

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perairan nusantara dan daratan yang luas serta pulau-pulau yang banyak menjadikan Indonesia sebagai salah satu negara yang memiliki sumber daya alam yang besar, khususnya pada sumber daya lautnya. Salah satu biota laut yang dapat dimanfaatkan yaitu alga. Rumpun laut (alga laut) terdiri atas tiga kelas, yaitu *Rhodophyceae* (ganggang merah), *Phaeophyceae* (ganggang coklat) dan *Chlorophyceae* (ganggang hijau) (Gufran dan Kordi, 2010). Menurut (Nontji, 2002) di Indonesia ditemukan 782 jenis alga yang terdiri atas 179 jenis alga hijau, 134 jenis alga coklat dan 452 jenis alga merah. Salah satu spesies alga yang sangat potensial untuk dikembangkan dan dimanfaatkan adalah alga merah jenis *Eucheuma spinosum* yang tumbuh dan tersebar luas di perairan Indonesia (Mattulada et al., 2018).

Enzim adalah protein yang berperan sebagai katalisator yang mempercepat reaksi kimia dalam makhluk hidup (Iswari dan Yuniastuti, 2006). Enzim dari mikroba bersifat lebih stabil dibandingkan dengan enzim yang berasal dari tumbuhan dan hewan (Susanti dan Fibriana, 2017). Enzim dimanfaatkan dalam bidang medis sebagai antioksidan dan menjadi agen terapi terutama penyakit kanker. Sebuah pendekatan baru dalam dunia pengobatan adalah penggunaan enzim sebagai penangkal radikal bebas sehingga tubuh bisa terhindar dari stres oksidatif. Salah satu enzim yang dapat berpotensi yaitu L-metioninase yang sedang dieksplorasi sebagai antioksidan dan terapi kanker. Oleh karena itu, pencarian sumber biologis baru yang memproduksi L-metioninase sangat penting terhadap penemuan obat kanker (El-sayed et al., 2012).

L-metioninase telah digunakan dan dikembangkan untuk kebutuhan terapeutik sebagai antikanker dan antioksidan. Sel kanker memiliki kebutuhan akan asam amino L-metionin yang lebih tinggi karena sel tersebut kekurangan metionin sintase, tidak seperti sel sehat normal (Finkelstein, 1990). Oleh karena itu, penggunaan L-metioninase dapat memecah L-metionin dan mengubah aktivitas metabolisme yang bergantung pada metionin dalam sel kanker sehingga menghentikan pertumbuhan sel kanker tersebut. Penipisan asam amino esensial L-metionin ditargetkan oleh degradasi enzimatis menjadi pendekatan yang menjanjikan dalam mengobati sel kanker (Rahman et al., 2013). Produksi L-metioninase biasa ditemukan pada bakteri seperti *Pseudomonas putida*, *Clostridium sporogenes*, dan *Aeromonas* sp. bakteri ini memiliki kemampuan antioksidan yang secara spesifik dapat menargetkan sel kanker berdasarkan keragaman metabolit sekundernya (Bopaiah et al., 2020).

Berdasarkan uraian diatas, maka dilakukan penelitian ini untuk mengisolasi enzim L-metioninase dari bakteri simbiosis alga merah *Eucheuma spinosum* yang dimurnikan dengan proses fraksinasi dan dialisis. Fraksi enzim diuji aktivitas antioksidannya secara *in vitro* dengan metode DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil) dan uji toksisitasnya menggunakan metode BSLT sebagai acuan aktivitas

antikanker enzim L-metioninase.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang ditemukan dalam penelitian ini adalah:

1. apa jenis spesies bakteri simbion dari alga merah *Eucheuma spinosum* yang dapat menghasilkan enzim L-metioninase?
2. bagaimana karakteristik enzim L-metioninase dari bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum*?
3. bagaimana aktivitas antioksidan dan antikanker enzim L-metioninase dari simbion alga merah *Eucheuma spinosum*?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Maksud dari penelitian ini adalah untuk menentukan karakteristik aktivitas enzim L-metioninase dari bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum* serta menentukan bioaktivitasnya sebagai bahan antioksidan dan antikanker

1.3.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini yaitu:

1. mengidentifikasi bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum* yang mampu menghasilkan enzim L-metioninase.
2. mengkarakterisasi aktivitas enzim L-metioninase dari bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum*.
3. menentukan aktivitas antioksidan enzim L-metioninase dengan metode DPPH dan uji toksisitas enzim L-metioninase dengan metode BSLT.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Oktober 2022 hingga Oktober 2024 di Laboratorium Biokimia Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, dan Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin.

