

AKTIVITAS ENZIM KITINASE ACTINOBACTERIA ASAL PERKEBUNAN KELAPA SAWIT PTPN VI MUARO JAMBI DALAM MENGHAMBAT GANODERMA BONINENSE***Activity of The Chitinase Enzyme Actinobacteria from Palm Oil Plantation PTPN VI Muaro Jambi in Inhibiting Ganoderma boninense*****Rena Astika¹, Mahya Ihsan², Ashiv Irvan Yusuf³**^{1 2 3}Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Jambi Jl. Jambi-Ma. Bulian KM15 Mendalo Darat Jambi 36361*Email : astikarena9@gmail.com**Abstract**

Actinobacteria are gram-positive bacteria that can produce primary metabolites in the form of enzymes, one of which is the chitinase enzyme. Chitinase is an enzyme that has the ability to degrade chitin which is the main structure in the cell wall of plant pathogenic fungi. One of the Actinobacteria that have the ability to produce enzymes can be obtained from the soil of the PTPN VI Muaro Jambi oil palm plantation which can be used as a biocontrol agent for plant pathogenic fungi, namely Ganoderma boninense. The purpose of this study was to determine the magnitude of the activity of the chitinase enzyme Actinobacteria and to determine the magnitude of the inhibitory activity of the enzyme chitinase Actinobacteria against Ganoderma boninense. This research was conducted with a quantitative descriptive method. The results showed that one isolate of Actinobacteria (SP1) had enzyme activity (Crude Extract Enzyme (EEK) and concentrated chitinase enzyme). The activity of the chitinase enzyme was higher at 0.0296 U/mL compared to the EEK activity of 0.0288 U/mL. The inhibitory power using the concentrated chitinase enzyme also had a higher value, namely 57.3% compared to the inhibitory power using EEK, which was 56.6%

Keywords: *Actinobacteria, PTPN VI Muaro Jambi Oil Plantation, Chitinase Enzyme, Ganoderma boninense.***Abstrak**

Actinobacteria merupakan bakteri gram positif yang dapat menghasilkan senyawa metabolit primer berupa enzim, salah satunya yaitu enzim kitinase. Kitinase merupakan enzim yang memiliki kemampuan dalam mendegradasi kitin yang menjadi struktur utama pada dinding sel jamur patogen tanaman. Actinobacteria yang memiliki kemampuan dalam menghasilkan enzim salah satunya dapat diperoleh dari tanah perkebunan kelapa sawit PTPN VI Muaro Jambi yang dapat dijadikan sebagai agen biokontrol jamur patogen tanaman, yaitu Ganoderma boninense. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui besarnya aktivitas enzim kitinase Actinobacteria dan mengetahui besarnya aktivitas penghambatan enzim kitinase Actinobacteria terhadap Ganoderma boninense. Penelitian ini dilakukan dengan metode deskriptif kuantitatif. Hasil penelitian diperoleh satu isolat Actinobacteria (SP1) yang memiliki aktivitas enzim (Enzim Ekstrak Kasar (EEK) dan enzim kitinase hasil pemekatan). Aktivitas enzim kitinase hasil pemekatan lebih tinggi yaitu 0,0296 U/mL dibandingkan dengan aktivitas EEK yaitu 0,0288 U/mL. Daya hambat menggunakan enzim kitinase hasil pemekatan juga memiliki nilai lebih tinggi yaitu 57,3% dibandingkan dengan daya hambat menggunakan EEK yaitu 56,6%.

Kata kunci: *Actinobacteria, Perkebunan Kelapa Sawit PTPN VI Muaro Jambi, Enzim Kitinase, Ganoderma boninense*

PENDAHULUAN

Actinobacteria atau dikenal juga dengan *Actinomycetes* merupakan kelompok bakteri gram positif berbentuk benang yang memiliki kemampuan dalam menghasilkan senyawa metabolit primer dan sekunder (Fathurahman, 2019). Senyawa metabolit primer yang dihasilkan oleh *Actinobacteria* berupa enzim, salah satunya yaitu enzim kitinase (Gomes dkk., 2018). Kitinase adalah kelompok enzim yang memiliki kemampuan untuk menghidrolisis polimer kitin menjadi oligomer kitin. Kitin merupakan struktur penyusun dinding sel pada jamur, salah satunya yaitu jamur patogen. Struktur kitin pada dinding sel jamur patogen dapat didegradasi oleh mikroorganisme kitinolitik sehingga mengurangi terjadinya infeksi penyakit tanaman (Yurnaliza dkk., 2011). Jamur patogen adalah jamur yang menyebabkan penyakit pada inangnya dan bersifat merugikan. Menurut Shivas (2005) menyatakan bahwa terdapat beberapa jenis jamur patogen yang menyerang tanaman yang mencakup jamur *Fusarium* sp., *Sclerotium rolfsii*, *Peronospora manshurica*, *Phytophthora* sp., *Collectotrichum gloeosporioides*, dan *Ganoderma boninense*.

Ganoderma boninense merupakan jamur patogen yang menyebabkan busuk pangkal batang (BPB) pada tanaman kelapa sawit. Patogen ini tidak hanya menyerang tanaman tua, tetapi juga yang masih muda (Priwiratama dkk., 2014). Menurut Queendy dan Roza (2019), penyakit busuk pangkal batang ini menyebabkan berkurangnya hasil panen secara drastis pada perkebunan kelapa sawit dan menyebabkan kematian 80% atau lebih dari populasi kelapa sawit. Banyak upaya untuk pengendalian penyakit BPB dengan fungisida kimia, tetapi keamanan lingkungan menjadi pertimbangan yang harus diperhatikan. Alternatif yang dapat dilakukan ialah menggunakan agen pengendalian hayati.

