

**Bidang Fokus/Unggulan: KEMARITIMAN
Fakultas: MIPA**

**LAPORAN AKHIR
RISET DASAR UNGGULAN UNSRAT**



**ANALISIS STRUKTUR KOMUNITAS MIKROBA YANG
BERASOSIASI DENGAN MANGROVE DI KOTA MANADO
DENGAN METODE *CULTURE-DEPENDENT***

**Dr. Agustina Monalisa Tangapo, S.Si., M.Si./ NIDN 0002088301 (Ketua)
Feiby Ester Fany Kandou, S.Si., M.Kes./ NIDN 0021026902 (Anggota)
Pience Veralyn Maabuat, SSi., M.Si./ NIDN 0008028005 (Anggota)**

UNIVERSITAS SAM RATULANGI

Oktober 2019

Dibiayai oleh:
Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) Universitas Sam Ratulangi
Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi
Nomor: SP DIPA - 042.01.2.400959/2019 tanggal 5 Desember 2018



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS SAM RATULANGI
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
Alamat : Kampus UNSRAT Manado
Telp : (0431) 827560, Fax. (0431) 827560
Email : lppm@unsrat.ac.id Laman : http://lppm.unsrat.ac.id

HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR

RDUU

Judul Kegiatan ANALISIS STRUKTUR KOMUNITAS MIKROBA YANG BERASOSIASI DENGAN MANGROVE DI
KOTA MANADO DENGAN METODE CULTURE-DEPENDENT

Ketua Peneliti

Nama Lengkap : AGUSTINA MONALISA TANGAPO
Perguruan Tinggi : Universitas Sam Ratulangi
NIP/NIK : 198308022006042004
NIDN : 0002088301
Jab. Fungsional : Asisten Ahli
Unit Kerja :
Nomor HP :
Alamat Email : agustina.tangapo@unsrat.ac.id
Usulan Biaya : 40.000.000
Biaya Maksimum : 39.000.000
Lama Penelitian : 6 bulan

Anggota Peneliti (1)

Nama Lengkap : FEBBY ESTER FANY KANDOU
NIP : 196902271997032001
NIDN : 0021026902
Perguruan Tinggi : Universitas Sam Ratulangi

Anggota Peneliti (1)

Nama Lengkap : PIENCE VERALYN MAABUAT
NIP : 198002082007012002
NIDN : 0008028005
Perguruan Tinggi : Universitas Sam Ratulangi



Prof. Dr. Benny Pinontoan, M.Sc.
NIP 196606041995121001



Manado, 10 Oktober 2019
Ketua Peneliti

AGUSTINA MONALISA TANGAPO
NIP 198308022006042004



RINGKASAN

Umumnya mikroba hidup pada satu habitat membentuk suatu komunitas. Tanaman hidup berasosiasi dengan mikroba yang sangat beragam. Tanaman menyediakan *niche* yang sangat luas dan bervariasi untuk mikroba. Tanaman berasosiasi dengan mikroba pada rizosfer, filosfer (epifit) dan di dalam jaringan tanaman (endofit). Mikroba yang terdapat pada akar dan daerah rizosfer tanaman mendapat keuntungan dari eksudat yang dikeluarkan oleh akar, tetapi beberapa mikroba dapat masuk ke dalam tanaman sebagai endofit yang tidak menyebabkan bahaya ataupun penyakit bagi tanaman dan dapat membentuk asosiasi yang saling menguntungkan. Mangrove dikenal sebagai layanan ekologis baik di daerah tropis maupun subtropis dengan menyediakan *niche* bagi berbagai flora, fauna dan mikroba. Komunitas mikroba indigen yang berasosiasi dengan tanaman merupakan sumber yang penting bagi keanekaragaman genetik dan sumber yang kaya akan senyawa metabolit sekunder dengan aktivitas biologi yang luas seperti penghasil protein dan enzim, berperan dalam fiksasi nitrogen dan penyediaan fitohormon yang penting untuk pertumbuhan tanaman, menghasilkan substansi antimikroba seperti antibiotik, menghasilkan siderofor dan meningkatkan resistensi terhadap patogen. Sejauh ini karakterisasi dan analisis komunitas mikroba yang berasosiasi dengan mangrove di Kota Manado belum dilaporkan. Profil komunitas mikroba dapat menjadi sumber informasi yang penting dalam eksplorasi keanekaragaman hayati. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menganalisis mikroba yang berasosiasi dengan tumbuhan mangrove di Kota Manado. Hasil penelitian menunjukkan mikroba yang berasosiasi dengan tumbuhan mangrove baik sebagai endofit maupun rhizobakteri yang berhasil diisolasi sangat beragam. Mikroba yang diperoleh mencakup kelompok bakteri, fungi, dan aktinomycetes.

Keyword: komunitas mikroba, mangrove, endofit, rizosfer

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yesus Kristus, atas berkat dan anugerah-Nya, sehingga kami dapat melaksanakan kegiatan penelitian dengan judul “Analisis Struktur Komunitas Mikroba Yang Berasosiasi Dengan Mangrove Di Kota Manado Dengan Metode *Culture-Dependent*”. Kegiatan penelitian ini merupakan perwujudan salah satu Tri Dharma Perguruan Tinggi. Kegiatan ini merupakan awal dari rencana penelitian besar tentang bioprospeksi mikroba yang berasosiasi dengan tumbuhan mangrove di Kota Manado, baik sebagai endofit maupun mikroba rhizosfer.

Dalam kesempatan ini, kami menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. LPPM Universitas Sam Ratulangi yang telah memberikan dukungan dana dalam pelaksanaan kegiatan penelitian ini.
2. Dekan FMIPA Unsrat yang telah mendorong pelaksanaan kegiatan penelitian ini.
3. Mahasiswa dan para pembantu lapangan yang telah membantu dalam penelitian ini.

Akhir kata, semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat sebagai informasi tentang keanekaragaman hayati mikroba endofit dan rhizosfer tumbuhan mangrove Kota Manado.

Manado, 22 Oktober 2019

Ketua Pelaksana

Dr. Agustina Monalisa Tangapo

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	2
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	7
BAB 4. METODE PENELITIAN	9
BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	12
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	16
DAFTAR PUSTAKA	17
LAMPIRAN	20

DAFTAR TABEL

Tabel 1	Jumlah Total Mikroba	14
---------	----------------------------	----

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	Kolonisasi bakteri endofit.....	4
Gambar 2	<i>Road map</i> penelitian.....	9
Gambar 3	Diagram alir penelitian tahun 2019	9
Gambar 4	Media yang digunakan.....	12
Gambar 5	Mangrove <i>Avicennia</i> , <i>Rhizophora</i> , dan <i>Sonneratia</i>	13
Gambar 6	Sterilisasi permukaan sampel.....	13
Gambar 7	Sampel yang telah disterilisasi.....	14
Gambar 8	Hasil isolasi bakteri dan jamur	15
Gambar 9	Pengamatan makroskopis dan mikroskopis mikroba	16

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Surat Tugas Penelitian.....	20
Lampiran 2	Bukti luaran yang didapatkan	21
Lampiran 3	Dokumentasi penelitian	28

BAB 1. PENDAHULUAN

Umumnya tanaman hidup berasosiasi dengan mikroba yang sangat beragam. Tanaman menyediakan *niche* yang sangat luas dan bervariasi untuk mikroba. Tanaman berasosiasi dengan mikroba pada rizosfer, filosfer (epifit) dan di dalam jaringan tanaman (endofit). Mikroba yang terdapat pada akar dan daerah rizosfer tanaman mendapat keuntungan dari eksudat yang dikeluarkan oleh akar, tetapi beberapa mikroba dapat masuk ke dalam tanaman sebagai endofit yang tidak menyebabkan bahaya ataupun penyakit bagi tanaman dan dapat membentuk asosiasi yang saling menguntungkan (Hallman dkk., 1997).