2.2 Bahan dan Alat Penelitian

2.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan yaitu alga merah *Eucheuma spinosum* dari Desa Baruga, Kecamatan Pajukukang, Kabupaten Bantaeng, Sulawesi Selatan, *Artemia salina* L., media *Nutrient Agar* (NA), media *Nutrient Broth* (NB), *Bovine Serum Albumin* (BSA), substrat L-metionin, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , laktosa, D-glukosa, indikator fenol merah, 2 % agar pH 7, K_2HPO_4 , piridoksal fosfat, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, *buffer* Tris-HCl, NaCl, CaCl_2 , β -merkaptotanol, asam askorbat, 2,2-*diphenyl-1-picryl hydrazil* (DPPH), folin-cialcateu, Na_2CO_3 , NaOH, CuSO_4 , Na-K-tartrat, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , membran selofan, reagen *Nessler*, trikloroasetat, indikator pH universal, tali, kapas, $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 , triton X-100, akuades, akuabides, spiritus, aluminium foil, dan *tissue roll*.

2.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan yaitu neraca analitik, *magnetic stirrer*, *spectronic 20D*⁺, *sentrifuge*, inkubator Memmert, spektrofotometer UV-Vis, autoklaf Napco, oven, enkas, mortar, pinset, labu semprot, lemari pendingin, penangas air, cawan petri, jarum ose, bunsen, *shaker* inkubator Memmert, dan alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

2.3 Prosedur Penelitian

2.3.1 Preparasi Sampel

Sampel alga merah *Eucheuma spinosum* yang telah dikumpulkan kemudian dibersihkan dari kotoran yang menempel dan disimpan dalam *cool box*. Selanjutnya sampel disebarkan dalam media *nutrient broth* (NB).

2.3.2 Pembuatan Media

2.3.2.1 Media *Nutrient Broth* (NB)

Media *nutrient broth* dibuat dengan melarutkan 3 g *nutrient broth* dengan 100 mL air laut sambil dipanaskan sampai larut. Selanjutnya media diatur pH-nya hingga 7, lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 15-21 psi selama ± 15 menit. Kemudian, dimasukkan ke dalam cawan petri steril lalu dibiarkan mengeras didalam enkas (CLSI, 2017).

2.3.2.2 Media *Nutrient Agar* (NA)

Media NA dibuat dengan melarutkan 3 g *nutrient agar* dengan 100 mL air laut

sambil dipanaskan sampai larut. Selanjutnya, media diatur pH-nya hingga 7. Media NA dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL kemudian disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 15-20 psi selama \pm 15 menit (CLSI, 2017).

2.3.3 Penyegaran Sampel dalam Media *Nutrient Broth*

2.3.3.1 Bagian Permukaan Alga

Sebanyak 5 g sampel alga merah *Euचेuma spinosum* dibilas dengan 45 mL air laut steril. Selanjutnya air bilasan dimasukkan ke dalam 45 mL media *nutrient broth* lalu dikocok menggunakan *shaker* pada suhu 37 °C selama 24 jam dengan kecepatan 180 rpm (Sartika, 2014).

2.3.3.2 Bagian dalam Alga

Sebanyak 15 g sampel alga dibilas dengan 45 mL air laut steril. Alga yang telah dibilas dihaluskan dengan menggunakan mortar dan ditambahkan air laut steril. Suspensi kemudian dimasukkan ke dalam 45 mL media *nutrient broth* lalu dikocok menggunakan *shaker* pada suhu 37 °C selama 24 jam dengan kecepatan 180 rpm (Sartika, 2014).

2.3.4 Isolasi Bakteri Simbion

Sampel yang telah disegarkan pada media *nutrient broth* diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam 9 mL air laut steril, dengan demikian diperoleh pengenceran sampel sebesar 10^{-1} . Pengenceran bertingkat selanjutnya dilakukan hingga diperoleh pengenceran sampel 10^{-6} . Pengenceran seri 10^{-3} hingga 10^{-6} tersebut selanjutnya diambil 100 μ L sampel dan disebar ke dalam cawan petri steril berisi NA yang selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 3 x 24 jam.

