

**Karakterisasi dan penapisan enzim protease, amilase, serta selulase isolat kapang filoplan *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh.****Characterization and screening of protease, amylase, and cellulase from phylloplane fungi isolates of *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh.**Wahyu Aji Mahardhika ^{1)*}, Warih Ramadhany ²⁾, Arina Tri Lunggani ¹⁾²⁾¹⁾ Jurusan Biologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang²⁾ Jurusan Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang**SUBMISSION TRACK**Submitted : 2021-08-14
Revised : 2021-10-19
Accepted : 2021-10-20
Published : 2021-10-21**KEYWORDS**Mangrove,
Enzyme,
Amylase,
Cellulose,
Protease***CORRESPONDENCE**email:
mahardhikaaji@gmail.com**ABSTRACT**

Mangrove (*Avicennia marina* (Forssk.) Vierh.) is an important mangrove species, because it has many benefits for human life, including in the ecological scope as a source of food and medicine. These plants can also be used as a source of symbiotic mold isolates which can be developed as an alternative to produce bioactive compounds, one of which is enzymes. Enzymes are protein compounds that can catalyze all chemical reactions in biological systems. This study aims to determine whether mangrove symbiont fungi (*A. marina*) can produce amylase, protease and cellulase enzymes. This research was conducted using a method based on enzyme activity, namely amylase activity with lugol iodine staining, protease activity and cellulase activity with congo red staining. on agar media enriched with 1% skim milk, 1% starch and 1% CMC. The results showed that 4 isolates were able to show potential enzymatic activity to be developed as agents for enzyme production.

PENDAHULUAN

Enzim dalam kehidupan sering digunakan dalam bidang industri, baik dibidang pangan maupun kesehatan. Enzim merupakan katalisator protein untuk reaksi-reaksi kimia dalam sistem biologi. Enzim disebut katalisator protein, karena susunan utamanya adalah protein dan senyawa lain. Terdapat banyak macam-macam enzim yang memiliki reaksi yang spesifik (Robinson, 2015). Pemanfaatan enzim dapat dilakukan secara langsung menggunakan hasil isolasi maupun dengan cara pemanfaatan mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim yang diinginkan. Enzim dapat diperoleh dari makhluk hidup seperti hewan, tumbuhan dan mikroorganisme. Meskipun banyak sumber dapat menghasilkan enzim yang berasal dari hewan dan tumbuhan, namun pemanfaatan mikroorganisme salah satunya kapang sebagai sumber enzim lebih banyak diminati, karena enzim dari mikroorganisme dapat dihasilkan dalam waktu yang sangat singkat, mudah diproduksi dalam skala besar, proses produksi bisa dikontrol, kemungkinan terkontaminasi oleh senyawa-

senyawa lain lebih kecil, dan dapat diproduksi secara berkesinambungan dengan biaya yang relatif rendah. Contoh enzim yang digunakan dalam kehidupan diantaranya amilase, protease, selulosa.

Protease merupakan enzim yang berperan dalam reaksi pemecahan protein. Penggunaan enzim ini dibidang industri diantaranya pada pengolahan susu, deterjen, bir, makanan, kulit, dan limbah. Enzim protease dapat diproduksi oleh hewan, tumbuhan, maupun mikroorganisme (Motyan *et al.*, 2013). Mikroorganisme sering dipakai sebagai penghasil enzim protease, hal ini dikarenakan waktu produksi yang cepat dibanding tumbuhan dan hewan (Susanti, 2002). Amilase adalah sekelompok enzim yang fungsi katalitiknya adalah menghidrolisis (memecah) pati untuk menghasilkan produk yang beragam termasuk dekstrin, dan polimer yang semakin kecil yang terdiri dari unit glukosa (Ogbonna, 2014). Penggunaan amilase dalam bidang industri diantaranya pada produksi kertas, pembuatan roti dan sirup, detergen, tekstil, fermentasi alcohol, dan sebagainya (Saini *et al.*, 2017). Selulase merupakan enzim yang mampu

menghidrolisis selulosa. Penggunaan selulase dalam kehidupan diantaranya sebagai biokonversi, perusahaan pulp kertas, tekstil, agrikultur, fermentasi, dan pembuatan makanan (Kuhad *et al.*, 2011). Berdasarkan latar belakang di atas, maka enzim sangat diperlukan di kehidupan sehari-hari dan membutuhkan sumber enzim yang dapat diproduksi terus menerus. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menguji apakah beberapa kapang yang diisolasi dari mangrove *A. marina* (Forssk.) Vierh. ini mampu menghasilkan enzim amilase, selulase, dan protease.