Beberapa tahun terakhir penggalian sumber daya mikroba yang berasosiasi dengan tanaman mendapat banyak perhatian. Aktivitas interaksi kumpulan bakteri yang berasosiasi dengan tanaman tersebut dapat memberikan keuntungan bagi tanaman dalam proses perkembangan tanaman, suplai nutrisi, peningkatan pertumbuhan tanaman dan perlindungan terhadap patogen. Mikroba rizosfer berperan penting dalam membantu pertumbuhan dan meningkatkan kesehatan ekologi tanaman inangnya melalui mekanisme langsung maupun tidak langsung (Hallmann dkk., 1997). Berbagai penelitian tentang komunitas bakteri yang berasosiasi dengan tanaman baik sebagai endofit maupun yang hidup pada tanah rizosfer telah berkembang cukup pesat mengingat pentingnya kontribusi komunitas bakteri tersebut. Komunitas bakteri tersebut dapat mendukung pertumbuhan tanaman dan meningkatkan serapan unsur hara dengan menghasilkan hormon pertumbuhan tanaman seperti giberelin dan *indole-3-acetic acid* (IAA) (Khan dkk., 2014; Nagata dkk., 2015) dan fiksasi nitrogen (Khan dan Doty, 2009). Selain itu, bakteri endofit juga dapat menghasilkan enzim, substansi antimikroba seperti antibiotik, menghasilkan siderofor dan meningkatkan resistensi terhadap patogen (Sessitsch dkk., 2004; Strobel dkk., 2004). Bakteri endofit memiliki potensi untuk menghasilkan metabolit-metabolit sekunder yang sangat luas cakupan fungsinya, yang dapat diaplikasikan untuk bidang kesehatan, pertanian dan industri (Strobel dkk., 2004; Yu dkk., 2010).

Mangrove hidup di daerah tropik dan subtropik, terutama pada garis lintang 25° LU dan 25° LS. Interaksi yang terjadi pada ekosistem mangrove menunjukkan

keanekaragaman yang tinggi termasuk mikroba (Sengupta, 2010). Tumbuhan mangrove termasuk tumbuhan halofit yaitu dapat hidup dalam lingkungan dengan kadar garam tinggi (salin) seperti lingkungan di daerah pesisir pantai dan di sekitar negara tropis maupun subtropis (Snedaker, 1978). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa bakteri endofit asal tumbuhan mangrove di India menunjukkan aktivitas antibiotik, memfiksasi nitrogen, pelarut fosfat dan penghasil hormon IAA, menghasilkan enzim pektinase, protease, kitinase, dan lipase (Gayahtri dkk., 2010; Gayathri dan Muralikrishnan, 2014).

Komunitas mikroba indigen yang berasosiasi dengan tanaman merupakan sumber yang penting bagi keanekaragaman genetik dan sumber yang kaya akan senyawa metabolit sekunder dengan aktivitas biologi yang luas. Menurut Strobel dkk. (2004), bahwa bakteri endofit yang berada di daerah tropis jumlahnya lebih banyak dan beragam serta dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang lebih banyak dibandingkan dengan bakteri endofit dari tanaman daerah subtropis.

Fokus penelitian tentang analisis komunitas mikroba yang berasosiasi dengan tumbuhan mangrove di Kota Manado termasuk potensi fungsionalnya secara komprehensif hingga saat ini belum dilakukan, sementara Indonesia memiliki sekitar 27% dari total hutan mangrove dunia (Arobaya dan Wanma, 2006). Genus tumbuhan mangrove yang paling banyak ditemui di Indonesia adalah *Avicennia* dan *Rhizophora* (Rusila dkk., 2006). Luas hutan mangrove di Indonesia tercatat 3.741.533 Ha, termasuk seluas 181.459 Ha di Sulawesi. Di pesisir bagian utara Molas-Wori terdapat hutan mangrove seluas 235 ha. Hal ini menjadikan mangrove menjadi sumber keanekaragaman hayati yang tinggi yang dapat dieksplorasi termasuk mikroba yang berasosiasi dengan tumbuhan mangrove tersebut. Sejauh ini belum ada laporan tentang profil mikroba baik rizosfer maupun endofit yang berasosiasi dengan tumbuhan mangrove di Kota Manado. Penelitian ini merupakan penelitian dasar yang sangat penting untuk dikaji, karena luarannya berupa profil fungsional komunitas mikroba yang dapat diaplikasikan lebih lanjut. Ketersediaan mikroba dan informasi profil fungsionalnya dalam penelitian ini dapat menunjang pengembangan penelitian unggulan Universitas Sam Ratulangi dalam hal eksplorasi mikroba yang berpotensi penghasil metabolit

sekunder untuk pengembangan obat-obatan berbasis bahan baku alami dan pemanfaatan sumber daya alam hayati. Selain itu, kemampuan mikroba rizosfer untuk memacu pertumbuhan tanaman dapat menunjang pemanfaatan mikroba sebagai agen hayati yang dapat mengurangi penggunaan pupuk kimia dan pestisida sehingga menunjang peningkatan mutu dan keamanan pangan.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

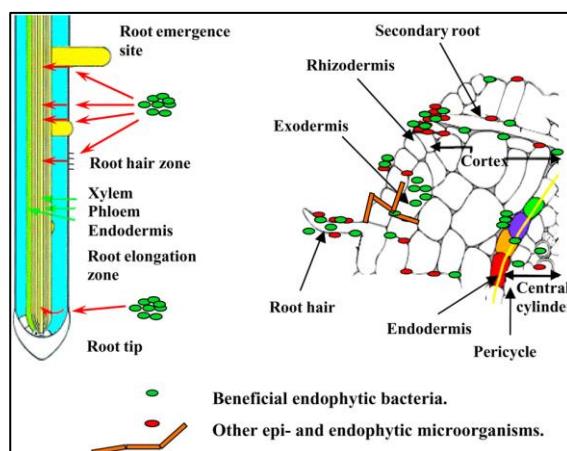
2.1 Keragaman Mikroba yang Berasosiasi dengan Tanaman

Mikroba yang terdapat pada akar dan daerah rizosfer tanaman mendapat keuntungan dari eksudat yang dikeluarkan oleh akar, tetapi beberapa mikroba dapat masuk ke dalam tanaman sebagai endofit yang tidak menyebabkan bahaya ataupun penyakit bagi tanaman dan dapat membentuk asosiasi yang saling menguntungkan (Hallman dkk., 1997). Komunitas mikroba tanah merupakan komunitas paling kompleks, beranekaragam dan memiliki peranan yang penting dan unik dalam fungsi ekosistem dan dalam sebagai penyusun biosfer. Lapisan tanah yang menutupi permukaan akar tanaman yang masih dipengaruhi oleh aktivitas akar dikenal sebagai daerah rizosfer. Pada daerah inilah umumnya akar tanaman yang berinteraksi dengan bakteri (Hardoim dkk., 2008).

Bakteri perakaran dan di daerah rizosfer dapat memanfaatkan eksudat akar. Daerah rizosfer merupakan mikrohabitat tanah yang paling tinggi diversitasnya dan titik dimana aktivitas mikroba paling besar. Bakteri rizosfer dapat masuk ke dalam jaringan tanaman membentuk bakteri endofit melalui rambut akar, zona pemanjangan, ujung akar dan pada titik munculnya akar sekunder, yang kemudian berkolonisasi sel-sel tumbuhan dan ruang intersel, bahkan juga xilem dan jaringan vaskular (Complant dkk., 2010. Genus *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* dan *Bacillus* merupakan bakteri yang umum ditemukan di daerah rizosfer. Umumnya densitas populasi bakteri endofit lebih sedikit dibandingkan bakteri yang hidup di rizosfer atau bakteri patogen (Hallman dkk., 1997).

Jumlah bakteri endofit berkisar antara 10^3 – 10^5 CFU/g jaringan tanaman. Densitas bakteri endofit paling tinggi terdapat pada bagian akar dan semakin menurun dari batang ke daun (Quadt-Hallman dan Kloeppe, 1996). Hal ini menunjukkan bahwa kolonisasi bakteri banyak terjadi di jaringan akar dan akar merupakan bagian utama dimana endofit masuk ke dalam jaringan tanaman, selain yang bakteri yang dibawa oleh biji. Hal inilah yang mungkin menjelaskan hubungan yang dekat antara bakteri endofit dan rizosfer, bahwa sejumlah bakteri endofit fakultatif dapat juga bertahan hidup sebagai bakteri rizosfer.