Pengendalian hayati menggunakan berbagai mikroorganisme seperti bakteri kitinolitik penghasil kitinase sudah banyak digunakan. *Actinobacteria* menghasilkan aktivitas enzim kitinase yang merupakan salah satu alternatif pengendalian *G. boninense* (Queendy dan Roza, 2019). Penelitian Muzaimah dkk., (2015) menyatakan isolat aktinomicetes yang diisolasi dari rhizosfer tanaman kelapa sawit dapat menghambat pertumbuhan jamur *G. boninense* yang menyebabkan penyakit busuk pangkal batang pada tanaman kelapa sawit. Berdasarkan uraian diatas maka perlu dilakukan penelitian mengenai aktivitas enzim kitinase *Actinobacteria* asal perkebunan kelapa sawit PTPN VI Muaro Jambi dalam menghambat *Ganoderma boninense*

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan April-Agustus 2022. Pengambilan sampel dilakukan di perkebunan kelapa sawit PTPN VI Unit Usaha Batang Hari di Jalan Ness Kab. Muaro Jambi, kemudian untuk tahap isolasi tanah sampai uji antagonis dilakukan di Laboratorium Agroindustri Tanaman Obat dan Bioteknologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Jambi.

Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Alkohol 70%, spirtus, Aquades, *Starch Nitrat Agar (SNA)* (KNO_3 , K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $NaCl$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, *Solublestarch*, agar), *Potato Dextrose Agar (PDA)*, media kitin agar (bubuk kitin, HCl, air dingin, NaOH, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, *yeastextract*, *pepton*, *bactotripton*, NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, agar, aquades), Buffer fosfat, Pereaksi Schales (K-Ferrisianida + Na_2CO_3), *ketoconazole*, kertas saring, plastik wrap dan alumuniumfoil. Isolat *Actinobacteria* yang digunakan dalam penelitian ini merupakan isolat hasil isolasi dari tanah perkebunan kelapa sawit PTPN VI Muaro Jambi. Isolat jamur patogen yang digunakan yaitu *Ganoderma boninense*.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah erlenmeyer, *beaker glass*, cawan petri, *hot plate* dan *magnetic stirrer*, *sentifuge*, kertas pH, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *Laminar Air Flow*, jarum ose, bunsen, vortex, shaker, spektrofotometer, *waterbath*, *tabung effendorf*, spatula, batang pengaduk, pipet tetes, neraca analitik, inkubator, *refrigerator*, *autoclave*, *objectglass*, jangka sorong, mikroskop *fluorescence*.

Metode Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan di perkebunan kelapa sawit PTPN VI Unit Usaha Batang Hari di Jalan Ness Kab. Muaro Jambi, kemudian untuk tahap isolasi tanah sampai uji antagonis dilakukan di Laboratorium Agroindustri Tanaman Obat dan Bioteknologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Jambi.

Preparasi Koloidal Kitin

20 g bubuk kitin ditambah 400 mL HCl 1 N distirrer 2 jam kemudian ditutup rapat dan dibiarkan selama 24 jam pada suhu 4°C (semua tahapan perlakuan dalam suhu dingin). Selanjutnya disaring dengan menggunakan kertas saring dan filtrat yang diperoleh ditambahkan 200 mL air dingin dan pH larutan diatur menjadi 7,0 dengan penambahan NaOH 10 N dan disentrifugasi pada 8.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Filtrat dibuang dan pellet (endapan) dicuci dengan *aquades* dingin

kemudian disentrifugasi lagi. Endapan berupa pelet (koloidal kitin) disimpan pada suhu dingin (Suryadi dkk., 2013).

Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel tanah dilakukan secara acak di beberapa titik pada kedalaman 10-20 cm untuk memaksimalkan potensi tanah yang terdapat bakteri *Actinobacteria*. Sampel tanah sebanyak 5 g dilarutkan kedalam 45 mL larutan fisiologis. Larutan dihomogenkan menggunakan vortex selama 90 menit pada suhu ruang ($\pm 27^{\circ}\text{C}$). Sebanyak 1 mL suspensi biakan diencerkan hingga 10^{-4} , kemudian sebanyak 0,1 mL disebarkan secara merata pada media agar kitin (Koloidal kitin 0,3%, yeast extract 0,1%, K_2HPO_4 1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01% dan NaCl 0,1% dan agar 1,5%, diinkubasi pada suhu kamar selama 5 hari (Nurmalinda dkk., 2020).

Identifikasi Makroskopis dan Mikroskopis *Actinobacteria*

Identifikasi makroskopis dilakukan untuk melihat pertumbuhan *Actinobacteria* pada media kitin agar (Koloidal Kitin Agar). Uji makroskopis dilakukan dengan melihat bentuk, ukuran, warna, karakteristik optik, elevasi dan margin dari koloni *Actinobacteria*. Untuk uji mikroskopis dilakukan pewarnaan gram (Amanullah dkk., 2020).

Uji Kualitatif Aktivitas Kitinolitik *Actinobacteria*

Uji kualitatif *Actinobacteria* dilakukan dengan menumbuhkan *Actinobacteria* pada media kitin agar. sebanyak 2 ose isolat *Actinobacteria* diencerkan dalam 100 μL aquades dan diinokulasikan sebanyak 5 μL dengan metode titik (sumur) pada bagian tengah media kitin agar dan diinkubasi pada suhu 31°C selama 7 hari (Suryadi dkk., 2013). Setelah terbentuk zona bening diberi *congo red* 0,1% selama 15 menit dan dibilas menggunakan aquades. Indeks Kitinolitik (IK) yang diperoleh menunjukkan kemampuan isolat *Actinobacteria* dalam mendegradasi kitin. Indeks Kitinolitik (IK) tinggi apabila isolat memiliki nilai $\text{IK} \geq 2$, sedangkan IK dikatakan rendah apabila nilai $\text{IK} < 2$ (Khikmah dkk., 2016). Indeks Kitinolitik (IK) dihitung dengan rumus sebagai berikut (Haedar dkk., 2017) :

$$\text{IK} = \frac{\text{Diameter Zona Bening yang terbentuk}}{\text{Diameter Koloni } Actinobacteria}$$

Pengukuran Kurva Pertumbuhan *Actinobacteria*

Inokulasikan sebanyak 2 lup isolat *Actinobacteria* yang memiliki zona bening paling tinggi kedalam 100 mL media cair kitin didalam erlenmeyer lalu di inkubasi menggunakan shaker dengan kecepatan 130 rpm pada suhu 37°C .