METODE PENELITIAN

1. Peremajaan isolate

Isolat kapang yang telah diisolasi di penelitian sebelumnya diremajakan pada media PDA miring dan digunakan sebagai kultur kerja dan kultur stok. Isolat tersebut adalah PFM1X, PFM2X, PFM13, dan PFM19. Kode PFM menandakan substrat isolate tersebut. Kode angka menunjukkan lokasi dan nomor isolate.

2. Karakterisasi Kapang Symbion Mangrove

Kultur kapang yang telah tumbuh kemudian dikarakterisasi morfologi secara makroskopis dan mikroskopis. Karakterisasi makroskopis dilihat dari warna koloni, tekstur permukaan, koloni sebaliknya (*reverse of colony*), ada tidaknya tetes eksudat, sclerotia, *radial furrow*, *growing zone*, dan *soluble pigmen*, sedangkan secara mikroskopis dilihat dari ada tidaknya septa pada hifa, warna dan tekstur permukaan hifa, bentuk dan warna konidia, serta struktur lain seperti vesikel, fialid, sporangium, cleistothecia, sel kaki (foot cell) dan lain sebagainya. Data morfologis yang telah didapat kemudian di cocokkan dengan literatur yang ada, antara lain *Food and Indoor Fungi* oleh Samsons *et al.* (2004), *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi* oleh Watanabe (2002), dan sebagainya.

3. Pembuatan Media Uji

Media yang dipakai adalah Soluble Starch Agar (SSA), Skim Milk Agar (SMA), dan Carboxymethylcellulose Agar (CMC) yang

masing-masing digunakan untuk uji penapisan enzim amilase, protease, dan selulase.

4. Skrining Kapang penghasil Amilase

Skrining amilase dilakukan dengan menggunakan media SSA. Hasil isolasi kapang diinkulasikan dalam media SSA cawan petri dan diinkubasi pada suhu 30°C selama empat hari. Pengujian aktivitas amilolitik dilakukan dengan menambahkan larutan lugol iodine 1% untuk identifikasi aktivitas amilase, adanya aktivitas enzim amilase ditunjukkan oleh terbentuknya zona bening di sekitar koloni kapang.

5. Skrining Kapang Protease

Skrining protease dilakukan pada medium SMA. Isolat diinkubasi selama 4 hari pada suhu 30°C. Aktivitas proteolitik ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni kapang (Sunitha *et al.*, 2013).

6. Skrining Kapang Selulase

Skrining kapang selulolitik dilakukan dengan menggunakan media CMC. Hasil isolasi kapang diinokulasikan dalam media CMC cawan petri dan diinkubasi pada suhu 30°C selama empat hari. Pengujian aktivitas selulolitik dilakukan dengan menambahkan larutan *congo red*. Koloni kapang yang mampu menguraikan CMC ditunjukkan dengan kemampuannya membentuk zona bening di sekeliling koloni setelah diuji dengan *congo red* selama 3-5 menit. Perbedaan warna media yang mencolok antara bagian yang terhidrolisis dan tidak terhidrolisis setelah penambahan *congo red* sehingga zona bening terlihat lebih jelas (Kasana *et al.*, 2008).

