

Keragaman Bakteri Endofit Penghasil L-Asparaginase Bebas L-Glutaminase

Diversity of Endophytic Bacteria as a L-Asparaginase Producer Free of L-Glutaminase

Tri Ratna Sulistiyani*, Dinihari Indah Kusumawati

Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong, Indonesia

*E-mail: trilisty01@gmail.com

Diterima: 14 Desember 2018

Direvisi: 2 Februari 2019

Disetujui: 20 Februari 2019

Abstrak

Endofit merupakan mikroba potensial sumber penghasil senyawa aktif penting. Endofit yang diisolasi dari tanaman obat tropis telah menarik perhatian karena biodiversitasnya yang tinggi dan diperkirakan mampu menghasilkan senyawa baru di bidang kesehatan. L-asparaginase merupakan enzim pertama dengan aktivitas antileukemia yang sedang intensif dipelajari. Penelitian ini bertujuan untuk mengoleksi dan mengidentifikasi bakteri endofit dari tanaman obat tropis serta melakukan penapisan potensi penghasil enzim L-asparaginase bebas L-Glutaminase. Tanaman *Gliricidia sepium*, *Pittosporum moluccanum*, *Clerodendrum b Buchananii*, dan Zingiberaceae dikoleksi dari Desa Wanggameti, Sumba Timur, NTT. Sampel disterilkan menggunakan metode sterilisasi permukaan dan bakteri endofit diisolasi menggunakan metode *plant piece* pada media R2A. Bakteri endofit terisolasi diidentifikasi berdasarkan sekuen 16S rDNA. Penapisan bakteri endofit penghasil enzim L-asparaginase dilakukan secara kualitatif menggunakan media R2A termodifikasi dengan penambahan L-asparagin dan indikator *phenol red*. Terdapat 34 isolat bakteri endofit berhasil diisolasi dari 5 sampel tanaman obat. Sebanyak 14 genus terdiri dari 17 spesies bakteri yang berbeda diperoleh dari 34 isolat terseleksi. Bakteri endofit *Pseudomonas stutzeri* strain SMKL1 dan *Rhizobium radiobacter* strain SMKW2 dari tanaman Kahili berpotensi sebagai penghasil L-asparaginase bebas L-glutaminase dan berpotensi sebagai kandidat penghasil senyawa kemoterapi kanker leukemia.

Kata kunci: Bakteri endofit; L-asparaginase; Tanaman obat

Abstract

Endophytes are potential as a source of active compound producer. Endophytes that is isolated from tropical medicinal plants has been getting attention due to its high biodiversity and active compound producing ability. L-asparaginase is the first enzyme used as chemotherapeutic agent for leukemia. The aim of this study is to collect the endophytic bacteria associated with tropical medicinal plants from Sumba Island and investigate the activity of L-asparaginase free L-Glutaminase from endophytic bacteria isolates. The samples *Gliricidia sepium*, *Pittosporum moluccanum*, *Clerodendrum b Buchananii*, and Zingiberaceae are collected from Wanggameti, East Sumba, NTT. Samples are sterilized using surface-sterilization method and endophytic bacteria are isolated using plant piece method on R2A media. Selected endophytic bacteria are identified by 16S rDNA sequences. L-asparaginase screening is conducted using modified R2A with addition of L-asparagine and phenol red as colour indicator. A total of 34 isolates of endophytic bacteria were collected from 5 samples. A total of 14 genus consisted of 17 different bacterial species were obtained from 34 selected isolates. Endophytic bacteria of *P. stutzeri* strains of SMKL1 and *R. radiobacter* strains of SMKW2 from the Kahili plant were needed as L-glutaminase-free L-asparaginase and were potential to be candidate of leukemia cancer chemotherapy.

Keywords: Endophytic bacteria; L-asparaginase; Medicinal plants

PENDAHULUAN

Kebutuhan senyawa obat kanker untuk kemoterapi semakin meningkat seiring meningkatnya angka kejadian 36 jenis kanker di 185 negara yang mencapai 18.1 juta kasus dan 9.6 juta kematian.¹ Kanker menempati peringkat ke-7 sebagai penyebab kematian utama di Indonesia dengan persentase kematian 5.7% dari total angka kejadian dengan tingkat prevalensi 4.3 per 1000 populasi.² Obat-obatan dari tanaman herbal telah lama digunakan oleh masyarakat untuk mengobati berbagai penyakit seperti diabetes, kanker, dan masalah kulit. Beberapa tanaman yang dapat digunakan untuk terapi kanker diantaranya Tapak dara (*Catharanthus roseus*), Kemangi (*Ocimum sanctum*), Lidah buaya (*Aloe vera*), Ginseng India (*Withania somnifera*), Bawang putih (*Allivum sativum*), Kunyit (*Curcuma longa*)³, *Taxus brevifolia*, dan beberapa tanaman obat lainnya. Senyawa kurkuminoid yang terkandung dalam tanaman kelompok famili Zingiberaceae mempunyai banyak manfaat salah satunya sebagai antikanker.⁴

Selama beberapa dekade pengobatan kanker dilakukan dengan kemoterapi, operasi dan radiasi, atau kombinasi dari ketiganya.⁵ Akan tetapi, penggunaan obat melalui kemoterapi secara konvensional sering kali tidak efisien dan memiliki kendala dalam pengiriman obat ke target sel kanker sehingga kemoterapi justru membahayakan sel-sel sehat pasien. Perkembangan kemoterapi saat ini semakin pesat untuk meningkatkan efisiensi obat ke sel kanker dan meminimalisir pengaruh obat ke sel sehat menggunakan *Drug Delivery System* (DDS) yang dikombinasikan dengan nanopartikel yang berfungsi sebagai molekul pembawa obat ke sel kanker.⁶

