



Skrining Bakteri Termohalofilik Penghasil L-asparaginase dari Sumber Air Panas Wawolesea Sulawesi Tenggara dan Uji Aktivitas Enzimnya
(*Screening of L-asparaginase-Producing Thermohalophilic Bacteria from Wawolesea Hot Springs in Southeast Sulawesi and Their Enzyme Activity Test*)

Muzuni Muzuni^{a*}, Jamaluddin Jamaluddin^b, Suriana Suriana^b, Ardiansyah Ardiansyah^b, Nur Arfa Yanti^b

^a*Program Studi Bioteknologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Halu Oleo Kambu, Kec. Kambu, Kota Kendari, 93561, Indonesia*

^b*Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Halu Oleo Kambu, Kec. Kambu, Kota Kendari, 93561, Indonesia*

^{*}*Corresponding author: muzuni_fmipa@uho.ac.id*

DOI: 10.20961/alchemy.20.1.73523.12-21

Received 6 Mei 2023, Revised 7 August 2023, Accepted 25 August 2023, Published 30 March 2024

Kata kunci:

bakteri termohalofilik; L-asparaginase; skrining; sumber air panas Wawolesea.

ABSTRAK. L-asparaginase merupakan enzim yang mengubah L-asparagin menjadi L-aspartat. L-asparagin dapat dimanfaatkan oleh sel kanker leukemia sebagai salah satu sumber nutrisinya. Penambahan L-asparaginase dapat menghambat pertumbuhan sel kanker. Penggunaan L-asparaginase dalam skala industri lebih mengutamakan L-asparaginase yang memiliki aktivitas dan stabilitas optimum di suhu tinggi, karena kecepatan reaksi dalam menghidrolisis L-asparagin tinggi, stabil dari denaturasi misalnya detergen dan senyawa organik, dan stabil pada kondisi asam maupun basa. L-asparaginase yang memiliki aktivitas dan stabilitas di suhu tinggi dapat dieksplorasi dari mikroorganisme yang hidup di lingkungan yang bersuhu dan bersalinitas tinggi. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh isolat bakteri termohalofilik penghasil enzim L-asparaginase dari sumber air panas Wawolesea dan untuk mengetahui aktivitas enzim L-asparaginase yang dihasilkannya. Bakteri termohalofilik penghasil enzim L-asparaginase diperoleh dengan tahapan: isolasi bakteri pada media NA yang mengandung NaCl 1,5% – 1,6%; seleksi bakteri penghasil L-asparaginase pada media M-9; produksi L-asparaginase dengan prinsip fermentasi pada media produksi serta pengukuran aktivitas dan aktivitas spesifik enzim L-asparaginase. Hasil isolasi menunjukkan adanya 14 isolat bakteri termohalofilik yang mampu menghasilkan enzim L-asparaginase. Aktivitas enzim L-asparaginase tertinggi yaitu 86,61 IU/mL pada isolat AAT3.2 dan terendah yaitu 38,24 IU/mL pada isolat CAT1.1. Aktivitas spesifik tertinggi 6767,98 IU/mg pada isolat CAT3.2 dan terendah 684,54 IU/mg pada isolat CAT1.1.

Keywords:

thermohalophilic bacteria; L-asparaginase; screening; Wawolesea hot springs

ABSTRACT. The L-asparaginase is an enzyme that can convert L-asparagine to L-aspartate. L-asparagine can be utilized by leukemia cancer cells as a source of nutrition. The use of L-asparaginase on an industrial scale prioritizes L-asparaginase that exhibits optimal activity and stability at high temperatures due to the high reaction rate in hydrolyzing L-asparagine, stability against denaturants such as detergents and organic compounds, and stability under acidic or basic conditions. L-asparaginase with activity and stability at high temperatures can be explored from microorganisms that live in high-temperature and high-salinity environments. This study aimed to obtain isolates of thermohalophilic bacteria that produce L-asparaginase enzymes from Wawolesea hot springs and determine the activity of the L-asparaginase enzymes. Thermohalophilic bacteria producing L-asparaginase from Wawolesea hot springs were obtained by the following steps: isolation of bacteria on NA (Nutrient Agar) media containing 1.5% – 1.6% NaCl, selection of L-asparaginase-producing bacteria on M-9 media, production of L-asparaginase with the principle of fermentation on production media and measurement of activity and specific activity of L-asparaginase enzyme. The isolation results showed that there were 14 isolates of thermohalophilic bacteria capable of producing L-asparaginase. The highest L-asparaginase enzyme activity was 86.61 IU/mL in AAT3.2 isolates, and the lowest was 38.24 IU/mL in CAT1.1 isolates. The highest specific activity was 6767.98 IU/mg in isolate CAT3.2, and the lowest was 684.54 IU/mg in isolate CAT1.1.

Cite this as: Muzuni, M., Jamaludin, J., Suriana, S., Ardiansyah, A., & Yanti, N. A., 2024. Skrining Bakteri Termohalofilik Penghasil L-asparaginase dari Sumber Air Panas Wawolesea Sulawesi Tenggara dan Uji Aktivitas Enzimnya. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*, 20(1), 12-21. <https://dx.doi.org/10.20961/alchemy.20.1.73523.12-21>.

PENDAHULUAN

L-asparaginase memberikan manfaat yang cukup besar pada terapi kanker sistem limfatik, *Hodgkin's lymphoma*, ALL (*Acute Lymphoblastic Leukimia*) dan melanosarkoma (Singh *et al.*, 2013). Potensi L-asparaginase sebagai *biological agent* terapi kanker tersebut karena L-asparaginase secara spesifik memiliki kemampuan untuk menghambat pembentukan nutrisi sel kanker. Alrumman *et al.* (2019) menyatakan bahwa pemberian L-asparaginase pada sel kanker dapat menguraikan L-asparagin sebagai salah satu komponen nutrisi sel kanker, sehingga dapat menghambat pertumbuhan sel kanker tersebut. Selain itu, L-asparaginase juga digunakan secara efektif di industri-industri makanan yang beroperasi pada suhu tinggi karena kemampuannya mereduksi akrilamid, yakni senyawa karsinogenik yang terbentuk melalui reaksi Millard antara L-asparagin dan gula pereduksi pada suhu tinggi (Jia *et al.*, 2021).

