

**SKRINING AMILASE, LIPASE DAN PROTEASE DARI BAKTERI ENDOFIT
DAUN CIPLUKAN (*Physalis angulata* L.)**

**SCREENING OF AMYLASE, LIPASE DAN PROTEASE FROM ENDOPHYTIC BACTERIA
OF CIPLUKAN LEAVES (*Physalis angulata* L.)**

Oktavia Widya Nursanti*, Winni Astuti, dan Ritbey Ruga

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman
Jalan Barong Tongkok, Kampus Gn. Kelua, Samarinda 75123, Kalimantan Timur, Indonesia

*Corresponding Author: winniastuti@gmail.com

Received: 20 April 2022, Accepted: 30 April 2022

ABSTRACT

Endophytic bacteria is one of the source of extracellular enzymes producer. Enzymes that produced by endophytic bacteria are more beneficial because they can be cultured in small spaces with big quantities, relatively fast time and cheaper production costs compared to the sources of enzyme from plants and animals. This study was conducted to obtain amylase, lipase and protease from endophytic bacteria of ciplukan leaves (*Physalis angulata* L.). The research method used is experimental, by isolating endophytic bacteria from ciplukan leaves (*Physalis angulata* L.) in Nutrient Agar (NA) media and screening tests of extracellular enzyme activity from endophytic bacteria isolates. The isolation results was obtained 24 endophytic bacteria isolates that 4 bacteria isolates produce amylase, 3 bacteria isolates produce lipase and 2 bacteria produce protease.

Keywords: *Endophytic bacteria, Ciplukan leaves (Physalis angulata L.), Amylase, Lipase, Protease.*

PENDAHULUAN

Ciplukan merupakan tumbuhan liar berupa herba tahunan yang tumbuh subur di dataran rendah sampai dengan ketinggian 1.550 mdpl [1]. Tanaman ini tumbuh secara alami di pinggiran hutan maupun di semak-semak daerah pemukiman. Penyebaran tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.) relatif luas, selain di Indonesia dijumpai pula di kawasan Amerika, Pasifik, Australia dan Asia [2]. Tanaman ciplukan berpotensi menghasilkan bakteri endofit [3].

Bakteri endofit merupakan bakteri yang hidup di dalam jaringan tanaman inang tanpa mengakibatkan gejala penyakit tertentu [4]. Bakteri endofit dapat diisolasi dari jenis tumbuhan monokotil hingga dikotil pada bagian daun, batang maupun akar. Salah satu kontribusi yang diberikan oleh bakteri endofit yakni sebagai penghasil enzim [5].

Enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme lebih menguntungkan dari biaya produksi maupun kuantitas enzim yang dihasilkan bila dibandingkan dengan sumber enzim dari tumbuhan maupun hewan. Enzim amilase, lipase dan protease merupakan enzim hidrolitik yang penggunaannya

dikenal secara luas sebagai pemecah makromolekul karbohidrat, lemak dan protein [6].

Berbagai penelitian telah berhasil memperoleh isolat bakteri endofit sebagai penghasil enzim ekstraseluler. Ginting (2020) memperoleh 5 isolat bakteri endofit yang potensial menghasilkan amilase dari tanaman papaya (*Carica papaya* L.). Marliani (2019) memperoleh 6 isolat bakteri endofit yang menunjukkan adanya aktivitas lipase dari daun *Macaranga hullettii* King ex Hook.f. Rori (2020) juga berhasil memperoleh 6 isolat bakteri endofit yang potensial menghasilkan protease dari tumbuhan mangrove *Avicennia marina*.

Berdasarkan penelitian-penelitian di atas yang menunjukkan bahwa bakteri endofit potensial sebagai penghasil enzim ekstraseluler. Sehingga, penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengisolasi dan menyeleksi bakteri endofit daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) yang potensial sebagai penghasil enzim amilase, lipase dan protease.

METODOLOGI PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *laminar air flow cabinet*, *hot plate*, *magnetic stirrer*, *shaker waterbath*, *beaker glass*, *Hocky stick*, *autoclave*, lampu UV, inkubator, neraca analitik, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, tabung mikro 2 mL, pipet mikro 20-200 μL dan 100-1000 μL , jarum ose, tip 100 dan 1000 μL , gelas ukur 100 mL, spatula, batang pengaduk, labu Erlenmeyer 250 mL, bunsen, korek api, dan vortex.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun ciplukan (*Physalis angulata* L.), akuades, akuabides steril, etanol 95%, bayclin, wipol, aluminium foil, *Nutrient Agar* (NA), amilum, susu skim, Rhodamin B, minyak zaitun, tripton, *yeast extract*, NaCl, kapas, kain kasa dan *plastic wrap*.