Pengetahuan tentang etnobotani suatu tanaman mampu memberikan informasi yang cukup untuk melakukan isolasi senyawa aktif dari tanaman tradisional. Keterbatasan sediaan tanaman di alam dianggap sebagai faktor pembatas untuk

memperoleh senyawa aktif baru. Bakteri endofit merupakan salah satu mikroba sumber senyawa bioaktif potensial. Bakteri endofit hidup mengkolonisasi pada tanaman terutama daun, batang, akar, dan dapat tinggal untuk seluruh atau sebagian dari siklus hidupnya tanpa menyebabkan kerusakan atau penyakit bagi inangnya. Populasi dan profil bakteri endofit pada tanaman dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu kondisi lingkungan tempat tumbuh tanaman inang, jenis tanaman, umur tanaman, dan umumnya tanaman dengan sejarah etnobotani tinggi memiliki prospek keragaman mikroba endofit yang tinggi pula.⁷⁻⁹

Endofit saat ini dipandang sebagai sumber potensial untuk menghasilkan metabolit sekunder dan enzim penting dalam industri. Senyawa alami berupa enzim yang berasal dari mikroba dimanfaatkan oleh industri farmasi sebagai obat, contohnya L-asparaginase, kitinase, kolagenase, lipase, nattokinase, *L-amino acid α -ligase*, dan *serratiopeptidase*.^{10,11} Enzim L-asparaginase merupakan enzim yang rutin digunakan dalam kemoterapi terutama untuk kanker sel darah putih.^{12,13} Enzim akan mengambil asam amino esensial asparagin dari sel kanker dan memecahnya sehingga sel kanker mengalami kelaparan dan akhirnya mati. Enzim tersebut bertanggung jawab dalam konversi L-asparagin menjadi L-aspartat dan amonia. L-asparaginase dari bakteri yang telah digunakan adalah Elspar[®] dari *Escherichia coli* dan Erwinase[®] dari *Erwinia chrysantemi*.⁹ Selain dalam bidang kesehatan, L-asparaginase juga digunakan dalam membantu proses reduksi kadar L-asparagin yang merupakan prekursor utama dalam pembentukan kontaminasi makanan akrilamid. Bakteri endofit yang berasal dari lima tanaman obat *Catharanthus roseus*, *Ocimum sanctum*, *Aloe vera*, *Withania somnifera*, dan *Marrayo konengi* memiliki aktivitas L-asparaginase yang dapat dikembangkan sebagai senyawa antikanker baru.¹⁰

Beberapa mikroba dapat menghasilkan L-asparaginase dan memiliki aktivitas L-glutaminase karena L-asparagin dan L-glutamin memiliki struktur yang sama. Mikroba tersebut antara lain *Serratia marcescens*, *E. coli*, *E. chrysantemi*, *Pseudomonas* sp. dan *Acinetobacter glutaminasificans*. Studi melaporkan bahwa adanya aktivitas L-glutaminase dapat menyebabkan efek samping selama terapi antara lain alergi, pankreatitis, diabetes, dan kelainan koagulasi.¹¹

Secara tradisional tanaman obat yang digunakan untuk isolasi bakteri endofit memiliki sifat antimikroba, namun belum ada data ilmiah yang mempelajari sifat antikankernya. Oleh karena itu, penapisan mikroba penghasil L-asparaginase bebas L-glutaminase perlu dilakukan dari berbagai sumber, terutama dari bakteri endofit. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengidentifikasi, dan melakukan penapisan bakteri endofit penghasil enzim L-asparaginase bebas L-glutaminase dari tanaman obat yang dikoleksi dari Desa Wanggameti, Sumba Timur, Nusa Tenggara Timur (NTT).

METODE

Penelitian ini merupakan percobaan laboratorium yang dilakukan di Laboratorium Biosistematika dan Kultur Koleksi Mikroba, Pusat Penelitian Biologi-LIPI.

Alat dan bahan

Alat yang digunakan antara lain mesin PCR (*Thermo Scientific*), Elektroforator (Takara, model Mupid-EXu), dan UV *transilluminator* (Biorad). Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 70%.

natrium hipoklorit 3%, sikloheksamida (Merck), media R2A (Difco), KOH (Merck), gliserol (Merck), *GoTaq Green Master Mix 2x* (Promega), primer 27F dan 1492R (IDT), DMSO for *molecular* (Sigma), agarosa (Thermo Scientific), etidium bromida (Biotech), pati terlarut (Merck), K₂HPO₄ (Merck), MgSO₄ (Merck), agar (Difco), *phenol red* (Sigma), L-asparagin (Merck), L-glutamin (Merck).

Sampel tanaman

Sampel tanaman obat diambil dari Desa Wanggameti, Sumba Timur, NTT dari ketinggian yang berbeda pada tahun 2016. Tanaman terpilih adalah tanaman sehat bebas kontaminasi patogen tanaman. Sampel yang digunakan sebanyak lima tanaman obat (Tabel 1). Sampel tanaman diidentifikasi di Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi-LIPI berdasarkan karakteristik morfologi.

Penyiapan sampel tanaman

Sampel tanaman dari lokasi pengambilan sampel dibawa ke laboratorium untuk diisolasi bakteri endofitnya. Sampel tanaman (rimpang, batang, daun, bunga, dan buah) dicuci dengan air mengalir selama 5-10 menit, dipotong-potong, dan dilanjutkan dengan proses sterilisasi permukaan.

Sterilisasi permukaan jaringan tanaman

Sampel tanaman direndam dalam etanol 70% selama 3 menit, lalu direndam dengan natrium hipoklorit 3% selama 5 menit, dan dibilas dengan etanol 70% selama 30 detik, dilanjutkan pencucian dengan akuades steril selama 2 menit.