Adapun perlakuan waktu inkubasi dilakukan variasi setiap 12 jam sekali selama 5 hari. Setiap jam tersebut diambil 1,5 ml dan dimasukkan kedalam tabung *ependorf* lalu disimpan di *refrigerator*. Setelah itu, dihitung menggunakan spektrofotometer untuk mengetahui jumlah koloni *Actinobacteria* (Pribadhi dkk., 2021).

Produksi Enzim Ekstrak Kasar

Sebanyak 1-2 lup bakteri diinokulasi ke dalam 100 mL media cair kitin (koloidal kitin 0,3%, yeast extract 0,1%, K_2HPO_4 1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01% dan NaCl 0,1%) diinkubasi sampai waktu optimum pertumbuhan *Actinobacteria* pada suhu ruang ($\pm 27^{\circ}\text{C}$). Kultur disentrifugasi pada 8.000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar kitinase dari isolat terpilih. Pengendapan kitinase dilakukan dengan amonium sulfat dengan kadar 20-70%. Endapan yang diperoleh dilarutkan dengan 1 mL buffer fosfat 0,1 M pH 7,0 kemudian dilakukan pengukuran aktivitas enzim kitinase (Nurmalinda dkk., 2020).

Pengukuran Aktivitas Enzim kitinase

150 μL ekstrak kasar enzim kitinase ditambahkan ke dalam 300 μL koloidal kitin dan 150 μL bufer fosfat 0,1 M pada suhu 30°C , pH 7 dan di vortex. Campuran diinkubasi menggunakan *waterbath* pada suhu 30°C selama 30 menit. Kemudian inkubasi dihentikan pada 100°C selama 10 menit dan didinginkan selama 10 menit. Selanjutnya campuran disentrifugasi pada 6.000 rpm selama 5 menit. Kemudian filtrat diambil dan ditambahkan kedalam aquades 500 μL dan 1000 μL reagens *schales* (K-Ferrisianida dan Na-Karbodat 0,5 M) dan reaksi dihentikan pada suhu 100°C selama 10 menit. Aktivitas enzim ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang 420 nm. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 μmol N-asetilglukosamin (sebagai standar) per menit (Nurmalinda dkk., 2020). Rumus perhitungan aktivitas enzim sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas enzim (U/mL)} = \frac{K \times 1000}{t \times \text{BM}}$$

Keterangan :

K = Konsentrasi (ppm)

t = waktu inkubasi

BM = Berat Molekul ($\text{Glc-NaC} = 221, 21 \text{ g/mol}$)

Uji Antagonis *Actinobacteria* Terhadap *Ganoderma boninense* Secara In vitro

Uji antagonis secara in vitro menggunakan metode *dual culture* pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA). Enzim kitinase dimasukkan ke dalam sumur sebanyak 20 μL yang diletakkan pada 3 cm dari tempat jamur patogen yang berukuran 0,5 cm

di media PDA dengan diameter cawan petri 9 cm. Inkubasi dilakukan selama 10 hari pada suhu ruang ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) (Nurmalinda dkk., 2020; Suryadi dkk., 2020).

Menurut Zivkovic dkk., (2010) secara kuantitatif aktivitas kitinase *Actinobacteria* dalam menghambat jamur patogen tanaman dapat dilihat dari persentase daya hambat dengan kategori 0-4 (0 = tidak ada daya hambat, 1 = 1-25% (rendah), 2 = 26-50% (sedang/cukup), 3 = 51-75% (tinggi) dan 4 = 76-100% (sangat tinggi). Berdasarkan Amaria dkk., (2015) perhitungan persentase hambatan enzim kitinase *Actinobacteria* terhadap *G. boninense* dihitung dengan rumus :

$$P = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100\%$$

Keterangan :

P = persentase hambatan

R1 = jari-jari koloni patogen yang tumbuh kearah berlawanan dengan isolat antagonis (mm)

R2 = jari-jari koloni patogen yang tumbuh mendekati isolat antagonis (mm)

Analisis Data

Aktivitas kitinase *Actinobacteria* secara kualitatif dan kuantitatif serta persentase daya hambat enzim kitinase *Actinobacteria* terhadap jamur patogen tanaman dianalisis secara deskriptif kuantitatif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi *Actinobacteria* Tanah Perkebunan Kelapa Sawit

Hasil isolasi dari tiga titik pengamatan hanya didapatkan satu sampel yang menunjukkan pertumbuhan *Actinobacteria* yaitu tanah yang berdekatan dengan pohon kelapa sawit. Jenis tanah tempat ditemukannya bakteri *Actinobacteria* tersebut berjenis Tanah Merah Kekuningan (PMK) dengan kode isolat SP1 (Gambar 1). Keberadaan *Actinobacteria* di lokasi ini disebabkan karena pada Tanah Merah Kekuningan mendapat penambahan nutrisi dari proses pemupukan yang dilakukan secara rutin. Selain itu, tanah tersebut juga memiliki faktor fisik kimia lingkungan yang baik untuk pertumbuhan *Actinobacteria*. Sunarko (2014), menyatakan tanah PMK (Podsolik Merah Kuning) merupakan salah satu ekosistem yang memiliki potensi sebagai habitat pertumbuhan *Actinobacteria* karena memiliki kandungan mineral yang tinggi dengan pH 4-5,5. Pada tanah merah pertumbuhan *Actinobacteria* menunjukkan persentase sebesar 36%. Hasil pengamatan faktor lingkungan tanah tersebut memiliki suhu 30°C dan pH 6 dengan kelembapan tanah 80%. Sesuai dengan Dhanasekaran dan Jiang (2016) Wink dkk (2017), bahwa *Actinobacteria* mampu tumbuh pada suhu $28-37^{\circ}$ dengan rentang pH 4,5-6,5. Namun, pertumbuhan *Actinobacteria* akan lebih optimum pada pH 6,5-8,0. Selanjutnya dilakukan identifikasi secara makroskopis dan mikroskopis.