Prosedur Penelitian

Isolasi Bakteri Endofit

Daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) dicuci bersih dengan air mengalir dan disterilisasi permukaan secara bertahap menggunakan bayclin (natrium hipoklorit), etanol 95% dan akuades steril dengan melakukan pengeringan pada setiap tahapan. Kemudian daun ciplukan disinari UV selama 30 menit. Kemudian sampel daun yang telah disterilisasi dipotong kecil-kecil secara aseptik di dalam *laminar air flow cabinet* dan disebar pada permukaan media padat *Nutrient Agar* (NA) (2,2%) yang telah memadat lalu diinkubasi selama 16-18 jam pada suhu 37°C. Daerah keruh disekitar daun tersebut menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri endofit. Bakteri endofit hasil isolasi pada media padat NA selanjutnya dibiakkan dengan mengambil satu ose bakteri endofit dan diinokulasikan ke dalam 5 mL media cair Luria Bertani (*yeast extract* 0,5% tripton 1% , dan NaCl 1%) steril. Kemudian bakteri tersebut diinkubasi selama 16-18 jam pada suhu 37°C hingga diperoleh kultur bakteri endofit.

Pemurnian Bakteri Endofit

Pemurnian bakteri endofit dilakukan dengan metode cawan tebar dengan melakukan pengenceran suspensi bakteri pada media cair LB sebanyak 10^4 kali pengenceran ke dalam akuabides steril. Kemudian suspensi bakteri yang telah diencerkan diambil sebanyak 30 μL lalu disebar pada media padat NA dan diratakan menggunakan *Hocky stick*.

Bakteri tersebut diinkubasi selama 16-18 jam pada suhu 37°C. Koloni tunggal yang diperoleh diinokulasikan masing-masing ke dalam 5 mL media cair LB steril dan diinkubasi selama 16-18 jam pada suhu 37°C menggunakan *shaker waterbath* dan diperoleh kultur murni koloni tunggal bakteri endofit.

Pembuatan Kultur Gliserol Stok

Isolat bakteri endofit yang telah dimurnikan masing-masing dibuat gliserol stok dengan mencampurkan 800 μL isolat murni bakteri endofit dan 200 μL gliserol ke dalam tabung mikro 2 mL. Kemudian kultur gliserol stok divortex hingga homogen dan disimpan dalam lemari pendingin pada suhu -20°C.

Skrining Aktivitas Amilase

Skrining aktivitas amilase dilakukan dengan menumbuhkan 1 ose masing-masing isolat bakteri endofit pada permukaan media padat NA yang mengandung amilum (2,2% NA; 1% amilum) steril dengan metode *streak* dan ditumbuhkan selama 16-18 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya diuji dengan menuangkan perlahan larutan iodine pada permukaan media yang telah ditumbuhi bakteri. Aktivitas amilase ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar koloni bakteri.

Skrining Aktivitas Lipase

Skrining aktivitas lipase dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri endofit pada media NA yang mengandung minyak zaitun dan Rhodamin B. Media dibuat dengan komposisi: 2,2% NA dan 1% minyak zaitun kemudian disterililasi dan ditambahkan larutan Rhodamin B steril secara aseptik di dalam *laminar air flow cabinet*. Sebanyak 1 ose masing-masing isolat bakteri endofit ditumbuhkan pada permukaan media padat NA yang mengandung minyak zaitun dan Rhodamin B dengan metode *streak* lalu ditumbuhkan selama 16-18 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya media yang telah ditumbuhi bakteri disinari dibawah lampu UV. Aktivitas lipase ditunjukkan dengan adanya pendar jingga disekitar koloni bakteri di bawah sinar UV.

Skrining Aktivitas Protease

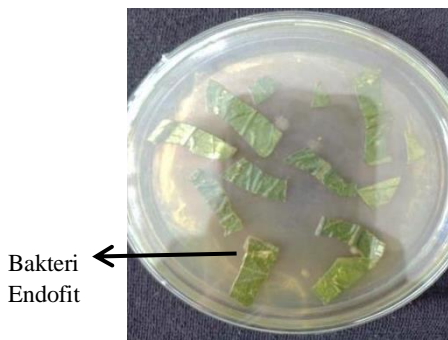
Skrining aktivitas protease dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri endofit pada permukaan media SMA (*Skim Milk Agar*) yang dibuat dengan komposisi: 2,2% NA dan 1% susu skim. Sebanyak 1 ose masing- masing isolat bakteri

endofit ditumbuhkan pada permukaan media SMA dengan metode *streak* dan ditumbuhkan selama 16-18 jam pada suhu 37°C. Aktivitas protease ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar koloni bakteri.