Tabel 1. Tanaman obat yang diambil dari Sumba Timur

Kode sampel	Nama Tanaman	Manfaat tanaman (secara tradisional)
SMG	Gamal (<i>Gliricidia sepium</i>)	Pengawet mayat
SMK	Kahili (<i>Pittosporum moluccanum</i>)	Obat luka kulit
SMR	Rarawala (<i>Clerodendrum buchanani</i>)	Obat sakit kepala
SMKz	Zingiberaceae	Imunostimulan
SMZg	Zingiberaceae	Antimikroba

Pencucian dengan akuades steril diulang sebanyak tiga kali.¹² Sampel kemudian dikeringkan menggunakan kertas tisu steril. Efisiensi sterilisasi permukaan diuji dengan menyebarkan 100 µL akuades hasil pencucian terakhir pada beberapa jenis media yang ditambah sikloheksamida 50 µg/mL untuk menghambat pertumbuhan cendawan. Media yang digunakan adalah R2A dengan konsentrasi 1/10. Akuades hasil pencucian yang menunjukkan adanya pertumbuhan mikroba tidak digunakan sebagai sampel isolasi bakteri endofit.

Isolasi bakteri endofit

Isolasi bakteri endofit dilakukan dengan metode *plant piece*.¹³ Sampel tanaman yang telah steril dipotong menjadi ukuran 4-6 mm. Sampel kemudian diletakkan di atas media yang telah ditambah sikloheksamida 50 µg/mL. Cawan petri selanjutnya diinkubasi selama 2-15 hari pada suhu 28 °C. Bakteri yang tumbuh dari metode *plant piece* diisolasi dan dipurifikasi. Bakteri endofit yang memiliki karakteristik morfologi berbeda dipilih untuk digunakan pada tahap berikutnya. Karakteristik fenotip yang diamati antara lain adalah warna, tepian permukaan, serta reaksi Gram menggunakan uji KOH.¹⁴

Pemurnian bakteri endofit

Koloni bakteri yang telah tumbuh dimurnikan pada media *Nutrient Agar* (NA) dengan cara digores berdasarkan metode kuadran. Pemurnian dilakukan sampai diperoleh koloni tunggal. Koloni yang telah murni kemudian ditanam dalam tabung reaksi yang berisi agar miring NA dan disimpan pada suhu 4 °C. Isolat murni selanjutnya dipelihara dengan baik dan disimpan dalam gliserol 10% pada suhu –80 °C.¹⁴

Ekstraksi DNA, amplifikasi PCR, dan elektroforesis

Sel dari koloni tunggal pada permukaan media padat diambil menggunakan tusuk

gigi steril dan disuspensikan ke dalam 20 µL air bebas nuklease. Suspensi kemudian di-*vortex* selama 10 detik dan diinkubasi pada suhu 98 °C selama 5 menit. Supernatan dipisahkan dari endapan dengan sentrifugasi untuk selanjutnya digunakan sebagai cetakan DNA.

DNA diamplifikasi menggunakan *GoTaq Green Master Mix 2x* dengan sepasang primer universal 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3'). Setiap tabung berisi *Ultrapure water* 9,75 µL, *GoTaq Green Master Mix 2x* 12,5 µL, primer 27F (10 µM) 0,625 µL, primer 1492R (10 µM) 0,625 µL, DMSO 0,5 µL, dan 1 µL sampel DNA dengan total volume 25 µL. Amplifikasi dilakukan pada kondisi PCR: predenaturasi 95 °C selama 90 detik, dilanjutkan 30 siklus terdiri atas denaturasi (95 °C, 30 detik), *annealing* (50 °C, 30 detik), *elongasi* (72 °C, 90 detik), dan *final extension* pada 72 °C selama 5 menit, dilanjutkan 4 °C selama 20 menit. Hasil amplifikasi dielektroforesis pada gel agarosa 1%. Setelah selesai, gel direndam dalam larutan etidium bromida 5 µg/mL selama 30 menit. Hasil elektroforesis dilihat menggunakan alat UV *transilluminator*.^{15,16}

Sekuensing 16S rDNA dan analisis bioinformatika

Hasil amplifikasi PCR disekuensing di Laboratorium MacroGen Korea menggunakan *automated DNA sequencer* (ABI PRISM 3130 *Genetic Analyzer*) (*Applied Biosystems*). Data hasil sekuensing diolah dengan program Bioedit. Homologi sekuen 16S rDNA dicari pada server Eztaxon. Sekuen referensi diperoleh dari bank data *GenBank/DDBJ/EMBL* yang diakses secara *online* melalui internet www.ezbiocloud.net. Analisis pohon filogenetik menggunakan metode *neighbour-joining* yang terimplementasi dalam MEGA 7.0 dengan nilai *bootstrap* 1000x.¹⁷⁻²⁰

Penapisan bakteri endofit dalam menghasilkan L-asparaginase atau L-glutaminase

Penapisan kemampuan bakteri endofit dalam menghasilkan L-asparaginase atau L-glutaminase menggunakan metode uji lempeng cepat berdasarkan kemampuan membentuk warna merah muda di sekitar koloni yang ditumbuhkan pada media R2A termodifikasi. Komposisi media R2A termodifikasi adalah *dextrose* 0.5 g, pati terlarut 0.5 g, K_2HPO_4 0.3 g, $MgSO_4$ 0.05 g, Agar 16 g, akuades 1000 mL. Media ditambah dengan *phenol red* 0.009%, dan asam amino (L-asparagin 5 g atau L-glutamin 5 g) dengan pH 6.2. Isolat bakteri selanjutnya digores pada permukaan media R2A termodifikasi dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24-48 jam. Isolat bakteri juga ditumbuhkan di media R2A termodifikasi tanpa asam amino (L-asparagin atau L-glutamin) sebagai kontrol negatif.²¹

