

# BAB I

## PENDAHULUAN UMUM

### 1.1 Latar Belakang

Aplikasi enzim di dalam industri medis menuntut enzim dapat bersifat tahan terhadap lingkungan yang panas. Enzim yang tetap aktif dan stabil pada suhu tinggi dapat diperoleh dari mikroba termohalofilik yang bersumber dari Lokasi air panas. Salah satu daerah sumber air panas bersalinitas dapat ditemukan di Desa Wawolesea, Kecamatan Lasolo, Kabupaten Konawe Utara, Provinsi Sulawesi Tenggara yang selanjutnya disebut sebagai sumber air panas Wawolesea. Sumber air panas Wawolesea terletak diantara pegunungan kapur dengan mata air yang mengeluarkan air panas dengan temperatur dan salinitas tinggi.

Hasil penelitian terkait dengan bakteri termohalofilik dari sumber air panas yang dilaporkan oleh Jamaluddin et al. (2018) menyatakan bahwa sumber air panas Wawolesea memiliki suhu berkisar antara 48 -70 °C. Umar (2017) melaporkan bahwa kadar salinitas sumber air panas Wawolesea berkisar antara 15 - 20%. Sumber air panas Wawolesea dapat dijadikan sebagai sumber bakteri termohalofilik penghasil L-asparaginase dengan aktivitas tinggi pada suhu dan salinitas tinggi. Bakteri termohalofilik memiliki kemampuan bertahan pada suhu tinggi karena adanya enzim termostabil. Bakteri termohalofilik termasuk kelompok mikroorganisme yang tumbuh optimal pada suhu lebih dari 45 °C dan kisaran umum pertumbuhan antara 45-80 °C (Zuraidah et al., 2020).

Studi pendahuluan yang dilakukan menunjukkan bahwa sumber air panas Wawolesea memiliki suhu pada kisaran 45-52 °C, pH 6-7 dan salinitas 15-20%. Air panas di Wawolesea memiliki sifat hidrotermal dan kandungan mineral yang tinggi, menjadikannya tempat yang menarik untuk studi bakteri termohalofilik. Bakteri ini mampu memproduksi enzim termostabil yang berpotensi dalam berbagai industri. Bakteri termohalofilik mampu bertahan dan berfungsi pada suhu yang tinggi karena adaptasi struktural pada protein, termasuk enzim. Enzim dari bakteri ini memiliki lipatan protein yang lebih stabil dan jembatan disulfida yang lebih banyak untuk mempertahankan strukturnya pada suhu tinggi.

Data dari *Globocan Internasional Agency for Research on Cancer* (IARC) menyebutkan bahwa pada tahun 2018 terdapat 18,1 juta kasus baru dengan angka kematian sebesar 9,6 juta kematian (Maresa et al., 2023). Aplikasi enzim sebagai antikanker terus dikembangkan. Kanker merupakan penyakit yang paling banyak mengakibatkan kematian di seluruh dunia. Kanker merupakan sekelompok penyakit



in tidak terkendalinya pertumbuhan dan penyebaran sel-sel disebabkan oleh faktor eksternal seperti tembakau, bahan kimia, dan infeksi virus, serta faktor internal seperti mutasi genetik, ketidakseimbangan tubuh, dan mutasi-mutasi yang terjadi dari metabolisme. Jenis kanker yang paling banyak adalah kanker payudara dan kanker usus besar. Kanker payudara adalah tumor ganas yang menyerang

jaringan payudara. Kementerian Kesehatan (Kemenkes) menyatakan, angka kanker payudara di Indonesia mencapai 42,1 orang per 100 ribu penduduk.

Penyembuhan kanker pada umumnya dilakukan melalui proses pembedahan, kemoterapi, terapi radiasi, imunoterapi, hormon terapi, transparansi sel induk dan obat yang tepat. Beberapa terapi ini tentu membutuhkan biaya yang mahal dan tidak semua penderita kanker mampu menjalaninya terutama masyarakat yang memiliki status ekonomi yang rendah. Pilihan alternatif yang dapat dilakukan adalah pemanfaatan enzim-enzim yang diproduksi oleh bakteri termohalofilik. Enzim L-asparaginase mampu menghambat sintesis protein dari sel kanker tanpa merusak sel normal. Enzim L-asparaginase akan mengkatalis reaksi hidrolisis dari L-asparagin yang merupakan asam amino non esensial untuk sintesis protein dalam pertumbuhan sel kanker. L-asparagin dihidrolisis menjadi asam aspartat dan amonia sehingga proses sintesis protein terganggu dan menghambat pertumbuhan sel kanker yang pada akhirnya mengakibatkan kematian sel kanker tersebut (Shrivastava et al., 2015).

Enzim L-asparaginase merupakan enzim dari kelompok hidrolase yang mengkatalis reaksi hidrolisis L-asparagin menjadi amonia dan L-aspartat (Lopes et al., 2017; Nadeem et al., 2022; Van Trimpont et al., 2022). Enzim L-asparaginase dapat efektif digunakan untuk pengobatan pasien yang menderita kanker (Jiang et al., 2021). Bakteri termohalofilik penghasil L-asparaginase telah diisolasi oleh Jamaluddin et al. (2018) dan menghasilkan 14 isolat bakteri yang dapat menghasilkan enzim L-asparaginase tetapi masih dalam tahap eksplorasi dan belum sampai tahap pemurnian parsial dan uji sitotoksik. Kemampuan tersebut ditandai dengan adanya perubahan warna media spesifik dari kuning menjadi merah muda hingga ungu tua di sekitar koloni bakteri. Semakin tinggi intensitas warna ungu yang terbentuk pada media spesifik menunjukkan semakin banyaknya jumlah amonia yang terbentuk pada media tersebut sebagai produk dari hidrolisis L-asparagin oleh L-asparaginase (Siciliano et al., 2023). Enzim L-asparaginase yang diproduksi dari bakteri lebih disukai karena kemudahannya dan efektivitasnya (Raveendran et al., 2018). Beberapa bakteri yang memproduksi L-asparaginase adalah *Bacillus licheniformis* (Alrumman et al., 2019), *Serratia marcescens* (Ghosh et al., 2013), *Pyrococcus abyssi* (Nadeem et al., 2022). Pemurnian protein melalui tahapan pengendapan amonium sulfat dengan fraksinasi bertingkat. Pemilihan garam amonium sulfat didasarkan pada kelarutannya dalam air, sebagian besar protein tahan terhadap garam tersebut, daya pengendap yang cukup besar dan mempunyai efek penstabil terhadap protein. Enzim L-asparaginase hasil fraksinasi masih mengandung amonium sulfat, sehingga perlu pemurnian lebih lanjut dengan proses dialisis menggunakan membran selofan (Suprobo et al., 2011).



hasil penelitian sebelumnya dan telah dilakukan penelitian bahwa pada lokasi sumber air panas Wawolesea di Utara Sulawesi Tenggara yang suhunya 45 °C sampai 52 °C dan bakteri termohalofilik yang bertahan hidup yang dapat menghasilkan enzim termostabil. Fokus utama penelitian ini adalah bakteri penghasil enzim L-asparaginase yang diperoleh dari daerah tersebut. Penelitian ini menunjukkan bahwa L-asparaginase dari bakteri simbiosis

alga hijau *Caulerpa lentilifera* yang difermentasi selama 66 jam memiliki aktivitas enzim tertinggi. L-asparaginase tersebut memiliki aktivitas enzim optimum sebesar 17.99 U/mL dengan waktu inkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C dan pH 7,5. Berdasarkan hasil *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) nilai LC<sub>50</sub> adalah sebesar 17,83 µg/mL dan enzim yang diperoleh bersifat biotoksik dengan tingkat toksisitas tinggi.

*Michigan Cancer Foundation* (MCF-7) adalah sel kanker payudara yang umum digunakan, dan telah dipromosikan selama lebih dari 40 tahun oleh beberapa kelompok penelitian. Sel MCF-7 digunakan dalam penelitian untuk percobaan sel kanker payudara ER-positif (*Estrogen Receptor*), dengan sebagian besar penyelidikan terhadap resistensi obat anti estrogen. Sel MCF-7 sangat cocok untuk studi resistensi terapi antihormon karena mudah dikultur dan mempertahankan ekspresi ER ketika diobati dengan terapi yang ditargetkan.

Uji antibakteri enzim L-asparaginase bertujuan untuk mengetahui apakah enzim tersebut memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri, sehingga selain fungsi utamanya dalam terapi kanker juga bisa memiliki potensi sebagai agen antimikroba. Skrining jamur tanah penghasil L-asparaginase dan aktivitas antibakterinya terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Dari 12 isolat jamur tanah, 7 menghasilkan L-asparaginase. Ada 4 isolat menunjukkan aktivitas antibakteri, isolat CM zona hambat terbesar 4,649 mm terhadap *S. aureus* dan 13,681 mm terhadap *E. coli* (Kurniawati et al., 2023).

Berdasarkan uraian pada latar belakang, peneliti tertarik untuk melakukan isolasi dan pemurnian enzim L-asparaginase dari bakteri termohalofilik dan uji aktivitasnya terhadap sel kanker payudara MCF-7 dan uji antibakteri. Produksi massal enzim ini terus dilakukan dengan eksplorasi yang berlanjut.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang, maka rumusan masalah pada penelitian ini yaitu:

1. apakah bakteri termohalofilik potensial menghasilkan enzim L-asparaginase dan dapat diidentifikasi spesiesnya?
2. bagaimana karakteristik biokimia enzim L-asparaginase yang diisolasi dari bakteri termohalofilik terpilih?
3. bagaimana purifikasi parsial enzim L-asparaginase yang diisolasi dari bakteri termohalofilik terpilih?
4. apakah enzim L-asparaginase dari bakteri termohalofilik terpilih dapat digunakan sebagai antikanker pada sel kanker MCF-7 dan antibakteri?

## 1.3 Tujuan Penelitian



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

lagang, maka tujuan dari penelitian ini yaitu:

- 1. mengidentifikasi spesies bakteri termohalofilik terpilih dari sumber air panas;
- 2. menguji potensial menghasilkan enzim L-asparaginase;
- 3. mengkarakterisasi enzim L-asparaginase;
- 4. memurnikan enzim L-asparaginase dengan fraksinasi dan dialisis;
- 5. menguji potensi antikanker dan antibakteri enzim L-asparaginase dari bakteri termohalofilik terpilih.

## 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini yaitu:

1. memperoleh isolat bakteri termohalofilik terpilih sebagai penghasil enzim L-asparaginase dari sumber air panas Wawolesea yang teridentifikasi genus dan spesiesnya;
2. memberikan informasi tentang karakteristik sifat biokimia enzim L-asparaginase;
3. memberikan informasi tentang kemurnian enzim L-asparaginase dari isolasi bakteri termohalofilik terpilih;
4. memberikan Informasi tentang optimasi produksi enzim L-asparaginase dari isolat bakteri termohalofilik terpilih sebagai antikanker dan antibakteri

## 1.5 Kebaharuan Penelitian

Kebaruan penelitian ini yaitu L-asparaginase dari bakteri termohalofilik di sumber air panas Wawolesea dapat dikembangkan untuk aplikasi industri dan medis serta uji sitotoksik MCF-7 dan Antibakteri.