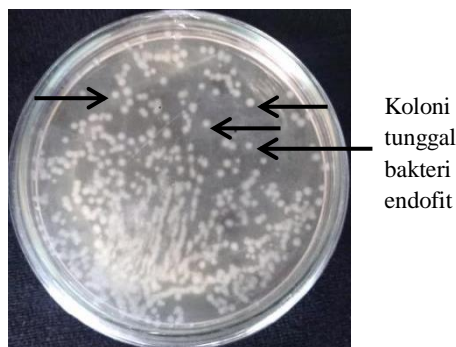
HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Endofit

Hasil isolasi bakteri endofit daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) ditunjukkan dengan adanya daerah keruh disekitar daun ciplukan seperti pada Gambar 1. Bakteri endofit hasil isolasi dibiakkan pada media cair Luria Bertani steril untuk memperoleh kultur bakteri endofit. Selanjutnya dilakukan pemurnian dari kultur bakteri yang diperoleh dengan metode cawan tebar untuk mendapatkan koloni tunggal bakteri endofit. Dari hasil pemurnian bakteri endofit diperoleh 24 koloni tunggal seperti pada Gambar 2.



Gambar 1. Hasil isolasi bakteri endofit



Gambar 2. Hasil pemurnian bakteri endofit

Skrining Aktivitas Enzim Ekstraseluler

Hasil skrining aktivitas enzim ekstraseluler bakteri endofit daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) menunjukkan adanya aktivitas enzim amilase, lipase dan protease. Hal ini membuktikan bahwa bakteri endofit daun ciplukan potensial sebagai penghasil enzim ekstraseluler. Kemampuan produksi enzim dari masing-masing isolat bakteri endofit dapat dilihat pada tabel 1.

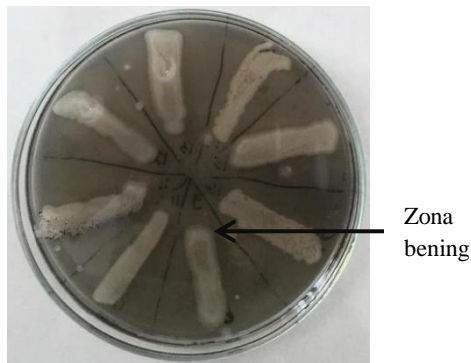
Berdasarkan hasil skrining aktivitas amilase dari 24 isolat bakteri endofit diperoleh 4 isolat

bakteri yang menghasilkan aktivitas amilase yang ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri pada media NA selektif amilum setelah masa inkubasi (Gambar 3). Isolat bakteri yang memiliki aktivitas amilase adalah PA9, PA12, PA13 dan PA15. Pembentukan zona bening pada media setelah ditambahkan larutan iodin menunjukkan bahwa amilum terhidrolisis oleh enzim amilase menjadi gula yang lebih sederhana, sedangkan media yang berwarna biru kehitaman merupakan amilum yang belum terhidrolisis. Menurut Sumardjo [7] karbohidrat yang berantai pendek seperti monosakarida dan disakarida tidak berikatan dengan iodin karena tidak membentuk struktur heliks (melingkar), sedangkan polisakarida umumnya membentuk rantai heliks sehingga dapat berikatan dengan iodin membentuk rantai poliiodida.

Tabel 1. Hasil skrining enzim ekstraseluler

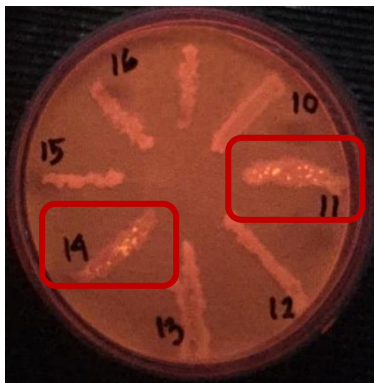
Kode Koloni	Enzim Ekstraseluler		
	Amilase	Lipase	Protease
PA1	-	-	-
PA2	-	-	-
PA3	-	-	-
PA4	-	-	-
PA5	-	-	-
PA6	-	-	-
PA7	-	-	-
PA8	-	-	-
PA9	+	-	-
PA10	-	-	-
PA11	-	+	-
PA12	+	-	-
PA13	+	-	-
PA14	-	+	+
PA15	+	-	-
PA16	-	-	-
PA17	-	-	-
PA18	-	-	-
PA19	-	-	-
PA20	-	-	-
PA21	-	-	-
PA22	-	-	-
PA23	-	+	+
PA24	-	-	-

Ket: (+) Positif menghasilkan enzim ekstraseluler
 (-) Negatif menghasilkan enzim ekstraseluler