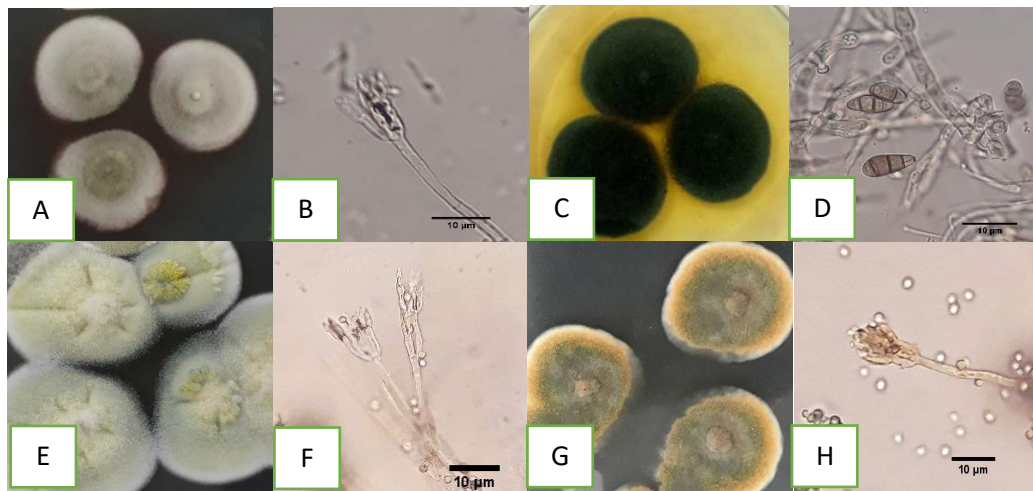
HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi Kapang Symbion Mangrove

Berdasarkan hasil karakterisasi morfologi baik secara makroskopis dan mikroskopis, ketiga isolate tersebut berasal dari genus *Penicillium* dan satu isolate dari genus *Curvularia*. Hasil karakterisasi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakterisasi Isolat Kapang Symbion Mangrove *A. marina*

No	Karakterisasi Isolat	PFM1X	PFM2X	PFM13	PFM19
1	Koloni :				
	Warna	Hijau terang	Hijau kusam	Hitam	Hijau gelap
	Tekstur	Beludru	Beludru	Beludru	Beludru
	Reverse	Kekuningan	kekuningan	Kecoklatan	Kekuningan
	Soluble Pigment	Kuning	Merah	Kuning	Oranye
	Radial Furrow	ada	-	-	-
	Growing Zone	-	-	-	-
	Exudate Drops	kekuningan	-	-	oranye
2	Hifa				
	Sekat	ada	ada	ada	Ada
	Warna	hyalin	hyalin	kecoklatan	Hyalin
3	Tekstur Permukaan	halus	halus	halus	Halus
	Konidia				
4	Bentuk	globose	subglobose	Reniform (Phragmospora)	subglobose
	Tekstur Permukaan	halus	halus	halus	Halus
5	Struktur lain				
	Branch (Percabangan)	Biverticillata	Biverticillata	-	Biverticillata
	Cleistothecia	-	-	-	-
5	Genus	<i>Penicillium</i>	<i>Pencilium</i>	<i>Curvularia</i>	<i>Penicillium</i>

**Gambar 1.** Morfologi makroskopis dan mikroskopis isolate, PFM2X (A & B), PFM13 (C & D), PFM1X

Berdasarkan hasil karakterisasi, tiga isolate berasal dari genus *Penicillium* dan satu isolate berasal dari genus *Curvularia*. Kapang tersebut ditemukan dan diisolasi dari permukaan daun atau filoplan mangrove *A. marina*. Penelitian Shaukat *et al.* (2014) membuktikan jika *Penicillium* dan *Curvularia* dapat ditemukan pada filoplan mangrove dari spesies *C. tagai* dan *A. corniculatum*