Gambar 1. Isolat *Actinobacteria* (SP₁) tanah Perkebunan Kelapa Sawit

Identifikasi Makroskopis dan Mikroskopis *Actinobacteria* Asal Tanah Perkebunan Kelapa Sawit

Berdasarkan pengamatan ciri makroskopis dan mikroskopis yang didapatkan, diduga bakteri isolat SP1 merupakan *Actinobacteria* dari genus *Streptomyces* (Tabel 1).

Tabel 1. Ciri Makroskopis *Actinobacteria*

Ciri Makroskopis			
Bentuk	Warna	permukaan	Tepi
<i>Irregular</i>	Putih kekuningan	<i>Raised</i>	<i>undulate</i>

Kemiripan ciri yang ditemukan pada isolat SP1 ini yaitu pada bentuk dan warna koloni yang dihasilkan. Warna koloni ini muncul disebabkan oleh produksi pigmen hifa aerial vegetatif yang larut dan berdifusi ke dalam media. Kawuri (2016), menyatakan bahwa *Streptomyces* memiliki bentuk koloni bulat tidak teratur dengan miselium yang

memanjang dengan pewarnaan koloni kelabu, merah, putih, kuning, coklat, dan hijau. Selain itu, Madigan dkk., (2011), juga menyatakan bahwa warna khas yang timbul pada koloni *Streptomyces* disebabkan oleh konidia dan sporofor yang berpigmen. Sehingga, akan terlihat penampakan koloni yang berdebu dengan pewarnaan koloni kelabu, putih, kekuningan dan hijau. Hasil pengamatan mikroskopis bakteri isolat SP1 merupakan bakteri gram positif berwarna ungu berbentuk coccus, hifa tidak bercabang dan memiliki hifa aseptat (tidak bersekat) (Gambar 2). Hasil pengamatan sesuai dengan Prasetya dan Abadi (2022), menyatakan bahwa *Streptomyces* merupakan bakteri gram positif yang bersifat aerobik dan tidak tahan asam dengan karakter membentuk percabangan hifa yang kompleks, hifa tidak memiliki sekat (aseptat) dan spora aerial yang berkumpul membentuk rantai spora yang panjang yang tersusun bergelung.



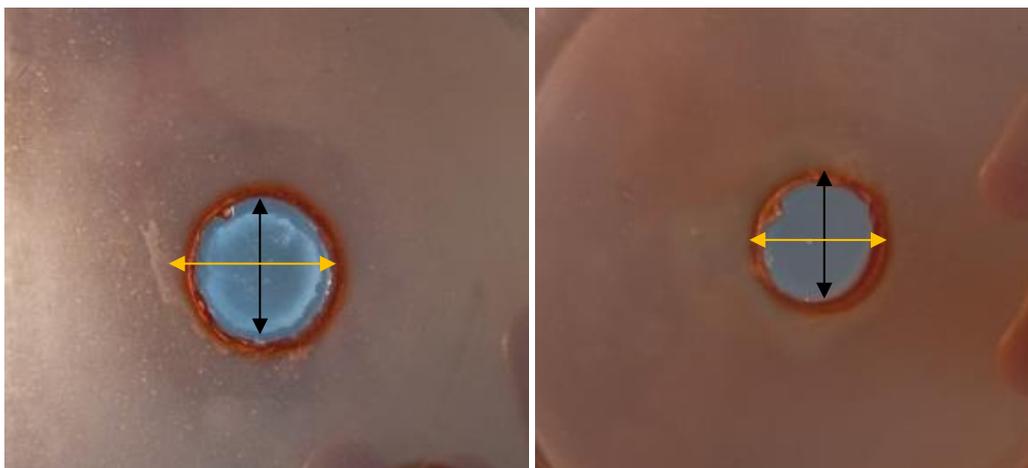
Gambar 2. Karakteristik Mikroskopik (A) Bentuk sel bakteri *coccus* ; (B) Hifa aseptat

Uji Kualitatif Aktivitas Kitinolitik *Actinobacteria* Asal Tanah Perkebunan Kelapa Sawit

Hasil pengujian aktivitas kitinolitik isolat SP1 menunjukkan bahwa isolat SP1 memiliki kemampuan aktivitas kitinolitik. Adanya aktivitas kitinolitik ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri (Gambar 3). Zona bening akan semakin terlihat jelas setelah penambahan larutan *congo red*.

Congo red ($C_{32}H_{22}N_6O_6S_2Na_2$) berfungsi mengikat polisakarida kompleks dalam hal ini yaitu kitin yang terkandung dalam media. Menurut Suryadi dkk., (2013), *congo red* akan berikatan

dengan substrat polimer kitin ikatan β -1,4 dalam media agar sehingga berwarna merah. Bagian media kitin agar yang terhidrolisis oleh kitinase yang menghasilkan monomer GlcNAc yang tidak memiliki ikatan β -1,4 tidak dapat diikat kuat oleh *congo red*. Kemudian dilakukan pembilasan menggunakan aquades yang akan melunturkan *congo red*, terutama di daerah sekitar koloni yang mengandung gula reduksi sehingga terlihat zona bening. Terbentuknya zona bening membuktikan bahwa isolat tersebut mampu memproduksi enzim kitinase. Berdasarkan zona bening terbentuk dapat diketahui indeks kitinolitik *Actinobacteria*. Hasil indeks kitinolitik isolat SP1 ditunjukkan dalam tabel 2.



Gambar 3. Aktivitas Kitinolitik Isolat SP1 asal Tanah Perkebunan Kelapa Sawit. (↔) Menunjukkan Diameter Zona Bening dan (↕) Menunjukkan Diameter Koloni

Tabel 2. Perhitungan Indeks Kitinolitik Isolat SP1 *Actinobacteria* Tanah Perkebunan Kelapa Sawit.