Bakteri endofit dapat bersifat obligat atau fakultatif. Bakteri endofit obligat dapat bertumbuh dan bertahan hidup tergantung pada tanaman inang. Bakteri endofit fakultatif memiliki tahapan dalam siklus hidupnya yang berada di luar tanaman inang yaitu di lingkungannya terutama tanah. Bakteri yang paling baik beradaptasi untuk hidup dalam jaringan tanamanlah yang terseleksi secara alami sebagai endofit. Umumnya bakteri endofit berasal dari tanah rizosfer, walaupun bakteri endofit yang ditemukan pada jaringan tanaman tembakau tidak ditemukan di tanah. Bakteri endofit yang berasal dari rizosfer diinisiasi dengan menginfeksi tanaman inang melalui kolonisasi dan akar diketahui menjadi tempat koloniasi bakteri (Complant dkk., 2010). Bakteri endofit dapat membentuk koloni pada suatu jaringan tanaman secara sistemik dengan melakukan endosimbiosis, baik di dalam sel maupun dalam jaringan pembuluh tanaman (Gambar 1).



Gambar 1. Kolonisasi bakteri endofit (Complant dkk., 2010).

Bakteri endofit telah diisolasi dari tanaman yang beragam (Sturz dan Nowak, 2000). Berikut adalah genus bakteri yang ditemukan sebagai endofit yaitu *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Aeromonas*, *Afipia*, *Agrobacterium*, *Agromonas*, *Alcaligenes*, *Alcanivorax*, *Allorhizobium*, *Alteromonas*, *Aminobacter*, *Aquaspirillum*, *Arthrobacter*, *Aureobacterium*, *Azoarcus*, *Azomonas*, *Azorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Blastobacter*, *Blastomonas*, *Brachymonas*, *Bradyrhizobium*, *Brenneria*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Chelatobacter*, *Chromobacterium*, *Chryseomonas*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Delftia*, *Dexxia*, *Devasia*, *Enterobacter*, *Flavimonas*, *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Frankia*, *Halomonas*, *Herbaspirillum*, *Matsuebacter*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Moraxella*, *Nevskia*, *Nocardia*, *Ochrabactrum*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Phenylbacterium*, *Phyllobacterium*, *Photobacterium*, *Porphyrobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Ralstonia*, *Renibacterium*, *Rhizobacter*, *Rhizobium*, *Rhizomonas*, *Rhodanobacter*, *Rhodococcus*, *Shewanella*, *Sinorhizobium*, *Sphingobacterium*, *Sphingomonas*, *Spirillum*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Thauera*, *Variovorax*, *Vibrio*, *Xanthomonas*, *Xylella*, *Zoogloea*, *Zymobacter*, *Zymomonas*. Beberapa dari bakteri-bakteri tersebut merupakan jenis yang dominan yang diisolasi dari tanaman, paling sering ditemukan dan terdapat dalam jumlah yang besar. Genus *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* dan *Agrobacterium* merupakan genus bakteri endofit yang melimpah yang berhasil diisolasi (Hallman dkk., 1997). Bakteri genus *Bacillus* dan *Pseudomonas* merupakan genus yang sering ditemukan sebagai bakteri endofit yang mudah dikultur dan diidentifikasi dengan pendekatan kultivasi. Selain jenis yang dominan, terdapat juga jenis yang jarang ditemukan, yaitu jenis yang tidak mudah untuk diisolasi karena jumlahnya yang rendah terus menerus.

2.2 Potensi Mikroba Rizosfer dan Endofit

Hasil-hasil penelitian menunjukkan bahwa mikroba rizosfer dan endofit dapat memberikan manfaat bagi tanaman inang dalam interaksi mutualisme antara keduanya. Bagi tanaman inang, mikroba tersebut memberikan nutrisi bagi tanaman inang dan memberikan perlindungan stres biotik. Manfaat tersebut

diperoleh dari adanya metabolit sekunder, fitohormon, nutrisi yang disediakan oleh mikroba endofit. Mikroba endofit merupakan sumber yang penting bagi keanekaragaman genetik dan sumber yang kaya akan senyawa metabolit sekunder dengan aktivitas biologi yang luas. Mikroba endofit dapat menghasilkan protein dan enzim yang penting. Bakteri endofit *Azozrcus* sp. dan *Pseudomonas fluorescens* menghasilkan enzim pektinolitik yang membantu mereka masuk ke dalam jaringan tanaman (Hallmann dkk., 1997).

Saat ini belum dapat diketahui secara pasti apakah tanaman lebih mendapatkan keuntungan dari bakteri endofit daripada bakteri rizosfer, tetapi yang telah dapat dijelaskan adalah bahwa asosiasi bakteri endofit maupun bakteri rizosfer dengan tanaman berpotensi dalam perlindungan tanaman dan kontrol biologi. Mekanisme PGPB meningkatkan pertumbuhan tanaman dapat dilakukan secara langsung atau tidak langsung. Mekanisme secara langsung seperti kemampuan bakteri untuk produksi hormon pertumbuhan, membantu dengan penyediaan nutrient dari lingkungan yang dapat diserap oleh tumbuhan. Peningkatan pertumbuhan secara tidak langsung melalui kemampuan PGPB untuk mengurangi atau melindungi tanaman dari bahaya organisme fitopatogen misalnya dengan menghasilkan senyawa antibakteri atau antifungal ataupun menginduksi sistem pertahanan tanaman. Bakteri endofit menghasilkan substansi volatil (2-3 butanediol dan aceotin) yang merupakan penemuan terkini dalam mekanisme yang bertanggung jawab untuk peningkatan pertumbuhan tanaman (Ryu dkk., 2003). Aplikasi campuran bakteri rizosfer dan endofit dapat meningkatkan hasil dan berpotensi dalam menginduksi resistensi melawan virus pada tanaman pisang (Harrish dkk., 2009).

2.3 Potensi Mikroba yang Berasosiasi dengan Tumbuhan Mangrove

Mangrove merupakan tumbuhan yang hidup di area pasang surut, pantai dan muara sungai berlumpur di daerah tropis maupun subtropis. Tumbuhan mangrove yang sering dijumpai di Indonesia, yaitu *Avicennia*, *Aegiceras*, *Bruguiera*, *Ceriops*, *Excoecaria*, *Lumnitzera*, *Nypa*, *Rhizophora*, *Scyphiphora*, dan *Sonneratia*. Tumbuhan ini memiliki daya adaptasi yang baik pada lingkungan tergenang dan memiliki kadar garam tinggi. Hutan mangrove berperan untuk

melindungi pesisir pantai dari abrasi air laut, gelombang pasang, dan angin kencang. Indonesia memiliki 27% luasan hutan mangrove yang ada di dunia, selain itu Indonesia juga memiliki koleksi mangrove yang beragam (Rusila dkk., 2006).

Beberapa penelitian menunjukkan potensi mikroba yang berasosiasi dengan tumbuhan mangrove. Ravikumar dkk. (2010) berhasil memperoleh dua isolat bakteri endofit tumbuhan mangrove yaitu *Bacillus thuringiensis* dan *B. pumilus* dengan aktivitas antibiotik luas. Bakteri endofit asal *Rhizophora* juga berpotensi menghasilkan antibiotik (Jose dan Christy, 2013). Hasil penelitian Gayathri dkk. (2010) diperoleh isolat bakteri endofit yang berasal dari berasal dari *Rhizophora*, *Avicennia*, *Exoecaria*, *Ceriops*, dan *Aegicaras* menghasilkan enzim pektin, protease, kitinase, lipase, memfiksasi nitrogen, penyedia fosfat dan penghasil hormon auksin. Hasil penelitian lain melaporkan bakteri endofit dari golongan *Actinomices* dan *Streptomyces*. Kedua golongan bakteri tersebut mampu memfiksasi nitrogen, melarutkan fosfat, tumbuh pada media dengan kadar garam yang tinggi, memproduksi hormon pertumbuhan dan menghasilkan antibiosis yang dapat menekan pertumbuhan patogen manusia seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *P. vulgaris*, *Staphylococcus aureus* dan *S. typhi* (Gayathri dan Muralikrishnan, 2014). Bakteri endofit penghasil enzim L-asparaginase juga berhasil diisolasi dari mangrove *Avicennia marina* yang berasal dari Pantai Bajul Mati, Malang, Jawa Timur, Indonesia (Prihanto dkk., 2018).