2.3.5 Identifikasi Isolat Bakteri Simbion Alga Merah (*Euचेuma sp.*) Penghasil L-Metioninase

Identifikasi spesies bakteri dilakukan dengan cara: 1. Pengamatan morfologi dari isolat yang dihasilkan meliputi: bentuk sel dan warna koloni, 2. Pengamatan secara mikroskopis dengan pewarnaan gram, 3. Uji biokimia meliputi: uji TSIA, uji SIM, uji Fermentasi Karbohidrat, uji Sitrat, uji Urea dan uji VP-MR.

2.3.6 Peremajaan Isolat Bakteri Simbion *Euचेuma sp.*

Peremajaan isolat bakteri simbion *Euचेuma spinosium* dilakukan dengan cara mengambil 1 ose isolat bakteri simbion ke dalam media spesifik dengan metode gores. Media yang telah ditumbuhkan bakteri kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam (Nurvita, 2019).

2.3.7 Optimasi Produksi L-Metioninase

Optimasi produksi L-Metioninase dari isolat bakteri simbion alga merah *Euचेuma spinosum* dilakukan terhadap penentuan waktu produksi optimum pada waktu tertentu. Biakan bakteri simbion yang murni diambil 1 ose dari stok kultur berumur 24 jam dimasukkan dalam media produksi steril, dengan konsentrasi L-metionin 1

%). Selanjutnya diinkubasi dalam shaker inkubator pada 150 rpm suhu 37 °C selama 72 jam, dan dilakukan sampling setiap 6 jam untuk mengetahui pertumbuhan bakteri dengan mengukur *optical density* (OD) pada panjang gelombang 660 nm. Kemudian dilakukan sentrifugasi pada 5000 rpm dan suhu 4 °C selama 30 menit untuk memisahkan filtrat dan sel. Filtrat yang diperoleh merupakan enzim L-metionin ekstrak kasar, kemudian ditentukan aktivitas dan kadar proteinnya.

2.3.8 Produksi Enzim L-Metioninase dari Isolat Bakteri Simbion Alga Merah (*Eucheuma* sp.)

Peremajaan isolat bakteri simbion terlebih dahulu dilakukan sebelum produksi. Bakteri ditumbuhkan pada media M9 padat atau media spesifik dengan metode gores dan diinkubasi pada suhu 37 °C, kemudian diambil 2-3 ose isolat dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi 500 mL media produksi kemudian dikocok di dalam *shaker* pada kecepatan 150 rpm selama waktu produksi optimum pada suhu 37 °C. Media produksi yang telah di *shaker*, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm dan suhu 4 °C selama 15 menit untuk memisahkan filtrat dan sel. Filtrat yang merupakan ekstrak kasar enzim disimpan di dalam lemari es pada suhu -20 °C untuk proses selanjutnya (Kavya dan Nadumane, 2020).

2.3.9 Pemurnian Enzim L-Metioninase dari Isolat Bakteri Simbion Alga Merah (*Eucheuma* sp.)

2.3.9.1 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

Filtrat yang merupakan ekstrak kasar enzim ekstraseluler kemudian difraksinasi dengan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan masing-masing 0-40% (F1), 40-60% (F2), dan 60-80% (F3). Filtrat ekstrak kasar enzim ditambahkan dengan amonium sulfat sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga kejenuhan F1 dan didiamkan semalam pada suhu 4 °C. Endapan yang terbentuk dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada 10.000 rpm dan suhu -4 °C selama 30 menit. Endapan kemudian dilarutkan dengan *buffer* kalium fosfat pH 7. Filtrat hasil sentrifugasi sebelumnya kemudian ditambahkan lagi dengan amonium sulfat hingga kejenuhan F2 dan dilakukan cara yang sama dengan sebelumnya pada kejenuhan F3 hingga terdapat 3 fraksi amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan yang berbeda. Hasil fraksi-fraksi tersebut kemudian diukur aktivitas dan kadar proteinnya pada panjang gelombang maksimum (Kavya dan Nadumane, 2020).

2.3.9.2 Dialisis dalam Membran Selofan

Endapan-endapan yang diperoleh setelah fraksinasi dari masing-masing tingkat kejenuhan amonium sulfat dilarutkan dalam sejumlah *buffer* B dan selanjutnya didialisis dalam sejumlah *buffer* C. Masing-masing fraksi tersebut dimasukkan dalam membran selofan dengan dipastikan bahwa kantong selofan yang digunakan tidak bocor atau rusak. Selofan yang telah diisi dengan fraksi enzim dimasukkan ke dalam gelas kimia yang berisi larutan *buffer* C lalu diaduk dengan pengaduk *magnetic stirrer* selama 10 jam. Dialisis terus dilakukan sampai larutan *buffer* tidak

berwarna lagi saat ditambahkan BaCl_2 . Fraksi enzim hasil dialisis ditentukan kadar protein dan aktivitas enzimnya (Alzahrani, 2009).

