



JIPK

JURNAL ILMIAH PERIKANAN DAN KELAUTAN

Research Article

Identifikasi Bakteri Endofit Mangrove Api-Api Putih (*Avicennia marina*) Penghasil Enzim L-asparaginase

Identification of Mangrove Endophyte Bacteria of Api-Api Putih (*Avicennia marina*) as Producing L-asparaginase Enzyme

Asep Awaludin Prihanto^{1,2,3*}, Alifatul Fatchiyah¹, Hartati Kartikaningsih^{1,2}, dan Ken Audia Pradarameswari¹

¹Department of Fishery Product Technology, Faculty of Fisheries and Marine Science, Brawijaya University, Jl. Veteran Malang 65145, East Java, Indonesia.

²Bio-Seafood Research Unit, Faculty of Fisheries and Marine Science, Brawijaya University, Jl. Veteran Malang 65145, East Java, Indonesia.

³Halal Thoyib Research center, Ged. Layanan bersama, Brawijaya University, Jl. Veteran Malang 65145, East Java, Indonesia.

ARTICLE INFO

Received: September 10, 2018

Accepted: November 16, 2018

*) Corresponding author:

E-mail: asep_awa@ub.ac.id

Kata Kunci:

Endofit mangrove, *Pseudomonas aeruginosa*, L-asparaginase, Mikroorganisme

Keywords:

Endophytes mangrove, *Pseudomonas aeruginosa*, L-asparaginase, Microorganism

Abstrak

Enzim L-asparaginase (E.C 3.5.1.1) adalah protein tetramer yang termasuk dalam kelompok keluarga amidohidrolases homolog. L-asparaginase secara selektif menghidrolisis L-asparagin (L-Asn) menjadi amonia (NH₃) dan asam aspartat. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan spesies bakteri penghasil enzim L-asparaginase yang diisolasi dari mangrove *Avicennia marina* yang berasal dari Pantai Bajul Mati, Malang, Jawa Timur, Indonesia. Penelitian ini dilakukan beberapa tahapan yaitu pengambilan dan preparasi sampel, skrining L-asparaginase, dan identifikasi menggunakan uji *mycobact system*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat dengan aktivitas enzim L-asparaginase terbesar adalah isolat DAM6 yang berasal dari daun *Avicennia marina*. Isolat DAM6 adalah bakteri merupakan bakteri gram negatif, berbentuk basil, bentuk koloni oval, tepi koloni tidak rata dan elevansi cembung. Berdasarkan analisis *mycobact*, isolat DAM6 adalah bakteri spesies *Pseudomonas aeruginosa*.

Abstract

The L-asparaginase enzyme (E.C 3.5.1.1) is a tetramer protein belonging to the family group of amidohydrolyses. L-asparaginase selectively hydrolyzes L-asparagin (L-Asn) to ammonia (NH₃) and aspartic acid. This study aims to obtain species of L-asparaginase enzyme producing bacteria isolated from *Avicennia marina* mangroves from Bajul Mati Beach, Malang, East Java, Indonesia. This research carried out several stages such as took and prepared samples, screened L-asparaginase, and identified using the *mycobact system* test. The results showed that the isolates with the largest L-asparaginase enzyme activity were DAM6 and it was originated from the leaves of *Avicennia marina*. DAM6 isolate is a gram negative with oval shape, uneven edges and convex elevation. Based on *mycobact* analysis, DAM6 isolates are *Pseudomonas aeruginosa*.