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

Tujuan khusus penelitian ini adalah untuk: (1) mengisolasi mikroba yang berasosiasi dengan tumbuhan mangrove di Kota Manado, (2) mengarakterisasi fungsional mikroba indigen tersebut. Dalam menganalisis komunitas mikroba dilakukan dengan pendekatan *culture-dependent* atau tergantung-kultivasi. Pendekatan tergantung kultivasi dilakukan agar memperoleh kultur mikroba yang

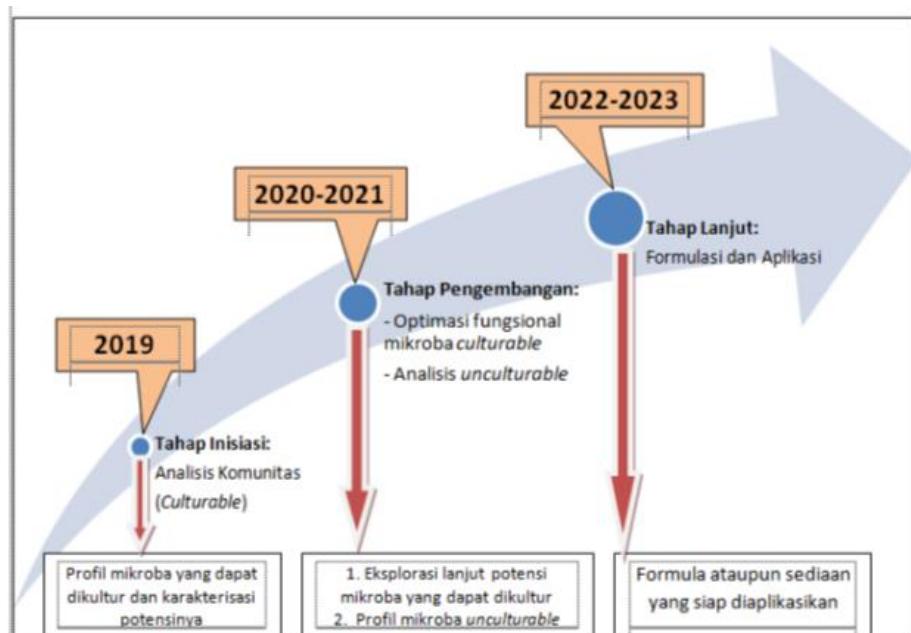
kemudian dapat dianalisis kemampuan fungsionalnya dan dapat secara langsung diaplikasikan pada tahap selanjutnya.

3.2 Manfaat Penelitian

Ketersediaan mikroba dan informasi profil fungsionalnya dalam penelitian ini dapat menunjang pengembangan penelitian unggulan Universitas Sam Ratulangi dalam hal eksplorasi mikroba yang berpotensi penghasil metabolit sekunder untuk pengembangan obat-obatan berbasis bahan baku alami dan pemanfaatan sumber daya alam hayati. Selain itu, kemampuan mikroba rizosfer untuk memacu pertumbuhan tanaman dapat menunjang pemanfaatan mikroba sebagai agen hayati yang dapat mengurangi penggunaan pupuk kimia dan pestisida sehingga menunjang peningkatan mutu dan keamanan pangan. Eksplorasi lanjut yang dapat menjadi Penelitian Terapan Unggulan Unsrat berkaitan dengan pemanfaatan sumber daya hayati berupa mikroba yang berasosiasi dengan tumbuhan mangrove di pesisir Kota Manado yang kemudian dapat menjadi sumber plasma nutfah yang dapat dimanfaatkan dalam pengembangan obat-obatan berbasis bahan baku alami. Profil mikroba yang berasosiasi dengan tumbuhan mangrove di Kecamatan Bunaken Kota Manado dan karakterisasi potensinya termasuk kemampuan antibakteri yang menjadi sasaran dapat menjadi *data base* sumber daya alam yang berpotensi dalam pengobatan. Tidak hanya itu, eksplorasi lanjut terhadap kemampuan mikroba sebagai agen hayati dan pemacu pertumbuhan tanaman baik secara langsung maupun tidak langsung dapat dimanfaatkan dalam bidang pertanian untuk menunjang ketahanan pangan dengan peningkatan kualitas dan pengurangan penggunaan pupuk kimia dan pestisida.

BAB 4. METODE PENELITIAN

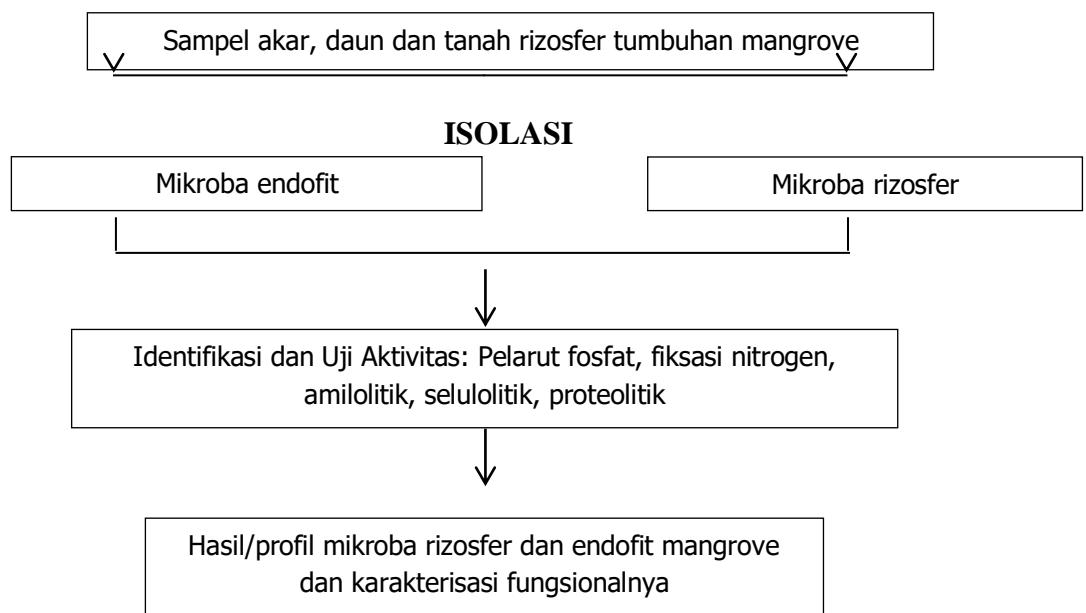
Road map penelitian ini secara utuh dapat dilihat pada Gambar 2 di bawah ini.



Gambar 2. *Road map* penelitian.

Cara Kerja untuk Tahun 2019

Secara umum, diagram alir penelitian untuk tahun 2019 dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Diagram Alir Penelitian Tahun 2019.

Tahapan-tahapan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pengambilan Sampel

Sampel mangrove diambil di Kelurahan Meras dan Tongkaina Kecamatan Bunaken Kota Manado. Bagian sampel yang diambil yaitu akar, batang dan daun serta tanah rizosfer. Sampel diambil dan dimasukkan ke dalam plastik sampel dan disimpan di *cool box* sampai penanganan di laboratorium.

2. Isolasi Mikroba

Isolasi mikroba dilakukan dengan metode cawan-sebar (*spread plate method*) dengan teknik pengenceran serial (Cappuccino dan Sherman, 2005). Sampel tanah rizosfer 10 g dilarutkan dalam 90 ml PBS, kemudian dilakukan pengenceran berseri dan disebarluaskan secara merata menggunakan batang kaca L di medium. Kultur diinkubasi pada suhu ruang selama 24–72 jam dengan tiga kali ulangan (Kumar dkk., 2012; Marques dkk., 2014). Isolasi bakteri endofit diawali dengan sterilisasi permukaan sampel tanaman dilakukan secara bertahap menggunakan air mengalir, alkohol 70%, natrium hipoklorit (5,25%), Tween 20 dan akuades steril. Untuk mengecek proses sterilisasi, sampel dipotong-potong, bagian permukaan dijejakan dan eksplan ditanam pada media Nutrient Agar dan diinkubasi selama 24 jam. Sampel yang terkontaminasi tidak digunakan untuk analisis selanjutnya. Sampel dihomogenisasi dengan larutan PBS dan dilakukan pengenceran berseri kemudian disebar pada medium Nutrient Agar, Tryptic Soy Agar dan Potato Dextrose Agar (Kumar dkk., 2012). Isolasi fungi endofit, sampel dipotong berukuran 1cm x 1 cm dan ditanam pada medium PDA. Selanjutnya, koloni-koloni yang berbeda diamati, dicatat pengamatan fenotipik, diberi kode, dimurnikan, diperbanyak untuk analisis selanjutnya dan dibuat larutan stok gliserol untuk disimpan.

