



ISOLASI DAN PENENTUAN INDEKS AMILOLITIK BAKTERI DARI SEDIMENT MANGROVE DI WONOREJO, SURABAYA

Isolation and Determination Index Amylolytic of Bacteria from Sediment Mangrove in Wonorejo, Surabaya

Aliyah Siti Sundari*, Ni Nyoman Purwani, Anita Kurniati

Departemen Kesehatan, Fakultas Vokasi, Universitas Airlangga,
Jl. Srikana 65, Surabaya 60286, Jawa Timur, Indonesia

*email: aliyah.sundari@vokasi.unair.ac.id

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menentukan bakteri amilolitik potensial dari sedimen mangrove di Wonorejo, Surabaya. Bakteri tanah diisolasi di media *Starch Agar* 2% dan diuji dengan pereaksi Lugol's Iodine untuk diukur indeks amilolitiknya. Karakteristik isolat yang diamati meliputi morfologi koloni, pewarnaan Gram, dan motilitas. Dari 27 isolat yang ditemukan, terdapat 3 isolat dengan nilai indeks tertinggi dalam aktivitas amilasanya, yaitu isolat A.7, A.27 dan A.64. Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa isolat A.7 dan A.64 adalah kelompok bakteri Gram negatif, dan isolat A.27 kelompok bakteri Gram positif. Hasil motilitas untuk ketiga isolat tersebut negatif, dengan hasil uji katalase positif.

Kata kunci: amilase, bakteri, mangrove, tanah

Abstract. *This study aims to obtain potential amylolytic bacteria from mangrove sediment in Surabaya. Soil bacteria were isolated in starch media agar 2% and tested with Lugol's Iodine reagents to measure their amylolytic index. Character isolates observed included colony morphology, Gram staining, and motility. From 27 isolates found, there were 3 isolates with the highest index values in their activity, namely A.7, A.27 and A.64 isolates. Characterization results showed that isolates A.7 and A.64 were Gram negative bacteria, and isolates A.27 were Gram positive bacteria. The motility results for the three isolates were negative, with the results of a positive catalase test.*

Keywords: *amylase, bacteria, mangrove, soil*

PENDAHULUAN

Enzim amilase termasuk kelompok enzim yang mempunyai aplikasi luas dan penggunaannya menempati 30% dari total produksi enzim yang lainnya (Devi *et al.*, 2010). Aplikasi enzim amilase meluas ke bidang medis, farmasi dan analitik sejak diproduksi enzim amilase yang diisolasi dari fungal dan digunakan sebagai alternatif untuk mengatasi masalah pencernaan (Steinberg *et al.*, 2012; Seetharaman & Betroft, 2012). Selama 190 tahun terakhir, penggunaan enzim amilase dalam diagnosis penyakit terus berkembang, antara lain terapi enzim amilase merupakan metode yang disarankan untuk mengatasi defisiensi enzim untuk mencegah terjadinya malnutrisi (Somaraju & Moya, 2014).

Enzim yang bersumber dari mikroorganisme banyak diminati oleh industri sebab memiliki beberapa keuntungan dibandingkan dari sumber lain seperti hewan dan tumbuhan. Enzim amilase yang diproduksi oleh mikroorganisme memiliki efisien kerja yang tinggi, dapat dihasilkan dari berbagai sumber, kondisi produksi yang tidak terikat dengan musim dan dengan biaya yang lebih rendah (Poernomo & Joko, 2003; Yuliar, 2008). Sedikitnya 50% dari produksi amilase saat ini,

Diterbitkan oleh Program Studi Pendidikan Kimia FKIP Universitas Lambung Mangkurat
pISSN: 2086-7328, eISSN: 2550-0716. Terindeks di SINTA (Peringkat 4), IPI, IOS, Google Scholar, MORAREF, BASE, Research Bib, SIS, TEI, ROAD dan Garuda.

Received : 18-01-2019, Accepted : 06-03-2019, Published : 14-05-2019

diperoleh dari organisme yang dimodifikasi secara genetik. Kemajuan teknologi terutama di bidang rekayasa genetika memungkinkan proses produksi enzim dalam skala komersial dapat dilakukan lebih efisien. Adanya modifikasi dari sifat asli enzim yang dapat bertahan di lingkungan ekstrim dengan aktivitas tinggi.