L-asparaginase terdistribusi secara luas pada sel eukariotik dan prokariotik. Jia *et al.* (2021) melaporkan bahwa L-asparaginase dapat dihasilkan oleh *E. coli*, *Erwinia chrysanthemi*, *Aspergillus oryzae*, dan *Aspergillus niger*, *Penicillium crustosu*. Akan tetapi, dalam aktivitasnya, L-asparaginase yang berasal dari mikroorganisme masih memiliki kekurangan, antara lain masih memiliki aktivitas dan stabilitas yang rendah pada suhu tinggi sehingga pemanfaatannya dalam skala industri masing kurang diminati.

Penggunaan L-asparaginase yang memiliki aktivitas dan stabilitas optimum di suhu tinggi sangat diutamakan dalam skala industri karena reaksi hidrolisis L-asparagin menjadi lebih cepat dan efisien. L-asparaginase yang memiliki aktivitas dan stabilitas optimum di suhu tinggi dapat dieksplorasi pada mikroorganisme yang hidup di lingkungan ekstrem seperti lingkungan yang bersuhu dan bersalinitas tinggi. Ahmad *et al.* (2013) menyatakan bahwa *Bacillus licheniformis* HSA3-1a dari sumber air panas Sulawesi Selatan dapat menghasilkan L-asparaginase yang dapat meningkatkan kecepatan reaksi sebesar dua kali lipat setiap peningkatan suhu di atas 10 °C dan memiliki aktivitas optimum pada suhu 50 °C dengan aktivitas spesifik 616,26 IU/mg protein.

Martínez *et al.* (2022) menyatakan, enzim yang diperoleh dari bakteri yang hidup di lingkungan ekstrem seperti lingkungan bersuhu dan bersalinitas tinggi memiliki beberapa kelebihan yaitu memiliki kecepatan reaksi yang tinggi, stabil dari zat-zat yang mendenaturasinya seperti deterjen dan senyawa organik lainnya, stabil dalam kondisi lingkungan yang asam dan alkali. Oleh karena itu, eksplorasi bakteri penghasil L-asparaginase penting dilakukan pada bakteri yang hidup di lingkungan bersuhu dan bersalinitas tinggi. Bakteri yang hidup pada lingkungan bersuhu dan bersalinitas tinggi dikenal sebagai kelompok bakteri termohalofilik.

Bakteri termohalofilik merupakan kelompok bakteri yang hidup pada suhu dan salinitas ekstrem. Straub *et al.* (2018) dan Muzuni *et al.* (2022) menyatakan bahwa bakteri termohalofilik tumbuh pada kisaran suhu 45 – 1100 °C dengan salinitas 2% – 30% . Bakteri termohalofilik dapat ditemukan di sedimen laut geotermal dan sumber air panas yang bersalinitas. Salah satu 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 ini memiliki beberapa sumur dengan suhu dan salinitas yang bervariasi di setiap sumurnya. Jamaluddin *et al.* (2018) menyatakan bahwa sumber air panas Wawolesea memiliki suhu berkisar antara 48 – 700 °C dan Jamaluddin and Umar (2017) melaporkan bahwa kadar salinitas sumber air panas Wawolesea berkisar antara 15% – 20%. Oleh karena itu, sumber air panas Wawolesea dapat dijadikan sebagai sumber bakteri termohalofilik penghasil L-asparaginase dengan aktivitas tinggi pada suhu dan salinitas tinggi.

Bakteri termohalofilik penghasil L-asparaginase telah diisolasi oleh Jamaluddin *et al.* (2018) dan menghasilkan 14 isolat bakteri yang menunjukkan kemampuan menghasilkan L-asparaginase. Kemampuan tersebut ditandai dengan adanya perubahan warna media M-9 dari kuning menjadi merah muda hingga ungu tua di sekitar koloni bakteri. Semakin tinggi intensitas warna ungu yang terbentuk pada media M-9 menunjukkan semakin banyaknya jumlah amonia yang terbentuk pada media tersebut sebagai produk dari hidrolisis L-asparagin oleh L-asparaginase (Siciliano *et al.*, 2023). Secara kualitatif, Jamaluddin *et al.* (2018) telah mendapatkan isolat penghasil L-asparaginase dengan aktivitas rendah, sedang, dan tinggi. Isolat bakteri yang mempunyai aktivitas rendah adalah AAT1.3, AST2.2, CAT1.4, dan CAT2.4; aktivitas sedang adalah AAT1.4, AST1.2, CAT2.2, dan CAT3.2; serta aktivitas tinggi adalah AAT1.1, AAT3.2, AST3.1, AST3.3, CAT1.1, dan CAT3.4. Aktivitas L-asparaginase dari 14 isolat tersebut hanya ditentukan secara kualitatif yang masih dipengaruhi oleh jumlah inokulum yang ditambahkan pada media. Tinggi rendahnya aktivitas enzim dalam suatu media dapat ditentukan oleh jumlah inokulum suatu mikroba yang diberikan (Kurniawati *et al.*, 2019). Karena

jumlah inokulum yang ditambahkan pada media perlakuan belum tentu seragam, maka intensitas warna yang menunjukkan aktivitas enzim belum tentu memberikan hasil yang sebenarnya. Oleh karena itu, penentuan aktivitas enzim secara kuantitatif perlu dilakukan untuk memastikan isolat yang mempunyai aktivitas tinggi.

METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah L-asparagin (Merck KGaA), reagen Nessler (Merck), Tris-HCl pH 8 (Roche), dan asam trikloroasetat (Sigma-Aldrich). Alat-alat yang digunakan adalah Esco *laminar flow cabinet*, *autoclave* HL-340, cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, mikropipet dan tip, orbital *incubator* SI500, hitachi *centrifuge* CT15RE dan spektrofotometer UV-Vis (Perkin Elmer Lamda 25).