## 1.6 Ruang Lingkup

Ruang lingkup penelitian Tesis ini terdiri dari 6 bab, dengan masing-masing bab membahas topik yang berbeda sesuai dengan pendekatan penelitian yang diterapkan. Ruang lingkup dari masing-masing Bab dapat dijelaskan sebagai berikut:

1. Bab I : Membahas mengenai latar belakang, rumusan masalah, tujuan, manfaat, ruang lingkup dan kebaruan penelitian.
2. Bab II : Membahas mengenai isolasi, dan identifikasi bakteri termohalofilik penghasil L-asparaginase
3. Bab III : Membahas mengenai produksi, karakterisasi dan purifikasi parsial L-asparaginase dari bakteri termohalofilik
4. Bab IV : Membahas mengenai aplikasi L-asparaginase sebagai antikanker dan antibakteri
5. Bab V : Merupakan pembahasan umum yang menghubungkan hasil penelitian dari Bab II hingga Bab IV
6. Bab VI : Merupakan kesimpulan dari hasil penelitian dan saran penelitian lanjutan.

## 1.7 Landasan Teori

### 1.7.1 Mikroba Termofil

Mikroba termofil memiliki kemampuan hidup pada suhu tinggi karena tidak mempunyai organel yang mudah rusak seperti membran kloroplas (Brock dan Madigan, 1991). Mikroba dapat tumbuh dengan ekstrem panas. Berdasarkan kisaran suhu pertumbuhan, mikroba dapat diklasifikasikan menjadi mesofil (13-42 °C) dan termofil (45-100 °C). Termofil terbagi menjadi fakultatif dan obligat (45-65 °C). Ekstrem termofil adalah mikroba yang mampu hidup pada kisaran suhu yang sangat tinggi. Mikroba termofil merupakan makhluk hidup yang berperan sebagai



agen biodegradasi berbagai macam bahan organik, karena kemampuannya untuk menghasilkan berbagai enzim ekstraseluler (Rukmi et al., 2018).

### 1.7.2 Bakteri Termohalofilik

Bakteri termofilik merupakan mikroba yang berpotensi untuk memproduksi enzim termostabil. Enzim seperti ini sangat diperlukan karena lebih tahan pada suhu tinggi. Enzim ini memiliki keistimewaan pada membran selnya yang berhubungan dengan lingkungan luar. Tujuh asam lemak (asam palmitat, asam stearat, asam miristat, asam laurat, asam arachidat, asam behenat dan asam lignoserat) merupakan penyusun komponen asam lemak tak jenuh sehingga membuat membran ini lebih stabil dan tahan pada suhu tinggi. Bakteri golongan termofilik ini berbeda dengan bakteri jenis lainnya, karena bakteri ini mempunyai kemampuan untuk beradaptasi dan bertahan hidup pada suhu dan lingkungan yang ekstrem seperti salinitas yang tinggi (NaCl jenuh), lingkungan dengan pH ekstrem (kisaran kurang dari 2.0 dan  $\geq 10.0$ ) serta tekanan yang disebabkan oleh substrat. Bakteri termofilik ini terbagi menjadi dua dominan filogenetik yang berbeda satu sama lain yaitu bakteri dan archae. Bakteri termofilik ini dominan hidup dan bertahan pada lingkungan yang memiliki suhu antara 50-90 °C, sedangkan archae lebih bertahan hidup pada suhu  $\geq 80$  °C. Bakteri termofilik dapat beradaptasi dan bertahan hidup pada suhu ekstrem karena protein yang dihasilkan dari tubuhnya bersifat stabil dan tahan terhadap suhu panas (Kurniawati, 2012).

Mikroorganisme termofilik memiliki kemampuan bertahan pada suhu tinggi karena adanya enzim termostabil. Bakteri termofilik dapat dimanfaatkan dalam bidang bioteknologi karena bakteri ini memiliki efisiensi dalam keadaan suhu tinggi. Semakin tinggi temperatur maka semakin tinggi pula laju difusi. Enzim pada bakteri termofilik juga mampu mengkatalisis reaksi biokimia pada suhu tinggi dan umumnya lebih stabil dari bakteri mesofilik. Enzim yang terdapat pada bakteri termofilik juga dapat dimanfaatkan pada industri antara lain enzim amilase, selulase, xilanase, kitinase dan protease (Maria dan Surya, 2012). Bakteri termofilik dapat dilihat pada **Gambar 1.1.**



**Gambar 1.1.** Bakteri termofilik (Maria dan Surya, 2012)

Bakteri termohalofilik merupakan kelompok bakteri yang hidup pada suhu dan salinitas yang tinggi. Bakteri termohalofilik dapat ditemukan pada lingkungan bersuhu dan salinitas tinggi misalnya pada pasca erupsi gunung berapi dan sumber air panas yang bersalinitas. Kebanyakan bakteri termohalofilik tumbuh pada suhu lebih dari 45 °C dan kadar salinitas diantara 1-5% (Jamaluddin et al., 2018).

Suhu merupakan salah satu faktor penting dalam kehidupan mikroba. Beberapa mikroba dapat tumbuh pada kisaran suhu yang khas. Terkait dengan suhu pertumbuhan dikenal suhu minimum dan maksimum. Suhu minimum ini adalah suhu yang paling rendah dimana aktivitas mikroba masih berlangsung. Sedangkan suhu maksimum adalah suhu tertinggi yang masih dapat menumbuhkan mikroba tetapi pada tingkat aktivitas fisiologis yang paling rendah. Bakteri termofilik pertama kali diisolasi pada tahun 1879 oleh Miquel, yang mampu berkembang biak pada suhu 72 °C. Bakteri termofilik juga berhasil diisolasi dari kawah air panas dan sedimen lautan geotermal (Edwards, 1990). Spesies termofilik umumnya banyak ditemukan pada lingkungan yang ekstrem, misalnya daerah vulkanik dan sumber air panas. Bakteri ini umumnya berasal dari genus *Beggiatoa*, *Thermochromatium*, *Acidithiobacillus*, *Thermithiobacillus*, *Thermomonas*, *Methylococcus*, *Pyrococcus* dan *Alterococcus* (Labeda, 1990).

Menurut Brock dan Madigan (1991), ada beberapa hal yang menyebabkan mikroba termofil mampu bertahan hidup dan berkembang biak pada suhu tinggi, antara lain :

1. kandungan enzim dan proteinnya sangat stabil terhadap panas, sehingga dapat berfungsi secara optimal pada suhu tinggi. Jika dibandingkan dengan mikroba mesofil, enzim termofil berbeda sedikit dengan mesofil, karena dalam enzim termofil ada penggantian asam amino penting pada suatu lokasi atau lebih di dalamnya sehingga membuat enzim tersebut berlipat sedemikian rupa yang akhirnya dapat mencegah terjadinya denaturasi karena panas,
2. mesin pensintesis protein (ribosom dan konstituen lainnya) stabil terhadap panas,
3. membran lipid sel mikroba termofil kaya akan asam lemak tak jenuh sehingga dapat membentuk ikatan hidrofobik yang jauh lebih kuat, dan menyebabkan mikroba tersebut tahan terhadap panas. Enzim termostabil yang diisolasi dari mikroba termofilik dapat digunakan secara komersial karena stabilitasnya. Keuntungan dari bioproses yang berlangsung pada suhu tinggi adalah kecepatan difusi yang lebih tinggi, menurunkan viskositas substrat, kecepatan reaksi lebih tinggi serta meningkatkan kelarutan reaktan, dan mengurangi resiko terjadinya kontaminasi dengan mikroba patogen (Mutzel et al., 1996).



### hasil Enzim L-asparaginase

lagalhaes (2010) menyimpulkan bahwa pemilihan mikroba n mempunyai beberapa keuntungan bila dibandingkan dengan dari tumbuhan maupun hewan, antara lain:

mudah untuk ditumbuhkan dan kecepatan pertumbuhannya

dan lebih mudah ditingkatkan apabila dikehendaki produksi yang



- lebih besar,
3. biaya produksinya relatif lebih murah,
  4. kondisi selama produksi tidak tergantung oleh adanya perubahan musim dan waktu yang dibutuhkan dalam proses produksi lebih singkat.

Enzim L-asparaginase terdistribusi secara luas pada sel eukariotik dan prokariotik. Moharam et al. (2010) menemukan bahwa jumlah L-asparaginase dihasilkan dalam jumlah yang besar pada mikroorganisme *Candida utilities*, *Erwinia cartova*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli* dan *Bacillus* sp. Sedangkan Patta et al. (2013) menemukan bahwa bakteri termofilik *Bacillus licheniformis* dari sumber air panas Sulawesi Selatan dapat memproduksi L-asparaginase. Bessoumy et al. (2004); Vimal dan Awanish (2017) menyimpulkan sumber bakteri yang menghasilkan enzim L-asparaginase, di antaranya terdapat pada **Tabel 1.1**.

**Tabel 1.1.** Beberapa bakteri penghasil l-asparaginase

| Spesies Bakteri                     | Jenis Enzim                                                        |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 50071 | L-asparaginase, lipase, protease                                   |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i>         | L-asparaginase, lipase, protease                                   |
| <i>E. chrysanthemi</i>              | L-asparaginase                                                     |
| <i>Mycobacterium phlei</i>          | L-asparaginase, katalase, lipase, protease, urease                 |
| <i>Lactobacillus crispatus</i>      | L-asparaginase, laktase, protease                                  |
| <i>Lactobacillus plantarum</i>      | L-asparaginase, laktase, protease                                  |
| <i>Lactobacillus fermentum</i>      | L-asparaginase, laktase, protease                                  |
| <i>Bacillus subtilis</i>            | L-asparaginase, amilase, protease, lipase, selulase                |
| <i>Bacillus pasteurii</i>           | L-asparaginase, urease, protease, lipase                           |
| <i>Salmonella paratyphi</i> A-1     | L-asparaginase, katalase, lipase, protease, galactosidase          |
| <i>Salmonella enteritidis</i>       | L-asparaginase, katalase, lipase, protease, fosfolipase            |
| <i>Staphylococcus aureus</i>        | L-asparaginase, lipase, penicillinase, DNase, protease             |
| <i>Enterobacter aerogenes</i>       | L-asparaginase, Beta-laktamase, lipase, protease, urease           |
| <i>Enterobacter cloacea</i>         | L-asparaginase, Beta-laktamase, lipase, protease, urease, katalase |
|                                     | L-asparaginase, laktase, galactosidase                             |

4); Vimal dan Awanish (2017)

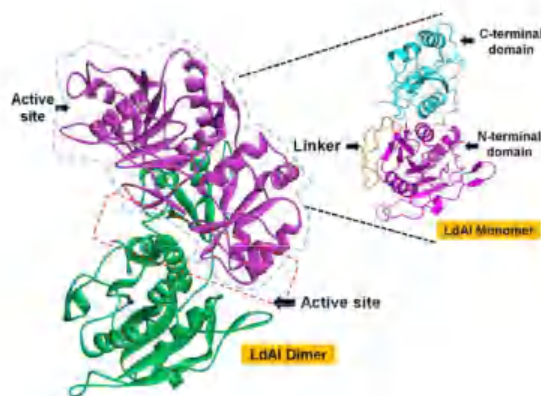
nish, (2017) menemukan beberapa spesies bakteri, yakni *E.coli* *chemi* yang diproduksi pada skala industri untuk aplikasi klinis. mempunyai afinitas yang lebih tinggi ( $K_m = 18 \pm 3 \mu M$ ) dibandingkan *chenthemi* ( $K_m = 33 \pm 6 \mu M$ ) terhadap substrat L-asparagin.