Kode isolat	Indeks Kitinolitik	Keterangan
SP1	2,05	Tinggi

Keterangan : Indeks Kitinolitik (< 2 : Rendah; ≥ 2 : Tinggi)

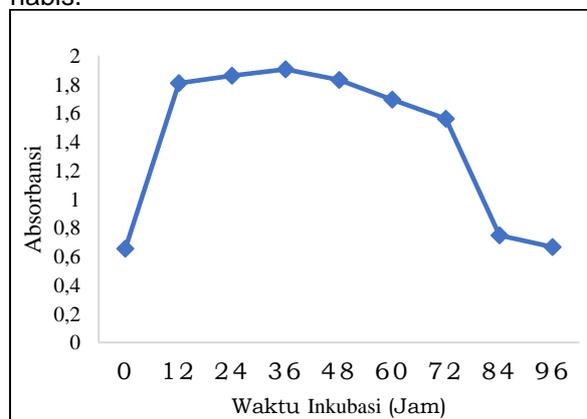
Berdasarkan uji kualitatif zona bening yang terbentuk (Tabel 2), isolat *Actinobacteria* SP1 memiliki indeks kitinolitik yang tinggi dengan nilai 2,05. Indeks kitinolitik dikategorikan tinggi apabila memiliki nilai ≥ 2 dan dikategorikan rendah apabila memiliki nilai < 2 (Khikmah dkk., 2016). Indeks kitinolitik yang tinggi menunjukkan bahwa isolat memiliki kemampuan dalam mendegradasi kitin. Sesuai dengan penelitian Suryadi dkk., (2013) bahwa besarnya zona bening yang dihasilkan tergantung pada jumlah monomer N-asetilglukosamin yang dihasilkan dari proses hidrolisis kitin dengan memutuskan ikatan β-1,4. Semakin besar jumlah monomer yang dihasilkan maka akan semakin besar pula zona bening yang terbentuk disekitar koloni. Jika zona bening yang terbentuk besar maka indeks kitinolitiknya juga akan tinggi.

Penentuan Kurva Pertumbuhan dan Penentuan Waktu Inkubasi Optimum Produksi Kitinase dari *Actinobacteria*

Tujuan dari pengukuran kurva pertumbuhan ini yaitu untuk mengkondisikan pertumbuhan bakteri mencapai fase *log* (eksponensial), yaitu fase dimana bakteri mengalami pertumbuhan yang pesat dan merupakan fase yang optimal dalam pertumbuhan sel. Fase *log* isolat SP1 didapatkan melalui pengukuran kurva pertumbuhan pada substrat media cair kitin

(Gambar 4).

Berdasarkan kurva pertumbuhan, bakteri *Actinobacteria* Isolat SP1 diinkubasi selama 96 jam. Kurva pertumbuhan menunjukkan isolat SP1 mengalami fase *lag* yang singkat dan tidak memerlukan waktu yang lama untuk beradaptasi dengan media. Hal ini dikarenakan isolat SP1 sudah terbiasa tumbuh pada media kitin. Kemudian, isolat SP1 mengalami fase *log* pada jam ke-0-36. Pada fase ini bakteri mengalami pertumbuhan yang sangat pesat dan melakukan pembelahan sel yang cepat. Pada jam ke-48-72 mulai terjadinya fase stasioner karena jumlah sel tidak mengalami kenaikan dan pada jam ke-84-96 sudah dapat dikatakan fase *death* karena jumlah sel berkurang sangat drastis. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri sudah tidak mampu mengkonsumsi media karena nutrisi pada media sudah mulai habis.



Gambar 4. Kurva Pertumbuhan *Actinobacteria* Isolat SP1

Produksi dan Pemekatan Enzim Ekstrak Kasar (EEK) Kitinase *Actinobacteria* Isolat SP1

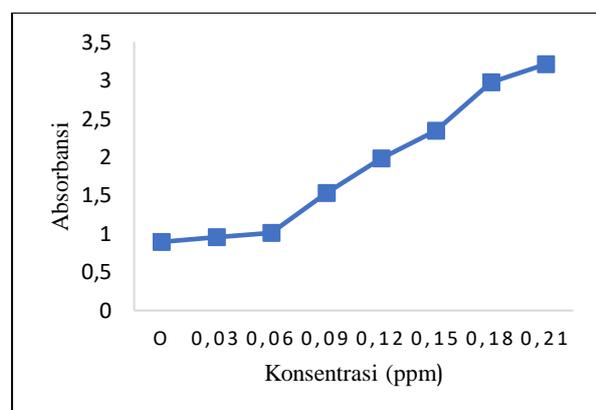
Optimasi waktu produksi Enzim Ekstrak Kasar (EEK) dilakukan untuk mengetahui waktu panen

yang tepat selama proses produksi enzim kitinase. Berdasarkan kurva pertumbuhan yang telah dibuat, isolat SP1 memiliki nilai tertinggi yaitu 1,904 berada pada jam ke-36. Dapat diketahui bahwa pada jam tersebut bakteri isolat SP1 mengalami fase log/eksponensial. Menurut Oktavia, dkk., (2018) pada fase inilah enzim kitinase dapat di produksi, karena bakteri mengalami pertumbuhan yang sangat cepat dengan laju konstan dan aktivitas metabolisme berada pada kondisi optimum dan metabolisme paling aktif. Sehingga pada fase ini diharapkan lebih banyak enzim kitinase yang dihasilkan.

Dari proses ini, didapatkan Enzim Ekstrak Kasar (EEK) sebanyak 150 mL. Enzim Ekstrak Kasar (EEK) yang dihasilkan dibagi menjadi 2 yaitu 100 mL untuk pemekatan enzim dan 50 mL tanpa pemekatan enzim. Kedua enzim inilah yang nantinya akan digunakan sebagai uji antagonis pada jamur *Ganoderma boninense*.

Pengukuran Aktivitas EEK dan Enzim kitinase *Actinobacteria* Asal Perkebunan Kelapa Sawit

Aktivitas kitinase ditentukan secara kolorimetri dengan alat spektrofotometer. Hasil pemecahan kitin yang berupa N-asetilglukosamin (GlcNAc) digunakan sebagai standar (Gambar 5).