Isolat yang digunakan untuk skrining adalah 14 isolat bakteri termohalofilik penghasil L-asparaginase yang diisolasi dari sumber air panas Wawolesea, Sulawesi Tenggara oleh [Jamaluddin *et al.* \(2018\)](#).

Uji Aktivitas Enzim Untuk Skrining Bakteri Termohalofilik Penghasil L-asparaginase Secara Kuantitatif Produksi L-asparaginase pada media produksi

Sebanyak 9% (v/v) kultur bakteri penghasil L-asparaginase ditambahkan ke dalam 20 mL media produksi steril lalu diinkubasi pada suhu 50 °C selama 72 jam ([Ahmad *et al.*, 2013](#); [Patta *et al.*, 2013](#)). Selanjutnya enzim L-asparaginase diekstraksi dengan menambahkan *buffer* Tris HCl 50 mM, pH 8,5 ke dalam media produksi sebanyak 5 kali volume, lalu dikocok menggunakan *shaker* pada kecepatan 150 rpm selama 1 jam. Kemudian, hasil ekstraksi disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C ([Gosh *et al.*, 2013](#)). Supernatan yang merupakan ekstrak enzim L-asparaginase ditampung ke dalam botol steril dan disimpan pada suhu 0 °C.

Pengukuran Aktivitas L-asparaginase

Pembuatan kurva standar amonia

Kurva standar amonia digunakan sebagai standar penentuan amonia yang dihasilkan oleh aktivitas L-asparaginase. Standar amonia dibuat dengan cara mencampurkan masing-masing 100 µL (NH₄)₂SO₄ konsentrasi 10 µmol/mL, 20 µmol/mL, 40 µmol/mL, 60 µmol/mL, 80 µmol/ML, dan 100 µmol/mL dengan 200 µL reagen Nessler dan 3,7 mL akuabides. Selanjutnya, campuran tersebut direaksikan selama 10 menit dan diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 450 nm. Setelah itu, kurva standar amonia dibuat dengan menghubungkan antara absorbansi dengan konsentrasi amonium.

Uji aktivitas L-asparaginase

Uji aktivitas L-asparaginase dilakukan menggunakan metode Nessler secara kalorimetri. Uji aktivitas L-asparaginase dilakukan dengan cara mereaksikan ekstrak enzim sebanyak 500 µL dengan 500 µL L-asparagin (0,04 M) dan 500 µL *buffer* Tris HCl 50 mM (pH 8,5). Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 50 °C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 500 µL asam trikloroasetat (TCA) 1,5 M dan didiamkan selama 5 menit. Setelah itu, disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 8000 rpm suhu 4 °C, kemudian 100 µL supernatan diambil dan diencerkan dengan 3,7 mL akuabides, setelah itu ditambahkan dengan 200 µL reagen Nessler. Selanjutnya kadar amonia diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 450 nm. Aktivitas L-asparaginase (IU) dinyatakan sebagai jumlah amonia yang dihasilkan oleh 1 mL enzim yang digunakan untuk menghidrolisis substrat. Nilai IU enzim dihitung menggunakan [Persamaan \(1\)](#) ([Singh *et al.*, 2013](#)).

$$IU/ml = \frac{y-b}{a} \times \frac{Vt}{Va} \times \frac{1}{Ve} \times \frac{1}{Ti} \quad (1)$$

Keterangan:

y : absorbansi

a : *slope*

b : *intercept*

Vt : volume total (2,0 mL)

Va : volume total yang dianalisis (0,1 mL)

Ve : volume enzim yang dianalisis (0,5 mL)

Ti : waktu inkubasi enzim (10 menit)

Penentuan Kadar Protein Enzim L-asparaginase

Penentuan kadar protein enzim L-asparaginase dilakukan menggunakan metode Bradford dan dengan BSA (*Bovin Serum Albumin*) sebagai protein standar. Prosedur kerja yang dilakukan pada pengukuran kadar protein enzim L-asparaginase yaitu sebagai berikut.

Pembuatan Kurva Standar

Sebanyak 0,001 g BSA (*Bovin Serum Albumin*) ditimbang dan dilarutkan ke dalam 10 mL akuades steril lalu dihomogenkan selama 2 – 5 menit hingga mencapai konsentrasi 0,1 mg/mL. Larutan ini disebut sebagai larutan stok protein BSA. Sebanyak 6 tabung reaksi disiapkan untuk membuat seri konsentrasi BSA 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1 mg/mL dan blanko. Selanjutnya, ke dalam masing-masing tabung, kecuali tabung blanko, dimasukkan dengan larutan stok protein BSA sebanyak 0,2 mL; 0,4 mL; 0,6 mL; 0,8 mL; dan 1 mL dan selanjutnya masing-masing ditambahkan dengan akuades sebanyak 0,8 mL; 0,6 mL; 0,4 mL; 0,2 mL; dan 0 mL. Larutan blanko dibuat dengan penambahan 1 mL akuades ke dalam tabung reaksi. Kemudian pada masing-masing larutan diambil 0,8 mL lalu ditambahkan dengan 0,2 mL pereaksi Bradford. Setelah itu, masing-masing larutan dicampur sampai homogen dan dibiarkan selama 15 menit agar reagen Bradford benar-benar bereaksi dengan protein BSA. Kemudian, setiap larutan termasuk blanko diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm (Utami *et al.*, 2016). Setelah itu, kurva standar protein dibuat dengan menghubungkan nilai absorbansi terhadap konsentrasi BSA yang digunakan (Hadinoto and Syukroni, 2019).