3. Karakteristik makroskopis dan mikroskopis

Pengamatan karakteristik makroskopis meliputi bentuk, tepian, elevasi, pigmentasi, dan sifat optis. Pengamatan mikroskopis dilakukan untuk pengamatan bentuk sel dan pewarnaan Gram dan LPB.

4. Karakterisasi Potensi Fungsional

A. Aktivitas amilolitik, selulolitik dan proteolitik

Uji amilolitik dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada medium pati 0,2%, setelah diinkubasi 24 jam kultur ditetesi lugol sampai menutupi permukaan media. Isolat yang positif memiliki aktivitas amilolitik akan menghasilkan zona bening di sekitar isolat (Hankin dan Anagnostakis, 1975). Untuk uji selulolitik dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada medium CMC. Setelah masa inkubasi, kultur ditetesi larutan *congo red* dan dibilas menggunakan 1 M NaCl selama 15 menit. Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri mengindikasikan adanya aktivitas selulolitik (Hendricks dkk., 1995). Penghitungan indeks enzimatik berdasarkan rasio antara diameter zona halo dengan diameter koloni (Hankin dan Anagnostakis, 1975). Pengujian proteolitik dilakukan dengan menggores bakteri uji pada media TSA yang ditambah 10 g susu skim dalam 100 ml akuades. Apabila terbentuk zona bening pada media tersebut maka hasilnya positif bakteri tersebut mampu menghasilkan enzim protease dan apabila tidak terbentuk zona bening maka hasilnya negatif bakteri tidak menghasilkan enzim protease.

B. Uji fiksasi nitrogen

Uji bakteri fiksasi nitrogen dilakukan secara kualitatif dengan menumbuhkan bakteri uji pada medium bebas mineral nitrogen (NFB), diinkubasi selama tiga hari. Pengamatan berdasarkan perubahan warna media yang akan menjadi biru untuk bakteri yang positif memfiksasi nitrogen (Cappuccino dan Sherman, 2005).

C. Uji kemampuan sebagai pelarut fosfat

Uji ini dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada media Pikovskaya dengan penambahan tri-kalsium fosfat sebagai sumber fosfat, diinkubasi pada suhu $28\pm2^{\circ}\text{C}$ selama 7 hari. Pengamatan dilakukan terhadap terbentuknya zona bening di sekitar koloni sebagai zona solubilisasi. Indeks solubilisasi dihitung berdasarkan rasio diameter zona solubilisasi / diameter koloni (Nguyen dkk. 1992).

BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

1. Persiapan Alat dan Bahan, dan Pembuatan Media

Sebelum dilakukan isolasi mikroba, terlebih dahulu mempersiapkan alat dan bahan. Semua alat gelas yang akan digunakan untuk isolasi telah disterilisasi menggunakan autoklaf. Sterilisasi dilakukan untuk menghindari kontaminasi mikroba yang tidak dinginkan. Larutan NaCl 0.85% yang digunakan sebagai larutan pengenceran juga disterilisasi. Media yang digunakan untuk isolasi yaitu media NA, TSA, PDA, dan PCA (Gambar 4). Setelah dilarutkan, media tersebut disterilisasi kemudian dituang ke cawan petri.



Gambar 4. Media yang digunakan

2. Pengambilan sampel tumbuhan mangrove

Lokasi pengambilan sampel mangrove yaitu di Tongkaina (N 01°34'56.45", E 124°49'07.23") dan Meras (N 01°33'04.76", E 124°48'52.44"). Sampel yang diambil yaitu daun, batang, akar dan tanah rhizosfer. Pada kedua lokasi tersebut terdapat tiga jenis mangrove yaitu *Avicennia marina*, *Rhizophora apiculata* dan *Soneratia alba* (Gambar 5).



Gambar 5. Mangrove *Avicennia*, *Rhizophora* dan *Sonneratia*.

3. Sterilisasi Permukaan Sampel

Sebelum isolasi mikroba endofit, sterilisasi permukaan dilakukan pada sampel agar mengeliminasi mikroba yang ada di permukaan sampel (Gambar 6). Sterilisasi permukaan dilakukan menggunakan alkohol 70% dan natrium hipoklorit.



Gambar 6. Sterilisasi permukaan sampel

4. Isolasi

Isolasi dilakukan dengan metode cawan sebar. Setelah sampel dikeringkan di atas tisu steril. Sampel dipotong-potong (Gambar 7) untuk dilakukan

pengenceran, selanjutnya dari setiap pengenceran dilakukan isolasi dengan metode cawan sebar. Inkubasi dilakukan di suhu ruang.



Gambar 7. Sampel yang telah disterilisasi

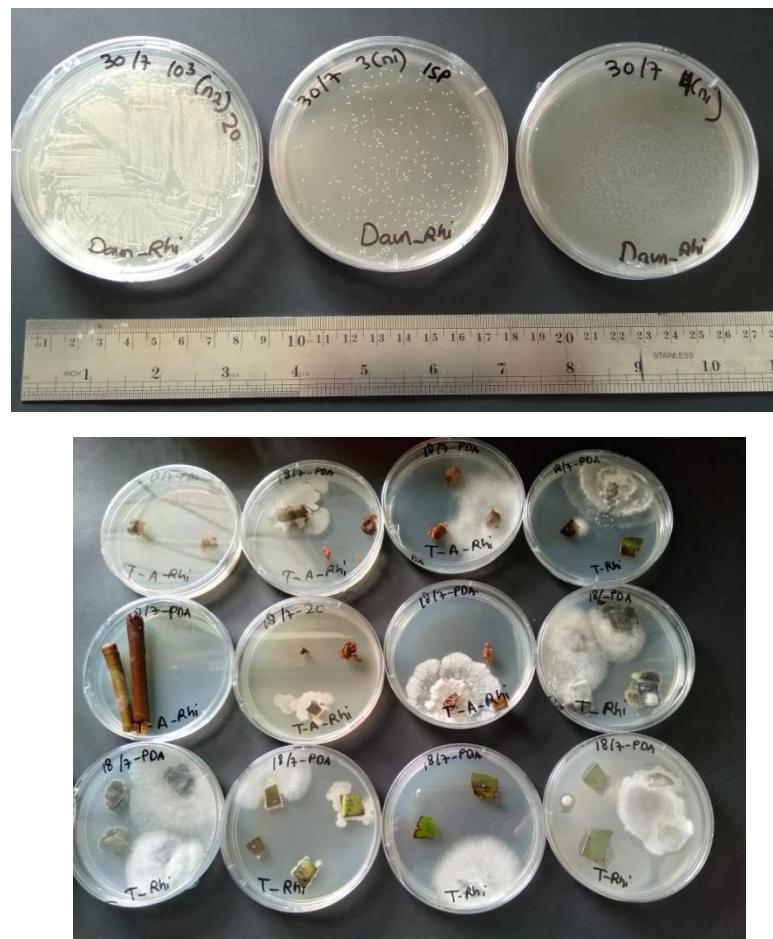
5. Enumerasi Total Mikroba

Hasil isolasi menunjukkan jumlah total mikroba yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Jumlah Total Mikroba