Gambar 5. Kurva Standar Glc-NAc

Aktivitas kitinase ditentukan berdasarkan kurva N-asetilglukosamin yang dibuat dengan mengukur absorbansi dari campuran antara larutan N-asetilglukosamin dengan aquades dan reagen *schales*. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 μ mol N-asetil-D-glukosamin per menit. Hasil aktivitas enzim kitinase dapat dilihat

pada Tabel 3.

Tabel 3. Perhitungan Aktivitas Enzim kitinase

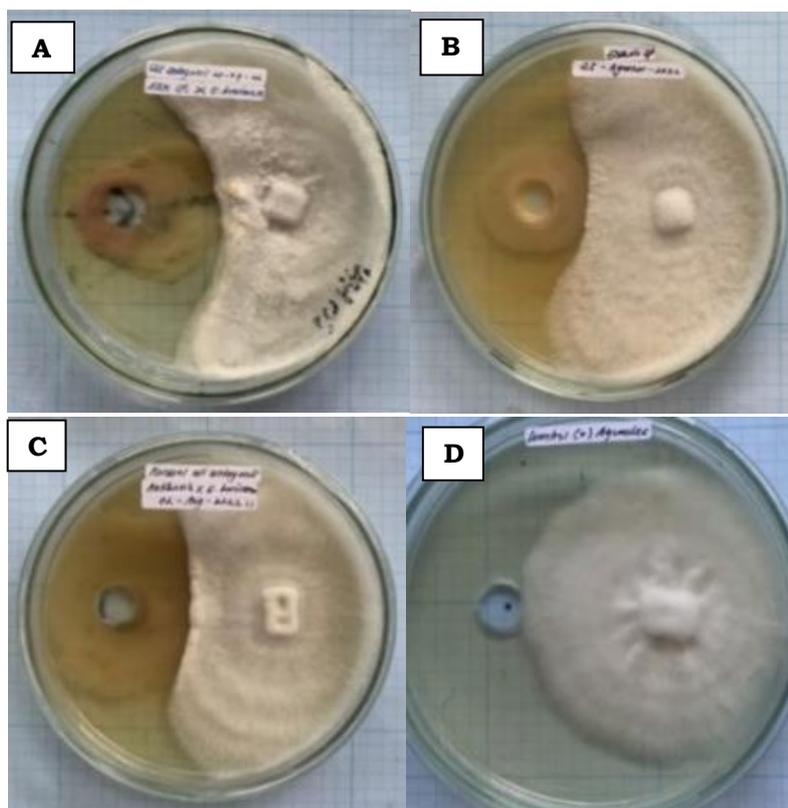
Jenis	Konsentrasi (ppm)	Aktivitas Enzim (U/mL)
EEK SP1	0,19125	0,0288
Enzim SP1	0,19662	0,0296

Berdasarkan nilai aktivitas pada Tabel 3 diketahui bahwa aktivitas enzim kitinase hasil pemekatan lebih tinggi yaitu 0,0296 U/mL dibandingkan dengan EEK *Actinobacteria* yaitu 0,0288 U/mL. Hal ini disebabkan oleh tingkat kemurnian enzim kitinase yang telah dipekatkan dengan amonium sulfat 70%. Menurut Putri dkk., (2013), penambahan amonium sulfat mampu memisahkan enzim dari campuran senyawa-senyawa lainnya seperti karbohidrat, vitamin, dan lemak sehingga enzim yang dihasilkan lebih murni. Semakin tinggi nilai aktivitas enzim maka semakin murni pula enzim tersebut.

Selain kemurnian enzim, tingginya aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh pH dan suhu. Pada penelitian ini pengukuran aktivitas enzim kitinase *Actinobacteria* menggunakan pH 7 dengan suhu 30°C. Enzim dengan pH yang optimum akan menyebabkan aktivitas enzim yang optimum juga. Hal ini sesuai dengan penelitian Orinda dkk., (2015), yang menunjukkan bahwa aktivitas kitinase bakteri asal limbah kulit udang meningkat dengan pH mencapai 6,5 dan suhu 25-45°C dengan aktivitas kitinase sebesar 0,09 U/mg. Penelitian Hardi dkk., (2016), juga menyatakan aktivitas enzim kitinase isolat B1211 dengan suhu 30°C memiliki aktivitas tertinggi sebesar 0,75 U/mL.

Kemampuan Daya Hambat EEK dan Enzim Kitinase bakteri *Actinobacteria* terhadap *Ganoderma boninense*

Hasil uji daya hambat menunjukkan bahwa EEK dan enzim kitinase *Actinobacteria* hasil pemekatan isolat SP1 memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan *Ganoderma boninense*. Pertumbuhan *G. boninense* akan terganggu akibat adanya EEK dan enzim kitinase *Actinobacteria* hasil pemekatan yang ditumbuhkan bersama pada media jika dibandingkan dengan kontrol positif antibiotik dan kontrol negatif aquades, dan diinkubasi selama 10 hari (Gambar 6).



Gambar 6. Kemampuan Daya Hambat Actinobacteria Terhadap *G. boninense* (A). EEK Actinobacteria dan *G. boninense*; (B) Enzim kitinase hasil pemekatan dan *G. boninense*; (C). Antibiotik dan *G. boninense*; (D) Kontrol aquades.

Berdasarkan data yang didapatkan, diketahui bahwa EEK dan enzim kitinase *Actinobacteria* hasil pemekatan memiliki kemampuan daya hambat yang tinggi terhadap *G. boninense*. Persentase daya hambat menggunakan enzim kitinase hasil pemekatan dengan daya hambat menggunakan EEK yaitu 57,3% dibandingkan dengan daya hambat menggunakan EEK yaitu 56,6%.