Pengukuran Kadar Protein Enzim L-asparaginase

Sebanyak 10 µL ekstrak enzim L-asparaginase dilarutkan ke dalam 790 µL akuades steril dan 0,2 mL reagen Bradford. Setelah itu, campuran larutan dihomogenkan menggunakan vortex lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Selanjutnya, absorbansi larutan diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Kadar protein enzim dihitung menggunakan *Persamaan (2)* (Utami *et al.*, 2016).

$$y = ax + b \quad (2)$$

Keterangan:

y = absorbansi sampel

a = slope

b = *intercept*

x = konsentrasi protein sampel (mg/mL)

Penentuan aktivitas spesifik enzim L-asparaginase

Aktivitas spesifik enzim L-asparaginase adalah aktivitas unit enzim L-asparaginase (IU) dalam mg protein enzim. Aktivitas spesifik enzim L-asparaginase menunjukkan jumlah protein total enzim L-asparaginase dalam menghidrolisis L-asparagin. Aktivitas spesifik ekstrak enzim L-asparaginase ditentukan dengan membagi hasil aktivitas L-asparaginase dengan kadar total protein enzim L-asparaginase (Cachumba *et al.*, 2016).

HASIL DAN PEMBAHASAN

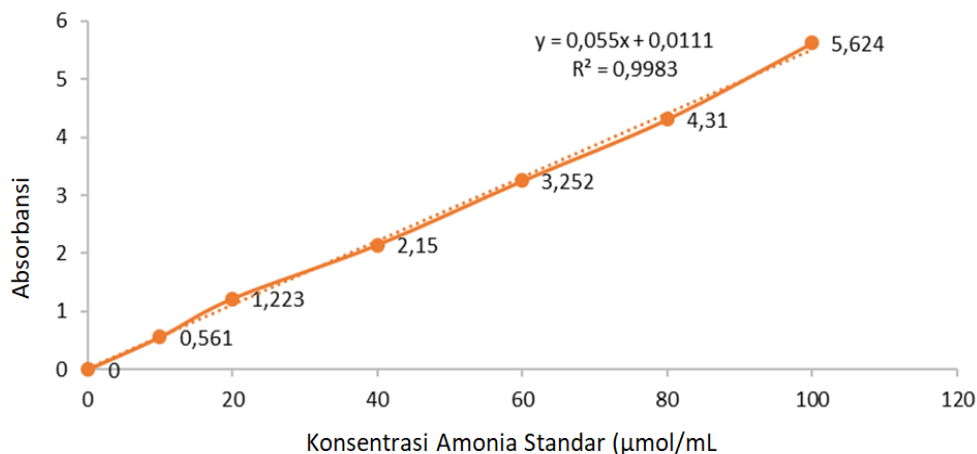
Skrining bakteri termohalofilik penghasil L-asparaginase dapat dilakukan baik secara kualitatif maupun secara kuantitatif. Skrining secara kualitatif telah dilakukan oleh Jamaluddin *et al.* (2018) dan menghasilkan 14 isolat bakteri yang menunjukkan kemampuan menghasilkan L-asparaginase. Keempat belas isolat tersebut adalah AAT1.3, AST2.2, CAT1.4, dan CAT2.4 dengan aktivitas rendah; AAT1.4, AST1.2, CAT2.2, dan CAT3.2 dengan aktivitas sedang; serta AAT1.1, AAT3.2, AST3.1, AST3.3, CAT1.1, dan CAT3.4 dengan aktivitas tinggi. Semua isolat ini selanjutnya diklarifikasi dengan skrining bakteri secara kuantitatif melalui penentuan aktivitas enzim, kadar protein, dan aktivitas spesifik enzim.

Aktivitas L-Asparaginase Isolat Bakteri Termohalofilik Asal Sumber Air Panas Wawolesea

Aktivitas L-asparaginase didefinisikan sebagai banyaknya amonia sebagai hasil hidrolisis L-asparagin oleh L-asparaginase (El-Gendy *et al.*, 2021). Aktivitas L-asparaginase pada penelitian ini ditentukan dengan menggunakan metode Nessler. Satu unit L-asparaginase (IU) didefinisikan sebagai jumlah enzim L-asparaginase yang mengkatalisis pembentukan satu µmol amonia per menit dalam kondisi pengujian (Qeshmi *et al.*, 2018; El-Naggar *et al.*, 2016). Amonia yang dilepaskan dari hasil hidrolisis L-asparagin akan bereaksi dengan reagen Nessler dan ditentukan kadarnya menggunakan kurva standar amonium sulfat seperti pada Gambar 1.

Berdasarkan kurva standar tersebut, persamaan garis yang diperoleh adalah $y = 0,055x + 0,0111$. Absorbansi amonia yang dilepas dari hasil hidrolisis L-asparagin oleh L-asparaginase (nilai y) dan aktivitas L-

asparaginase isolat bakteri ditunjukkan pada Tabel 1. Hasil pengujian aktivitas L-asparaginase disajikan pada Tabel 1 dan Gambar 2.



Gambar 1. Kurva standar Amonia.

Tabel 1. Absorbansi amonia yang dilepas dari hasil hidrolisis L-asparagin oleh L-asparaginase (nilai y) dan aktivitas L-asparaginase isolat bakteri.

Nama Isolat	y	a	b	y-b	(y-b/a)	aktivitas L-Asparaginase
AAT1.1	1,137	0,055	0,0111	1,1259	20,4709	81,88
AAT1.3	0,635	0,055	0,0111	0,6239	11,3436	45,37
AAT1.4	1,178	0,055	0,0111	1,1669	21,2164	84,86
AAT3.2	1,202	0,055	0,0111	1,1909	21,6527	86,61
AST1.2	0,721	0,055	0,0111	0,7099	12,9073	51,62
AST2.2	1,118	0,055	0,0111	1,1069	20,1255	80,50
AST3.1	0,986	0,055	0,0111	0,9749	17,7255	70,90
AST3.3	1,096	0,055	0,0111	1,0849	19,7255	78,90
CAT1.1	0,537	0,055	0,0111	0,5259	9,56182	38,24
CAT1.4	1,041	0,055	0,0111	1,0299	18,7255	74,90
CAT2.2	0,735	0,055	0,0111	0,7068	12,8509	51,40
CAT2.4	0,721	0,055	0,0111	0,7099	12,9073	51,62
CAT3.2	1,061	0,055	0,0111	1,0499	19,0891	76,35
CAT3.4	1,139	0,055	0,0111	1,1279	20,5073	82,02

