sitosterol dan stigmasterol untuk fitosterol (Basyuni *et al.*, 2007). Distribusi senyawa lipid ini berbeda secara anatomis pada bagian epidermis, korteks dan stele di mana semakin ke arah luar, konsentrasi senyawa triterpenoid akan terdapat semakin banyak (S P *et al.*, 2016).

Terhadap enzim Protease, hanya isolat A12 dan A2 yang terlihat menunjukkan aktivitas Protease. Aktivitas protease dianalisis dengan melihat adanya zona bening yang terbentuk dari reaksi katalitik enzim protease yang menguraikan protein yang terkandung dalam media yang mengandung sumber susu skim (Perwendha *et al.*, 2020). Substrat yang mengandung protein yang terdapat pada Mangrove dapat berasal dari senyawa eksudat yang disekresikan oleh akarnya (Zhuang *et al.*, 2020). Kelompok Actinomycetes yang diketahui dapat mendegradasi substrat berprotein terutama berasal dari Genus *Streptomyces* (Swarna & Gnanadoss, 2020). Contoh salah satu isolat yang menunjukkan hasil yang positif ditampilkan pada Gambar 5 berikut.



Gambar 5. Hasil Positif Uji Lipase Terhadap Isolat A2.

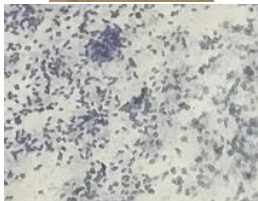
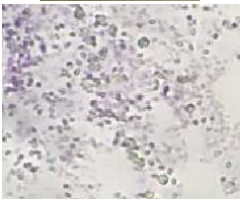
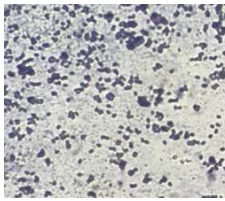
Distribusi produksi enzim hidrolitik pada ketiga isolat dapat dilihat pada tabel 1. di bawah. Dari tabel ini juga terlihat jelas bahwa isolat A2 memiliki keempat enzim hidrolitik yang diujikan. Isolat A11 hanya mampu menunjukkan aktivitas Amilase dan Lipase. Untuk isolat A12, aktivitas katalik hanya ditunjukkan terhadap enzim Amilase, Lipase dan Protease. Meskipun demikian, khusus untuk Amilase, aktivitas tertinggi tampak ditunjukkan oleh isolat A11 dan A12 berupa terbentuknya zona amilolitik (zona bening) yang lebih besar bila dibandingkan dengan isolat A2.

Tabel 1 Produksi Enzim Hidrolitik Isolat Actinomycetes Endofitik Akar Mangrove

Enzim Hidrolitik	Isolat		
	A11	A12	A2
Selulase	-	-	+
Amilase	++	++	+
Lipase	+	+	+
Protease	-	+	+

Bila dihubungkan dengan aspek pengolahan pakan ternak, analisis lanjutan terhadap efektivitas tiap enzim ini dapat dilakukan dengan menambahkan ekstrak enzim kasar pada pakan ternak (mungkin dengan kisaran konsentrasi) dan memberikannya langsung ke hewan ternak untuk mengamati parameter pertumbuhan dan perkembangannya (*in vivo*), atau dengan menganalisis aktivitas katalitik masing-masing eksoenzim ekstrak (*in vitro*) dengan mengukur jumlah atau konsentrasi monomer yang dihasilkan selama degradasi bahan baku pakan sebagai substratnya.

Tabel 2 Karakterisasi Morfologis dan Pewarnaan Gram Isolat Actinomycetes Endofitik

Karakteristik Morfologis	A11	A12	A2
Bentuk	<i>Irregular</i>	<i>Irregular</i>	<i>Irregular</i>
Elevasi	<i>Crateriform</i>	<i>Crateriform</i>	<i>Crateriform</i>
Margin	<i>Undulate</i>	<i>Undulate</i>	<i>Undulate</i>
Tekstur	Kasar	Kasar	Kasar
Transparansi	Tidak tembus cahaya (<i>Opaque</i>)	Tidak tembus cahaya (<i>Opaque</i>)	Tidak tembus cahaya (<i>Opaque</i>)
Warna dalam Media ISP2	Cokelat muda	Cokelat muda	Cokelat muda
Tampilan Koloni			
Pewarnaan Gram	 Gram +	 Gram +	 Gram +

Prosedur pewarnaan gram juga dilakukan pada koloni isolat. Karena Actinomycetes adalah Gram-positif, pewarnaan akan memberikan warna sel-sel menjadi ungu di bawah pengamatan mikroskopis. Berdasarkan prosedur, semua isolat menunjukkan warna ungu. Kelompok bakteri ini akan memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tebal. Bila diwarnai dengan Kristal violet, pewarna primer ini akan berikatan dengan dinding sel baik Gram-negatif maupun -positif. Penambahan dengan larutan Iodine pada langkah kedua akan bertindak sebagai fiksatif untuk lebih memperkuat ikatan kompleks iodium-peptidoglikan. Larutan Etanol 95% pada tahap ketiga akan berfungsi sebagai penghilang warna (*decolorizing agent*) yang melarutkan lipid. Namun, karena Gram-positif memiliki kandungan lipid yang rendah, tahap ini tidak akan memberikan dampak yang signifikan sehingga ketika ditambahkan dengan pewarna tandingan (*counter-stain*) pada tahap terakhir, yaitu Safranin. Pewarna ini kurang reaktif dengan peptidoglikan, sehingga akan memberikan tampilan dinding sel berwarna ungu dari kristal violet

yang diberikan pada tahap pertama (Bruckner, 2017). Tampilan pewarnaan gram beserta karakterisasi morfologis tiap isolat Actinomycetes Endofitik ditampilkan pada Tabel 2. di atas. Akan tetapi, untuk mendapatkan informasi akurat terkait identifikasi spesies Actinomycetes Endofitik yang didapatkan, ekstraksi materi genetik sangat penting untuk dilakukan yang kemudian dapat dilanjutkan dengan sekuensing genom.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan di atas, dapat disimpulkan beberapa hal berikut:

1. Actinomycetes Endofitik pada akar Mangrove yang mampu menghasilkan enzim hidrolitik telah berhasil diisolasi yang membuktikan bahwa habitat lokal ekosistem Nusa Tenggara Timur dapat menjadi sumber alternatif penghasil metabolit primer Actinomycetes, terutama enzim hidrolitik.
2. Enzim hidrolitik yang dihasilkan oleh isolat Actinomycetes Endofitik pada akar Mangrove memiliki prospek untuk diaplikasikan sebagai enzim aditif pakan ternak, khususnya terkait enzim Selulase, Amilase, Lipase dan Protease.
3. Ketiga isolat berpotensi dikembangkan sebagai imbuhan pakan ternak karena mengandung minimal salah 1 enzim hidrolitik yang diujikan dengan Isolat A2 memiliki keempat enzim hidrolitik yang diujikan tersebut.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan di atas, juga dapat disarankan beberapa hal berikut :

1. Analisis lebih lanjut harus dilakukan pada aktivitas katalitik dari setiap eksoenzim hidrolitik yang dihasilkan oleh masing-masing isolat untuk membandingkan efektivitasnya.
2. Eksplorasi lebih lanjut terkait Actinomycetes Endofitik ini dapat dilakukan pula terhadap enzim-enzim hidrolitik lainnya yang juga sering dimanfaatkan sebagai imbuhan pakan ternak seperti enzim Xylanase, Pektinase, Lignase dan Fitase.
3. Eksplorasi yang sama terhadap Actinomycetes Endofitik penghasil enzim hidrolitik dapat pula dilakukan pada daerah Mangrove pada lokasi habitat yang berbeda di Nusa Tenggara Timur.
4. Identifikasi secara molekuler terhadap isolat-isolat Actinomycetes Endofitik yang telah didapatkan dapat dilakukan untuk memperoleh informasi spesies yang akurat yang dapat dijadikan sebagai referensi bagi penelitian-penelitian lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., & Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, 221, 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- Aghamirian, M. R., & Ghiasian, S. A. (2009). Isolation and Characterization of Medically Important Aerobic Actinomycetes in Soil of Iran (2006—2007). *The Open Microbiology Journal*, 3, 53–57. <https://doi.org/10.2174/1874285800903010053>
- Alnahdi, H. S. (2012). Isolation and screening of extracellular proteases produced by new Isolated Bacillus sp. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*.