Persentase daya hambat yang dihasilkan oleh EEK dan enzim kitinase *Actinobacteria* hasil pemekatan terhadap *G. boninense* berbanding lurus dengan pengukuran aktivitas enzimnya. Aktivitas enzim kitinase *Actinobacteria* hasil pemekatan memiliki nilai lebih tinggi yaitu 0,0296 U/mL dibandingkan dengan aktivitas EEK *Actinobacteria* yaitu 0,0288 U/mL. Semakin tinggi nilai aktivitas enzim maka semakin tinggi pula nilai kemurniannya serta memiliki kemampuan yang baik dalam menghambat jamur patogen. Hal ini sesuai dengan Yuniati dkk., (2015), Guo dkk., (2019), yang menyatakan bahwa semakin tinggi aktivitas enzim maka semakin tinggi pula tingkat kemurnian enzim tersebut serta aktivitas antifungal yang disebabkan oleh *Actinobacteria* kitinolitik akan lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas antifungal *Actinobacteria* non-kitinolitik.

Mekanisme penghambatan oleh EEK dan enzim kitinase *Actinobacteria* hasil pemekatan dapat diketahui melalui pengamatan secara

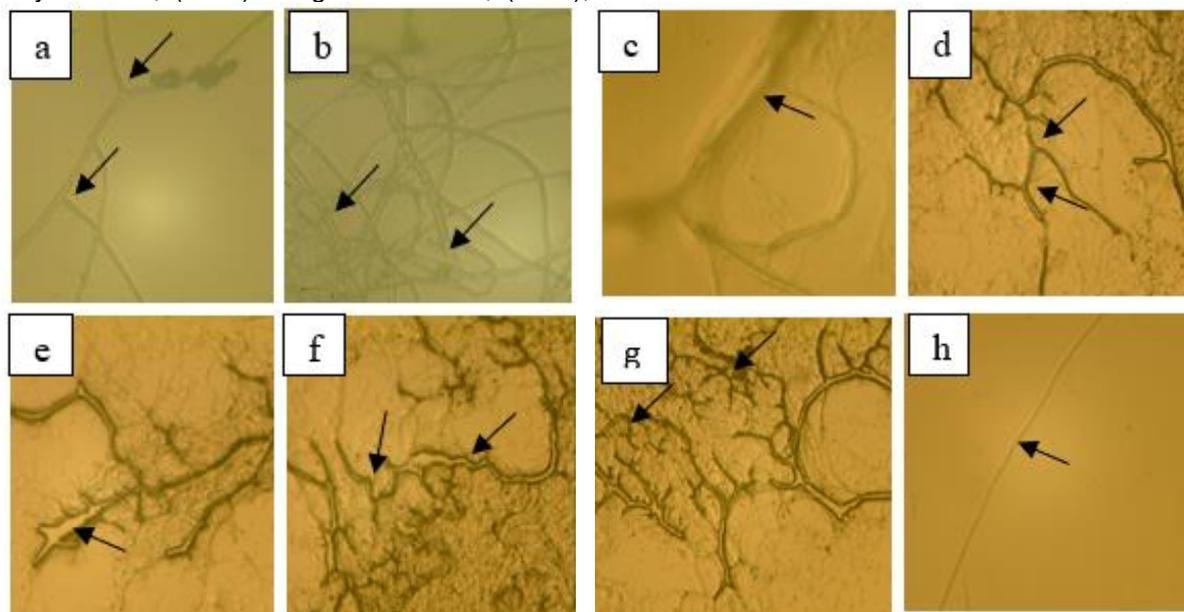
makroskopis dan mikroskopis. Mekanisme antibiosis secara makroskopis ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambatan disekitar EEK dan enzim kitinase *Actinobacteria* hasil pemekatan (Gambar 6).

Mekanisme antibiosis oleh EEK dan enzim kitinase *Actinobacteria* hasil pemekatan dapat menyebabkan perubahan bentuk hifa jamur patogen *G. boninense*. Untuk memperjelas hal tersebut dapat dilakukan pengamatan hifa secara mikroskopis. Kerusakan hifa yang disebabkan mekanisme antibiosis oleh EEK dan enzim kitinase *Actinobacteria* isolat SP1 yaitu hifa bercabang, hifa melengkung, hifa melilit, hifa membesar, hifa berkelok, dan hifa keriting (Gambar 10). Kerusakan hifa inilah yang menyebabkan pertumbuhan *G. boninense* terhambat. Hal ini sesuai dengan Hanif dkk., (2012), yang menyebutkan bahwa mekanisme penghambatan jamur patogen oleh mikroorganisme dapat menyebabkan abnormalitas hifa seperti pembengkokan ujung hifa, hifa pecah, hifa melilit, hifa melengkung, hifa terbelah, hifa bercabang, hifa lisis dan hifa kerdil.

Berdasarkan kerusakan hifa *G. boninense* pada gambar 7, menunjukkan bahwa penghambatan menggunakan enzim kitinase *Actinobacteria* hasil pemekatan lebih baik dibandingkan dengan penghambatan

menggunakan EEK *Actinobacteria*. Hal ini dapat dilihat dari penampakan kerusakan hifa *G.boninense* oleh enzim kitinase hasil pemekatan yang lebih rusak dan tidak beraturan. Hasil pengamatan membuktikan semakin tinggi kemurnian enzim maka semakin tinggi aktivitas enzim yang berakibat banyaknya kerusakan pada hifa *G. boninense* yang mempengaruhi daya pertumbuhan *G. boninense* itu sendiri. Menurut Sriyanti dkk., (2015) Pangemanan dkk., (2020),

enzim kitinase menyebabkan terjadinya abnormalitas hifa jamur patogen tanaman dan efektif menghambat pertumbuhan jamur. Enzim kitinase merupakan enzim hidrolitik yang menghidrolisis ikatan β -1,4 antar subunit N-asetilglukosamin (GlcNAc) pada polimer kitin rusaknya polimer kitin yang merupakan salah satu komponen dinding sel jamur patogen tanaman dapat menghambat pertumbuhan jamur patogen tanaman.



Gambar 7. Pengamatan Mikroskopis Hifa Abnormal *G. boninense*. Daya Hambat EEK *Actinobacteria* terhadap *G.boninense* (a) hifa normal; (b) hifa bercabang; (c) hifa melilit; (d) hifa membesar. Daya Hambat Enzim kitinase *Actinobacteria* Hasil Pemekatan Terhadap *G. boninense* (e) hifa bercabang; (f) hifa membesar/membengkak; (g) hifa berkelok; (h) hifa keriting.