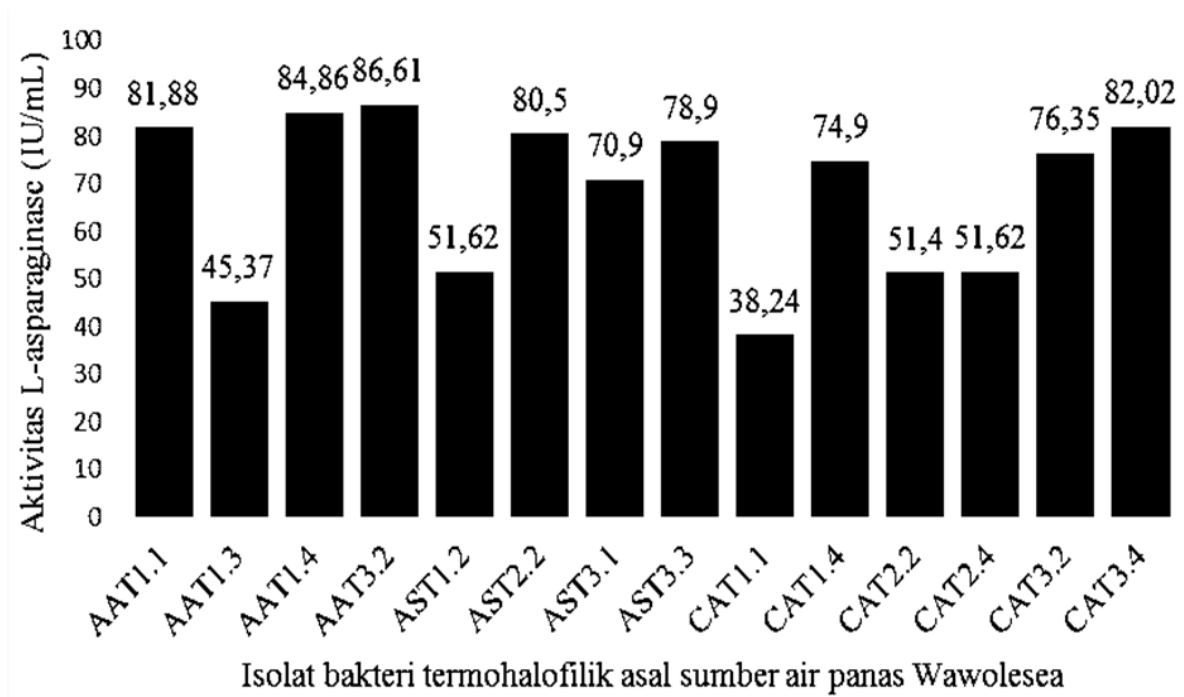
Keterangan :

y = absorbansi sampel
a = slope

b = intercept
x = konsentrasi protein sampel (mg/ml)

Hasil skrining aktivitas L-asparaginase pada Gambar 2 menunjukkan bahwa aktivitas L-asparaginase isolat bakteri termohalofilik asal sumber air panas Wawolesea berada pada level paling rendah 38,24 IU/mL sampai paling tinggi 86,61 IU/mL. Aktivitas L-asparaginase tertinggi yaitu pada isolat AAT3.2 sedangkan aktivitas terendahnya yaitu pada isolat CAT1.1. Berdasarkan hasil skrining isolat penghasil enzim L-asparaginase secara kuantitatif (Gambar 2), isolat yang memiliki aktivitas enzim L-asparaginase tertinggi adalah AAT1.1, AAT1.4, AAT3.2, AST2.2, AST3.1, AST3.3, CAT1.4, CAT3.2, dan CAT3.4. Berdasarkan hasil skrining secara kualitatif dan kuantitatif (Gambar 2) menunjukkan bahwa isolat yang memiliki aktivitas enzim L-asparaginase tinggi adalah AAT1.1, AAT3.2, AST3.1, AST3.3, dan CAT3.4. Enzim L-asparaginase yang dimiliki oleh isolat bakteri hasil skrining memiliki aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat *Bacillus subtilis* strain hswx88 asal sumber air panas Taptani India dengan aktivitas sebesar 23,8 IU/mL (Pradhan *et al.*, 2013). Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Patta *et al.* (2013) pada isolat bakteri *Bacillus licheniformis* HSA3-1a asal sumber air panas Sulawesi Selatan masih lebih rendah dibandingkan dengan isolat sampel, yaitu sebesar 31,51 IU/mL. Oleh karena itu, aktivitas L-asparaginase isolat bakteri termohalofilik asal sumber air panas Wawolesea tergolong tinggi. Tingginya aktivitas L-asparaginase isolat bakteri termohalofilik asal sumber air panas Wawolesea diduga disebabkan oleh adanya faktor salinitas pada sumber air panas Wawolesea. Hänel and Müller

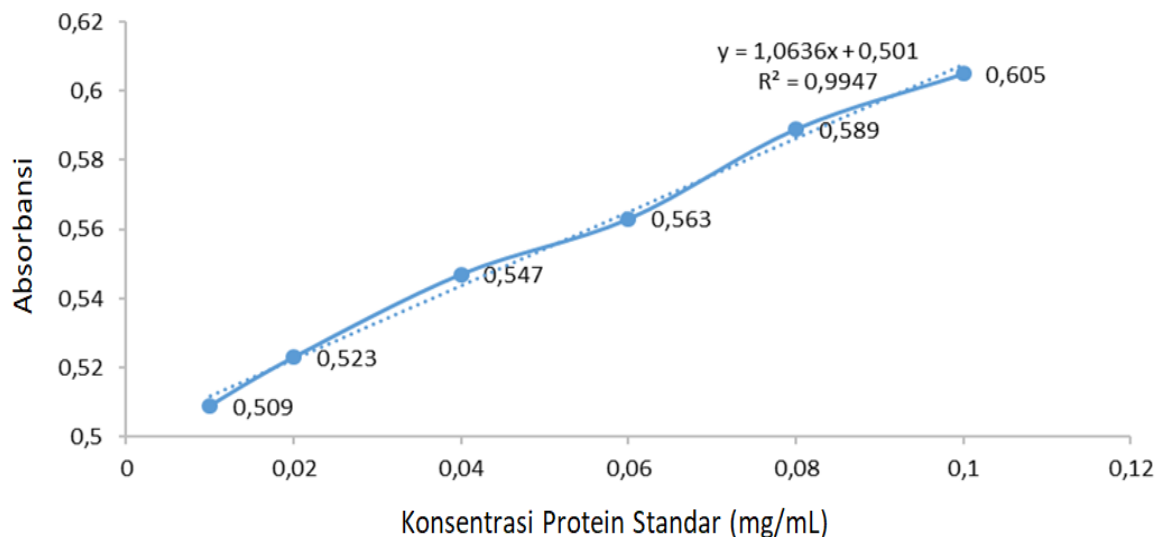
(2013) dan Rubiano-Labrador *et al.* (2015) menyatakan bahwa bakteri yang hidup di lingkungan bersalinitas mengabsorpsi *compatible solute* yang dapat berperan sebagai stabilisator dan dapat mempengaruhi aktivitas enzim.