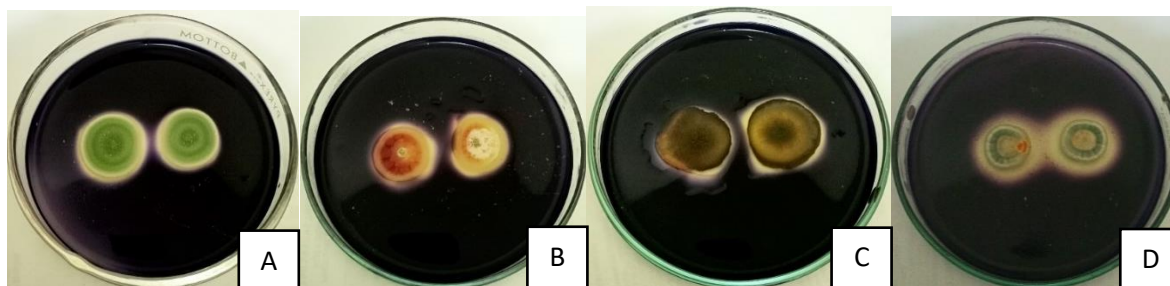
Penapisan Kapang Penghasil Enzim Amilase

Berdasarkan hasil uji kualitatif pada Tabel 2, diketahui bahwa isolat PFM13 memiliki

aktivitas enzim tertinggi (1,10 dan 0,54 mm) sedangkan isolat PFM1X memiliki aktivitas terendah (0,31 dan 0,23 mm). Sedangkan dua isolat lain memiliki aktivitas enzim yaitu 0,2-0,5 mm. Besar kecilnya zona bening juga merupakan indikasi awal banyak sedikitnya amilase yang dihasilkan, semakin besar zona bening yang dihasilkan kemungkinan amilase yang dihasilkan semakin besar pula atau aktivitas enzimnya yang lebih tinggi.

Tabel 2. Diameter isolat dan zona bening uji aktivitas enzim amilase

Kode Isolat	Aktivitas Enzim (mm diameter zona bening)	
	D ₁	D ₂
PFM 1X	2,23±0,31	1,93±0,23
PFM 2X	2,10±0,47	2,08±0,29
PFM 11	-	-
PFM 13	3,56±1,10	3,43±0,54
PFM 19	2,34±0,52	2,32±0,50

**Gambar 2.** Isolat Uji Enzim Amilase A: PFM 1X, B: PFM 2X, C: PFM 13, D: PFM 19

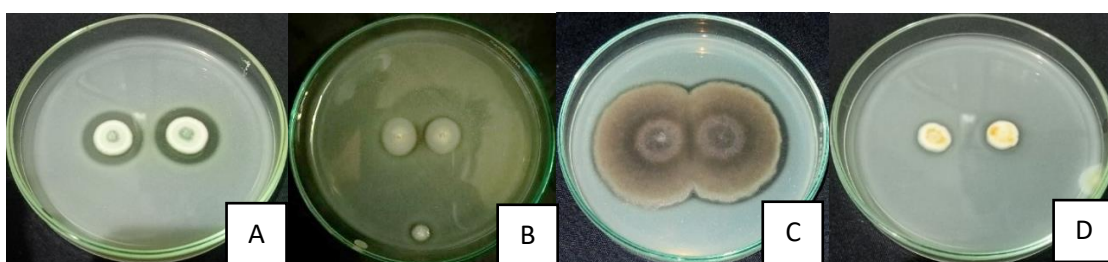
Penapisan Kapang Penghasil Enzim Protease

Aktivitas protease dapat dinyatakan sebagai perbandingan antara diameter zona bening dengan diameter koloni. Berdasarkan hasil uji kualitatif pada Tabel 3, diketahui bahwa isolate PFM1X memiliki aktivitas enzim tertinggi (0,79 dan 0,77 mm) sedangkan isolate PFM13 memiliki aktivitas terendah (0,13 dan 0,10 mm). Isolat lain memiliki aktivitas enzim yaitu 0,3-0,4 mm. Besar kecilnya zona bening juga merupakan indikasi awal banyak sedikitnya protease yang dihasilkan, semakin besar zona bening yang

dihasilkan kemungkinan protease yang dihasilkan semakin besar pula atau aktivitas enzimnya yang lebih tinggi. Daerah yang dibentuk oleh pencernaan protein dengan beberapa enzim protease yang dihasilkan oleh isolat, Zona bening yang terbentuk disebabkan oleh adanya hidrolisis protein yang dihasilkan oleh isolat tersebut, sumber protein dari susu skim ditambahkan ke dalamnya untuk menentukan produksi protease oleh strain kapang, yang menunjukkan aktivitas hidrolisis yang lebih tinggi (Cappuccino & Sherman, 2008).