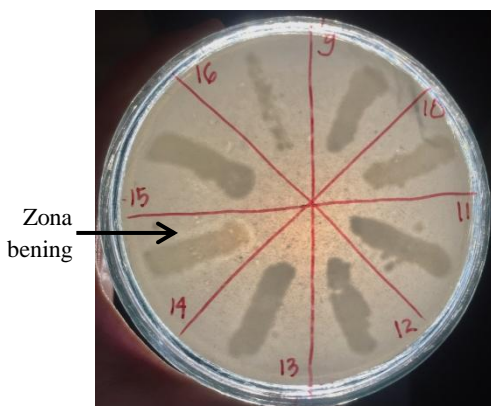


Gambar 3. Hasil skrining aktivitas amilase

Hasil skrining aktivitas lipase dari 24 isolat bakteri endofit menghasilkan 3 isolat bakteri yang menunjukkan aktivitas lipase ditandai dengan adanya pendaran jingga dibawah radiasi sinar UV (Gambar 4). Isolat bakteri yang menunjukkan hasil positif adalah PA11, PA14 dan PA25. Reaksi hidrolisis yang dikatalisis oleh lipase dengan substrat minyak zaitun menghasilkan produk berupa asam lemak bebas dan gliserol. Pendaran jingga yang terbentuk merupakan reaksi antara rhodamin B dan asam lemak bebas membentuk suatu senyawa kompleks dan berpendar disekitar koloni dibawah radiasi sinar UV. Besarnya zona pendaran menunjukkan kemampuan lipolitik dari koloni bakteri tersebut [8].



Gambar 4. Hasil skrining aktivitas lipase



Gambar 5. Hasil skrining aktivitas protease

Berdasarkan hasil skrining aktivitas protease dari 24 isolat bakteri endofit diperoleh 2 isolat yang menunjukkan hasil positif ditandai dengan adanya zona bening disekitar koloni pada media SMA (*Skim Milk Agar*) (Gambar 5). Isolat yang memiliki aktivitas protease adalah PA14 dan PA23. Pembentukan zona bening pada media SMA menunjukkan bahwa terjadi pemutusan ikatan peptida pada protein yang dikatalisis oleh protease menjadi unit peptida yang lebih sederhana [9]. Besarnya zona bening yang terbentuk menunjukkan kemampuan protease dalam menghidrolisis substrat. Enzim protease memiliki kemampuan dalam mengkatalisis proses pemecahan dari protein kasein yang terdapat pada susu skim menjadi peptida-peptida yang lebih sederhana dan asam amino [10].

KESIMPULAN

Bakteri endofit dari daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) menghasilkan 24 isolat bakteri dan potensial sebagai penghasil enzim ekstraseluler yaitu 4 isolat bakteri positif menghasilkan amilase, 3 isolat bakteri positif menghasilkan lipase dan 2 isolat bakteri positif menghasilkan protease.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Wijoyo, P. M. 2008. *Sehat dengan Tanaman Obat*. Jakarta: Bee Media Indonesia.
- [2] Ratri, W. S. dan Darini, M. T. 2016. Peluang Ekonomi Tanaman Ciplukan (*Physalis angulata* L.) Sebagai Abate Alami. *Jurnal Sciencetech* 2(1).
- [3] Utami, A. W. A. dan Munarti. 2020. Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria in Ciplukan Plant (*Physalis angulata*). *Indonesian Journal of Biology Education*, 3(1), 1-5.
- [4] Bhore, S. J. and Sathisha, G. 2010. Screening of Endophytic Colonizing Bacteria for Cytokinin-like Compounds: Crude Cell-free Broth of Endophytic Colonizing Bacteria Is Unsuitable In Cucumber Cotyledon Bioassay. *World Journal of Agricultural Sciences*, 6, 345-352.
- [5] Ginting, L., Wijanarka dan Kusdiyantini, E. 2020. Isolasi Bakteri Endofit Tanaman Pepaya (*Carica papaya* L.) dan Uji Aktivitas Enzim Amilase. *Jurnal Berkala Bioteknologi*, 3(2).
- [6] Supriyatna, A., Amalia, D., Jauhari, A. A. dan Holydaziah, D. 2015. Aktivitas Enzim Amilase, Lipase, dan Protease dari Larva. *Jurnal ISTEK* 9(2).
- [7] Sumardjo, D. 2009. *Pengantar Kimia Buku Panduan Kuliah Mahasiswa Kedokteran dan*

- Program Strata 1 Fakultas Bioeksakta.*
Jakarta: EGC.
- [8] Yin, L. and Chrost, R. J. 2006. Microbial Enzymatic Activities in Aerobic Activated Sludge Model Reactor. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 68-572.
- [9] Pricilia, S., Astuti, W. dan Marlina E. 2018. Skrining Bakteri Endofit Penghasil Amilase, Lipase dan Protease dari Daun *Macaranga hullettii* King ex Hook.f. *Jurnal Atomik* 3(2).
- [10] Rori, C. A., Kandou, F. E. F. dan Tangapo, A. M. 2019. Aktivitas Enzim Ekstraseluler dari Bakteri Endofit Tumbuhan Mangrove *Avicennia marina*. *Jurnal Bios Logos* 10(2).