Sampel	Jumlah total mikroba (CFU/gr)	
LOKASI TONGKAINA		
Daun <i>Sonneratia alba</i>	$1,8 \times 10^4$	5×10^5
Akar <i>Sonneratia alba</i>	5×10^5	6×10^5
Rhizosfer	$1,26 \times 10^6$	$9,3 \times 10^4$
LOKASI MERAS		
Daun <i>Rhizophora apiculata</i>	$2,95 \times 10^6$	$1,3 \times 10^5$
Daun <i>Avicennia marina</i>	$6,8 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$
Daun <i>Sonneratia alba</i>	7×10^4	4×10^4
Akar <i>Avicennia marina</i>	$2,9 \times 10^4$	$4,8 \times 10^4$
Akar <i>Sonneratia alba</i>	$8,1 \times 10^5$	$9,2 \times 10^5$
Rhizosfer	$1,2 \times 10^6$	$9,6 \times 10^5$



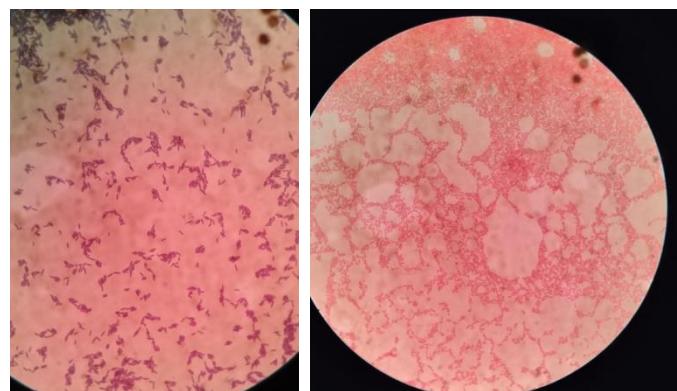


Gambar 8. Hasil isolasi bakteri dan jamur

6. Karakterisasi Makroskopis dan Mikroskopis

Karakterisasi makroskopis bakteri meliputi bentuk, warna, elevasi, dan margin dan karakterisasi mikroskopis meliputi bentuk sel dan Gram (Gambar 8). Hasil isolasi memperoleh 30 jenis bakteri dan 37 jenis fungi. Sebagian besar bakteri yang diperoleh termasuk bakteri Gram positif berbentuk batang.

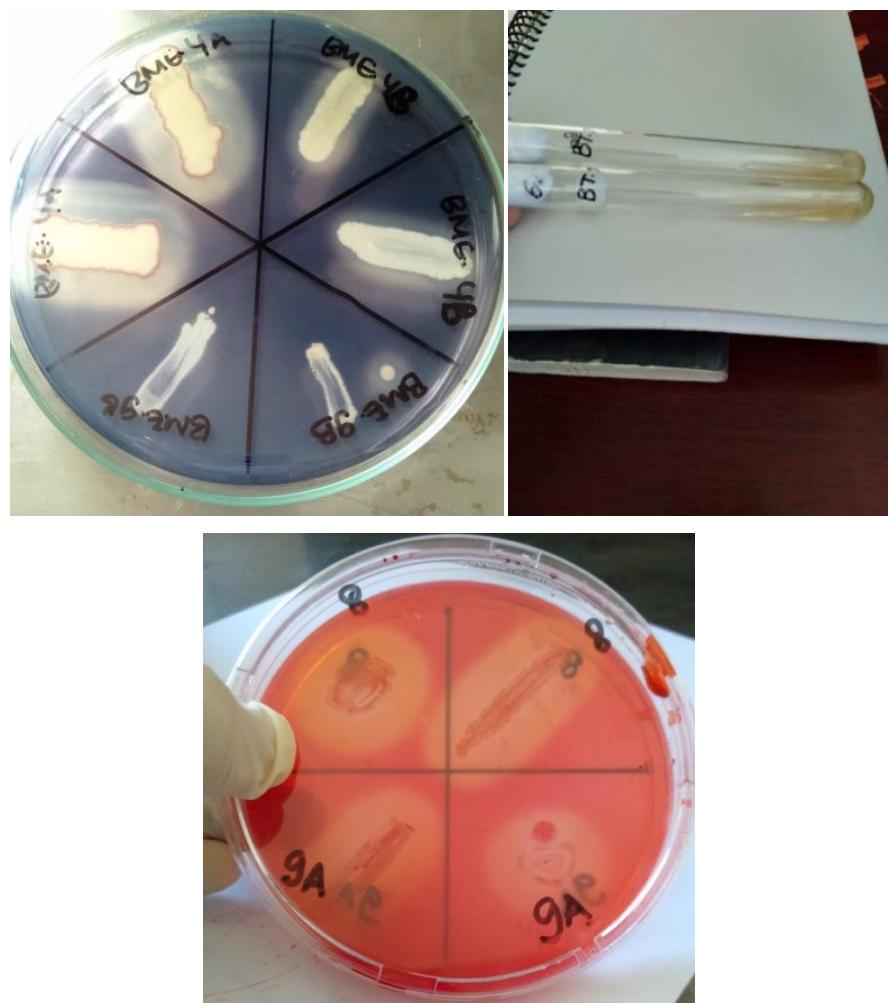




Gambar 8. Pengamatan makroskopis dan mikroskopis mikroba.

7. Skrining Kemampuan Menghasilkan Enzim Ekstraseluler

Uji yang telah dilakukan adalah uji enzim gelatinase, amilase, dan selulase.



Luaran yang telah dicapai yaitu artikel dengan judul “The isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from mangrove in Manado, North Sulawesi that produce gelatinase” telah diseminarkan dalam Seminar Internasional IORA International Conference on Operations Research pada tanggal 19-20 September 2019, dan publikasi *full paper* akan direvisi sampai 30 Oktober 2019.

BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN

Isolat-isolat terkultur yang diisolasi dari tumbuhan mangrove yang hidup di Manado Sulawesi Utara memiliki kemampuan menghasilkan enzim-enzim ekstraseluler dan memiliki kemampuan untuk memacu pertumbuhan tanaman melalui aktivitas fiksasi nitrogen dan pelarut fosfat.

Saran yaitu agar dapat mengidentifikasi secara molekuler semua isolat yang telah berhasil diisolasi dan memiliki kemampuan produksi enzim dan sebagai pemacu pertumbuhan tanaman. Selanjutnya, dibutuhkan optimasi pH, suhu dan media untuk produksi enzim ekstraseluler.

DAFTAR PUSTAKA

- Arobaya A, Wanma A. 2006. Menelusuri sisa areal hutan mangrove di Manokwari. *Warta Konservasi Lahan Basah* 14(4):4-5.
- Arturo, A. M., Oldelson, D. A., Hickey, R. F., dan Tiedje, J. M. (1995): Bacterial community fingerprinting of amplified 16-23S ribosomal DNA gene and restriction endonuclease analysis, *Molecular Microbial Ecology Manual*. Dordrecht, Kluwer Academic Publication, 1 – 8.
- Cappuccino, J.G., dan Sherman, N. (2005): *Microbiology: A laboratory manual*, 3rd ed., Benjamin Cummings Publishing Company, New York, NY, USA.
- Complant, S., Clement, C., dan Sessitsch, A. (2010): Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization, *Soil Biology and Biochemistry*, **42**, 669 – 678.
- Gayathri P, Muralikrishnan V. 2014. Bioprospecting of endophytic bacteria from mangrove, bananas and sugarcane plants for their pgpr activity. *Recent Advances in Biofertilizers and Biofungicides (PGPR) for Sustainable Agriculture* 1(25):288-299.
- Gayathri S, Saravanan D, Radhakrishnan M, Balagurunathan R, Kathiresan K. 2010. Bioprospecting potential of fast growing endophytic bacteria from