Tabel 3. Diameter isolat dan zona bening uji aktivitas enzim protease

Kode Isolat	Aktivitas Enzim (mm diameter zona bening)	
	D ₁	D ₂
PFM 1X	1,57±0,77	1,65±0,79
PFM 2X	1,41±0,42	1,34±0,37
PFM 11	0	0
PFM 13	4,27±0,13	4,26±0,10
PFM 19	1,32±0,33	1,23±0,39

**Gambar 3.** Isolat Uji Enzim Protease A: PFM1X, B: PFM2X, C: PFM13, D: PFM19

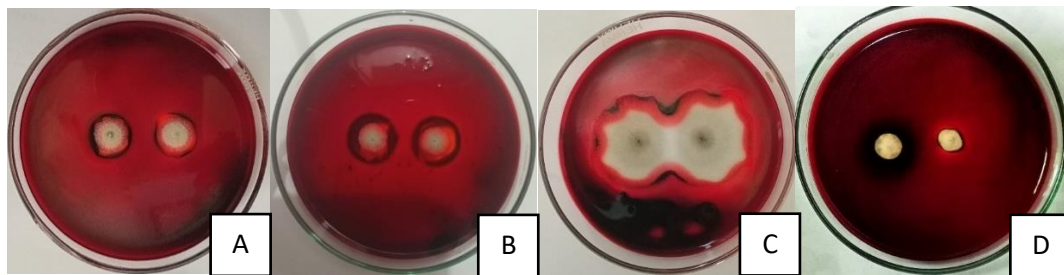
Penapisan Kapang Penghasil Enzim Selulase

Aktivitas selulolitik dapat dinyatakan sebagai perbandingan antara diameter zona bening dengan diameter koloni. Berdasarkan hasil uji kualitatif pada Tabel 4, diketahui bahwa isolat PFM1X memiliki aktivitas enzim tertinggi (0,37 dan 0,33 mm) sedangkan isolat memiliki aktivitas terendah PFM13 (0,08 dan 0,13 mm).

Sedangkan isolat lain memiliki aktivitas enzim <0,2 mm. Besar kecilnya zona bening juga merupakan indikasi awal banyak sedikitnya selulase yang dihasilkan, semakin besar zona bening yang dihasilkan kemungkinan selulase yang dihasilkan semakin besar pula atau aktivitas enzimnya yang lebih tinggi.

Tabel 4. Diameter isolat dan zona bening uji aktivitas enzim selulase

Kode Isolat	Aktivitas Enzim (mm diameter zona bening)	
	D ₁	D ₂
PFM 1X	1,36±0,37	1,37±0,33
PFM 2X	1,16±0,14	1,08±0,10
PFM 11	0	0
PFM 13	3,30±0,08	3,46±0,13
PFM 19	1,07±0,13	1,13±0,09



Gambar 4. Isolat Uji Enzim Selulase A: PFM1X, B: PFM2X, C: PFM13, D: PFM19

Berdasarkan hasil uji yang dilakukan, kapang dengan kode isolate PFM1X memiliki kemampuan yang terbaik dalam menghasilkan enzim selulase dan protease dibanding 3 isolat lainnya. Kapang yang menghasilkan amilase tertinggi dihasilkan oleh isolate PFM13. Berdasarkan morfologinya PFM1X, PFM2X, dan PFM19 berasal dari genus *Penicillium*. *Penicillium* dikenal sebagai kapang yang berperan penting baik di bidang industri maupun kesehatan. Kapang ini dalam bidang industri dikenal sebagai salah satu penghasil enzim. Penelitian Rodrigues *et al.*, (2005) membuktikan bahwa kapang *Penicillium* ini mampu untuk menghasilkan protease. Selain itu, menurut Gusakov dan Sinitsyn (2012) *Penicillium* yang berhasil diisolasi mampu memproduksi enzim selulase dan berpotensi dalam berbagai bidang. Isolat PFM13 berasal dari genus *Curvularia*. *Curvularia* dapat