Sebagian besar mikroba L-asparaginase bersifat intraseluler kecuali sedikit yang disekresikan diluar sel.

#### 1.7.4 Enzim L-Asparaginase

L-asparaginase dapat secara khusus mengkatalisis konversi L-asparaginase bebas menjadi asam aspartat dan amonia. Sehingga L-asparaginase dapat menghambat pertumbuhan sel tumor yang beredar dalam darah. L-asparaginase telah banyak digunakan sebagai obat kanker yang penting untuk mengobati leukimia limfoblastik akut dan kanker lainnya di seluruh dunia. Enzim L-asparaginase adalah enzim penting yang memainkan peran komplementer dalam industri farmasi dan makanan (Patial et al., 2023). Struktur L-aspraginase dapat dilihat pada **Gambar 1.2**.



**Gambar 1.2.** Simulasi molecular dynamics L-asparaginase (Singh et al., 2015).

L-asparaginase telah diakui secara luas sebagai salah satu obat antikanker yang paling menjanjikan. L-asparaginase telah digunakan sebagai agen kemoterapi untuk pengobatan leukimia limfoblastik akut dan limfosarkoma selama beberapa dekade. Kemampuan L-asparaginase untuk mengubah L-asparagin menjadi aspartat dan amonia telah digunakan secara luas untuk pengobatan kanker. Sel tumor tidak dapat mensintesis asparagin karena tidak adanya enzim asparaginase. Sel tumor auksotrofik bergantung pada pasokan eksogen L-asparagin yang tersedia dalam sistem peredaran darah untuk melakukan pertumbuhan dan fungsi metabolik. Sel tumor yang diberi L-asparaginase menjadi stress karena pasokan L-asparagin yang berkurang dan menghambat biosintesis DNA, RNA, dan protein yang pada akhirnya menyebabkan kematian sel (Patel et al., 2022).

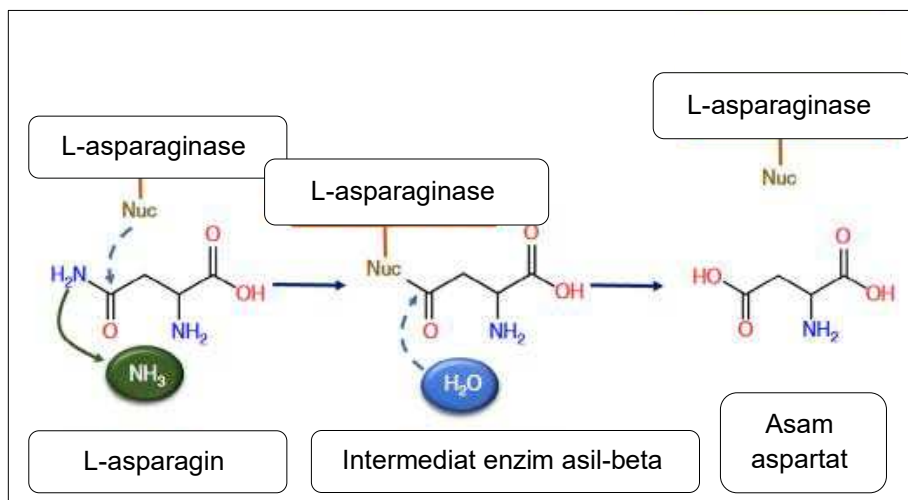
L-asparaginase adalah enzim yang mengkatalisis terutama hidrolisis m L-aspartat dan amonia. Enzim ini dapat digunakan sebagai ting untuk pengobatan berbagai gangguan limfoproliferatif dan (ikimia limfoblastik akut) dan limfoma Hodgkin dan telah menjadi kemoterapi selama sekitar 30 tahun. Selain itu aplikasi lainnya stri makanan dengan menggunakan sifat enzim ini untuk akrilamida dalam makanan gorengan komersial, menjaga na, rasa, tekstur, keamanan), sebenarnya L-asparaginase





mengkatalis hidrolisis L-asparagin, tidak memungkinkan reaksi gula pereduksi dengan asam amino ini untuk menghasilkan akrilamida (Cachumba et al., 2016a).

Produksi enzim L-asparaginase menghadapi tantangan, seperti pencarian mikroorganisme baru yang mampu memproduksinya dengan efek samping yang lebih sedikit. Saat ini produksi industri dilakukan dengan bakteri seperti *Escherichia coli* dan *Erwinia chrysanthemi* (Cachumba et al., 2016b).



**Gambar 1.3.** Mekanisme umum reaksi yang di katalis oleh L-asparaginase, panah putus menunjukkan serangan nukleofilik (Cachumba et al., 2016b).

Produksi L-asparaginase didasarkan pada produksi bioteknologi dengan menggunakan beberapa bakteri. Namun produksi industri juga memerlukan penelitian yang bertujuan untuk memperoleh hasil produksi yang lebih baik, serta proses baru dengan menerapkan mikroorganisme yang berbeda untuk meningkatkan rentang aplikasi enzim yang dihasilkan. Proses hidrolisis terjadi dalam dua langkah melalui suatu intermediet: beta-asyl-enzim **Gambar 1.3**. Pada langkah proses pertama, residu nukleofilik enzim diaktivasi oleh basa kuat yang menyerang atom karbon amida L-asparagin (substrat), menghasilkan intermediet produk beta-asyl-enzim. Langkah reaksi kedua adalah serangan terhadap karbon ester yang dilakukan oleh nukleofil yang diaktifkan oleh molekul air. Mekanisme ini dapat dibandingkan dengan mekanisme serin-protease, yang aktivitasnya tergantung pada kelompok asam amino, diklasifikasikan sebagai triade katalitik. Triade katalitik ini terdiri dari satu ik, serin (Ser), satu basa, histidine (His), dan satu asam amino asam, asam aspartat (Asp), semuanya terhubung oleh ikatan



### 1.7.5 Pemurnian Enzim dengan Pengendapan dengan Amonium Sulfat (Fraksinasi)

Prinsip pengendapan dengan amonium sulfat berdasarkan pada kelarutan protein yang merupakan interaksi antara gugus polar dengan molekul air, interaksi ionik protein dengan garam dan daya tolak menolak protein yang bermuatan sama. Kelarutan protein ada dua yaitu proses *salting in* dan *salting out*. Kelarutan protein pada pH dan suhu tertentu akan meningkat saat konsentrasi garam meningkat sampai pada konsentrasi tertentu (*salting in*). Selanjutnya pada penambahan garam dengan konsentrasi tertentu, kelarutan protein akan menurun (*salting out*), karena molekul air yang berikatan dengan ion-ion garam semakin banyak sehingga terjadi penarikan selubung air yang mengelilingi permukaan protein. Peristiwa pengendapan dengan garam amonium sulfat mengakibatkan protein saling berinteraksi, beragregasi, dan kemudian mengendap (Harris, 1989). Filtrat enzim yang telah dijenuhi dengan amonium sulfat dibiarkan semalam pada suhu 4 °C agar molekul protein teragregasi dan mengendap sempurna, endapan yang diperoleh adalah protein.

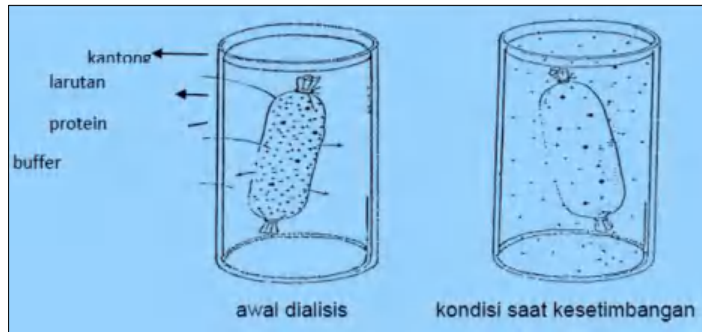
Menurut (Scopes, 1987) bahwa amonium sulfat merupakan garam yang umumnya digunakan untuk mengendapkan protein karena memiliki keuntungan yaitu:

- a. memiliki daya larut yang tinggi dalam air,
- b. tidak mengandung zat yang bersifat toksik,
- c. protein stabil di dalam larutan amonium sulfat 2-4 M,
- d. protein terlindungi dari denaturasi
- e. membatasi pertumbuhan bakteri
- f. relatif tidak mahal

### 1.7.6 Pemurnian Enzim dengan Dialisis

Dialisis merupakan proses yang dilakukan untuk memisahkan atau menghilangkan molekul garam amonium sulfat dan ion-ion pengganggu lainnya yang berpengaruh terhadap kestabilan molekul protein enzim selama penyimpanan, Dimana molekul-molekul kecil dan ion-ion akan melewati pori-pori selaput semipermeabel dan keluar dari kantong selofan. Pemurnian enzim yang tidak menghendaki adanya garam, oleh karena itu garam yang tersisa dari proses pengendapan dipisahkan dengan cara dialisis menggunakan kantong selofan dapat dilihat pada **Gambar 1.4**.





**Gambar 1.4.** Proses pemurnian metode dialisis (Stryer,1995)

Metode dialisis merupakan metode yang mampu menghilangkan molekul pengganggu, seperti garam atau ion-ion lain yang berukuran kecil dengan cara suspensi protein yang mengandung garam dimasukkan kantong selofan yang memiliki pori ultra halus. Air yang digunakan untuk melarutkan garam bebas melalui pori, sedangkan protein tertinggal dalam kantong selofan. Untuk menghindari kontaminan dari bahan logam, maka kantong selofan terlebih dahulu direbus selama 10 menit sebanyak 2 kali. Dialisis dilakukan di lingkungan yang dingin untuk mengurangi terjadinya penurunan aktivitas enzim. Pengadukan dengan kecepatan rendah bertujuan untuk mempermudah keluarnya molekul berukuran kecil dari kantong selofan dan mencegah molekul tersebut terkonsentrasi di sekitar kantong. Pada proses dialisis keberadaan amonium sulfat di dalam kantong selofan diuji dengan menambahkan  $\text{BaCl}_2$  ke dalam larutan buffer yang berada di luar kantong selofan (Selvia et al., 2013).

Proses dialisis dapat terjadi karena konsentrasi garam lebih tinggi di dalam membran dialisis daripada di luar membran, sehingga menyebabkan buffer atau air masuk ke dalam dialisat. Hal ini terjadi pada awal proses dialisis. Selanjutnya garam akan keluar melalui membran hingga tercapai kondisi keseimbangan. Tetapi setelah proses dialisis kadang terjadi penurunan aktivitas enzim yang mungkin disebabkan oleh hilangnya ion yang dapat mengaktifkan enzim (Pummer, 1979).

### 1.8 Kerangka Pikir

Sulawesi Tenggara memiliki sumber panas bumi yaitu sumber air panas Wawolesea di Konawe Utara. Sumber air panas Wawolesea terletak diantara pegunungan kapur dengan mata air yang mengeluarkan air panas dengan temperatur dan salinitas tinggi. Sumber air panas Wawolesea memiliki temperatur antara 48-53 °C dan berada

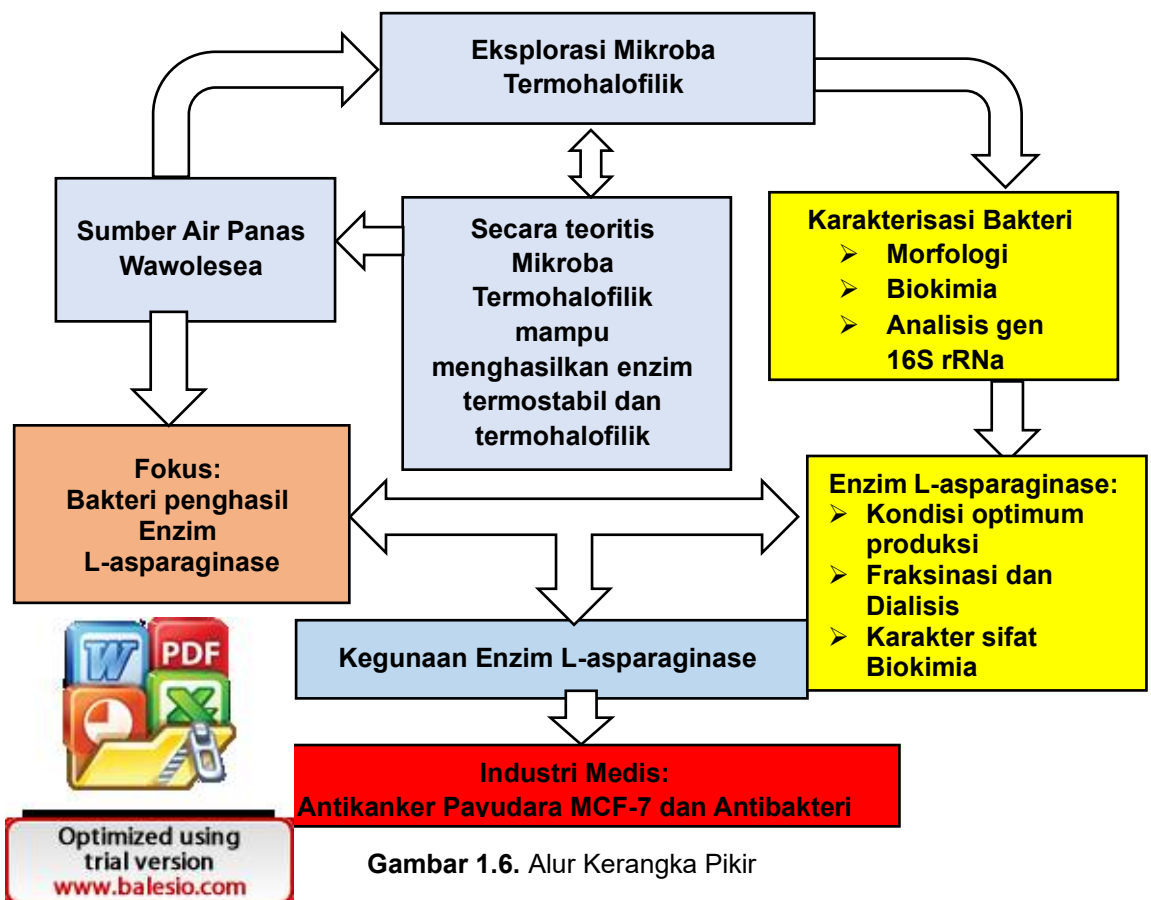


berada diantara 15-20% dengan kisaran pH 6,7-7,4. Eksplorasi < dari sumber air panas Wawolesea, menawarkan keuntungan efisien yang dapat diterapkan sebagai penghasil enzim L- dari mikroba termohalofilik dapat mengkatalisis reaksi biokimia lebih stabil dari enzim mesofil.

asparaginase berperan dalam mengkatalisis hidrolisis asparaginat dan amonia, serta banyak dimanfaatkan di bidang medis

sebagai agen kemoterapi antikanker (Kumar dan Verma, 2012; Cappelletti et al., 2016). Keunggulan enzim L-asparaginase yang dihasilkan oleh mikroorganisme termohalofilik adalah stabilitas termal dan struktural yang lebih tinggi dibandingkan enzim dari mikroba mesofilik, sehingga lebih efisien digunakan dalam proses bioteknologi skala industri (Patil et al., 2012; Karan et al., 2013). Penelitian terdahulu oleh Jamaluddin et al. (2018) telah melakukan eksplorasi terhadap bakteri termohalofilik dari sumber air panas Wawolesea yang berpotensi menghasilkan enzim L-asparaginase sebagai kandidat agen antikanker. Hasil penelitian tersebut menunjukkan adanya isolat bakteri yang mampu menghidrolisis L-asparagin pada media selektif, menandakan kemampuan produksi enzim tersebut. Namun, penelitian sebelumnya belum melanjutkan hingga tahap pemurnian enzim dan pengujian aktivitas antikanker maupun antibakteri.

Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini difokuskan pada karakterisasi lebih lanjut enzim L-asparaginase yang dihasilkan oleh isolat termohalofilik dari sumber air panas Wawolesea, meliputi proses purifikasi parsial, karakterisasi L-asparaginase, serta potensi antibakteri dan sitotoksik (antikanker). Tahapan ini diharapkan dapat memberikan gambaran yang lebih komprehensif mengenai potensi aplikasi enzim L-asparaginase dari mikroba termohalofilik dalam bidang medis dan bioteknologi. Gambaran alur kerangka pikir terlihat pada **Gambar 1.6**.



**Gambar 1.6.** Alur Kerangka Pikir

## 1.9 Hipotesis

Berdasarkan rumusan masalah, adapun hipotesis pada penelitian ini yaitu:

1. bakteri termohalofilik sebagai penghasil L-asparaginase dapat diidentifikasi spesiesnya;
2. enzim L-asparaginase dapat diisolasi, dan dikarakterisasi;
3. enzim L-asparaginase dapat dimurnikan dari isolasi bakteri termohalofilik;
4. enzim L-asparaginase dari sumber air panas Wawolesea memiliki aktivitas sebagai antikanker pada sel kanker MCF-7 dan antibakteri.



## BAB II

### TOPIK PENELITIAN I

#### ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI TERMOHALOFILIK PENGHASIL ENZIM L-ASPARAGINASE DI SUMBER AIR PANAS WAWOLESEA

##### 2.1 Abstrak

**Latar Belakang.** Indonesia sebagai negara tropik yang memiliki banyak daerah dengan aktivitas geotermal seperti daerah sumber air panas dan kawah gunung merapi. Daerah sumber air panas dan kawah gunung merapi merupakan salah satu sumber mikroba termofil yang dapat menghasilkan enzim termostabil. Salah satu sumber Air panas tersebut yaitu sumber air panas Wawolesea. Penelitian ini bertujuan mengisolasi bakteri termohalofilik penghasil enzim L-asparaginase dari sumber air panas Wawolesea dan mengidentifikasi bakteri termohalofilik. **Metode** penelitian yang digunakan yaitu pengukuran parameter lingkungan, Isolasi pada media nutrient agar dan media spesifik serta identifikasi secara biokimia dan identifikasi 16s rRNA. **Hasil** penelitian menunjukkan bahwa pengukuran parameter lingkungan yaitu pH, suhu, dan salinitas sebesar 5,91, 53 °C, dan 16%. Isolasi bakteri dari 15 isolat terdapat 8 isolat yang mampu menghasilkan enzim L-asparaginase yang ditandai dengan berubahnya media dari warna kuning menjadi pink. Sedangkan uji biokimia dari 2 isolat terpilih yaitu Isolat EASII dan Isolat EASIII didapatkan spesies bakteri Gram Negatif yaitu spesies *Alkaligenes faecalis* dan Isolat EASIII merupakan bakteri Gram positif *Bacillus Maquariensis*. Dari identifikasi 16s rRNA diperoleh spesies bakteri yaitu *Enterobacter* sp. **Kesimpulan** dari penelitian ini bahwa bakteri dengan kode isolat EASIII dapat dilanjutkan untuk produksi sebagai penghasil enzim L-asparaginase.

##### 2.2 Pendahuluan

Bakteri termohalofilik merupakan kelompok mikroba yang dapat hidup dan berkembang biak pada suhu tinggi (umumnya di atas 45 °C) dan salinitas tinggi (konsentrasi garam tinggi). Habitat alami mereka meliputi sumber air panas dan lingkungan salin seperti laut atau danau asin. Kemampuan mereka untuk bertahan dalam kondisi ekstrem ini disebabkan oleh adaptasi fisiologis dan molekuler, seperti modifikasi struktur protein dan membran sel. Penelitian oleh Muzuni et al. (2024) mengidentifikasi bakteri termohalofilik penghasil L-asparaginase dari sumber air



ulawesi Tenggara. Isolat CAT3.4 menunjukkan aktivitas enzim tinggi, mencapai 86,61 IU/mL, lebih tinggi dibandingkan dengan strain hswx88 dari Taptani, India, yang hanya 23,8 IU/mL. Hal ini diduga terkait dengan faktor salinitas di lingkungan sumber air



Uji biokimia pada bakteri penghasil enzim L-asparaginase bertujuan untuk menilai aktivitas enzimatik serta karakteristik fisiologis dan biokimia bakteri tersebut. Uji ini meliputi beberapa parameter penting, antara lain: Uji Aktivitas Enzim L-Asparaginase: Mengukur kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim L-asparaginase. Seperti penelitian Sari et al. (2023) menunjukkan bahwa isolat bakteri termohalofilik memiliki aktivitas enzim L-asparaginase yang signifikan. Hasil isolasi menunjukkan adanya 14 isolat bakteri termohalofilik yang mampu menghasilkan enzim L-asparaginase. Uji Identifikasi Bakteri: Menentukan spesies atau genus bakteri melalui uji morfologi, pewarnaan Gram, dan reaksi biokimia lainnya (Prihanto et al., 2018).

## 2.3 Metode

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel air (Zona I, II, III, IV, V), akuades, nutrient agar (Merck), nutrient broth (Merck),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck),  $\text{NaCl}$  (Merck), glukosa (Merck), gliserol (Merck),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck), buffer Tris-HCl 0,05 M, asam trichloroacetic (TCA), paragin (Merck), indikator fenol red (Nitra Kimia), alkohol 70% (Merck), Buffer PBS (fosfat buffer saline) (Nitra Kimia), agarose (Merck), amide (Merck), aluminium foil, tissue.

Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

Wisconsin Aluminium), laminar air flow CRUMA model 9005-FL, *hotplate* (Thermo), termometer, dan alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

### 2.3.2 Pengambilan Sampel

Sampel air sebagai sumber isolat diambil dari sumber air panas Wawolesea pada titik koordinat dengan kode area 8833+F8W, di Desa Wawolesea, Kecamatan Lasolo, Kabupaten Konawe, Sulawesi Tenggara. Sebelum sampel diambil, pH, suhu dan salinitas diukur pada lingkungan tersebut. Masing-masing parameter diukur dengan mencelupkan alat pengukur ke dalam air panas selama kurang lebih 3 menit. Sampel diambil pada bagian permukaan dan bagian dasar dengan kedalaman sebesar 50 cm sebanyak 250 mL dari 5 tempat yang berbeda. Selanjutnya sampel air dimasukkan ke dalam botol steril, kemudian diberi label.

### 2.3.3 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan dalam penelitian ini disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama  $\pm$  15 menit untuk media dan peralatan gelas yang tahan panas. Sebelum disterilisasi, alat yang digunakan dibersihkan, dikeringkan, dan dibungkus terlebih dahulu. Alat yang tidak tahan panas di sterilisasi menggunakan alkohol (Oktaviani et al., 2022).

### 2.3.4 Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)

Medium nutrient agar ditimbang sebanyak 15 g, dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan dilarutkan pada 500 mL akuades. Setelah itu, medium dipanaskan menggunakan hot plate sampai homogen. Media NA disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, lalu didinginkan sampai suhu 45-50 °C. Media NA (Nutrient Agar) dituang 5 mL ke dalam masing-masing cawan petri, ditunggu sampai memadat.

### 2.3.5 Pengenceran Sampel dan Isolasi Bakteri Termohalofilik

Sampel sebanyak 1 mL diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril. Setelah itu sampel ditambahkan 9 mL NaCl 0,9% steril. Pengenceran dilakukan hingga  $10^7$ . Selanjutnya, sampel hasil pengenceran dituang di atas media NA dan disebarkan menggunakan *L-glass* dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam. Koloni bakteri yang tumbuh diamati. Setiap koloni bakteri yang tumbuh dikarakterisasi berdasarkan karakteristik morfologi dan diisolasi. Adapun karakteristik

ati meliputi warna, elevasi, ukuran dan tepian koloni bakteri. Selain diisolasi berdasarkan karakteristik morfologi koloni, karakterisasi berdasarkan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram berdasarkan metode Hadjioetomo (1993) yakni dengan melihat sel bakteri dalam menyerap zat warna kristal ungu dan safranin. Isolasi pada kaca objek dan dilihat menggunakan mikroskop.



### 2.3.6 Pembuatan Media Spesifik L-Asparaginase dan Seleksi Bakteri Potensial.

Seleksi bakteri potensial penghasil L-asparaginase dilakukan secara *in vitro*. Isolat bakteri termohalofilik asal sumber air panas Wawolesea yang telah dimurnikan ditumbuhkan pada media M-9 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  6 g/L, L-asparagin 5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g/L, NaCl 0,5 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1 g/L, glukosa 2 g/L, bacto Agar 20 g/L, indikator fenol red 1 mL dan ditambahkan akuades. Campuran media tersebut dipanaskan sampai larut, setelah itu disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit, lalu didinginkan sampai suhu 45-50 °C. Media M-9 tersebut dituang 5 mL ke dalam masing-masing cawan petri steril, ditunggu sampai memadat. Isolat bakteri termohalofilik murni digores pada medium M-9 dalam cawan petri dengan menggunakan Teknik cawan gores. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 48 °C selama 24 jam. Bakteri yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan L-asparaginase akan tumbuh dan dapat mengubah media M-9 dari warna kuning menjadi warna pink (Talluri et al, 2013).

### 2.3.7 Uji Biokimia

Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara memanaskan (*heat-fixed*) isolat bakteri pada kaca objek, kemudian diberi pewarna secara berurutan menggunakan violet gentian, iodium Lugol, dan fuksin, dengan pembilasan air di antara setiap langkah pewarnaan. Sel yang telah diwarnai diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan bantuan minyak imersi untuk mengamati morfologi bakteri.

### 2.3.8 Identifikasi 16s rRNA

Satu koloni bakteri disuspensikan dalam PBS steril, kemudian ditambahkan Proteinase K dan buffer GSB untuk melisiskan sel. Campuran diinkubasi pada suhu 60 °C. DNA yang dilepaskan kemudian diikat pada kolom GS, buffer pencuci (*Wash Buffer*), lalu dielusi menggunakan buffer elusi yang telah dipanaskan sebelumnya.

DNA murni yang diperoleh dikumpulkan dan digunakan untuk analisis PCR selanjutnya. Amplifikasi PCR dilakukan dengan program sebagai berikut: denaturasi awal pada 95 °C selama 5 menit, diikuti oleh 35 siklus yang masing-masing terdiri atas denaturasi pada 95 °C selama 30 detik, penempelan (*annealing*) primer pada 55 °C selama 30 detik, dan pemanjangan (*extension*) pada 72 °C selama 1 menit. Program diakhiri dengan pemanjangan akhir pada 72 °C selama 5 menit.

Gel agarosa 1% dibuat dengan melarutkan 1 g agarosa ke dalam 50 mL buffer TBE, lalu dipanaskan hingga agarosa larut sempurna. Setelah dingin hingga suhu



ditambahkan 3  $\mu\text{L}$  etidium bromida, kemudian larutan tersebut cetakan gel dan dibiarkan mengeras. Gel yang sudah mengeras an dalam alat elektroforesis dan direndam dalam buffer TBE luk PCR dan 3  $\mu\text{L}$  marker DNA 100 bp dimasukkan ke dalam

dijalankan pada tegangan 100 V selama 60 menit. Setelah menggunakan sistem *Gel documentation* untuk melihat pita DNA. elah mengeras ditempatkan dalam ruang elektroforesis dan

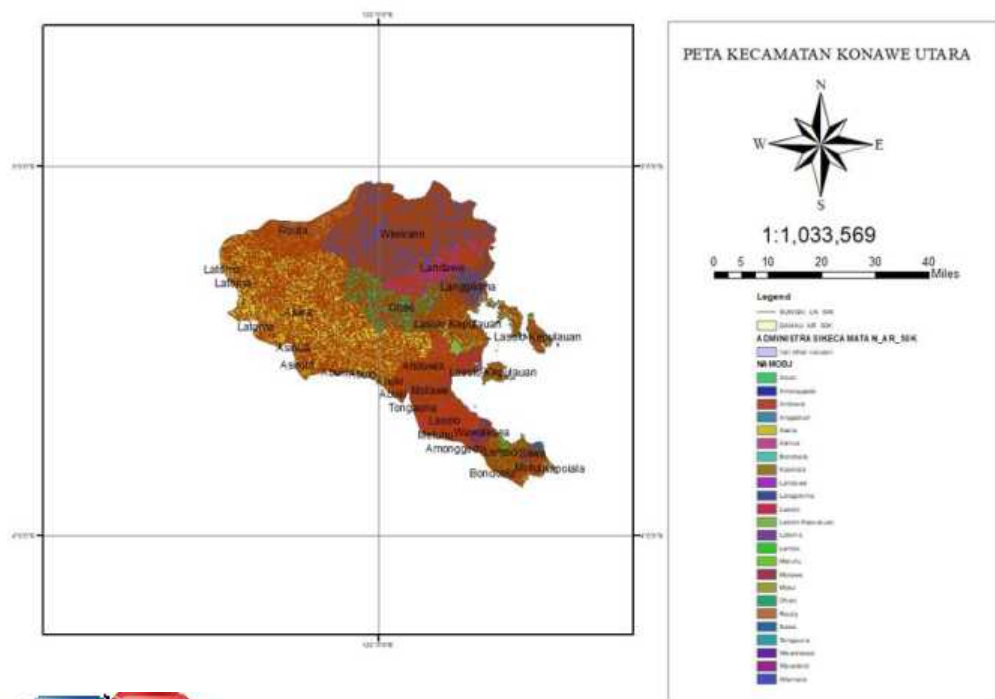
direndam dalam buffer TBE. Produk PCR sebanyak 10 µL dan marker DNA 100 bp sebanyak 3 µL dimasukkan ke dalam sumur gel. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 V selama 60 menit, kemudian pita-pita DNA divisualisasikan menggunakan sistem Gel Documentation.

Hasil amplifikasi PCR gen 16S rRNA disekuensing di Pusat Penelitian Medis Universitas Hasanuddin (HUMRC). Hasil sekuens tersebut kemudian dianalisis kesamaannya (homologi) menggunakan database BLAST dan disimpan di GenBank (NCBI) untuk memperoleh nomor akses (*accession number*).

## 2.4 Hasil dan Pembahasan

### 2.4.1 Gambaran Umum Lokasi Penelitian

Lokasi pengambilan sampel terletak di Daerah Wawolesea, Kecamatan Lasolo, Kabupaten Konawe Utara, Provinsi Sulawesi Tenggara disajikan pada **Gambar 2.1**. Kabupaten Konawe Utara terletak pada 2°97'-3°86' Lintang Selatan dan 121°49'-112°49' Bujur Timur. Lokasi pengambilan sampel mata air panas berada di permandian air panas Wawolesea.



**ambar 2.1.** Peta lokasi pengambilan sampel

Sulawesi Tenggara memiliki panas bumi yang berasosiasi dengan lingkungan non-vulkanik (Hermawan et al., 2011). Hal ini berpotensi untuk menghasilkan sumber air panas. Salah satu sumber panas bumi yang ada di Sulawesi Tenggara yaitu sumber air panas Wawolesea di Konawe Utara. Sumber air panas Wawolesea terletak diantara pegunungan kapur dengan mata air yang mengeluarkan air panas dengan temperatur dan salinitas tinggi. Umar et al. (2010) melaporkan bahwa sumber air panas Wawolesea memiliki temperatur berkisar antara 48-53 °C dan berasa asin.

Lingkungan ekstrem seperti mata air panas merupakan habitat alami bagi mikroorganisme termofil, yaitu mikroba yang mampu bertahan dan beradaptasi pada kondisi fisikokimia yang tidak bersahabat bagi organisme biasa, seperti suhu tinggi, salinitas tinggi, pH ekstrem, dan tekanan osmotik tinggi (Madigan et al., 2018). Salah satu jenis termofil adalah bakteri termohalofilik, yang mampu hidup dalam kondisi panas dan asin secara bersamaan.

Kondisi geotermal non vulkanik seperti di Wawolesea memberikan kondisi lingkungan yang unik dan masih jarang dieksplorasi. Zona-zona permeabel akibat rekahan geologi dan struktur karst memungkinkan aliran air panas dari dalam tanah yang membawa mineral dan zat terlarut penting bagi mikroorganisme (Iskandar et al., 2022). Kombinasi suhu tinggi, salinitas, dan kandungan mineral menjadikan Wawolesea sebagai lokasi yang sangat menjanjikan untuk isolasi mikroba dengan potensi bioteknologi tinggi, termasuk penghasil enzim dan senyawa bioaktif.

Mikroorganisme termohalofilik memiliki adaptasi khusus, seperti produksi enzim stabil panas, sistem osmoregulasi yang efisien, dan modifikasi membran sel agar tidak rusak pada suhu dan tekanan osmotik tinggi (Oren, 2011). Adaptasi ini memungkinkan mereka tidak hanya bertahan hidup, tetapi juga berpotensi menghasilkan metabolit sekunder seperti enzim ekstrem (L-asparaginase) atau senyawa antibakteri.

Lokasi pengambilan sampel sebagai sumber isolat bakteri termohalofilik penelitian ini dilakukan di sumber air panas Wawolesea. Sumber air panas Wawolesea adalah sumber air panas yang berada di Desa Wawolesea Kecamatan Lasolo, Kabupaten Konawe Utara, Sulawesi Tenggara. Sumber air panas Wawolesea memiliki tipe endapan travertin atau endapan batu kapur yang berwarna kuning kecoklatan dan berwarna putih. Endapan yang terbentuk pada sumber air panas Wawolesea tergolong endapan travertin yang banyak mengandung unsur-unsur mineral. Keberadaan unsur-unsur mineral tersebut dapat menjadi sumber nutrisi bagi kehidupan bakteri.

Lokasi pengambilan sampel dilakukan di lima titik yang berbeda dengan parameter lingkungan yang berbeda. Sampel di Lokasi a), b), c), d), dan e) dapat dilihat pada Gambar 2.2.





**Gambar 2.2.** Lokasi pengambilan sumber isolat;

- a) air tampak kehijauan, b) endapan nampak coklat, c) air kebiruan dan lebih pekat, d) air tampak jernih dan endapan putih, e) air tampak kehijauan dan endapan putih.

**Gambar 2.2** menunjukkan bahwa zona pengambilan sampel sebagai sumber isolat bakteri termohalofilik tampak memiliki perbedaan. Lokasi a) dan b) memiliki endapan berwarna kekuningan, sedangkan Lokasi c), d) dan e) memiliki endapan berwarna putih. Lokasi d) dan e) merupakan zona yang jauh dari sumber mata air, sedangkan titik III merupakan sumber mata air yang mendidih. Hasil pengukuran parameter suhu, salinitas dan pH lingkungan air panas Wawolesea.

Ada beberapa mata air panas dengan warna air/endapan berbeda: putih kekuningan, putih bening, kuning, kuning pekat, putih kehijauan. Endapan limonit (oksida besi) dan travertin ditemukan di berbagai Lokasi. Suhu rata-rata termal 48 °C. pH rata-rata 7,85. Ion klorida dominan (jenis klorida). Warna air jelas, terasa asin, bau sedikit belerang. Endapan travertin juga terdapat di lokasi tersebut (Jamaluddin et al., 2018).

Pelczar et al. (1988) membagi tiga kelompok bakteri berdasarkan perbedaan suhu pertumbuhannya, yaitu kelompok bakteri psikrofilik atau kelompok bakteri yang tumbuh pada kisaran suhu 0-20 °C, kelompok bakteri mesofilik yaitu kelompok bakteri yang tumbuh pada kisaran suhu 21-40 °C dan kelompok bakteri termofilik yaitu kelompok bakteri yang tumbuh pada suhu di atas 40 °C. Hasil pengukuran suhu pada Tabel 2.1 menunjukkan bahwa di titik I-V memiliki suhu air berkisar antara 45-53 °C. Data pengukuran suhu tersebut dapat menunjukkan bahwa bakteri yang tumbuh di lingkungan sumber air panas Wawolesea (Titik I hingga Titik V) tergolong ke dalam kelompok bakteri termohalofilik.

Hasil pengukuran parameter lingkungan sumber air panas Wawolesea dapat



I.



**Tabel 2.1.** Paramater lingkungan pH, suhu, dan salinitas sumber air panas wawolesea

| Parameter Lingkungan |        |                  |           |               |        |
|----------------------|--------|------------------|-----------|---------------|--------|
| No                   | Lokasi | Sampel           | Suhu (°C) | Salinitas (%) | pH air |
| 1                    | I      | I <sub>1</sub>   | 50        | 15            | 5,78   |
|                      |        | I <sub>2</sub>   | 50        | 15            | 5,78   |
| 2                    | II     | II <sub>1</sub>  | 49        | 15            | 5,73   |
|                      |        | II <sub>2</sub>  | 49        | 15            | 5,73   |
| 3                    | III    | III <sub>1</sub> | 53        | 16            | 5,91   |
|                      |        | III <sub>2</sub> | 53        | 16            | 5,91   |
| 4                    | IV     | IV <sub>1</sub>  | 49        | 15            | 5,84   |
|                      |        | IV <sub>2</sub>  | 49        | 15            | 5,84   |
| 5                    | V      | V <sub>1</sub>   | 45        | 15            | 5,60   |
|                      |        | V <sub>2</sub>   | 45        | 15            | 5,60   |

Parameter lingkungan lain yang diukur pada penelitian ini adalah salinitas. Salinitas dapat mempengaruhi tekanan osmotik pada sel bakteri, sehingga salinitas dapat menentukan daya hidup bakteri. Hasil pengukuran salinitas pada **Tabel 2.1** menunjukkan bahwa titik I, II, IV dan V memiliki salinitas air sebesar 15% atau setara dengan 1,5% sedangkan pada titik III diperoleh kadar salinitas air panas Wawolesea sebesar 16%. Data pengukuran salinitas tersebut menunjukkan bahwa bakteri yang hidup di sumber air panas Wawolesea (Titik I-V) tergolong bakteri yang tahan terhadap salinitas atau bakteri halofilik. Oleh karena itu, berdasarkan data parameter suhu dan salinitas dapat dikatakan bahwa bakteri yang hidup di sumber air panas Wawolesea adalah kelompok bakteri termohalofilik.

Parameter lingkungan yang juga diukur dalam penelitian ini adalah pH. Potensial hidrogen (pH) didefinisikan sebagai aktivitas ion hidrogen (H<sup>+</sup>) yang terlarut. Potensial hidrogen (pH) lingkungan sangat mempengaruhi keberadaan suatu bakteri di lingkungan. Hasil pengukuran pH pada **Tabel 2.1** menunjukkan bahwa nilai pH air pada titik pengamatan berada dalam kisaran sedikit asam. Rentang pH tersebut masih berada dalam batas yang memungkinkan bagi bakteri untuk tumbuh di lingkungan sumber air panas Wawolesea. Secara umum, bakteri mampu hidup pada pH 4-9, meskipun kondisi optimum pertumbuhannya berada pada pH netral hingga sedikit basa, yaitu sekitar 6,5-7,5 (Fajar et al., 2022). Dengan demikian, kondisi pH di lokasi penelitian masih mendukung keberadaan dan aktivitas bakteri.



### Termohalofilik pada Media Nutrien Agar

memisahkan satu jenis bakteri dengan yang lain yang berasal dari bakteri. Hal ini bisa dilakukan dengan menumbuhkannya di media agar untuk membentuk koloni (Nigsih et al., 2023). Hasil isolasi bakteri dari sampel air panas Wawolesea dapat dilihat pada **Gambar 2.3**.





**Gambar 2.3.** Isolat bakteri pada media nutrient agar:

a) lokasi I, b) lokasi II, c) lokasi III, d) lokasi IV, e) lokasi V, diinkubasi pada suhu 48°C, pH 7, 24 jam.

### 2.4.3 Isolasi Bakteri Termohalofilik Penghasil L-Asparaginase

Hasil Isolasi bakteri termohalofilik penghasil L-asparaginase dari sampel air yang diperoleh dari sumber air panas Wawolesea Kabupaten Konawe Utara Sulawesi Tenggara diperoleh 15 isolat bakteri termohalofilik. Dari 15 Isolat tersebut terdapat 8 isolat bakteri penghasil L-asparaginase (Tabel 2.2). Berdasarkan data pada **Tabel 2.2** menunjukkan bahwa dari lokasi sumber air panas dari 5 titik yang berbeda terdapat 4 titik yang terdapat bakteri termohalofilik penghasil L-asparaginase. Kedelapan isolat tersebut tumbuh dan mampu mengubah substrat L-asparagin dari berwarna kuning menjadi warna pink. Terbentuknya warna pink di sekitaran koloni menandakan kemampuan bakteri menghasilkan enzim L-asparaginase dapat dilihat pada Tabel 2.2.

**Tabel 2.2.** Isolat bakteri penghasil L-asparaginase, suhu 37 °C dan waktu Inkubasi 48 jam.

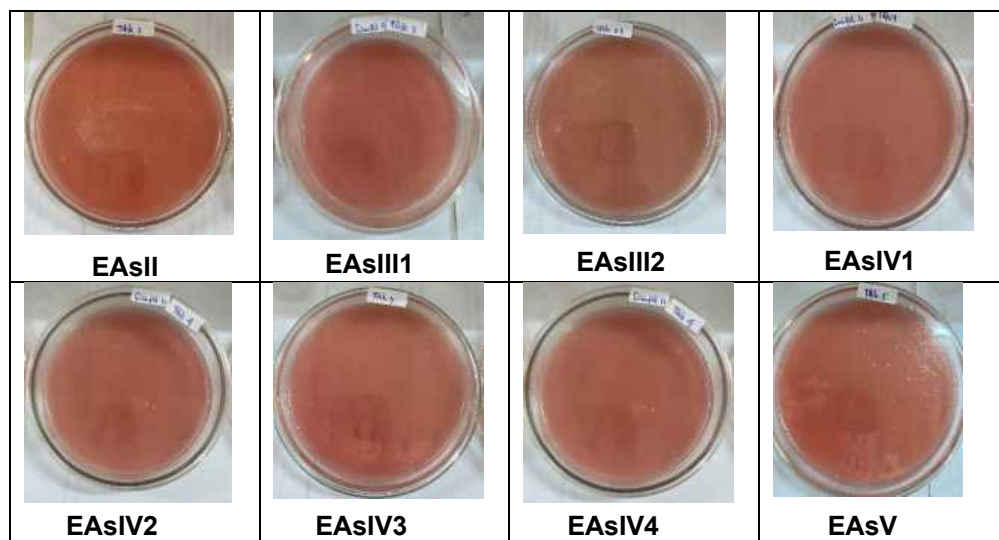
| No | Lokasi Pengambilan Sampel | Kode Isolat Penghasil L-Asparaginase | Warna      |
|----|---------------------------|--------------------------------------|------------|
| 1  | Titik I                   | EAsI                                 | Kuning     |
| 2  | Titik II                  | EasII                                | Merah muda |
| 3  | Titik III                 | EAsIII1                              | Merah muda |
|    |                           | EAsIII2                              | Merah muda |
| 4  | Titik IV                  | EAsIV1                               | Merah muda |
|    |                           | EAsIV2                               | Merah muda |
|    |                           | EAsIV3                               | Merah muda |
|    |                           | EAsIV4                               | Merah muda |
|    | Titik V                   | EAsV                                 | Merah muda |



lat bakteri termohalofilik asal sumber air panas Wawolesea menghasilkan L-asparaginase. Kemampuan tersebut, ditandai

dengan adanya perubahan pada media spesifik dari warna kuning menjadi warna pink di sekitar koloni bakteri. Hal ini sejalan dengan penelitian Dalfard (2016) dari 24 isolat bakteri dari mata air panas, 7 isolat menghasilkan L-asparaginase dengan berubahnya warna medium di sekitar koloni dari kuning ke pink.

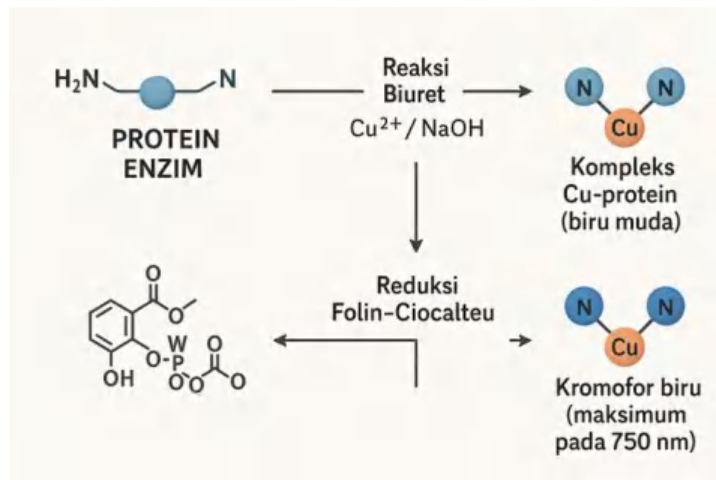
Hasil pada **Tabel 2.2** dan **Gambar 2.3** menunjukkan ada 8 isolat yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan L-asparaginase. Aktivitas Enzim L-asparaginase ditentukan dengan metode Nessler. Prinsip dari metode Nessler berdasarkan pada pereaksi Nessler ( $K_2HgI_4$ ) bila bereaksi dengan amonia dalam basa akan membentuk dispersi koloid yang berwarna kuning coklat. Intensitas warna yang tampak berbanding lurus dengan konsentrasi amonia yang ada dalam sampel. Banyaknya amonia yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis asam amino L-asparagin oleh enzim L-asparaginase dinyatakan sebagai aktivitasnya. Amonia yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis tersebut bereaksi dengan reagen Nessler. Penentuan aktivitas enzim L-asparaginase menggunakan amonium klorida sebagai larutan standar. Satu unit L-asparaginase (IU) didefinisikan sebagai jumlah enzim L-asparaginase yang mengkatalis pembentukan satu  $\mu\text{mol}$  amonia permenit pada kondisi pengujian (Ahmad et al., 2013).



**Gambar 2.4.** Bakteri termohalofilik pada media spesifik penghasil L-asparaginase

Pengujian kadar protein dilakukan dengan menggunakan metode Lowry. Metode Lowry merupakan uji protein secara kuantitatif, yaitu dengan spektrofotometer ar yang digunakan adalah larutan BSA ( *Bovine Serum Albumin*) ein. Prinsip kerja dari metode Lowry adalah reaksi antara protein pada suasana alkalis akan memberikan warna biru yang ung pada konsentrasi protein sampel reaksinya dapat dilihat





**Gambar 2.5.** Reaksi reagen Lowry dengan protein enzim (Dalfard et al., 2016).

Metode Lowry didasarkan pada reaksi Biuret antara ikatan peptida protein dengan ion  $Cu^{2+}$  dalam suasana basa yang membentuk kompleks Cu protein berwarna biru muda, diikuti oleh reaksi reduksi reagen Folin Ciocalteu oleh kompleks tersebut serta residu asam amino aromatik. Reaksi ini menghasilkan kromofor biru dengan absorbansi maksimum pada panjang gelombang sekitar 750 nm, di mana intensitas warna yang terbentuk berbanding lurus dengan konsentrasi protein dalam sampel.

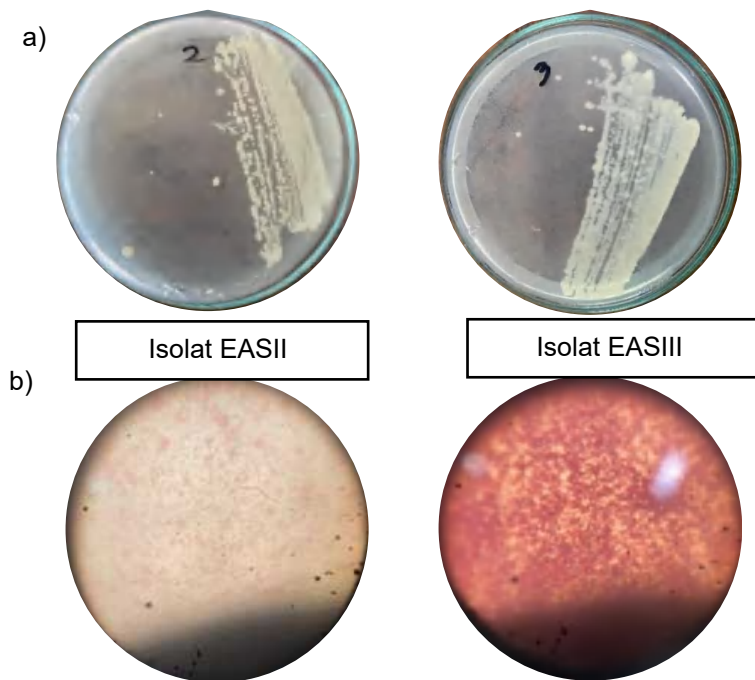
## 2.5 Uji Biokimia Isolat Bakteri Penghasil Enzim L-asparaginase

Pewarnaan bakteri adalah proses penggunaan warna untuk meningkatkan kontras dan mempermudah pengamatan bakteri di bawah mikroskop. Pewarnaan bakteri penting dalam identifikasi dan klasifikasi bakteri, karena membantu membedakan antara satu jenis bakteri dengan jenis lainnya (Ningsih et al., 2023). Pewarnaan Gram merupakan salah satu reaksi pewarnaan yang paling berguna untuk identifikasi bakteri. Bakteri dalam suspensi difiksasi ke slide kaca dengan pemanasan singkat dan kemudian ditetesi dua pewarna yang bergabung untuk membentuk kompleks pewarna biru besar di dalam setiap sel. Ketika slide dibilas dengan larutan alkohol, bakteri Gram positif memperlihatkan warna biru di setiap sel. Ketika slide dibilas dengan larutan alkohol, bakteri Gram positif mempertahankan warna biru dan bakteri Gram negatif kehilangan warna biru. Slide kemudian diwarnai dengan pewarnaan merah muda yang lebih lemah yang menyebabkan bakteri Gram negatif menjadi kan bakteri Gram positif tetap biru. Pewarnaan Gram bereaksi struktur permukaan sel bakteri yang terlihat Ketika sel dilihat lektron (Harahap, 2021).



penghasil enzim L-asparaginase di uji biokimia. Isolat bakteri memiliki bentuk tidak beraturan (irregular) dan menyebar. Koloni berbentuk batang (*bacill*) dan berwarna merah yakni termasuk Isolat bakteri EASIII koloninya memiliki bentuk beraturan dan

menyebar. Koloni berwarna biru dan berbentuk batang. Isolat ini merupakan bakteri Gram positif hal ini dapat dilihat pada **Gambar 2.6**.

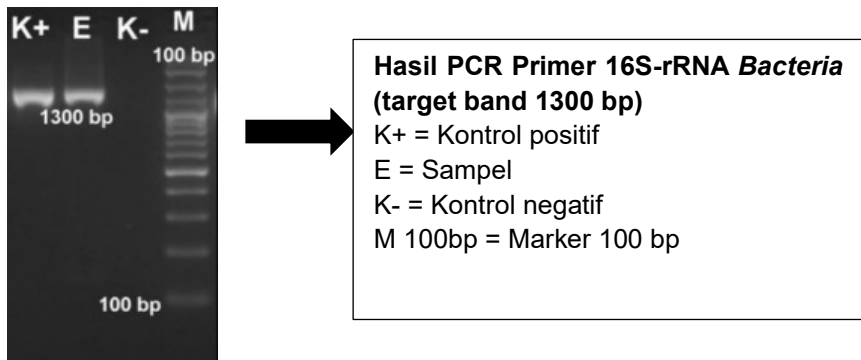


**Gambar 2.6.** a) Isolat bakteri EASII dan EASIII diinkubasi 48 °C, selama 24 jam, b) hasil pewarnaan dan pengamatan mikroskopik .

Setelah dilakukan pewarnaan mikroskopik pada isolat bakteri EASII dan EASIII, pengamatan di bawah mikroskop menunjukkan morfologi sel berupa batang (bacillus) dengan pewarnaan Gram. Menurut jurnal mikrobiologi, bakteri berbentuk batang yang diwarnai dengan pewarnaan Gram akan tampak sebagai sel-sel berwarna ungu gelap (Gram positif) atau merah-jambu (Gram negatif) pada struktur dinding selnya. Banyak isolat termofilik dari lingkungan panas menunjukkan Gram positif karena dinding sel tebalnya yang tahan panas. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan bahwa Isolat diidentifikasi sebagai *Enterobacter aesburiae* strain R16C1 (Manhas et al., 2023). Penelitian oleh Karim et al. (2020) juga menemukan Isolat *Enterobacter agglomerans* (Gram negatif), yang berasal dari



## 2.6 Hasil Elektroforesis Bacteria Isolat EASIII



**Gambar 2.7.** Elektroforesis PCR

Hasil elektroforesis PCR pada gel agarosa menunjukkan bahwa kontrol positif (K+) menghasilkan satu pita DNA berukuran sekitar 1300 bp, sesuai dengan target amplifikasi yang diharapkan, sehingga mengonfirmasi bahwa kondisi PCR optimal. Sampel uji (E) juga menampilkan satu pita DNA pada ukuran yang sama (1300 bp), yang menunjukkan bahwa fragmen gen target berhasil diamplifikasi dari sampel. Sebaliknya, kontrol negatif (K-) tidak menunjukkan adanya pita DNA, sehingga membuktikan tidak adanya kontaminasi dalam reaksi PCR. Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa sampel uji mengandung fragmen DNA target berukuran 1300 bp.

## 2.7 Hasil Identifikasi Spesies Bakteri

Isolat dikategorikan memiliki kesamaan spesies apabila nilai kemiripan urutannya  $\geq 97\%$ , sedangkan nilai  $\geq 99\%$  menunjukkan kemungkinan kuat bahwa isolat tersebut adalah strain dari spesies yang sama. Dalam penelitian ini, hasil analisis sekuensing terhadap isolat bakteri termohalofilik yang diperoleh dari sumber air panas Wawolesea menunjukkan bahwa masing-masing isolat memiliki kemiripan tinggi dengan berbagai spesies bakteri yang telah terdokumentasi, sebagaimana ditunjukkan pada **Tabel 2.3**. Penggunaan identifikasi berbasis gen 16S rRNA ini memiliki sejumlah kelebihan, antara lain metode yang cepat, akurat, dan mampu mengidentifikasi bakteri yang sulit dibedakan secara morfologi maupun biokimia.

Hasil sekuensing gen 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat EASIII memiliki kemiripan 97,38-97,62% dengan beberapa spesies *Enterobacter*. Isolat *Enterobacter* sp. termohalofilik berasal dari lingkungan ekstrem alami dari mata air panas Wawolesea yang bersalininitas tinggi. Mikroorganisme di lingkungan ini sering



genetik dan fisiologis terhadap suhu dan tekanan osmotik. Tidak hanya bakteri patogen, tetapi juga bakteri lingkungan yang ada di tanah, air, dan sedimen, sehingga wajar ditemukan pada lingkungan yang bersalininitas tinggi. Nilai kemiripan sekuens  $< 98,7\%$  menunjukkan bahwa isolat tersebut belum dapat dipastikan sebagai spesies yang telah terdeskripsi, sehingga isolat tersebut diidentifikasi sampai tingkat genus (*Enterobacter* sp.). Hal ini menunjukkan bahwa isolat tersebut merupakan strain lingkungan yang

unik, atau spesies baru yang belum dilaporkan sebelumnya. Hasil identifikasi spesies bakteri termohalofilik di sumber air panas Wawolesea didapatkan 10 sekuensing yang paling mirip dapat dilihat pada **Tabel 2.3**.

**Tabel 2.3.** Identifikasi bakteri 16s rRNA

| Kode Sampel | Hasil Identifikasi Bakteri              |                             |                                          |           |
|-------------|-----------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------|-----------|
|             | Kultur Identifikasi secara Uji Biokimia | PCR Primer 16S-rRNA Bakteri | Sekuensing (Sanger Sekuensing )          | Kemiripan |
| EAsIII      | <i>Bacillus maquariensis</i>            | 1300 bp                     | • <i>Enterobacter</i> sp.                | • 97,62%  |
|             |                                         |                             | • <i>Enterobacter ludwigii</i>           | • 97,54%  |
|             |                                         |                             | • <i>Enterobacter roggenkampii</i>       | • 97,54%  |
|             |                                         |                             | • <i>Enterobacter asburiae</i>           | • 97,54%  |
|             |                                         |                             | • <i>Enterobacter cloacae</i>            | • 97,46%  |
|             |                                         |                             | • <i>Enterobacter mori</i>               | • 97,46%  |
|             |                                         |                             | • <i>Enterobacter quasiroggenkampii</i>  | • 97,38%  |
|             |                                         |                             | • <i>Enterobacter vonholyi</i>           | • 97,46%  |
|             |                                         |                             | • <i>Enterobacter pseudoroggenkampii</i> |           |
|             |                                         |                             | • <i>Cedecea davisae</i>                 |           |

Hasil analisis gen 16S rRNA menunjukkan bahwa bakteri termohalofilik isolat EAsIII1 memiliki kedekatan dan kesamaan dengan *Entrobacter* sp. dengan kemiripan 97,62%. Kemiripan tidak sampai 100% dikarenakan bakteri spesies ini belum pernah ditemukan dan hanya sampai pada tingkat genus. Berikut pohon filogenetik menggunakan software MEGA 12.

## 2.8 Pohon Filogenetik

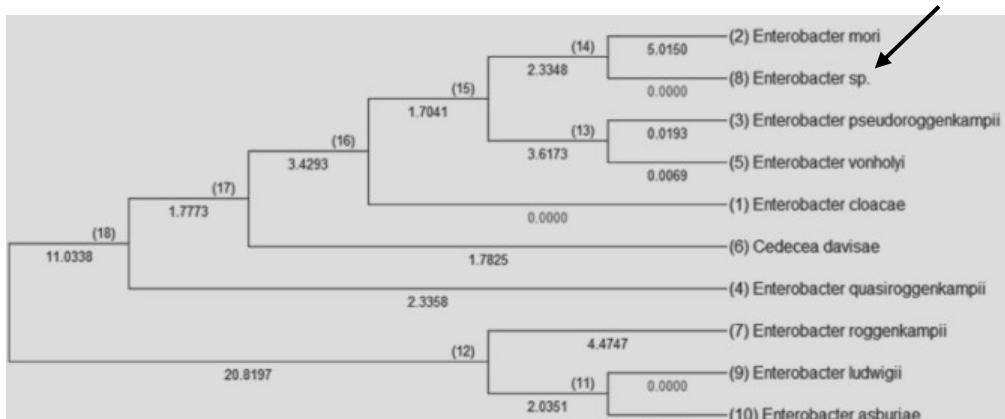
Pohon filogenetik adalah diagram yang menggambarkan hubungan evolusi antar organisme atau isolat berdasarkan data genetik atau karakteristik biologis lainnya. Pohon ini memperlihatkan leluhur bersama dan divergensi spesies atau strain. Dalam mikrobiologi, pohon ini biasanya dibuat berdasarkan gen konservatif seperti 16S rRNA inti (*core genome*). Tujuannya: identifikasi taksonomi, analisis kekerabatan, asal-usul evolusi, dan memperkirakan karakter hubungan evolusi.

Metode konstruksi pohon filogenetik dilakukan dengan beberapa metode *distance-based* (*Neighbor-Joining*), *maximum parsimony*, dan *Bayesian inference*, yang masing-masing memiliki





kelebihan dan keterbatasan dalam menggambarkan hubungan evolusi. Metode *maximum likelihood* dan *Bayesian inference* dinilai paling kuat secara statistik karena mempertimbangkan model evolusi. Pohon filogenetik dapat dilihat pada **Gambar 2.8**.



**Gambar 2.8.** Pohon filogenetik isolat EAsIII (Genbank NCBI Blast)

Berdasarkan analisis filogenetik yang ditunjukkan pada **Gambar 2.8**. Pohon filogenetik, diketahui bahwa isolat bakteri hasil penelitian memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat dengan *Enterobacter mori*. Hal ini ditunjukkan oleh nilai jarak genetik (*branch length*) sebesar 0.0000, yang menandakan tidak adanya perbedaan signifikan pada sekuens gen 16S rRNA antara isolat *Enterobacter sp.* hasil penelitian dan *Enterobacter mori*. Dengan demikian, isolat tersebut dapat diidentifikasi sebagai *Enterobacter mori* atau strain yang memiliki kedekatan genetik yang sangat tinggi dengan spesies tersebut. Secara umum, pohon filogenetik terbagi menjadi dua klaster utama kelompok *Enterobacter*. Klaster pertama mencakup *Enterobacter mori*, *Enterobacter sp.*, *Enterobacter pseudoroggenkampii*, *Enterobacter vonhoyi*, *Enterobacter cloacae*, dan *Cedecae davisae*, sedangkan klaster kedua terdiri atas *Enterobacter quasiroggenkampii*, *Enterobacter roggenkampii*, *Enterobacter ludwigii*, dan *Enterobacter asburiae*. Kedua klaster tersebut terpisah dengan jarak evolusi sebesar 20.8197, yang menunjukkan adanya perbedaan genetik yang cukup jauh antar kelompok.

Klaster pertama, *Enterobacter cloacae* berkerabat dekat dengan kelompok *E. vonhoyi* dan *E. pseudoroggenkampii* dengan jarak evolusi relatif kecil (1.7825-3.6173), menandakan hubungan taksonomi yang masih erat dalam genus yang sama. Sementara itu, *Cedecae davisae* menempati posisi filogenetik di antara klaster, mengindikasikan bahwa spesies ini masih memiliki hubungan dengan *Enterobacter* namun telah mengalami divergensi genetik. Hal ini memperlihatkan hubungan kekerabatan yang erat antara *E. ludwigii* (jarak 2.0351), serta *E. roggenkampii* dan *E. asburiae* (jarak 4.4747), yang menunjukkan bahwa keempat spesies tersebut berasal dari nenek moyang evolusioner yang sama. Jarak evolusi dalam klaster ini menunjukkan perbedaan yang relatif kecil,





sehingga spesies-spesies tersebut masih termasuk dalam kelompok filogenetik yang berdekatan.

Hasil analisis ini memperkuat bahwa isolat *Enterobacter* sp. yang diperoleh dari penelitian memiliki kedekatan genetik paling tinggi dengan *Enterobacter mori*, yang termasuk dalam genus *Enterobacter* famili *Enterobacteriaceae*. Analisis ini sejalan dengan laporan Zhang et al. (2018) dan Meera dan Shivaji (2020), yang menjelaskan bahwa spesies dalam genus *Enterobacter* memiliki tingkat kesamaan sekuens 16S rRNA yang tinggi ( $\geq 98\%$ ), sehingga perbedaan taksonomi antar genus sering kali ditentukan melalui analisis jarak genetik yang sangat kecil. Dengan demikian, isolat penelitian ini dapat dikonfirmasi secara molekuler sebagai bagian dari kelompok *Enterobacter mori* berdasarkan kedekatan filogenetiknya.

## 2.9 Kesimpulan

Hasil isolasi dan identifikasi bakteri termohalofilik penghasil enzim L-asparaginase menunjukkan 8 isolat yang memiliki aktivitas L-asparaginase dan satu isolat kode EASIII yang memiliki aktivitas tertinggi. Isolat EASIII telah diidentifikasi melalui uji biokimia dan identifikasi 16s rRNA yaitu termasuk spesies *Enterobacter* sp.