- leaves of mangrove and salt-marsh plant species. *Indian Journal of Biotechnology* 9(4):397-402.
- Gordon, S. A., dan Weber, R. P. (1951): Colorimetric estimation of indoleacetic acid, *Plant Physiology*, **26**, 192 – 195.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F., dan Kloepfer, J.W. (1997): Bacterial endophytes in agricultural crops, *Canadian Journal of Microbiology*, **43**, 895 – 914.
- Hankin, L., dan Anagnostakis, S. L. (1975): The use of solid media for detection of enzyme production by fungi, *Mycologia*, **67**, 597 – 607.
- Haroldim, P. R., Overbeek, L. S., dan Elsas, J. D. (2008): Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth, *Trends in Microbiology*, **16**, 463 – 471.
- Harrish, S., Kavino, M., Kumar, N., Balasubramanian, P., dan Samiyappan, R. (2009): Induction of defense-related proteins by mixtures of plant growth promoting endophytic bacteria against *Banana bunchy top virus*, *Biological Control*, **51**, 16 – 25.
- Hendricks, C. W., Doyle, J. D., dan Hughley, B. (1995): A new solid medium for enumerating cellulose-utilizing bacteria in soil, *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 2016 – 2019.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., dan Williams, S.T. (1994): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed., Baltimore, Williams and Wilkins.
- Jose AC, Christy PH. 2013. Assessment of antimicrobial potential of endophytic bacteria isolated from *Rhizophora mucronata*. *Int J Curr Microbiol App Sci* 2(10):188-94.
- Khan, Z., dan Doty, S. L. (2009): Characterization of bacterial endophytes of sweet potato plants, *Plant Soil*, **322**, 197 – 207.
- Khan, A. L., Waqas, M., Kang, S., Al-Harrasi, A., Hussain, J., Al-Rawahi, A., Al-Khiziri, S., Ullah, I., Ali, L., Jung, H., dan Lee, I. (2014): Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth, *Journal of Microbiology*, **52**, 689 – 695.
- Kumar, G., Kanaujia, N., dan Bafana, A. (2012): Functional and phylogenetic diversity of root-associated bacteria of *Ajuga bracteosa* in Kangra valley, *Microbiological Research*, **167**, 220 – 225.
- Marques, J. M., da Silva, T. F., Vollu, R. E., Blank, A. F., Ding, G., Seldin, L., dan Smalla, K. (2014): Plant age and genotype affect the bacterial community composition in the tuber rhizosphere of field-grown sweet potato plants, *FEMS Microbiology Ecology*, **88**, 424 – 435.
- Mohite, B. (2013): Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, **13**, 638 – 649.
- Nagata, S., Yamaji, K., Nomura, N., dan Ishimoto, H. (2015): Root endophytes enhance stress-tolerance of *Cicuta virosa* L. growing in a mining pond of eastern Japan, *Plant Species Biology*, **30**, 116 – 125.
- Nguyen, C., Yan, W., Le Tacon, F., dan Lapeyrie, F. (1992): Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton, *Plant and Soil*, **143**, 193 – 199.

- Prihanto, A.A., Fatchiyah, A., Kartikaningsih, H., dan Pradarameswari, K. A. (2018): Identifikasi Bakteri Endofit Mangrove Api-api Putih (*Avicennia marina*) Penghasil Enzim L-asparaginase, *JIPK*, **10**, 84-90.
- Quadt-Hallmann, A., Hallmann, J., dan Kloepper, J. W. (1996): Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria, *Canadian Journal of Microbiology*, **43**, 254 – 259.
- Ravikumar S, Inbaneson SJ, Sengottuvvel R, Ramu A. 2010. Assessment of endophytic bacterial diversity among mangrove plants and their antibacterial activity against bacterial pathogens. *Annals of Biological Research* 1(4):240-247.
- Rusila N, Khazali M, Suryadiputra IN. 2006. *Panduan Pengenalan Mangrove*. Bogor (ID): PHKA/WI-IP.
- Ryu, C., Farag, M. A., Hu, C., Reddy, M. S., Wei, H., Pare, P. W., dan Kloepper, J. W. (2003): Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **100**, 4927 – 4932.
- Sessitsch, A., Reiter, B., dan Berg, G. (2004): Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities, *Canadian Journal of Microbiology*, **50**, 239 – 249.
- Snedaker S. 1978. Ecology of mangrove. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 5(1):39-64.doi: 10.1146/annurev.es.05.110174.000351
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., dan Harper, J. (2004): Natural products from endophytic microorganisms, *Journal of Natural Products*, **67**, 257 – 268.
- Sturz, A.V., dan Nowak, J. (2000): Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops, *Applied Soil Ecology*, **15**, 183 – 190.
- Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., Sun, P., dan Qin, L. (2010): Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes, *Microbiological Research*, **165**, 437 – 449.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Tugas Penelitian



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS SAM RATULANGI
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
Alamat : Kampus UNSRAT Manado
Telp (0431) 827560, Fax. (0431) 827560
Email : lppm@unsrat.ac.id Laman : <http://lppm.unsrat.ac.id>

SURAT TUGAS

Nomor : 14/UN12.13/LT/2019

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Sam Ratulangi Manado, dengan ini menugaskan kepada :

1. Nama : AGUSTINA MONALISA TANGAPO (Ketua)
NIP : 198308022006042004
Pangkat Gol : Penata Muda/IIIa
Jabatan : Asisten Ahli
2. Nama : FEBBY ESTER FANY KANDOU (Anggota)
NIP : 196902271997032001
Pangkat Gol : Pembina/IVa
Jabatan : Lektor Kepala
3. Nama : PIENCE VERALYN MAABUAT (Anggota)
NIP : 198002082007012002
Pangkat Gol : Penata/IIIc
Jabatan : Lektor

Untuk melaksanakan Penelitian Skim RISET DASAR UNGGULAN UNSRAT, yang didanai oleh dana Institusi tahun 2019 dengan judul : "ANALISIS STRUKTUR KOMUNITAS MIKROBA YANG BERASOSIASI DENGAN MANGROVE DI KOTA MANADO DENGAN METODE CULTURE-DEPENDENT".

Demikian surat tugas ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Manado, 03 Mei 2019



Prof. Dr. Ir. Charles L. Kaunang, MS ✓
NIP : 195910181986031002

Lampiran 2. Bukti Luaran yang diperoleh

- Artikel yang telah diseminarkan dan akan dipublikasikan dalam prosiding seminar internasional.

IORA International Conference on Operations Research

Manado, Indonesia, 19-20 September 2019

The isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from mangrove in Manado, North Sulawesi that produce gelatinase

Agustina Monalisa Tangapo^{*1}, Febby Ester Fany Kandou¹ and Pience Veralyn Maabuat¹

¹Biology Department, Faculty of Mathematic and Natural Sciences, Sam Ratulangi University, INDONESIA

(E-mail:agustina.tangapo@unsrat.ac.id, febbykandou@unsrat.ac.id, veralyn.maabuat80@unsrat.ac.id)

ABSTRACT

Gelatinase is an enzyme that hydrolyze gelatin into gelatin hydrolyzate. The purpose of this study was to isolate and to identify endophytic bacteria from mangrove in Manado, which able to produce gelatinase enzyme. The samples in this study were, stems, and leaves. Pure cultured bacteria were investigated for its capability for producing gelatinase enzyme by using gelatin media. Screening process resulted in 10 positive isolates.

Keywords: endophytic bacteria; gelatinase; Manado; mangrove; North Sulawesi.

INTRODUCTION

Mangrove is vegetation lives in the coastal ecosystem of the tropics and subtropics area. This ecosystem is rich in organic matter. Mangroves are among the most productive ecosystems. The mangroves ecosystem has very high floral, faunal, and microbial diversity. These microbes usually produce

many secondary metabolites for its survival under stress conditions which may be very useful for the mankind.

Gelatinase is one type of diverse group protease, an extracellular metallo-endopeptidase or metalloproteinase which able to hydrolyze gelatin and other compounds. Gelatinase enzyme produced by microorganism hydrolyze gelatin into its subcompounds that can cross the cell membrane and be used by the organism. These enzymes have received considerable attention as targets for drug development because of their potential role in connective tissue degradation associated with tumor metastasis. The metalloproteinase gelatinase is an important enzyme not only for the chemical industry, but also for the food industry as a solvent, binder, stabilizer, water binder as well as an anticancer, antibiotic, and other medicinal products. Hence, the exploration of new sources of this enzyme is important and is always attracting the interests of not only microbiologists, but food chemists and pharmacists as well. The gelatinase enzyme can be produced by animals, plants and microorganisms. Microorganisms such as *Micrococcus*, *Pseudomonaaeruginosa*, *Seratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium*, *Salmonella*, *Vibriocomma*, *Chromobacterium violaceum*, *Staphylococcus aureus* and *Proteus* are widely known as gelatinase producers. Microorganisms, especially bacteria is a potential enzyme producer due to the fact that it can rapidly grow. Hence, the efficiency for mass production is very promising.