HASIL DAN PEMBAHASAN

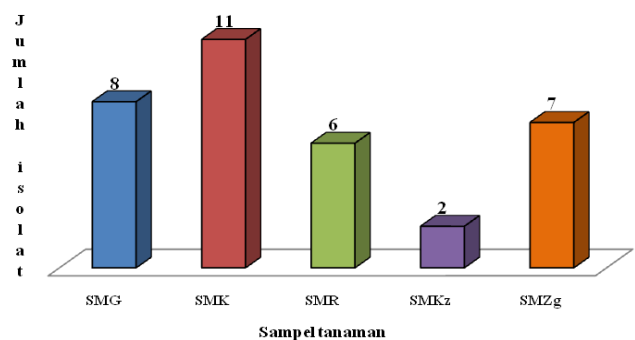
Isolasi bakteri endofit dari tanaman obat

Isolasi bakteri endofit asal tanaman obat dengan metode sterilisasi permukaan berhasil mensterilkan permukaan sampel. Hal ini ditunjukkan dengan tidak ditemukan mikroba yang tumbuh pada cawan petri yang telah disebar dengan akuades cucian terakhir hasil proses sterilisasi permukaan. Hasil isolasi menunjukkan bahwa bakteri endofit ditemukan pada semua bagian tanaman mulai dari rimpang, batang, daun, bunga, dan buah. Bakteri endofit ditemukan hampir pada semua bagian tanaman inang termasuk akar atau rimpang, batang, daun, biji, buah, umbi, dan juga dalam nodul tanaman legum.²²

Bakteri yang keluar dari bagian tanaman sampel dianggap sebagai bakteri

endofit. Bakteri yang terisolasi dari lima jenis tanaman sampel menunjukkan jumlah yang bervariasi (Gambar 1). Jumlah terbanyak diperoleh dari sampel tanaman obat Kahili (SMK) sebanyak 11 isolat. Terdapat dua faktor umum yang berpengaruh terhadap kelimpahan dan distribusi bakteri endofit pada suatu tanaman yaitu musim dan usia tanaman dimana tanaman yang lebih tua mempunyai organ yang lebih besar sehingga diperkirakan jumlah endofit akan lebih banyak.^{23,24} Beberapa faktor lain yang berpengaruh adalah rotasi tanaman, kondisi tanah, jaringan tanaman, dan keberadaan patogen tanaman. Jumlah endofit pada tanaman obat paling banyak terdapat pada bagian daun, diikuti batang, dan akar.²⁴

Daun pada umumnya dipilih oleh endofit karena permukaannya yang luas, kaya nutrisi, dan dinding selnya tipis sehingga memudahkan kolonisasi endofit. Hal tersebut berbeda dengan hasil studi yang menunjukkan bahwa jumlah bakteri endofit terisolasi lebih banyak dikoleksi dari bagian batang. Hal ini disebabkan batang merupakan tempat menyalurkan sari makanan dari daun menuju seluruh bagian tanaman.



Gambar 1. Bakteri endofit terisolasi dari tanaman obat di Sumba Timur ((Gamal (SMG); Kahili (SMK); Rarawala (SMR); Zingiberaceae (SMKz); Zingiberaceae (SMZg)).

Sebanyak 34 isolat bakteri endofit berhasil diisolasi dari 5 sampel tanaman obat yang diteliti. Isolat bakteri endofit yang berasosiasi dengan tanaman obat dari

Sumba Timur menunjukkan karakteristik yang beragam. Sebagian besar isolat memiliki karakteristik Gram negatif, bentuk *circular*, tepian *entire*, permukaan *shiny*, tidak tembus pandang, dan berwarna putih dan kuning. Hasil uji KOH

menunjukkan 85,29% merupakan bakteri Gram negatif dan 14,71% bakteri Gram positif (Tabel 2). Hasil pewarnaan Gram menunjukkan semua isolat memiliki sel berbentuk batang.

Tabel 2. Identitas bakteri endofit dari tanaman obat berdasarkan sekuen 16S rDNA

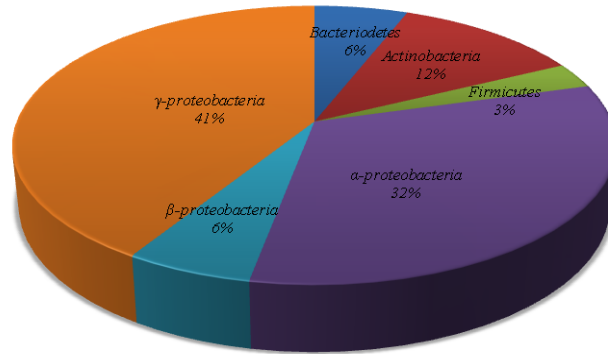
Isolat	Uji KOH	Identitas terdekat	Kesamaan (%)	Filum
SMGW1	-	<i>Chryseobacterium pallidum</i> DSM 18015(T)	99,42	<i>Bacteroidetes</i>
SMGW2	-	<i>Pantoea eucrina</i> PSNIH	99,70	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMGW3	-	<i>Pantoea anthophila</i> LMG2558(T)	99,81	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMGW4	-	<i>Chryseobacterium pallidum</i> DSM 18015(T)	99,42	<i>Bacteroidetes</i>
SMGW5	+	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> ATCC 31317(T)	99,48	<i>Actinobacteria</i>
SMGW6	-	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230 (T)	99,69	<i>Alphaproteobacteria</i>
SMGW7	-	<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 19358(T)	99,69	<i>Alphaproteobacteria</i>
SMGW8	-	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230 (T)	99,62	<i>Alphaproteobacteria</i>
SMKL1	-	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588(T)	99,86	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMKL2	-	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230 (T)	99,62	<i>Alphaproteobacteria</i>
SMKL3	+	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230 (T)	99,70	<i>Alphaproteobacteria</i>
SMKL4	-	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> ATCC 31317(T)	99,48	<i>Actinobacteria</i>
SMKL5	-	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34(T)	98,98	<i>Betaproteobacteria</i>
SMKW1	-	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> ATCC 31317(T)	99,93	<i>Actinobacteria</i>
SMKW2	-	<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 19358(T)	99,51	<i>Alphaproteobacteria</i>
SMKW3	-	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230(T)	99,69	<i>Alphaproteobacteria</i>
SMKW4	-	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230(T)	99,70	<i>Alphaproteobacteria</i>
SMKW5	-	<i>Methylobacterium oryzae</i> CBMB20(T)	99,91	<i>Alphaproteobacteria</i>
SMKFr1	+	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	99,70	<i>Actinobacteria</i>
SMRW1	-	<i>Xanthomonas cynarae</i> CFBP 4188(T)	99,93	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMRW2	-	<i>Enterobacter tabaci</i> YIM Hb-3(T)	99,88	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMRW3	-	<i>Enterobacter tabaci</i> YIM Hb-3(T)	99,69	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMRFr1	-	<i>Xanthomonas cynarae</i> CFBP 4188(T)	99,93	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMRF11	-	<i>Enterobacter tabaci</i> YIM Hb-3(T)	99,81	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMRF12	-	<i>Xanthomonas cynarae</i> CFBP 4188(T)	99,93	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMKzR1	-	<i>Stenotrophomonas panacihumi</i> JCM 16536(T)	96,94	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMKzR2	-	<i>Enterobacter tabaci</i> YIM Hb-3(T)	99,90	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMZgR1	-	<i>Enterobacter tabaci</i> YIM Hb-3(T)	99,89	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMZgR2	-	<i>Enterobacter asburiae</i>	99,89	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMZgR3	-	<i>Ancylobacter sonchi</i> Osot(T)	99,62	<i>Alphaproteobacteria</i>
SMZgF11	-	<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 19358(T)	98,25	<i>Alphaproteobacteria</i>
SMZgF12	+	<i>Pseudomonas entomophila</i> L48(T)	99,78	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMZgF13	-	<i>Bacillus mobilis</i> 0711P9-1(T)	100,00	<i>Firmicutes</i>
SMZgF14	-	<i>Variovorax gossypii</i> JM-310(T)	99,85	<i>Betaproteobacteria</i>

Ket: (+) bakteri Gram positif; (-) bakteri Gram negatif

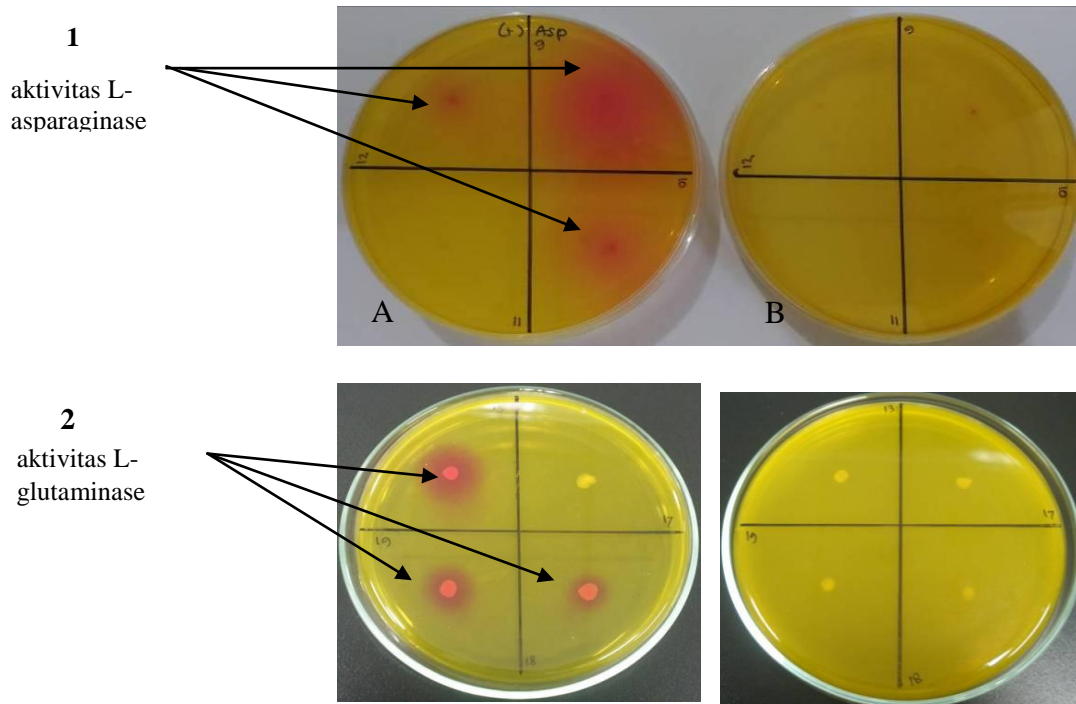
Identifikasi bakteri endofit dari tanaman obat

Analisis sekuen 16S rDNA isolat bakteri endofit yang dilakukan secara parsial dan perbandingan dengan sekuen tipe bakteri lain di bank data DNA, diperoleh nilai tingkat kesamaan yang tinggi dengan data base yaitu 98%-100%.

Tingkat keragaman bakteri endofit yang berasal dari tanaman yang dikoleksi dari Sumba Timur juga sangat tinggi yaitu dari 34 isolat teridentifikasi terdiri dari 14 genus yang merepresentasikan 17 spesies yang berbeda seperti yang ditampilkan pada Tabel 2.