Cite this as: Asep, A. P., Alifatul, F., Hartati, K., & Ken, A. P. (2018). Identifikasi Bakteri Endofit Mangrove Api-Api Putih (*Avicennia marina*) Penghasil Enzim L-asparaginase. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 10(2):84-90. <http://doi.org/10.20473/jipk.v10i2.10467>

1. Pendahuluan

L-asparaginase (E.C 3.5.1.1) adalah protein tetramer yang termasuk dalam kelompok keluarga amidohidrolases homolog (Abdel *et al.*, 2002). L-asparaginase secara selektif menghidrolisis L-asparagin (L-Asn) menjadi amonia (NH₃) dan asam aspartat (Hendriksen *et al.*, 2009). Enzim L-asparaginase memiliki banyak manfaat baik di dunia medis maupun industri pangan. Pada dunia medis L-asparaginase digunakan sebagai agen antikanker, penghambat pertumbuhan tumor, dan untuk pengobatan leukemia limfositik akut. Sedangkan pada industri pengolahan pangan enzim ini digunakan untuk mengurangi senyawa akrilamid (Trilockchandra *et al.*, 2016). Prihanto dan Wakayama (2014) menemukan B-ASNase sebagai enzim dari *B. Subtilis* (mikroorganisme food grade seperti *A. oryzae* dan *Arthrospira platensis*) yang mampu menekan pembentukan akrilamid.

L-asparaginase di alam banyak ditemukan pada *fungi*, *algae*, tanaman dan mikroba. Mikroorganisme sebagai sumber L-asparaginase saat ini banyak diaplikasikan untuk medis dan industri pengolahan makanan karena mudah dikultur. Salah satu yang berhasil dan sudah dikomersilkan adalah dari bakteri *Escherichia coli* dengan nama dagang *Elspar*, dari *Erwinia chrysanthemi* dengan nama dagang *Erwina*, selain itu dapat juga berasal dari *Enterobacter aerogene*, *Corynebacterium glutamicum*, *Candida utilis*, *Staphylococcus aureus*, *Thermus thermophiles*, dan *Pisum sativum* (El-Bessoumy *et al.*, 2004).

Salah satu tanaman yang memiliki potensi sebagai sumber mikroorganisme yang adalah mangrove. Endofit mangrove mengandung koloni yang diduga dapat menghasilkan enzim L-asparaginase. Batang tanaman mangrove *Rhizopora mucronata*, daun *Sonneratia caseolaris* dan batang *Excoecaria agalloca* yang berasal dari hutan mangrove di pesisir selatan Kerala diketemukan bakteri endofit yang positif menghasilkan enzim L-asparaginase. Akar mangrove *Avicennia marina* mengandung senyawa Asparagin. Asparagin adalah asam amino yang berfungsi sebagai substrat untuk tumbuh bakteri yang menghasilkan enzim L-asparaginase (Medrofa *et al.*, 2015). Menurut Nur *et al.*, (2013), tanaman mangrove

Rhizopora apiculata juga mengandung senyawa asparagin. Hal ini juga didukung oleh Pate (1980), bahwa asparagin adalah asam amino utama dengan prosentase 60-80% dari total asam amino pada akar, daun dan buah.

Pantai Bajul Mati berada di Desa Gajahrejo, Kecamatan Gedangan, Kabupaten Malang. Jaraknya sekitar 58 Km dari Kota Malang. Pantai Bajul Mati ditumbuhi beraneka macam jenis mangrove seperti *Sonneratia alba*, *Avicennia marina*, *Ceriops tagal*, *Excoecaria agallocha*, dan *Rhizopora mucronata*. Penelitian yang dilakukan oleh Prihanto dan Wakayama (2016) menyarankan bahwa wilayah laut dan pesisir adalah sumber utama enzim yang belum dieksplorasi. Oleh karena itu dengan mengeksplorasi daerah ini, enzim baru dapat ditemukan. Kurniawan *et al.*, (2018) menemukan bakteri yang diisolasi dari sedimen mangrove di Pulau Bangka yaitu *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus amyloliquefacien*, *Bacillus alvei*, *Bacillus coagulant*.

Saat ini, penelitian tentang enzim L-asparaginase masih belum berjalan maksimal, akan tetapi permintaan akan sumber baru semakin meningkat. Oleh karena itu melihat pentingnya peranan enzim L-asparaginase dalam bidang industri pangan maupun nonpangan maka perlu dilakukan penelitian sebagai terobosan sumber baru penghasil enzim L-asparaginase yang dihasilkan dari bakteri yang berasal dari mangrove sebagai langkah awal untuk dilakukannya pengkayaan sumber L-asparaginase.