Gambar 2. Hasil skrining aktivitas L-asparaginase secara kuantitatif dengan metode Nessler.

Aktivitas Spesifik Enzim L-asparaginase Bakteri Termohalofilik

Aktivitas spesifik enzim L-asparaginase adalah aktivitas unit enzim L-asparaginase (IU) dalam mg protein enzim. Aktivitas spesifik enzim L-asparaginase menunjukkan jumlah protein total enzim L-asparaginase dalam menghidrolisis L-asparagin. Cachumba *et al.* (2016) mendefinisikan aktivitas spesifik enzim adalah aktivitas unit enzim (IU) dalam mg protein atau dapat dihitung dengan cara membagi hasil aktivitas enzim dengan kadar protein enzim. Berdasarkan kurva standar protein, persamaan garis yang diperoleh adalah $y = 1,0636x + 0,501$ (Gambar 3).



Gambar 3. Kurva standar protein.

Absorbansi protein enzim (nilai y) dan kadar protein enzim isolat bakteri ditunjukkan pada Tabel 2. Nilai aktivitas L-asparaginase pada Gambar 2 dibagi dengan kadar total protein enzim pada Tabel 2 untuk

mendapatkan aktivitas spesifik L-asparaginase pada penelitian ini. Hasil penentuan aktivitas spesifik enzim L-asparaginase disajikan pada [Tabel 3](#) dan [Gambar 4](#).

Tabel 2. Konversi dan selektivitas biohidrokarbon hasil deoksigenasi katalitik FAME.

Nama Isolat	y	a	b	y-b	y-b/a (kadar protein)
AAT1.1	0,5795	1,0636	0,501	0,0785	0,073806
AAT1.3	0,5715	1,0636	0,501	0,0705	0,066284
AAT1.4	0,5150	1,0636	0,501	0,0140	0,013163
AAT3.2	0,5625	1,0636	0,501	0,0615	0,057822
AST1.2	0,5120	1,0636	0,501	0,0110	0,010342
AST2.2	0,5340	1,0636	0,501	0,0330	0,031027
AST3.1	0,5310	1,0636	0,501	0,0300	0,028206
AST3.3	0,5160	1,0636	0,501	0,0150	0,014103
CAT1.1	0,5120	1,0636	0,501	0,0110	0,010342
CAT1.4	0,5445	1,0636	0,501	0,0435	0,040899
CAT2.2	0,5455	1,0636	0,501	0,0445	0,041839
CAT2.4	0,5465	1,0636	0,501	0,0455	0,042779
CAT3.2	0,5130	1,0636	0,501	0,0120	0,011282
CAT3.4	0,5415	1,0636	0,501	0,0405	0,038078

Keterangan :

y = absorbansi sampel

b = intercept

a = slope

x = konsentrasi protein sampel (mg/ml)

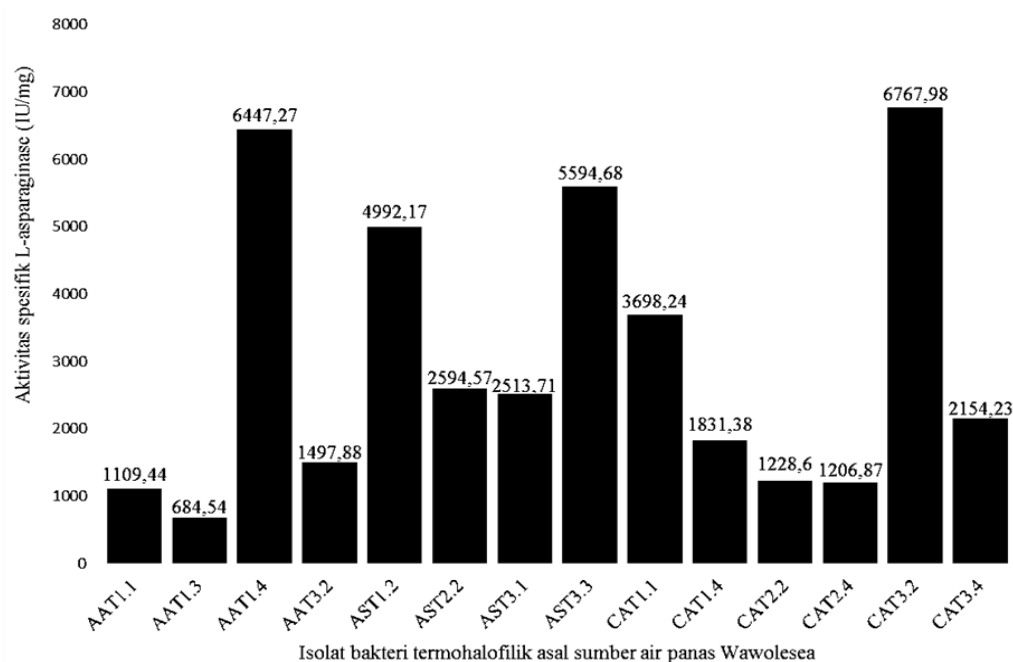
Hasil pengukuran aktivitas spesifik enzim L-asparaginase pada [Tabel 3](#) dan [Gambar 4](#) menunjukkan bahwa aktivitas spesifik L-asparaginase tertinggi yaitu 6767,98 IU/mg pada isolat CAT3.2, sedangkan aktivitas spesifik L-asparaginase terendah yaitu 684,54 IU/mg pada isolat AAT1.3. Hasil pengukuran tersebut menunjukkan bahwa aktivitas spesifik L-asparaginase dipengaruhi oleh aktivitas L-asparaginase ([Tabel 1](#) dan [Gambar 2](#)) dan kadar protein L-asparaginase ([Tabel 2](#)). Pengaruh aktivitas L-asparaginase dan kadar protein L-asparaginase terhadap aktivitas spesifik enzim L-asparaginase bakteri termohalofilik asal sumber air panas Wawolesea dijelaskan seperti pada [Tabel 3](#).