hidup sebagai patogen di beberapa tanaman. Kapang ini memiliki zona bening terluas dalam menghidrolisis amilum dibanding ketiga kapang lainnya.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, maka dapat disimpulkan jika kultur PFM1X, PFM2X, PFM13, dan PFM19 menghasilkan enzim amilase, protease, dan selulase.

UCAPAN TERIMA KASIH

Tim peneliti mengucapkan terima kasih terhadap Bapak Indra Gunawan, ST dan Eko Purnomo, S.Si yang membantu kami dalam penelitian di Laboratorium Bioteknologi Universitas Diponegoro.

DAFTAR PUSTAKA

- Cappuccino JG, Sherman N. 2008. *Mikrobiologi: Sebuah laboratorium Manual*. (Tenth Edit). Boston: Pendidikan Pearson.
- Gusakov, Alexander & Sinitsyn, Arkady. (2012). Cellulases from *Penicillium* species for producing fuels from biomass. *Biofuels*. 3. 463-477. 10.4155/bfs.12.41.
- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., & Gulati, A. (2008). A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Current Microbiology*, 57(5), 503–507. doi:10.1007/s00284-008-9276-8
- Kuhad, Ramesh C., Gupta, Rishi., Singh, Ajay. (2011). Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research*. Article ID 280696. DOI:10.4061/2011/280696.
- Motyán, Janos A., Toth, Ferenc., Tozser, J. (2013). Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules*. 3, 923-942; doi:10.3390/biom3040923
- Ogbonna C. N., Okpokwu N. M., Okafor C. U., Onyia C. E. (2014). Isolation and Screening of Amylase Producing Fungi Obtained from Garri Processing Site. *International Journal of Biotechnology and Food Science* Vol. 2(5), pp. 88-93.
- Robinson, Peter K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*. vol.59
- Rodrigues, Priscila M.B., Lima, Carolina A., Filho, Jose L., Teixeira, Jose A., Portu, Ana L.F., Cunha, Maria d.G.C. (2005) Production and Characterization of Protease from *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622. *Valnatura Project*.
- Safitri, Dian., Samingan. (2013). ISOLASI DAN IDENTIFIKASI FUNGI AMILOLITIK PADA BONGGOL PISANG KEPOK (*Musa paradisiaca* L.). *Jurnal Ilmiah Pendidikan Biologi, Biologi Edukasi* Vol 5, Nomor 1, hlm 29-35
- Saini, Ritu. Saini, Harnek S., Dahiya, Anjali. (2017). Amylases : Characteristics and Industrial Application. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 6(4): 1865-1871.
- Samsons, R.A., Hoekstra, E.S. 2004. *Introduction to Food and Airborne Fungi*. Centraalbureau Voor Schimmelcultures : Netherlands.
- Shaukat, S. S., Zafar, H., Khan, A., Ahmed, W., & Khan, M. A. (2014). Diversity of phylloplane mycobiota of two mangrove species *Ceriops tagal* and *Aegiceras corniculatum* under natural and greenhouse conditions. *Int J Biol Biotechnol*, 11, 299-307. ISSN: 1810-2719
- Sunitha, V.H., Nirmala Devi, D. & Srinivas, C. (2013) Extracellular Enzymatic Activity of Endophytic Fungal Strains Isolated from Medical Plant. *World Journal of Agricultural Sciences*. 9 (1), 1– 9. doi:10.5829/idosi.wjas.2013.9.1.72148
- Susanti, E. (2002). Isolasi dan karakterisasi Protease dari *Bacillus subtilis* 1012M15. *Biodiversitas*. 4 : 12 – 17.
- Watanabe, Tsuneo. (2010). *Pictorial Atlas of Seed and Soil Fungi Third Edition*. USA : CRC Press