2. Bahan dan Metode

2.1 Alat dan Bahan

Bahan-bahan yang di gunakan dalam penelitian ini meliputi yaitu bahan utama berupa sampel (batang, akar, daun) mangrove Api-Api Putih *Avicennia marina* yang diambil dari kawasan Pantai Bajul Mati Malang Jawa Timur, bahan media isolasi bakteri yaitu *Luria Bertani Agar* (LBA). Bahan media skrining L-asparaginase yaitu media M9 Modifikasi dan *Bromthymol Blue* (BTB), dan bahan lainnya seperti NaFis steril 0,9%, aquadest, alkohol 70%. Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, refrigirator, inkubator, *laminar air flow*, timbangan digital, mikropipet, pipet serologis, bola hisap, mortal, alu, cawan petri, tabung reaksi, dan pH meter.

2.2 Preparasi Sampel

Pengambilan sampel dilakukan mengikuti Prihanto *et al.*, (2011) di daerah Pantai Bajul Mati, Malang, Jawa Timur, Indonesia. Mangrove yang digunakan untuk penelitian ini adalah *Avicennia marina*. Tiga bagian tanaman (daun, batang, dan akar) dipotong dengan pemotong etanol-didesinfeksi. Setiap bagian ditempatkan secara terpisah dalam kantong plastik steril untuk menghindari hilangnya kelembaban. Bahan-bahan itu diangkut ke laboratorium dalam waktu 12 jam dan disimpan pada 4°C sampai prosedur isolasi dilakukan.

2.3 Isolasi bakteri

Isolasi bakteri mengikuti metode Prihanto (2018). Koloni bakteri yang tumbuh dimurnikan dengan metode strik plate pada media LBA untuk didapatkan biakan murni atau isolat tunggal. Kemudian seal cawan petri dengan wrap dan lakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. LBA mengandung komposisi pepton, NaCl, *yeast extract*, bakterial. Setelah didapatkan biakan murni, koloni tunggal tersebut kemudian di pindahkan kedalam media agar miring dengan cara mengambil isolat tunggal yang terbentuk pada cawan pemurnian dengan menggunakan ose lalu dipindahkan kedalam tabung reaksi yang berisi media LBA yang sudah di miringkan

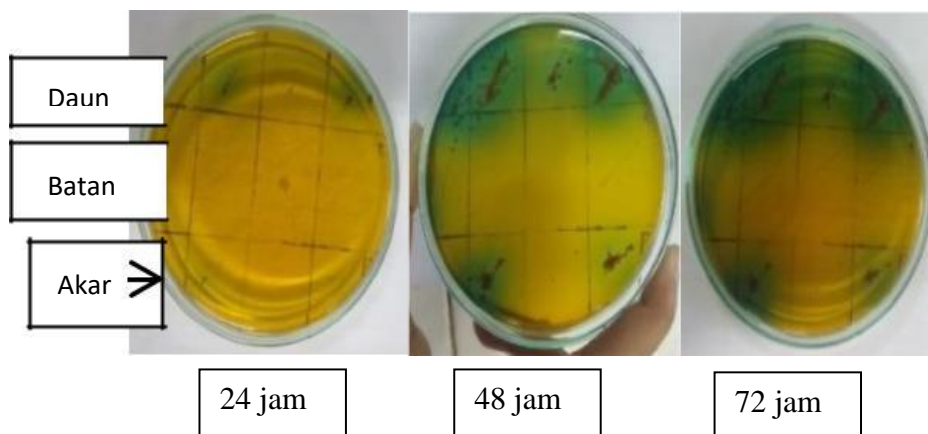
2.4 Skrining Enzim L-Asparaginase

Skrining bakteri mengikuti metode Gulati *et al.*, (1997). Isolat murni diambil dari stok isolat menggunakan tusuk gigi steril lalu digoreskan pada cawan petri berisi media modifikasi M9 dengan komposisi D-glucose 2

g/l, L-asparagin 5 g/l, Na₂HPO₄ 6 g/l, KH₂PO₄ 3 g/l, MgSO₄ 7H₂O 0,02 g/l, NaCl 0,5 g/l, CaCl₂ 0,02 g/l, Agar 15 g/l untuk selanjutnya dilarutkan dengan aquades. Kemudian tambahkan *Bromothymol blue* 0,007 g/l, sebagai indikator warna. pH diatur dengan kisaran antara 5.5 hingga 6.5. Kemudian inkubasi selama 72 jam pada suhu 37 °C.

2.5 Uji Morfologi

Uji morfologi sel bakteri meliputi dua tahap yaitu uji pewarnaan gram dan bentuk sel bakteri. Pewarnaan gram dilakukan mengikuti metode Hadioetomo (1993). Pengujian ini bertujuan sama dengan uji gram yaitu untuk membedakan bakteri apakah gram positif atau gram negatif, bakteri dicampur dengan tetesan air steril pada gelas objek, kemudian disebarkan ditengah gelas objek sehingga membentuk lapisan tipis dan difiksasi. Dengan kristal violet olesan bakteri digenangi selama dua menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Diberikan yodium selama dua menit, dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Selanjutnya diberi larutan pemucat yaitu alkohol 95%, tetes demi tetes sampai zat warna ungu tidak terlihat lagi, lalu dicuci pada air mengalir dan dikering anginkan. Kemudian digenangi lagi dengan safranin selama 30 detik, lalu dicuci dan dibiarkan kering di udara. Warna merah pada olesan bakteri menunjukkan bakteri gram negatif dan jika warna ungu menunjukkan bakteri gram positif. Uji morfologi koloni meliputi beberapa tahap antara lain bentuk koloni, warna koloni, tepi koloni, elevasi



Gambar 1. Hasil Skrining L-asparaginase

Tabel 1. Aktivitas enzim L-asparaginase pada bagian tumbuhan mangrove

Sampel	No	Kode	Jam	Jam	Jam
			ke- 24	ke- 48	ke- 72
Daun	1	DAM3	-	++	++
	2	DAM4	+	++	++
	3	DAM5	-	+	++
	4	DAM6	+	++	++
Batang	5	BAM3	-	-	-
	6	BAM4	-	-	-
	7	BAM5	-	-	-
	8	BAM6	-	-	-
Akar	9	KAM3	-	-	-
	10	KAM4	+	+	+
	11	KAM5	-	-	-
	12	KAM6	-	+	+

Keterangan:

+ : Aktivitas Hidrolisis Rendah

++ : Aktivitas Hidrolisis Sedang

+++ : Aktivitas Hidrolisis Besar

koloni yang dapat dilakukan secara visual dengan menggunakan mata.

2.6 Karakterisasi biokimia bakteri

Karakterisasi biokimia dilakukan menggunakan sistem *Microbact*. Untuk menentukan identitas bakteri, karakter biokimia mereka akan dibandingkan dengan Manual Bakteri Determinatif Bergey's (Kurniawan *et al.*, 2018).

3. Hasil dan Pembahasan

Sampel yang digunakan adalah endofit mangrove berupa akar batang dan daun dari *Avicennia marina*. Setelah ditumbuk, dilakukan pengenceran dan penanaman diketahui bahwa bakteri yang ada, dapat tumbuh baik pada media *Luria Bertani Agar* (LBA). Dari hasil isolasi bakteri didapatkan 12 isolat bakteri dari sampel mangrove *Avicennia marina*. Dari sampel daun terbentuk 4 isolat, sampel batang terbentuk 4 isolat, sampel akar terbentuk 4 isolat. Ciri-ciri isolat sebagian besar berbentuk bulat, tepi tidak rata, koloni