2.3.10 Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Penentuan kadar protein diukur dengan menggunakan metode Lowry dengan BSA (*Bovine Serum Albumine*) sebagai larutan standar dan akuades sebagai larutan blanko. Larutan standar BSA konsentrasi 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; dan 0,32 mg/mL dimasukkan ke dalam deret tabung reaksi dengan volume masing-masing sebanyak 2 mL. kemudian ditambahkan 2,75 mL reagen Lowry B dan dicampur merata lalu dibiarkan selama 15 menit pada suhu kamar. selanjutnya ditambahkan 0,25 mL reagen Lowry A, dikocok dengan menggunakan *vortex* dan dibiarkan selama 30 menit sampai warna biru terbentuk. Diukur absorbannya pada panjang gelombang 600 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan dibuat kurva standarnya untuk mendapatkan persamaan regresi (Ahmad et al., 2013).

2.3.12 Karakterisasi Aktivitas Enzim L-Metioninase dari Isolat Bakteri Simbion Alga Merah (*Eucheuma* sp.)

Karakterisasi aktivitas enzim L-metioninase dari bakteri simbion alga merah *Eucheuma* sp. dilakukan terhadap tiga variabel yaitu karakterisasi pada variasi pH, suhu dan waktu.

2.3.12.1 Pengaruh Variasi pH terhadap Aktivitas Enzim

Penentuan pH optimum media untuk menghasilkan L-metioninase yang memiliki aktivitas optimum dengan memvariasikan pH media fermentasi menggunakan *buffer* tris HCl 0,05 M pH 6 hingga 10 (Selim et al., 2015).

2.3.12.2 Pengaruh Variasi Suhu terhadap Aktivitas Enzim

Aktivitas L-metioninase diuji pada temperatur yang beragam pada pH optimum. Fraksi enzim diinkubasi pada rentang temperatur 27, 37, 47, dan 57 °C (Selim et al., 2015).

2.3.12.3 Pengaruh Variasi Waktu terhadap Aktivitas Enzim

Aktivitas L-metioninase diuji pada pH dan suhu optimum. Fraksi enzim diinkubasi pada variasi waktu inkubasi yaitu 10, 20, 30, 40 dan 50 menit (Selim dkk., 2015).

2.3.13.4 Penentuan Aktivitas Antioksidan Fraksi Enzim dengan Metode DPPH

Fraksi enzim dipipet sebanyak 0,1 mL, 0,2 mL, 0,4 mL, 0,8 mL dan 1,6 mL untuk membuat deret ukur 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm, 800 ppm dan 1600 ppm dari masing-masing ekstrak. Setelah itu larutan deret ukur ditambahkan masing-masing larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 1 mL dan dicukupkan dengan metanol p.a hingga didapatkan volume total 5 mL. Larutan kontrol dibuat dengan memipet larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi.

2.3.14 Uji Sifat Toksisitas dengan Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

2.3.14.1 Penyiapan Larva Udang

Penyiapan larva udang dilakukan dengan mengambil telur *Artemia salina* L. sebanyak ± 50 mg. Penetasan dilakukan dengan cara merendam telur tersebut dalam air laut sebanyak 1 L dan diberi penerangan dengan lampu pijar 40-60 watt serta diaerasi selama 48 jam (Handayani, dkk 2012).

2.3.14.3 Pelaksanaan Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) yang dilakukan oleh Meyer dkk. (1982) telah dimodifikasi. Senyawa uji dibuat dalam konsentrasi 1, 10, 100 ppm dalam air laut. Sepuluh ekor larva udang *Artemia salina* L. dimasukkan ke dalam vial yang telah berisi senyawa uji dan ditambahkan air laut sampai volume 5 mL. setelah 24 jam jumlah larva yang hidup dihitung dengan kaca pembesar. Selanjutnya jumlah larva yang mati dan yang hidup dihitung dengan bantuan kaca pembesar serta ditentukan nilai LC_{50} dengan program *Bliss Method*.