This study aimed to isolate endophytic bacteria and to screening the endophytic bacteria of mangrove which able to produce gelatinase enzyme. This research was conducted with several stages ie: sampling and sample preparation, isolation and characterization endophytic bacteria, and screening gelatinase.

MATERIAL and METHODS

Isolation of endophytic bacteria

Materials for this study were the leaves, bark and root of the mangrove *Avicennia marina*, *Sonneratia alba*, and *Rhizophora mucronata* from Mangrove Park of Bahowo, Tongkaina, Manado, which is located in North Sulawesi, Indonesia. The isolation of endophytic bacteria was carried out according to the method of Del Giudice et al. (2008), and Kumar et al. (2012) with modification. Ten gram of sample (leaves, bark and root) were grinded and diluted until 10^5 . The sample was then cultured in LB agar and incubated for 48 hours at the temperature of 37 °C. Each colony was pure cultured by using the streak quadrant method. The pure isolates were kept at 4°C until further used. Species characterization was performed with morphology and biochemical characterization. The Gram stain was performed according to the standard method. The microbact sistem is a method for identifying microorganisms based on their biochemical characteristics.

Screening of gelatinase-producing bacteria

The pure culture of bacteria was further analyzed to discover its capability for producing gelatinase by using a medium for gelatinase screening. Test to detect gelatin hydrolysis is the Nutrient Gelatin plate method. In this method, heavy inoculums of an 18-24 hour old test bacteria is stab-inoculated onto culture plates pre-filled with Nutrient Gelatin (23 g/L Nutrient Broth 120 g/L gelatin). Inoculated Nutrient Gelatin plates are incubated for 24 hours. Gelatin hydrolysis is indicated by clear zones around Gelatinase-positive colonies. In some cases, plates are flooded with mercuric chloride solution to precipitate unhydrolyzed gelatin making the clear zones easier to see. Results are often observed within 5-10 minutes after flooding with mercuric chloride solution.

RESULTS AND DISCUSSION

In our study, leaves sample of mangrove were collected from Mangrove Park Bahowo, Tongkaina, Manado. The samples were taken aseptically from the sampling site transferred and processed immediately in the lab for the isolation of gelatinase producing bacteria. The samples were serially diluted and spread plated on agar. Further colonies were purified on nutrient agar plates and screening for gelatinase activity. All bacterial isolates were studied for their morphological characteristics *viz.* shape, color, elevation and margin. All bacterial cultures were checked for their gelatinase activity using Gelatin agar plates. The results obtained the endophytic bacteria isolates were able to produce gelatinase. The selected isolates in our study exhibited high hydrolytic enzyme activity in substrate amended agar. The isolates were preliminary identified on the basis of their morphology and biochemical characters. The present study reported that these bacterial isolates have the ability to produce gelatinase. Therefore the untapped resources like mangrove ecosystem have gained greatest importance in discovering new sources of enzymes and other economically valuable natural products.

Characteristics	BR1	BR2	BR3	BR4	BR5
Colony Shape	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Elevation	Convex	Convex	Raised	Convex	Convex
Margin	Entire	Entire	Entire	Entire	Entire
Pigmentation	Opaque -white	Translucent -white	Transparant -white/pale brownish	Opaque -oranye	Opaque -yellow
Morphological	-	-	-	-	-
Gram staining	-	-	-	-	-
Cell shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Biochemical					
Hydrolysis of					
Starch	-	-	-	+	-
Lipid	-	-	-	-	+
Casein	-	-	-	+	+
Gelatin	-	-	-	+	-
Production of acid from					
Glucose	+	+	-	-	-
Sucrose	+	+	-	-	-
Lactose	+	-	-	-	-
Indole production	-	-	-	-	-
Methyl red test	+	+	-	-	-
Voges	+	+	-	-	-
Proskauer test					

Citrate utilization	+	+	+	-	-
Nitrate reduction	-	-	-	-	-
H₂S production	-	-	-	-	-
Urease test	+	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	-
Oxidase test	-	-	+	-	-

Characteristics	BR13A	BR13B	BR14	BR15	BR16
Colony Shape	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Elevation	Convex	Convex	Flat	Umbonate	Raised
Margin	Lobate	Undulate	Entire	Entire	Undulate
Pigmentation	Opaque -white	Opaque -white	Opaque -white	Opaque -white	Opaque -grey
Morphological Gram staining	+	+	+	+	+
Cell shape	Rod	Rod	Rod	Filament	Filament
Biochemical Hydrolysis of					
Starch	+	-	+	+	+
Lipid	-	+	+	+	-
Casein	+	-	+	-	-
Gelatin	+	-	+	-	-
Production of acid from					
Glucose	-	-	+	-	-
Sucrose	+	-	+	-	-
Lactose	-	-	-	-	-
Indole production	-	-	-	-	-
Methyl red test	+	-	-	-	-
Voges	-	-	-	-	-
Proskauer test					
Citrate utilization	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	-	+	-	-
H₂S production	-	-	-	-	-
Urease test	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+
Oxidase test	-	-	-	-	-

Acknowledgment

This study was funded by PNBP Sam Ratulangi University through “Riset Dasar Unggulan Unsrat (RDUU)” 2019 Research Grant.

References

- Arobaya A, Wanma A. 2006. Menelusuri sisa areal hutan mangrove di Manokwari. *Warta Konservasi Lahan Basah* 14(4):4-5.
- Cappuccino, J.G., dan Sherman, N. (2005): *Microbiology: A laboratory manual*, 3rd ed., Benjamin Cummings Publishing Company, New York, NY, USA.
- Gayathri S, Saravanan D, Radhakrishnan M, Balagurunathan R, Kathiresan K. 2010. Bioprospecting potential of fast growing endophytic bacteria from leaves of mangrove and salt-marsh plant species. *Indian Journal of Biotechnology* 9(4):397-402.
- Hankin, L., dan Anagnostakis, S. L. (1975): The use of solid media for detection of enzyme production by fungi, *Mycologia*, **67**, 597 – 607.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., dan Williams, S.T. (1994): *Bergeys's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed., Baltimore, Williams and Wilkins.
- Prihanto, A.A., Fatchiyah, A., Kartikaningsih, H., dan Pradarameswari, K. A. (2018): Identifikasi Bakteri Endofit Mangrove Api-api Putih (*Avicennia marina*) Penghasil Enzim L-asparaginase, *JIPK*, **10**, 84-90.
- Quadt-Hallmann, A., Hallmann, J., dan Kloepper, J. W. (1996): Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria, *Canadian Journal of Microbiology*, **43**, 254 – 259.
- Rusila N, Khazali M, Suryadiputra IN. 2006. *Panduan Pengenalan Mangrove*. Bogor (ID): PHKA/WI-IP.
- Snedaker S. 1978. Ecology of mangrove. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 5(1):39-64.doi: 10.1146/annurev.es.05.110174.000351
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., dan Harper, J. (2004): Natural products from endophytic microorganisms, *Journal of Natural Products*, **67**, 257 – 268.

Surat Penerimaan



**IORA-International Conference on
Operations Research (IORA-ICOR) 2019**
FAKULTAS MIPA UNIVERSITAS SAM RATULANGI

Alamat : Jurusan Matematika, Fakultas MIPA UNSRAT
Jl. Kampus UNSRAT, Kleak-Manado, Indonesia 95115.
Phone 081340737994, email: icor2019@unsrat.ac.id, website: <http://icor2019.org>



Manado, 17th September 2019

Dear Agustina Monalisa Tangapo,

Thank you for your interest in The 4th International Conference on Operations Research 2019 (ICOR 2019) and submitting your Extended Abstract entitled:

“The isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from mangrove in Manado, North Sulawesi that produce gelatinase”

It is our pleasure to inform you that your paper based on your Extended Abstract has been accepted for presentation at ICOR 2019 on 19-20 September 2019 in Manado.

Please submit your full paper by 10th of September 2019.

Please also note that the Deadline for Early Bird Payment is 24th of August 2019.

Please do not hesitate to contact us if you need further information.
Looking forward to your participation in ICOR 2019.

Warm Regards,
Chairman of ICOR2019



Dr. Nelson Nainggolan, M.Si

Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian