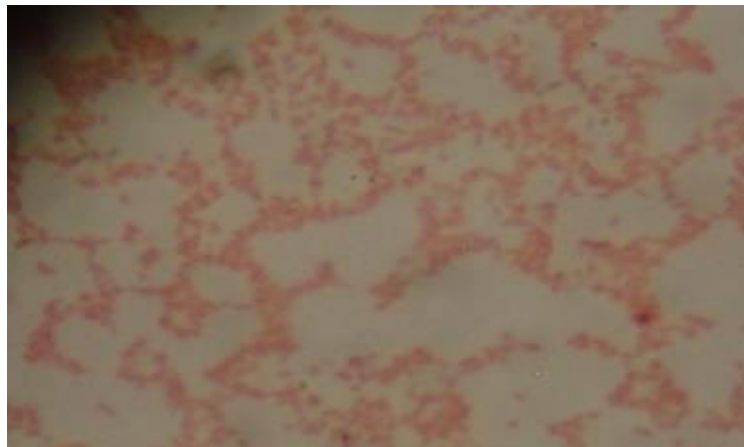
berwarna putih, dan elevansi cembung. Hasil skrining menggunakan media M9 Modifikasi sampel daun batang dan akar diketahui positif mengandung bakteri yang menghasilkan enzim L-asparaginase

Hasil analisis menunjukkan bahwa isolat sampel daun yang memiliki aktivitas enzim terbesar adalah isolat DAM4 dan DAM6. Sedangkan sampel batang tidak terlihat adanya aktivitas enzim dan sampel akar yang memiliki aktivitas enzim terbesar adalah isolate KAM4. Aktivitas enzim ini dapat dilihat dari kuatnya bakteri tersebut untuk menghidrolisi L-asparagin pada media skrining L-asparaginase yang ditandai dengan berubahnya media skrining menjadi warna biru. Isolat bakteri yang mampu menghasilkan enzim L-asparaginase akan menghidrolisis asam amino L-asparagin menjadi asam aspartat dan amoniak. Hasil dari pembentukan amoniak adalah meningkatnya pH medium. Meningkat atau tidaknya pH medium dapat dilihat dari perubahan warna yang terjadi. Indikator warna

BTB berwarna kuning pada suasana asam dan akan berubah menjadi biru pada suasana basa. Apabila isolat menghasilkan enzim asparaginase maka medium sekitar isolat menjadi alkali atau basa hal ini ditandai

dan dinding sel akan membesar dan menyebabkan terlepasnya kompleks kristal violet yang diserap sebelumnya (Pelczar, 2001).

Dari hasil identifikasi menggunakan



Gambar 2. Hasil pewarnaan gram isolate DAM6

Tabel 2. Hasil Uji Morfologi Koloni

Parameter	Hasil
Warna koloni	Hijau Biru
Bentuk Koloni	Oval
Tepi Koloni	Tidak Rata
Elevansi Koloni	Cembung
Konsistensi	Kering

dengan berubahnya media menjadi warna biru karena kemampuannya menghasilkan senyawa amoniak (Gulati *et al.*, 1977).

Hasil uji morfologi isolat bakteri sampel daun mangrove *Avicennia marina* kode DAM6 didapatkan hasil bahwa warna koloni adalah hijau kebiruan sedangkan bentuk koloni adalah oval, tepi koloni tampak tidak rata. Elevansi koloni adalah cembung sedangkan konsistensi koloni adalah kering. Sedangkan pada pewarnaan gram, isolat DAM6 merupakan bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif akan memberikan warna merah setelah diberikan safranin karena lipid yang terdapat di dalam dinding selnya akan larut pada waktu pencucian dengan alkohol sehingga pori-pori

Microbact system, isolat bakteri kode DAM6 dengan sampel daun dari mangrove *Avicennia marina* pada pengenceran 10⁻⁶ didapatkan jenis spesies yaitu *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa* termasuk dalam family *pseudomonadaceae*. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri Gram negatif, aerob, dan bergerak dengan menggunakan flagel, dan merupakan bakteri oportunistik (Todar, 2004). *Pseudomonas aeruginosa* berbentuk batang lurus atau lengkung, berukuran sekitar 0,6 x 2 mm dapat ditemukan satu-satu, berpasangan, dan kadang-kadang membentuk rantai pendek, tidak mempunyai spora, tidak mempunyai selubung (*sheath*) (Jawez, 2011).

Tabel 3. Hasil Uji *Microbact* dan *Bergey Manual*

Uji Biokimia	Uji Microbact	Bergey Manual	Keterangan
Spora	-	Tidak diketahui	-
Oksidase	+	+	Cocok
Motilitas	+	Tidak diketahui	-
Nitrat	+	Tidak diketahui	-
Lysin	+	+	Cocok
Ornithin	-	+	Tidak Cocok
H ₂ S	-	-	Cocok
Glukosa	+	+	Cocok
Manitol	-	+	Tidak cocok
Xylosa	+	-	Tidak cocok
ONPG	-	Tidak diketahui	-
Indole	-	Tidak diketahui	-
Urease	-	-	Cocok
V-P	-	-	Cocok
Sitrat	+	+	Cocok
TDA	-	-	Cocok
Gelatin	+	+	Cocok
Malonat	+	+	Cocok
Inositol	-	-	Cocok
Rhamnosa	+	-	Tidak cocok
Sukrosa	-	-	Cocok
Lactosa	-	-	Cocok
Arabinosa	-	-	Cocok
Adonitol	-	-	Cocok
Raffinosa	-	Tidak diketahui	-
Salicin	-	Tidak diketahui	-
Arginin	+	+	Cocok
Katalase	-	Tidak diketahui	-
Koagulase	-	Tidak diketahui	-
hemolisis	Beta	Tidak diketahui	-
Uji sensitive	Tidak diketahui	Tidak diketahui	-
Novobiosin			
Starch hydrolysis	-	-	-
Casein hydrolysis	+	Tidak diketahui	-

4. Kesimpulan

Mikroorganisme penghasil enzim L-asparaginase dengan aktivitas tinggi didapatkan dari isolat DAM6 yang berasal dari daun mangrove *Avicennia marina*. Berdasarkan analisis *microbact*, isolat tersebut adalah spesies bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

Daftar Pustaka

- Abdel, F. Y. R., & Olama, Z. A. (2002). L-asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* by solid state culture: evaluation and optimization culture conditions using factorial designs. *Process Biochemistry*, 38:115-22.
- El-Bossoumy, A. A., Sarhan, M., & Mansor, J. (2004). Production, isolation, and purification of l-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid-state fermentation. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 4 (37):387-393.
- Gulati, R., Saxena, R. K., & Gupta, R. (1997). A Rapid Plate Assay for Screening L-Asparaginase Producing Micro-Organisme. *Letter in Application Microbiology*, 24(1):23-26.
- Hendriksen, H. V., Kornbrust, B. A., Ostergaard, P. R., & Mary, A. (2009). Evaluating the

- potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:4168-4176.
- Jawez, E., Melnick, & Adelberg. (2001). *Medical Microbiology* 22 Edition. USA: MCGraw-Hill Companies.
- Kurniawan, A., Prihanto, A. A., Sari, S. P., Febriyanti, D., Sambah, A. B., & Asriani, E. (2018, April). Isolation and identification of cellulolytic bacteria from mangrove sediment in bangka island. Paper presented at the International Fisheries Symposium, University of Brawijaya, Indonesia.
- Medrofa, A. N., Isidora, K. S., & Mulawarmanti, D. (2015). Ekstrak daun mangrove (*A. marina*) mempercepat kesembuhan ulkus traumatikus. *Jurnal Dentofasial*, 14(1):11-14.
- Nur, M., Nasruddin, & Wasiq, J. (2013). Penerapan teknologi plasma untuk mempercepat persemaian mangrove sebagai upaya rehabilitasi green belt untuk mengatasi abrasi. *Jurnal Riptek*, 7(1):15-26.
- Nurdiani, R., Firdaus, M., & Prihanto, A. A. (2012). Phytochemical screening and Antibacterial activity of methanol extract of mangrove plant (*Rhizophora mucronata*) from Porong River Estuary. *Journal Basic Science And Technology*, 1(2):27-29