Tabel 3. Hubungan antara aktivitas dan aktivitas spesifik enzim L-asparaginase.

Nama Isolat	Aktivitas L-asparaginase (IU/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik L-asparaginase (IU/mg)
AAT1.1	81,88	0,07	1109,44
AAT1.3	45,37	0,06	684,54
AAT1.4	84,86	0,01	6447,27
AAT3.2	86,61	0,05	1497,88
AST1.2	51,62	0,01	4992,17
AST2.2	80,50	0,03	2594,57
AST3.1	70,90	0,02	2513,71
AST3.3	78,90	0,01	5594,68
CAT1.1	38,24	0,01	3698,24
CAT1.4	74,90	0,04	1831,38
CAT2.2	51,40	0,04	1228,60
CAT2.4	51,62	0,04	1206,87
CAT3.2	76,35	0,01	6767,98
CAT3.4	82,02	0,03	2154,23

Hubungan antara aktivitas dan aktivitas spesifik enzim L-asparaginase pada [Tabel 3](#) menunjukkan bahwa isolat AAT3.2 dengan aktivitas 86,61 IU/mL memiliki aktivitas spesifik rendah, yaitu 1497,88 IU/mg dibandingkan dengan isolat CAT3.2 dengan aktivitas 76,35 IU/mL dapat menghasilkan aktivitas spesifik tertinggi, yaitu 6767,98 IU/mg. Hal ini menunjukkan bahwa protein pada isolat AAT3.2 (0,05 mg/mL) masih tercampur dengan protein lain yang tidak memiliki daya katalitik atau memiliki afinitas yang rendah terhadap L-asparagin, sedangkan protein pada isolat CAT3.2 (0,01 mg/mL) memiliki daya spesifitas dan afinitas yang tinggi terhadap L-asparagin sehingga dapat menghasilkan aktivitas spesifik L-asparaginase yang tinggi. Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa aktivitas spesifik menunjukkan tingkat kemurnian suatu enzim. Hal ini sesuai dengan

pernyataan [Poernomo *et al.* \(2014\)](#) bahwa indikator kemurnian enzim dapat dilihat dari aktivitas spesifik enzimnya.



Gambar 4. Hasil pengukuran aktivitas spesifik L-asparaginase.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ditemukan 14 isolat bakteri termohalofilik asal sumber air panas Wawolesea yang memiliki kemampuan menghasilkan enzim L-asparaginase. Aktivitas enzim L-asparaginase isolat bakteri termohalofilik asal sumber air panas Wawolesea berkisar 38,24 – 86,61 IU/mL dan aktivitas spesifik berkisar 684,54 – 6767,98 IU/mg. Aktivitas tertinggi terdapat pada isolat AAT3.2 dan aktivitas terendah pada isolat CAT1.1. Aktivitas spesifik tertinggi terdapat pada isolat CAT3.2 dan aktivitas spesifik terendah pada isolat AAT1.3.

KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak ada konflik kepentingan dalam artikel ini.

KONTRIBUSI PENULIS

MM: Konseptualisasi, metodologi, penulisan draf manuskrip; JJ: Uji aktivitas enzim, analisis data, validasi; SS: Konseptualisasi; AA: Skrining bakteri, isolasi bakteri; NAY: Telaah dan penyuntingan manuskrip.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi Republik Indonesia atas pendanaan penelitian PDUPT dengan nomor kontrak 64/UN29.20/PG/2022. Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Halu Oleo atas bantuannya dalam analisis sampel.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, A., Patta, A. M., and Natsir, H., 2013. Purification and Immobilization of L-asparaginase Enzyme From the Thermophilic Bacteria *Bacillus licheniformis* Strain HSA3-1a. *Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(4), 277–278.
- Alrumman, S. A., Mostafa, Y. S., Al-izran, K. A., Alfaifi, M. Y., Taha, T. H., and Elbehairi, S. E., 2019. Production and Anticancer Activity of an L-Asparaginase from *Bacillus licheniformis* Isolated from the Red Sea, Saudi Arabia. *Scientific Reports* 9, 3756. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40512-x>.