Gambar 2. Komposisi bakteri endofit yang berasosiasi dengan tanaman obat asal Sumba Timur



Gambar 3. (1) Deteksi produksi L-asparaginase (2) Deteksi produksi L-glutaminase dari bakteri endofit yang berasosiasi dengan tanaman obat dari Sumba Timur (A: media dengan L-asparaginase/L-glutamin; B: media tanpa L-asparagin/L-glutamin, kontrol negatif)

Sebanyak 34 isolat terisolasi terdiri dari 4 filum antara lain *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, dan *Proteobacteria* dengan isolat paling dominan adalah filum *Proteobacteria* yang terdiri dari kelompok γ -*proteobacteria*, α -*proteobacteria*, dan β -*proteobacteria* (Gambar 2). Hal ini sejalan dengan studi Chowdhury *et al.* yang menyatakan bahwa *Proteobacteria* dominan pada tanaman ginseng dari Korea.²⁵ Studi ini menunjukkan bahwa isolat *Firmicutes* merupakan filum dengan isolat terkecil dengan satu isolat yang teridentifikasi sebagai *Bacillus* yaitu *Bacillus mobilis*. Hal tersebut berbeda dengan hasil studi lain yang menyatakan bahwa bakteri endofit genus *Bacillus* dan *Pseudomonas* lebih banyak terisolasi dibandingkan dengan genus lainnya.²⁵ Studi ini mengambil sampel tanaman obat dari lingkungan dengan temperatur dan ketinggian yang berbeda, dimana hal tersebut memengaruhi populasi dan profil bakteri endofit pada tanaman.^{26,27}

Penapisan bakteri endofit penghasil L-asparaginase dan L-glutaminase

Hasil penapisan awal menunjukkan beberapa isolat bakteri endofit berpotensi menghasilkan L-asparaginase. Hal ini ditandai dengan terbentuknya warna merah muda disekeliling isolat bakteri pada media R2A termodifikasi dengan penambahan senyawa L-asparagin. Berdasarkan reaksi kimia yang terjadi pada L-asparagin, adanya L-asparaginase yang dihasilkan oleh bakteri endofit menyebabkan terbentuknya L-aspartat dan amonia. Indikator *phenol red* pada kondisi asam berwarna kuning, sedangkan pada kondisi basa akan berwarna merah muda.

Amonia yang dihasilkan dari reaksi L-asparaginase bersifat basa dan kondisi ini akan mengubah warna media menjadi merah muda (Gambar 3). Warna media akan tetap kuning pada isolat yang tidak memiliki kemampuan menghasilkan L-asparaginase.

Aktivitas L-glutaminase selama produksi L-asparaginase dapat menyebabkan efek samping selama terapi secara enzimatik.¹¹ Beberapa isolat penghasil L-asparaginase juga menghasilkan L-glutaminase yang ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah muda pada media dengan penambahan L-glutamin (Gambar 3).

Tabel 3 menunjukkan aktivitas L-asparaginase dari 23 isolat. Kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan L-asparaginase berbeda-beda berdasarkan besar kecilnya zona merah muda yang terbentuk. Hasil uji kualitatif produksi L-asparaginase menunjukkan 12 dari 23 isolat memiliki aktivitas L-asparaginase yang tinggi. Bakteri potensial penghasil L-asparaginase adalah kelompok Enterobacteriaceae contohnya *E. coli* dan *E. chrysanthemi*.²⁸ Hal ini sesuai dengan hasil penapisan bahwa bakteri dengan aktivitas L-asparaginase sebagian besar dari kelompok Enterobacteriaceae yaitu genus *Pantoea* dan *Enterobacter* (Tabel 3).

Tabel 3 menunjukkan 4 isolat dari 23 isolat memiliki aktivitas L-asparaginase dan tidak menunjukkan aktivitas L-glutaminase. Hasil penapisan menunjukkan bahwa *P. stutzeri* strain SMKL1 dan *R. radiobacter* strain SMKW2 memiliki aktivitas L-asparaginase yang tinggi dan tidak memiliki aktivitas L-glutaminase sehingga berpotensi sebagai kandidat penghasil senyawa agen kemoterapi kanker leukemia. *P. eucrina* dan *R. radiobacter* strain SMZgF11 meskipun tidak memiliki aktivitas L-glutaminase tetapi aktivitas L-asparaginase yang rendah sehingga tidak potensial sebagai kandidat penghasil senyawa agen kemoterapi kanker leukemia.

Analisis filogenetik bakteri endofit penghasil L-asparaginase bebas L-glutaminase menggunakan isolat-isolat *strain type* yang diambil secara *online* dari *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* LPSN (Gambar 4).²⁹ Empat bakteri endofit terseleksi berdasarkan