Indonesia memiliki vegetasi mangrove 23% dari total mangrove di dunia. Vegetasi mangrove mendukung keanekaragaman jenis bakteri yang berasal dari sedimen tanah, air dan hasil dekomposisi bahan organik. Mikroorganisme mampu menjadi alternatif penghasil enzim amilase, selain tanaman. Salah satu ekosistem mangrove di Surabaya yaitu Ekowisata Mangrove Wonorejo, memiliki Luas total Hutan sekitar 700 hektar (648.453 ha) (Khiftiyah *et al.*, 2016). Tanah bakau umumnya kaya akan bahan organik dan memiliki nilai nitrogen tinggi, kondisi ini dapat menunjang potensi yang tinggi terhadap pertumbuhan keanekaragaman bakteri. Ekosistem bakau mengandung komunitas mikroba yang beragam yang dapat memanfaatkan nutrisi dari sisa vegetasi yang menghasilkan bahan organik (Das *et al.*, 2013).

Berdasarkan berbagai publikasi mengenai potensi bakteri sebagai penghasil enzim hidrolitik. Al Asna *et al.*, (2017) melaporkan empat strain bakteri penghasil amilase, seperti *Vibrio parahaemolyticus*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Listeria monocytogenes*, dan *Bacillus cereus*, diisolasi dari bakau Kalimantan. Penelitian lain yang dilakukan oleh Kurniawan *et al.*, (2018) menemukan lima strain bakteri penghasil enzim selulase yang di isolasi dari sediment mangrove di Bangka, yaitu *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus amyloliquefacient*, *Bacillus alvei*, *Bacillus coagulans*. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ada potensi yang tinggi terhadap mikroba di sediment bakau. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan bakteri amilolitik potensial dari sediment mangrove di Wonorejo, Surabaya.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *soil sampler*, plastik sampel, *cool box*, vortex, inkubator, *incubator shaker*, kompor listrik, cawan petri, erlenmeyer, tabung reaksi, mikropipet, jarum ose, gelas ukur, neraca analitik. Bahan yang digunakan yaitu tanah sampel, akuades steril, yeast extract (Merck), Trypton (Merck), MgSO₄ (Merck), NaHPO₄ (Merck), NaCl (Merck), Bacto agar (Merck), starch (pati), kristal Lugol's Iodine, larutan kristal violet, larutan safranin, larutan iodine, alkohol, aseton, spiritus, media motilitas, tisu, aluminium foil, dan kapas.

Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel sedimen dilakukan di ekosistem mangrove Wonorejo, Surabaya, Jawa Timur. Sampel sedimen diambil dari 3 lokasi yang berbeda. Sampel diambil menggunakan *soil sampler* pada kedalaman ± 10 cm kemudian dimasukkan ke dalam plastik sampel. Selanjutnya sampel dimasukkan ke dalam *cool box* dan dibawa ke laboratorium.

Penanaman Bakteri

Metode yang digunakan dalam penanaman bakteri adalah metode Agar tuang (*Pour Plate*). Diambil 10 g dari sampel, kemudian dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 90 mL akuades steril, dihomogenkan menggunakan vortex sehingga diperoleh pengenceran 10 kali. Selanjutnya dilakukan pengenceran sampai 10⁶. Pada masing-masing pengenceran diambil 1 mL suspensi bakteri dan dimasukkan ke dalam masing-masing cawan petri steril. Selanjutnya ditambahkan

ke dalamnya 20 mL minimal media agar steril (*yeast extract* 220 mg, MgSO_4 25 mg, NaHPO_4 500 mg, NaCl 230 mg, Bacto agar 2500 mg, akuades 100 mL) dan di homogenkan. Selanjutnya cawan petri diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C.

Seleksi Bakteri Penghasil Enzim Amilase

Skrining dilakukan berdasarkan kemampuan memproduksi enzim amilase. Isolasi mikroba penghasil enzim amilase dilakukan dengan mengambil acak 100 koloni yang tumbuh dari media isolasi. Selanjutnya menumbuhkan isolat pada media LB agar steril (Bacto agar 1000 mg, Trypton 500 mg, NaCl 500 mg, *yeast extract* 250 mg, akuades 100 ml) yang diperkaya *starch* (pati) 2%. Inkubasi dilakukan pada suhu 35°C selama 2 hari. Selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan *Lugol's Iodine*, didiamkan selama 15 menit dan koloni yang bersifat positif dapat diketahui dengan melihat zona bening disekitar koloni.