- Cachumba, J. J. M., Antunes, F. A. F., Peres, G. F. D., Brumano, L.P., Santos, J. C. D., and Silva, S. S. D., 2016. Current Applications and Different Approaches for Microbial L-asparaginase Production. *Brazilian Journal of Microbiology* 47, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.004>.
- El-Gendy, M. M. A. A., Awad, M. F., El-Shenawy, F.S., and El-Bondkly, A. M. A., 2021. Production, Purification, Characterization, Antioxidant and Antiproliferative Activities of Extracellular L-asparaginase Produced by *Fusarium Equiseti* AHMF4. *Saudi Journal of Biological Sciences* 28(4), 2540–2548. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.01.058>.
- El-Naggar, N. E., Deraz, S. F., Soliman, H. M., El-Deeb, N. M., and El-Ewasy, S. M., 2016. Purification, Characterization, Cytotoxicity and Anticancer Activities of L-asparaginase, Anti-colon Cancer Protein, from The Newly Isolated Alkaliphilic *Streptomyces Fradiae* NEAE-82. *Science Report* 6(32926). <https://doi.org/10.1038/srep32926>.
- Gosh, S. S., Murthy, S., Govindasamy, and Chandrasekaran, C., 2013. Optimization of L-Asparaginase Production by *Serratia marcescens* (NCIM 2919) Under Solid State Fermentation Using Coconut Oil Cake. *Journal Sus. Chem. Prosc* 1, 1–9. <https://doi.org/10.1186/2043-7129-1-9>
- Hadinoto, S., dan Syukroni, I., 2019. Pengukuran Protein Terlarut Air Cucian Gelembung Renang dan Kulit Ikan Tuna Menggunakan Metode Bradford. *Majalah BIAM* 15(01), 15–20.
- Hänelt, I., and Müller, V., 2013. Molecular Mechanisms of Adaptation of the Moderately Halophilic Bacterium *Halobacillus halophilus* to Its Environment. *Life* 3, 234–243. <https://doi.org/10.3390%2Flife3010234>.
- Jamaluddin, Alfin, Muzuni, dan Yanti, N. A., 2018. Eksplorasi Bakteri Termohalofilik Penghasil L-Asparaginase di Sumber Air Panas Wawolese Sulawesi Tenggara, *Biowallacea: Journal of Biological Research* 5(1), 1–9
- Jamaluddin dan Umar, E. P., 2017. Karakteristik Fisik dan Kimia Mata Air Panas Daerah Barasangka Kabupaten Konawe Utara Provinsi Sulawesi Tenggara. *Jurnal Geo Celebes* 1(2), 62–65. <https://doi.org/10.20956/geocelebes.v1i2.2291>.
- Jia, R., Wan, X., Geng, X., Xue, D., Xie, Z., Chen, C., 2021. Microbial L-asparaginase for Application in Acrylamide Mitigation from Food: Current Research Status and Future Perspectives. *Microorganisms* 9, 1659. <https://doi.org/10.3390%2Fmicroorganisms9081659>.
- Kurniawati, L., Kusdiyantini, E., dan Wijanarka, 2019. Pengaruh Variasi Suhu dan Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Enzim Selulase dari Bakteri *Serratia marcescens*. *Jurnal Akademika Biologi* 8(1), 1–9
- Martínez, G. M., Pire, C., and Martínez-Espinosa, R. M., 2022. Hypersaline Environments as Natural Sources of Microbes with Potential Applications in Biotechnology: The Case of Solar Evaporation Systems to Produce Salt in Alicante County (Spain). *Current Research in Microbial Sciences* 3, 100136. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100136>.
- Muzuni, Suriana, Yanti, N. A., and Ardiansyah, 2022. Phenotypic Characterization and Identification of Potential L-Asparaginase-Producing Thermohalophilic Bacteria from Wawolesea Hot Spring, North Konawe, Southeast Sulawesi, Indonesia. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 25(11), 1021–1032. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2022.1021.1032>.
- Patta, A.M., Ahmad, A., dan Natsir, H., 2013. Produksi, Pemurnian Parsial, dan Karakterisasi L-asparaginase dari Bakteri Termofilik *Bacillus Licheniformis* Strain Hsa3-1a, *Tesis*, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Pradhan, B., Dash, S. K., and Sahoo, S., 2013. Skrining and Characterization of Extracellular L-asparaginase producing *Bacillus subtilis* strain hswx88, Isolated from Taptapani Hotspring of Odisha, India. *Journal Trop Biomed* 3(12), 936–941 [https://doi.org/10.1016/s2221-1691\(13\)60182-3](https://doi.org/10.1016/s2221-1691(13)60182-3).
- Poernomo, A.T., Sudjarwo dan Parasati, R. A., 2014, Purifikasi Parsial Enzim Fibrinolitik Tempe Kacang Koro (*Canavalia ensiformis*) Produk Fermentasi *Rhizopus oryzae* FNCC 6078, *Jurnal Berkala Ilmiah Farmasi* 3(2), 23–30
- Qeshmi, F.I., Homaei, A., Fernandes, P., and Javadpour, S., 2018. Marine Microbial L-Asparaginase: Biochemistry, Molecular Approaches and Applications in Tumor Therapy and in Food Industry. *Microbiological Research* 208, 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.011>.
- Rubiano-Labrador, C., Bland, C., Miotello, G., Armengaud, J., and Baena, S., 2015. Salt Stress Induced Changes in the Exoproteome of the Halotolerant Bacterium *Tistlia consotensis* Deciphered by Proteogenomics. *PLoS ONE* 10(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135065>.
- Siciliano, C. C., Dinh, V. M., Canu, P., Mikkola, J-P., and Khokarale, S. G., 2023. Efficient Adsorption and Catalytic Reduction of Phenol Red Dye by Glutaraldehyde Cross-Linked Chitosan and Its Ag-Loaded Catalysts: Materials Synthesis, Characterization and Application. *Clean Technologies* 5(2), 466–483. <https://doi.org/10.3390/cleantechnol5020024>.

- Singh, Y. R., Kumar, V., Gundampati, S., Jagannadham, and S. K., Srivastava, 2013. Extracellular L-asparaginase from a Protease-Deficient *Bacillus aryabhatai* ITBHU02: Purification, Biochemical Characterization, and Evaluation of Antineoplastic Activity *In Vitro*. *Appl Biochem Biochemol* doi: <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0455-0>.
- Straub, C. T., Counts, J.A., Nguyen, D. M. N., Wu, C. H., Zeldes, B. M., Crosby, J. R., Conway, J. M., Otten, J. K., Lipscomb, G. L., Schut, G. J., Adams, M. W. W., and Kelly, R. M., 2018. Biotechnology of Extremely Thermophilic Archaea. *FEMS Microbiol Rev.* 42(5), 543–578. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy012>.
- Utami, P., Lestari, S., and Lestari, S. D., 2016. Pengaruh Metode Pemasakan Terhadap Komposisi Kimia dan Asam Amino Ikan Seluang (*Rasbora argyotaenia*). *Jurnal Teknologi Hasil Perikanan* 5(1), 73–84. <https://doi.org/10.36706/fishtech.v5i1.3520>.