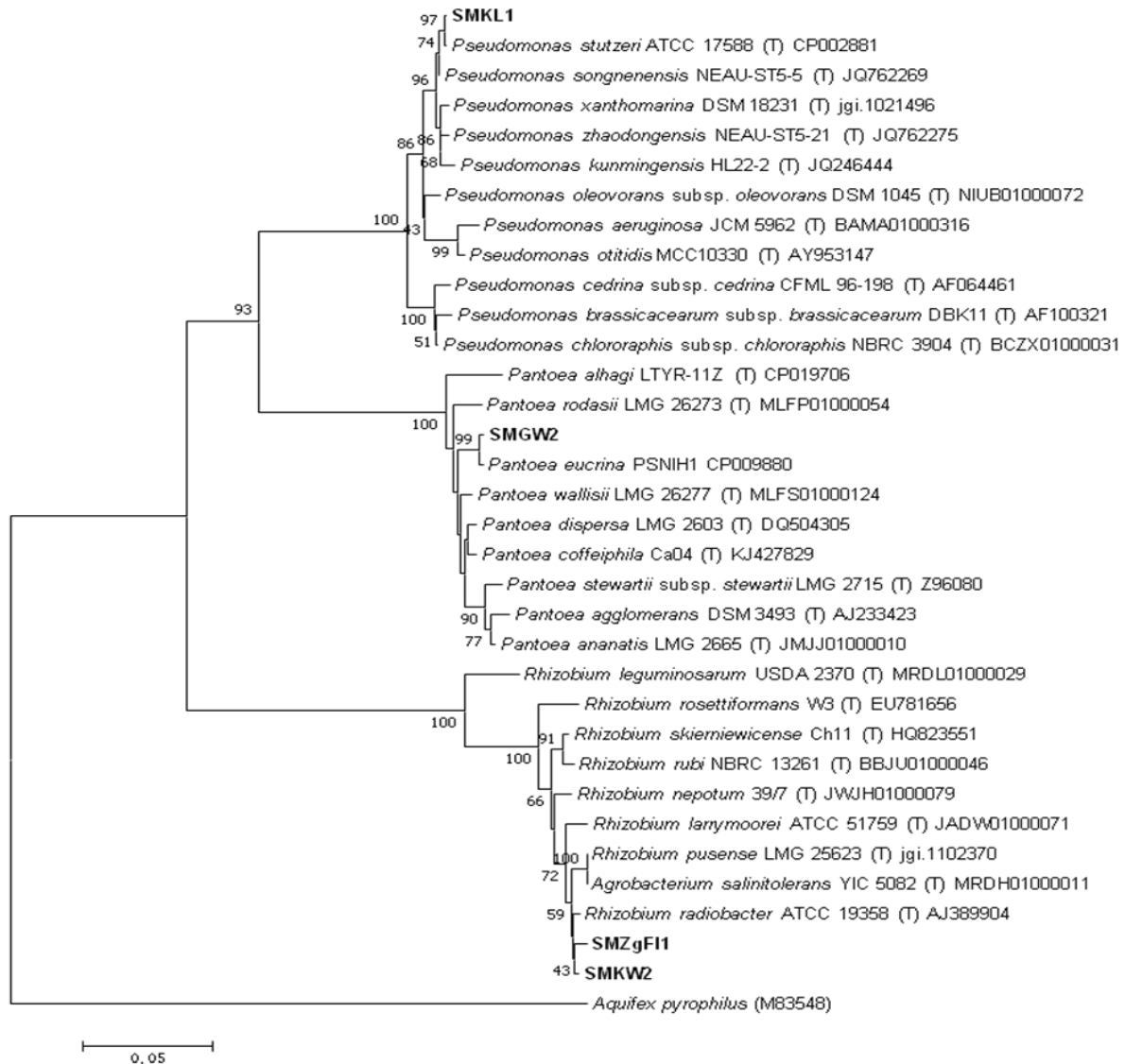
analisis filogenetik termasuk dalam filum *Proteobacteria* yaitu *Gammaproteobacteria* dan *Alphaproteobacteria*. Isolat SMKL1 yang teridentifikasi sebagai *P. stutzeri* termasuk dalam genus *Pseudomonas*, ordo *Pseudomonadales*, Kelas *Gammaproteobacteria*. Isolat

SMGW2 teridentifikasi sebagai *P. eucrina* genus *Pantoea*, ordo *Enterobacteriales*, Kelas *Gammaproteobacteria*, sedangkan isolat SMKW2 dan SMZgF11 teridentifikasi sebagai *R. radiobacter* termasuk dalam genus *Rhizobium*, Ordo *Rhizobiales*, Kelas *Alphaproteobacteria*.

Tabel 3. Penapisan bakteri endofit penghasil L-asparaginase dan L-glutaminase yang berasosiasi dengan tanaman obat

Kode isolat	Identitas	Famili	Aktivitas L-asparaginase	Aktivitas L-glutaminase
SMGW2	<i>Pantoea eucrina</i> PSNIH1	Enterobacteriaceae	+	-
SMGW3	<i>Pantoea anthophila</i> LMG2558(T)	Enterobacteriaceae	+++	+
SMRW2	<i>Enterobacter tabaci</i> YIM Hb-3(T)	Enterobacteriaceae	+++	+
SMRW3	<i>Enterobacter tabaci</i> YIM Hb-3(T)	Enterobacteriaceae	+++	+
SMRF11	<i>Enterobacter tabaci</i> YIM Hb-3(T)	Enterobacteriaceae	+++	+
SMKzR2	<i>Enterobacter tabaci</i> YIM Hb-3(T)	Enterobacteriaceae	+++	++
SMZgR1	<i>Enterobacter tabaci</i> YIM Hb-3(T)	Enterobacteriaceae	+++	+
SMZgR2	<i>Enterobacter asburiae</i>	Enterobacteriaceae	+++	+
SMGW6	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230 (T)	Sphingomonadaceae	+	++
SMGW8	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230 (T)	Sphingomonadaceae	++	+
SMKL2	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230 (T)	Sphingomonadaceae	++	+
SMKW3	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230(T)	Sphingomonadaceae	++	++
SMKW4	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230(T)	Sphingomonadaceae	++	++
SMGW7	<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 19358(T)	Rhizobiaceae	+++	++
SMKW2	<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 19358(T)	Rhizobiaceae	+++	-
SMZgF11	<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 19358(T)	Rhizobiaceae	+	-
SMKL1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588(T)	Pseudomonadaceae	+++	-
SMKL4	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> ATCC 31317(T)	Microbacteriaceae	+	+
SMKL5	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34(T)	Burkholderiaceae	+++	+++
SMKW5	<i>Methylobacterium oryzae</i> CBMB20(T)	Methylobacteriaceae	+	+
SMKzR1	<i>Stenotrophomonas panacihumi</i> JCM 16536(T)	Xanthomonadaceae	+	+++
SMZgF14	<i>Variovorax gossypii</i> JM-310(T)	Comamonadaceae	+++	++
SMZgF13	<i>Bacillus mobilis</i> 0711P9-1(T)	Bacillaceae	++	+

Ket: (+++) aktivitas tinggi; (++) aktivitas sedang; (+) aktivitas rendah; (-) tidak ada aktivitas