KESIMPULAN

Enzim Ekstrak Kasar (EEK) dan enzim kitinase *Actinobacteria* hasil pemekatan memiliki aktivitas enzim yang tinggi. Akan tetapi, aktivitas enzim kitinase hasil pemekatan lebih tinggi yaitu 0,0296 U/mL dibandingkan dengan EEK *Actinobacteria* yaitu 0,0288 U/mL. Enzim kitinase *Actinobacteria* memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan jamur patogen *G. boninense*. Persentase daya hambat menggunakan enzim kitinase hasil pemekatan memiliki nilai lebih tinggi yaitu 57,3% dibandingkan dengan daya hambat menggunakan EEK yaitu 56,6%.

DAFTAR PUSTAKA

Amaria, W., R. Harni dan Samsudin. 2015. Evaluasi Jamur Antagonis dalam Menghambat Pertumbuhan *Rigidoporus microsporus* Penyebab Penyakit Jamur Akar Putih pada Tanaman Karet. *J. TIDP*. Vol. 2 (1) : 51-60.

Amanullah R., M. Bahar, H. Muktamiroh dan O. Sandra. 2020. Aktivitas Isolat *Actinomycetes* Dari Tanah Kebun Raya Bogor Sebagai Antifungi Terhadap Pertumbuhan *Candida albicans* Secara In Vitro. *Bioeduscience*. Vol. 4 (1) : 90-96.

Dhanasekaran dan Y. Jiang. 2016. *Actinobacteria : Basics and Biotechnological Applications*. Croatia : InTech.

Fathurahman, A. T. 2019. *Actinobacteria : Sumber Biokatalis Baru yang Potensial*. *BioTrends*. Vol. 10 (1) : 28-35.

Guo, X., N. Liu., X. Li., Y. Ding., F. Shang., Y. Gao., J. Ruang dan Y. Huang. 2015. Red Soils Harbor Diverse Culturable *Actinomycetes* That are Promising Sources of Novel Secondary Metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 81 (9) : 3086-3103.

Haedar, N., H. Natsir., Fahrudin dan W. Aryanti. 2017. Produksi dan Karakterisasi Enzim kitinase dari Bakteri Kitinolitik Asal Kerang *Andara granosa*. *Jurnal Ilmu Alam dan*

- Lingkungan*. Vol. 8 (15) : 14-21.
- Hanif, A., D. Suryanto dan I. Nurwahyuni. 2012. Pemanfaatan Bakteri Kitinolitik dalam Menghambat Pertumbuhan *Curvularia* sp. Penyebab Penyakit Bercak Daun pada Tanaman Mentimun. *Jurnal USU*. Vol. 1 (1) : 1- 7.
- Hardi, J., Jusman., A. R. Razak dan Silva. 2016. Produksi dan Uji Aktivitas Enzim kitinase dari Isolat Bakteri Termofilik B1211 Asal Air Panas Bora. *KOVALEN*. Vol. 2 (3) : 67-72.
- Khikmah, N., S. Margino dan R. S. Kasiamdari. 2016. Isolasi, Seleksi dan Identifikasi Kapang Kitinolitik yang diisolasi dari Tanah Pembuangan Limbah Udang dan Rhizosfer Solanaceae. *Biota*. Vol. 1 (1) : 1-8.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko., D. A. Stahl dan D. P. Clark. 2011. *Brock Biology Of Microorganisms*. San Fransisco : Benjamin Cummings, Pearson.
- Nafiah, H., S. Pujiyanto dan B. Raharjo. 2017. Isolasi Uji Aktivitas Kitinase Isolat Bakteri Dari Kawasan Geotermal Dieng. *Bioma*. Vol. 19 (1) : 22-29.
- Nurmalinda, A., N. R. Mubarik dan L. Sudirman. 2020. Seleksi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Kitinase Penghambat Pertumbuhan Cendawan Patogen Tanaman. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. Vol. 25 (1) : 35-42.
- Oktavia, Y., S. D. Lestari., S. Lestari., Herpandi dan M. Jannah. 2018. Optimasi Waktu Inkubasi Produksi Protease dan Amilase Isolat Bakteri Asal Ikan Teri *Stolephorus* sp.. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. Vol. 10 (3) : 719-725.
- Orinda, E., I. D. Puspita., M. P. Putra., Ustadi dan I. Y. B. Lelana. 2015. Aktivitas Enzim Pendegradasi Kitin Dari Isolat SDI23 Asal Petis Serta Karakterisasi ph dan Suhu Aktivitas Enzim Hasil Purifikasi Parsial. *Jurnal Perikanan*. Vol. 17 (2) : 96-102.
- Pangemanan, F. E., I. B. G. Darmayasa dan J. Wiryanto. 2020. Potensi Enzim kitinase Yang Dihasilkan Bakteri Kitinolitik Yang Di Isolasi Dari Limbah Kulit Udang Sebagai Kandidat Biokontrol Dalam Mengendalikan Hama Penyakit Tanaman. *SIMBIOSIS*. Vol. 8 (1) : 1-8.
- Parwati, P. A., R. Kawuri dan N. L. Watiningsih. 2018. Isolasi dan Identifikasi Streptomyces spp. Penghasil Enzim kitinase Dari Lumpur Selokan. *JURNAL METAMORFOSA*. Vol. 5 (2) : 99-104.
- Yuniati, R., T. T. Nugroho dan F. Puspita. 2015. Uji Aktivitas Enzim Protease Dari Isolat *Bacillus* sp. Galur Lokal Riau. *JOM FMIPA*. Vol. 1 (2) : 116-122.
- Zivkovic, S., S. Stojanovic., Z. Ivanovic., V. Gavrilovic., T. Popovicand J. Balaz. 2010. Screening of Antagonistic Activity of Microorganisms against *Collectotrichum acutatatum* and *Collectotrichum gloeosporioides*. *Arch. Biol. Sci*. Vol. 62 (3) : 611-623