<https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2915>

- Ayuningrum, D., Sabdaningsih, A., & Jati, O. (2021). Screening of actinobacteria-producing amylolytic enzyme in sediment from *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) ponds in Rembang District, Central Java, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(4), Article 4. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220427>
- Basyuni, M., Oku, H., Baba, S., Takara, K., & Iwasaki, H. (2007). Isoprenoids of Okinawan mangroves as lipid input into estuarine ecosystem. *Journal of Oceanography*, 63(4), 601–608. <https://doi.org/10.1007/s10872-007-0053-2>
- Berezin, V., Abdukhakimova, D., Trenozhnikova, L., Bogoyavlenskiy, A., Turmagambetova, A., Issanov, A., & Azizan, A. (2019). Antiviral activities of extremophilic actinomycetes extracts from Kazakhstan's unique ecosystems against influenza viruses and paramyxoviruses. *Virology Journal*, 16(1), 150. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1254-1>
- Bruckner, M. Z. (2017). *Gram Staining*. Microscopy. https://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/microscopy/gramstain.html
- Dewi, T. K., Agustiani, D., & Antonius, S. (2017). Secondary Metabolites Production by Actinomycetes and their Antifungal Activity. *KnE Life Sciences*, 256–264. <https://doi.org/10.18502/cls.v3i4.713>
- Goedecke, C. (2016). Why Does Iodine Turn Starch Blue? *ChemViews*. <https://doi.org/10.1002/chemv.201600103>
- Gohel, H. R., Contractor, C. N., Ghosh, S. K., & Braganza, V. J. (2014). *A comparative study of various staining techniques for determination of extra cellular cellulase activity on Carboxy Methyl Cellulose (CMC) agar plates*. 6.
- Hastuti, U. S., Sangur, K., & Khasanah, H. N. (2015). BIODIVERSITY AND ENZYME ACTIVITY OF INDIGENOUS CELLULOLYTIC AND AMYLOLYTIC BACTERIAS IN DECAYED MANGROVE STEM WASTE PRODUCT AT WAAI SEASHORE, AMBON ISLAND. *KnE Life Sciences*, 433–438. <https://doi.org/10.18502/cls.v2i1.188>
- Hidayatullah, A. R. (2019). *ISOLASI ACTINOMYCETES DARI SEDIMEN MANGROVE UJUNG PANGKAH DI GRESIK* [Skripsi, Universitas Airlangga]. <http://lib.unair.ac.id>
- Jette, J. F., & Ziomek, E. (1994). Determination of lipase activity by a rhodamine-triglyceride-agarose assay. *Analytical Biochemistry*, 219(2), 256–260. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1265>
- Joseph, J., Abirami, B., Manigundan, K., Gopikrishnan, V., & Radhakrishnan, M. (2021). Chapter 9 - Antimicrobial peptides from Actinobacteria: Current status and future prospects. In S. Das & H. R. Dash (Eds.), *Microbial and Natural Macromolecules* (pp. 205–231). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820084-1.00009-0>
- Kishore, P. (2011). *Isolation, characterization and identification of Actinobacteria of Mangrove ecosystem, Bhitarakanika, Odisha* [MSc]. <http://ethesis.nitrkl.ac.in/2337/>
- Luang-In, V., Yotchaisarn, M., Saengha, W., Udomwong, P., Deeseenthum, S., & Maneewan, K. (2019). Isolation and Identification of Amylase-producing Bacteria from Soil in Nasinuan Community Forest, Maha Sarakham, Thailand. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(3), 1061–1068.

- Madhu, S., Evans, H. A., Doan-Nguyen, V. V. T., Labram, J. G., Wu, G., Chabiny, M. L., Seshadri, R., & Wudl, F. (2016). Infinite Polyiodide Chains in the Pyrroloperylene–Iodine Complex: Insights into the Starch–Iodine and Perylene–Iodine Complexes. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(28), 8032–8035. <https://doi.org/10.1002/anie.201601585>
- Matsumoto, A., & Takahashi, Y. (2017). Endophytic actinomycetes: Promising source of novel bioactive compounds. *The Journal of Antibiotics*, 70(5), 514–519. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.20>
- Mochon, A. B., Sussland, D., & Saubolle, M. A. (2016). Aerobic Actinomycetes of Clinical Significance. *Microbiology Spectrum*, 4(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.DMIH2-0021-2015>
- Mukhtar, S., Zaheer, A., Aiysha, D., Abdulla Malik, K., & Mehnaz, S. (2017). Actinomycetes: A Source of Industrially Important Enzymes. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 10(12). <https://doi.org/10.4172/jpb.1000456>
- Ortenberg, E., & Telsch, B. (2003). 42—Taste and odour problems in potable water. In D. Mara & N. Horan (Eds.), *Handbook of Water and Wastewater Microbiology* (pp. 777–793). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012470100-7/50043-1>
- Perwendha, R., Oetari, A., & Sjamsuridzal, W. (2020). *Skimmed milk-degrading ability of Rhizopus azygosporus UICC 539 at various temperatures*. 050006. <https://doi.org/10.1063/5.0007872>
- Pramiadi, D., & Yulianti, E. (2014). *Isolasi dan uji aktivitas enzim lipase termostabil dari bakteri termofilik pasca erupsi Merapi*. 11.
- Putri, A. L., & Setiawan, R. (2019). Isolation and screening of actinomycetes producing cellulase and xylanase from Mamasa soil, West Sulawesi. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 308(1), 012035. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/308/1/012035>
- Ravikumar, S., Inbaneson, S., Uthiraselvam, M., Priya, S., Ramu, A., & Banerjee, M. (2011). Diversity of endophytic actinomycetes from Karangkadu mangrove ecosystem and its antibacterial potential against bacterial pathogens. *Journal of Pharmacy Research*, 4, 294–296.
- S P, M., Sreeshan, A., & Augustine, A. (2016). Comparative Lipid Isolation Protocols from *Rhizophora mucronata* L. of Dharmadam Estuary and Lipid Profiling in the Context of a Non Mangrove *Mangifera indica*. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 5. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000286>
- Saenger, W. (1984). The structure of the blue starch-iodine complex | SpringerLink. *Naturwissenschaften*, 71, 31–36.
- Sauer, D. B., & Burroughs, R. (1986). Dinfection of Seed Surface with Sodium Hypochlorite. *PHYTOPATHOLOGY*, 76(7).
- Song, L., Jiang, N., Wei, S., Lan, Z., & Pan, L. (2020). Isolation, Screening, and Identification of Actinomycetes with Antifungal and Enzyme Activity Assays against *Colletotrichum dematium* of *Sarcandra glabra*. *MICROBIOLOGY*, 48(1), 37–43.
- Swarna, D., & Gnanadoss, J. J. (2020). Screening and Molecular Characterization of Actinomycetes from Mangrove Soil Producing Industrially Important Enzymes. *Journal of Scientific Research*, 64(02), 87–95. <https://doi.org/10.37398/JSR.2020.640211>

- Tankeshwar, A. (2021). *Colony Morphology of Bacteria • Microbe Online*. Microbe Online.
<https://microbeonline.com/colony-morphology-bacteria-describe-bacterial-colonies/>
- Tille, P. M. (2017). *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. Elsevier.
<https://fk.uir.ac.id/mikrobiologi/materi/sterilisasi/>
- Tripathi, N., & Sapra, A. (2021). Gram Staining. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>
- Yakupova, E. I., Bobyleva, L. G., Vikhlyantsev, I. M., & Bobylev, A. G. (2019). Congo Red and amyloids: History and relationship. *Bioscience Reports*, 39(1), BSR20181415.
<https://doi.org/10.1042/BSR20181415>
- Zhuang, W., Yu, X., Hu, R., Luo, Z., Liu, X., Zheng, X., Xiao, F., Peng, Y., He, Q., Tian, Y., Yang, T., Wang, S., Shu, L., Yan, Q., Wang, C., & He, Z. (2020). Diversity, function and assembly of mangrove root-associated microbial communities at a continuous fine-scale. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00164-6>