Gambar 4. Pohon filogenetik berdasar sekuen 16S rDNA dari bakteri endofit penghasil L-asparaginase tanpa aktivitas L-glutaminase menggunakan metode *neighbour-joining*, model K2 dan distribusi Gamma dengan nilai bootstarp 1000 replikasi

KESIMPULAN

Bakteri endofit yang berasosiasi dengan tanaman obat *G. sepium*, *P. moluccanum*, *C. b Buchananii*, dan Zingiberaceae, memiliki tingkat keragaman bakteri yang sangat tinggi. Bakteri endofit *P. stutzeri* strain SMKL1 dan *R. radiobacter* strain SMKW2 dari tanaman Kahili berpotensi sebagai penghasil L-asparaginase bebas L-glutaminase dan hal ini diharapkan menjadi peluang bakteri endofit tersebut sebagai kandidat penghasil senyawa kemoterapi kanker leukemia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Proyek DIPA Pusat Penelitian Biologi - Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) TA 2016. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdri. Rinatu Siswi S.Si atas bantuannya selama melakukan penelitian di laboratorium

DAFTAR RUJUKAN

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality

- Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. 2018;394–424.
2. Wahidin M, Noviani R, Hermawan S, Andriani V, Ardian A, Djarir H. Population-Based Cancer Registration in Indonesia. 2012;13:1709–10.
 3. Dixit S, Ali H. Anticancer activity of Medicinal plant extract-A review. *J Chem Cheml Sci.* 2010;1(1):79–85.
 4. Suhirman S, Hernani, Syukur C. Uji toksisitas ekstrak lempuyang gajah (*Zingiber zerumbet*) terhadap larva udang (*Artemia salina* Leach.) *Bul Littro.* 2006;XVII(1):30–8.
 5. Devita VT, Chu E. AACR Centennial Series A History of Cancer Chemotherapy. 2008;(21):8643–54.
 6. Hu Q, Sun W, Wang C, Gu Z. Recent advances of cocktail chemotherapy by combination drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2015; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.10.022>
 7. Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep.* 2001;18(4):448–59.
 8. Vellard M. The enzyme as drug: Application of enzymes as pharmaceuticals. *Curr Opin Biotechnol.* 2003;14(4):444–50.
 9. Manasa C, Nalini MS. L-Asparaginase Activity of Fungal Endophytes from *Tabernaemontana heyneana* Wall. (Apocynaceae), Endemic to the Western Ghats (India). *Int Sch Res Not.* 2014;2014:1–7.
 10. Joshi RD, Kulkarni NS. Optimization studies on L-asparaginase production from endophytic Bacteria. 2016;2:624–9.
 11. Saxena A, Upadhyay R, Kango N. Isolation and identification of actinomycetes for production of novel extracellular glutaminase free L-asparaginase. *Indian J Exp Biol.* 2015;53(12):786–93.
 12. Jalgaonwala RE, Mahajan RT. Evaluation of hydrolytic enzyme activities of endophytes from. *Biotechnol Adv.* 2011;7(6):1733–41.
 13. Arau WL, Marcon J, Maccheroni W, Elsas JD Van, Vuurde JW Van. Diversity of Endophytic Bacterial Populations and Their Interaction. 2002;68(10):4906–14.
 14. Powers EM. Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61(10):3756–8.
 15. Packeiser H, Lim C, Balagurunathan B, Wu J, Zhao H. An extremely simple and effective colony PCR procedure for bacteria, yeasts, and microalgae. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013;169(2):695–700.
 16. Palaniappan P, Chauhan PS, Saravanan VS, Anandham R, Sa T. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. *Biol Fertil Soils.* 2010;46(8):807–16.
 17. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Series.* 1999;41:95–98
 18. Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, et al. Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16s rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012;62(PART 3):716–21.
 19. Saitou N, Nei M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evo.* 1987;4:406–25.
 20. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. 2018;33(7):1870–4.
 21. Mahajan R V., Saran S, Saxena RK, Srivastava AK. A rapid, efficient and sensitive plate assay for detection and screening of l-asparaginase-producing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett.* 2013;341(2):122–6.
 22. Ruby EJ. A Review: Bacterial Endophytes and their Bioprospecting. *Journal of Pharmacy Research,* 2011;4(3), pp.795–799.
 23. Chareprasert S, Piapukiew J, Thienhirun S, Whalley AJS, Sihanonth P, Products F. Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samanea.* 2006;481–2.
 24. Chow Y, Ting ASY. Endophytic l-asparaginase-producing fungi from plants associated with anticancer properties. *J Adv Res.* 2015;6(6):869–76.
 25. Chowdhury EK, Jeon J, Rim SO, Park Y.

- Composition , diversity and bioactivity of culturable bacterial endophytes in mountain-cultivated ginseng in Korea. *Sci Rep*. 2017;(July):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-10280-7>
26. Hardoim PR, Overbeek LS Van, Berg G, Pirttilä M, Compant S, Campisano A, et al. The Hidden World within Plants : Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. 2015;79(3):293–320.
27. Ratna Sulistiyani T, Lisdiyanti P, Lestari Y. Population and Diversity of Endophytic Bacteria Associated with Medicinal Plant *Curcuma zedoaria*. *Microbiol Indones*. 2014;8(2):65–72. Available from: <http://jurnal.permi.or.id/index.php/mionline/article/view/276>
28. Lopes AM, Oliveira-Nascimento L de, Ribeiro A, Tairum CA, Breyer CA, Oliveira MA de, et al. Therapeutic l-asparaginase: upstream, downstream and beyond. *Crit Rev Biotechnol*. 2017;37(1):82–99.
29. Parte AC, Road W. LPSN — list of prokaryotic names with standing in nomenclature. 2014;42(November 2013):613–6.