Penghitungan Indeks Amilolitik

Indeks amilolitik (IA) dapat diukur dengan membandingkan diameter zona bening dengan diameter koloni yang telah diinkubasikan pada suhu 35°C selama 2 x 24 jam.

$$IA = \frac{\text{Diameter zona bening} - \text{Diameter koloni}}{\text{Diameter koloni}}$$

Pemisahan dan Pemurnian Isolat Bakteri

Pemisahan dan pemurnian isolat bakteri dilakukan dengan metoda goresan (*streak method*) pada isolat dengan positif amilase. Diambil koloni-koloni bakteri yang menampakkan morfologi dan warna yang berbeda. Selanjutnya masing-masing koloni bakteri tersebut digoreskan pada permukaan media LB agar dengan pati 2%. Selanjutnya cawan petri diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 24 jam dan diamati pertumbuhannya, untuk menjadi kultur murni.

Karakterisasi Koloni Bakteri

Isolat bakteri amilolitik kemudian dikarakterisasi secara morfologi dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis dapat dilakukan dengan melihat bentuk koloni, elevasi koloni, tepian koloni, dan warna koloni. Pengamatan mikroskopis dilakukan pewarnaan gram, pewarnaan spora, dan uji motilitas

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri dari sediment mangrove bertujuan untuk mencari potensi bakteri penghasil enzim amilase. Hasil isolasi ditemukan 100 isolat dan 27 isolat positif menghasilkan enzim amilase. Isolat bakteri tersebut diuji kemampuannya menggunakan media selektif yang diperkaya pati 2%. Penentuan hasil ditentukan berdasarkan pengamatan zona bening yang ada di sekitar koloni bakteri. Hasil kultur murni dari setiap bakteri digunakan sebagai penentu nilai Indeks Amilolitik (IA). Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni dapat dijadikan penentuan nilai IA. Dasar penentuan nilai IA yaitu besarnya zona bening yang terbentuk setelah media uji ditambahkan dengan reagen iodin (Winarno, 2002). Data perolehan indeks amilolitik pada 27 isolat bakteri potensial amilolitik dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Penghitungan Indeks Amilolitik terhadap Isolat Bakteri

No	Kode Isolat	Ø Koloni bakteri (mm)	Ø Zona bening (mm)	Indeks Amilolitik (IA)
1	A.1	7	9	0.29
2	A.4	5	6	0.20
3	A.6	9	13	0.44
4	A.7	5	8	0.60
5	A.9	9	11	0.22
6	A.10	9	11	0.22
7	A.19	5	6	0.20
8	A.25	5	7	0.40
9	A.27	4	8	1.00
10	A.32	12	13	0.08
11	A.35	9	11	0.22
12	A.37	7	10	0.43
13	A.38	5	6	0.20
14	A.41	7	10	0.43
15	A.43	14	16	0.14
16	A.46	6	8	0.33
17	A.48	15	17	0.13
18	A.50	15	19	0.27
19	A.53	12	14	0.17
20	A.57	8	9	0.13
21	A.58	10	11	0.10
22	A.59	7	10	0.43
23	A.60	10	13	0.30
24	A.61	7	9	0.29
25	A.63	8	9	0.13
26	A.64	4	7	0.75
27	A.65	7	10	0.43

Keterangan: Ø = diameter (satuan mm)

Indeks amilolitik diukur dengan cara menumbuhkan isolat murni pada media agar dengan substrat pati 2%. Isolat bakteri yang menghasilkan amilase ekstraseluler terlihat dari pembentukan zona bening di sekitar koloni bakteri dengan pewarnaan Lugol's Iodine. Pembentukan zona bening pada isolat potensial amilolitik menunjukkan bahwa pati yang terdapat di dalam media dihidrolisis oleh amilase menjadi senyawa yang sederhana seperti maltosa, dekstrin, dan glukosa (Kaneko *et al*, 2004; Mohsen & Fahime, 2012). Berdasarkan hasil isolasi, tiga isolat bakteri dipilih menurut nilai indeks amilolitik tertinggi yaitu isolat A.7, A.27, dan A.64. Isolat yang diperoleh dari isolasi sekunder selanjutnya dikarakterisasi secara mikroskopis dan makroskopis.

Karakteristik morfologi dan mikroskopik dilakukan pada 3 isolat dengan nilai Indeks tertinggi. Tabel 2 merupakan karakter morfologi sel dan mikroskopis dari ketiga isolat. Perbedaan karakteristik disebabkan oleh pigmen intraseluler yang dihasilkan oleh bakteri. Hasil uji pewarnaan Gram menunjukkan Gram positif yang berbentuk basil. Sebagian besar bakteri penghasil amilase adalah Genus *Bacillus* yang berbentuk basil dan Gram positif, karena bakteri ini mampu bertahan hidup dalam bentuk sel vegetatif sebagai pertahanan hidup pada kondisi ekstrim (Kaur *et al*, 2012).

Tabel 2. Karakteristik Morfologi dan Mikroskopis Koloni Bakteri

Isolat	Morfologi Koloni					Mikroskopis		
	Pigmen	Bentuk	Elevasi	Permukaan	Tepi	Warna	Bentuk	Motilitas
A.7	Putih	Circular	Flat	Halus	Entire	Merah	Coccus	Negatif
A.27	Putih	Irregular	Raised	Kasar	Undulate	Ungu	Basil	Negatif
A.64	Kuning	Circular	Raised	Halus	Entire	Merah	Basil	Negatif

Selain perbedaan habitat yang dijadikan sebagai substrat pertumbuhan alamnya, beberapa faktor lingkungan juga mempengaruhi produksi amilase. Faktor-faktor tersebut meliputi kandungan nutrisi, derajat keasaman media, tekanan osmotik, tingkat aerasi, suhu, dan kontrol terhadap kontaminasi selama fermentasi (Miguel *et al.*, 2013). Vegetasi mangrove merupakan ekosistem yang kaya akan nutrisi karena dipengaruhi oleh pasang surut air laut, asupan air tawar dari daratan, akumulasi mineral, dan aktivitas mikroorganisme. Kondisi tersebut menghasilkan ekosistem yang unik dan memiliki keanekaragaman mikroorganisme yang dapat beradaptasi dengan kondisi ekstrim (Bhat & Shewade, 2013).

Beberapa spesies mikroorganisme indigen termasuk bakteri indigen hidup dalam tanah yang tercampur daun, akar dan batang lapuk mangrove. Tanaman mangrove mengandung senyawa kompleks, antara lain: amilum, protease dan selulose (Thatoi *et al.*, 2012; Leena, 2013; Elias *et al.*, 2014). Beberapa penelitian sebelumnya tentang isolasi bakteri dari tanah mangrove menunjukkan bahwa isolat mikroba memiliki potensi yang bervariasi. Beberapa bakteri berhasil diisolasi dari tanah mangrove daerah Thuwal, Jeddah, Arab Saudi memiliki kemampuan untuk itu menghasilkan selulase, protease, lipase, dan amilase (Bibi *et al.*, 2017). Penelitian lain yang dilakukan oleh Kandasamy & Selvam (2006) menunjukkan bakteri diisolasi dari rhizospheres muara Pellar di Parangipettai, India aktivitas amilolitik dan proteolitik.

Dari hasil penelitian ini dapat memberikan informasi awal tentang bakteri penghasil enzim amilase yang di isolasi dari Mangrove di Surabaya. Oleh karena itu diperlukan penentuan karakteristik dari bakteri tersebut. Karakteristik dan uji aktivitas tidak dilakukan dalam penelitian ini, sehingga diperlukan untuk uji lanjut tentang potensi bakteri tersebut.

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian ditemukan 3 isolat dengan nilai Indeks Amilolitik tertinggi yaitu A.7, A.27, dan A.64. Hasil dari penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar penelitian lanjut dengan identifikasi secara molekuler dan uji aktivitas terhadap enzim amilase.

DAFTAR RUJUKAN

- Al Asna, P. M., Nugraheni, F. S. A., Hastuti, U. S. (2017). Isolasi dan identifikasi bakteri pektinolitik dari tanah mangrove di Margomulyo Balikpapan, Kalimantan Timur. *Prosiding Seminar Nasional III Tahun 2017 "Biologi, Pembelajaran, dan Lingkungan Hidup Perspektif Interdisipliner*. Malang: Universitas Muhammadiyah Malang.
- Bhat, M. R., Leena, S. (2013) Isolation and characterization of microorganisms from mangrove soil of CBD Belapur creek, Navi Mumbai, MS India. *International Journal of Environmental Sciences*, 3(6), 2304-2312.
- Bibi, F., Ullah, I., Alvi, S. A., Bakhsh, S. A., Yasir, M., Al-Ghamdi, A. A. K., Azhar, E. I. (2017). Isolation, diversity, and biotechnological potential of

- rhizo- and endophytic bacteria associated with mangrove plants from Saudi Arabia. *Genetics and Molecular Research*, 16(2), 1-12.
- Khiftiyah, A. M., Hanifah, N. N., Bachruddin, M., Sholichah, M., Istiqomah, S., Dewi, S. R., Rahayu, T., Prasetya, I. A. W., Marjayandari, L., 'Aini, N., Tsana, I., Triwahyuni, D., Fatimah, Ni'matuzahroh. (2018). Isolation and screening of potential proteolytic microbes from Wonorejo Mangrove forest soil, Surabaya, Indonesia. *AIP Conference Proceedings*, 040014, 1-5.
- Kandasamy, K., & Selvam, M. (2006). Evaluation of beneficial bacteria from mangrove soil. *Botanica Marina* 49(1), 86-89.
- Kaneko, T., Ohno, T., Ohisa, N. (2005) Purification and characterization of a thermostable raw starch digesting amilase from a *Streptomyces* sp. isolated in a milling factory. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 69(6), 1073-1081.
- Kaur, A., Kaur, M., Samyal, M. L., Ahmeed, Z. (2012). Isolation, characterization and identification of bacterial strain producing amilase. *Journal Microbiology Technology Research*, 2(4), 573-579.
- Devi, L. S., Khaund, P., Joshi, S. R. (2010). Thermostable α -amilase from natural variants of *Bacillus* spp. prevalent in eastern Himalyan range. *African Journal of Microbiology Research*, 4(23), 2534-2542.
- Shewade, L. (2013). Isolation and characterization of microorganisms from mangrove soil of CBD Belapur creek, Navi Mumbai, MS India. *International Journal of Environmental Sciences*, 3(6), 2304-2312.
- Miguel, A. S. M., Martins-Meyer, T. S., Figueiredo, E. V. C., Lobo, B. W. P., Dellamora-Ortiz, G. M. (2013). Enzymes in bakery: current and future trends. *Licensee In Tech*. Rio de Janeiro, Brazil: Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio de Janeiro.
- Mobini-Dehkordi, M., Javan, F. A. (2012). Application of alpha-amilase in biotechnology. *Journal of Biology and Today's World*, 1(1), 39-50.
- Poernomo, A. T., Purwanto, D. A. (2003). Uji aktivitas "crude" enzim proteolitik *Bacillus subtilis* FNCC 0059 hasil fermentasi curah. *Majalah Farmasi Airlangga (Airlangga Journal of Pharmacy)*, 3(3), 103-107.
- Das, S., Ganguly, D., Maiti, T. K., Mukherjee, A., Jana, T. K., De, T. K. (2013). A depth wise diversity of free living N_2 fixing and nitrifying bacteria and its seasonal variation with nitrogen containing nutrients in the mangrove sediments of Sundarban, WB, India. *Open Journal of Marine Science*, 3, 112-119.
- Seetharaman, K., Bertoft, E. (2012). Perspectives on the history of research on starch, Part II: on the discovery of the constitution of diastase. *Starch/Stärke*, 00, 1-5.
- Somaraju, U. R., Solis-Moya, A. (2014). Pancreatic enzyme replacement therapy for people with cystic fibrosis, *Cochrane Database Systematic Reviews*, 10, CD008227.
- Steinberg, W., DeVries, J. H., Wadden, T. A., Jensen, C.B., Svendsen, C. B., Rosenstock, J. (2012). Longitudinal monitoring of lipase and amilase in adults with type 2 diabetes and obesity: evidence from two phase 3 randomized clinical trials with the once-daily GLP-1 analog Liraglutide. *Gastroenterology*, 142(5), S850-S851.
- Thatoi, H., Behera, B. C., Dangar, T. K., Mishra, R. R. (2012). Microbial biodiversity in mangrove soils of Bhitarkanika, Odisha, India. *International Journal of Environmental Biology*, 2(2), 50-58.
- Winarno, F. G. (2002). *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.

- Yuliar. (2008). Skrining bioantagonistik bakteri untuk agen biokontrol rhizoctonia dan kemampuannya dalam menghasilkan surfaktin. *Biodiversitas*, 9(2), 83-86.