

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Landasan Teori

2.1.1 Bakteri Patogen *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (Gambar 2.1) adalah bakteri Gram-negatif berbentuk batang, aerobik, tidak membentuk spora, dan mampu menyebabkan berbagai jenis infeksi pada manusia (Kerr & Snelling, 2009). Bakteri ini dapat tumbuh dengan baik di berbagai jenis media kultur. Pada media padat koloni bakteri ini terkadang berbentuk bundar dan seringkali terlihat berwarna hijau karena sifat fluoresensinya (Kazmierczak et al., 2015).



Gambar 2.1 Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada *Scanning Electron Microscope* (SEM) Perbesaran 1000x.

Sumber: Nguyen et al., 2022

Pseudomonas aeruginosa menyebabkan berbagai infeksi serius, yang dapat memicu beragam gangguan pada individu dengan sistem kekebalan tubuh normal, seperti pneumonia, *cystic fibrosis*, infeksi saluran kemih, infeksi saluran pencernaan, serta infeksi kulit dan jaringan lunak. (Kariminik et al., 2017). Bakteri ini sangat mudah ditemukan di berbagai lingkungan seperti tanah, perairan, bahkan mampu mengkontaminasi

peralatan medis rumah sakit. *Pseudomonas aeruginosa* menjadi bakteri penting penyebab terjadinya penyakit infeksi dan resistansi antibiotik, hal ini disebabkan kemampuannya membentuk biofilm dan menghasilkan enzim yang dapat menginaktivasi antibiotik seperti enzim Acetyltransferases, Nucleotidyltransferases, Phosphotrasferases, dan lain lain (Tuon et al., 2022).

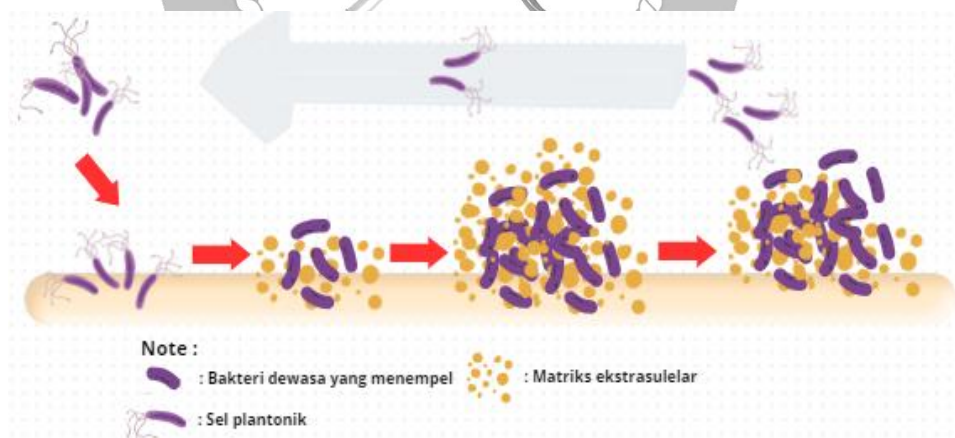
Kemampuan utama *Pseudomonas aeruginosa* dalam membentuk biofilm adalah dengan menghasilkan *extracellular polymeric substance* (EPS). EPS ini berfungsi sebagai kerangka untuk menyelubungi bakteri di atas permukaan. Struktur ini melindungi bakteri dari tekanan eksternal dan menghalangi terjadinya cekaman (Martak et al., 2022). Bakteri yang ada didalam biofilm membentuk lingkungan yang terlindungi dari aktivitas antibiotik, dan akan terus tumbuh dengan keadaan yang menguntungkan di dalam biofilm (Xu et al., 2021). Kehadiran biofilm menjadi tantangan dalam dunia kesehatan untuk segera diatasi.

2.1.2 Biofilm

Pembentukan biofilm menjadi salah satu penyebab utama resistansi obat antibiotik. Biofilm pada infeksi memiliki pengaruh terhadap 90% proses penyembuhan (Dharmayanti & Sukrama, 2019). Biofilm merupakan kumpulan mikroorganisme yang tumbuh dalam kondisi yang saling menempel di permukaan dengan menghasilkan matriks yang terdiri dari eksopolisakarida, protein, metabolit, dan DNA ekstraseluler (Gozali & Tjampakasari, 2023). Matriks ini melindungi bakteri yang terperangkap di dalamnya dari aktivitas antibiotik. Antibiotik hanya dapat menargetkan sel-sel planktonik yang berada di luar biofilm, sementara untuk penetrasi ke dalam matriks biofilm sangat sulit dilakukan (Limoli et al., 2015).

Bakteri membentuk biofilm secara bertahap yang dapat dilihat pada Gambar 2.2. Pembentukan dimulai dengan transportasi bakteri ke permukaan. Transportasi ini melibatkan sel planktonik bakteri yang aktif bergerak mencari lingkungan yang stabil dan menguntungkan (Bozorg et al., 2015). Ketika di permukaan, bakteri akan melakukan adhesi yaitu

mekanisme keterikatan antara sel mikroba dan permukaan. Saat proses ini, bakteri akan membentuk komposisi matriks EPS yang bersifat hidrofobik tinggi seperti alginat (Li et al., 2021). Alginat memainkan peran penting dalam proses ini. Bakteri yang sudah terikat pada permukaan akan menghasilkan senyawa biokimia yang mendukung lingkungannya untuk berkembang (Sharma et al., 2023). Ketika proses ini, terjadi juga komunikasi antar sel bakteri yang disebut *quorum sensing* yang meningkatkan faktor virulensi bakteri (Miranda et al., 2022). Tahap akhir dari pembentukan biofilm adalah dispersi. Bakteri akan mendispersikan diri dalam bentuk sel planktonik. Sel planktonik akan mengambang bebas dan berpindah ke permukaan baru untuk membentuk biofilm baru. Proses ini dibantu oleh pengaruh dari luar seperti faktor fisik, kimia, suhu, dan kondisi lingkungan yang menguntungkan (Thi et al., 2020).



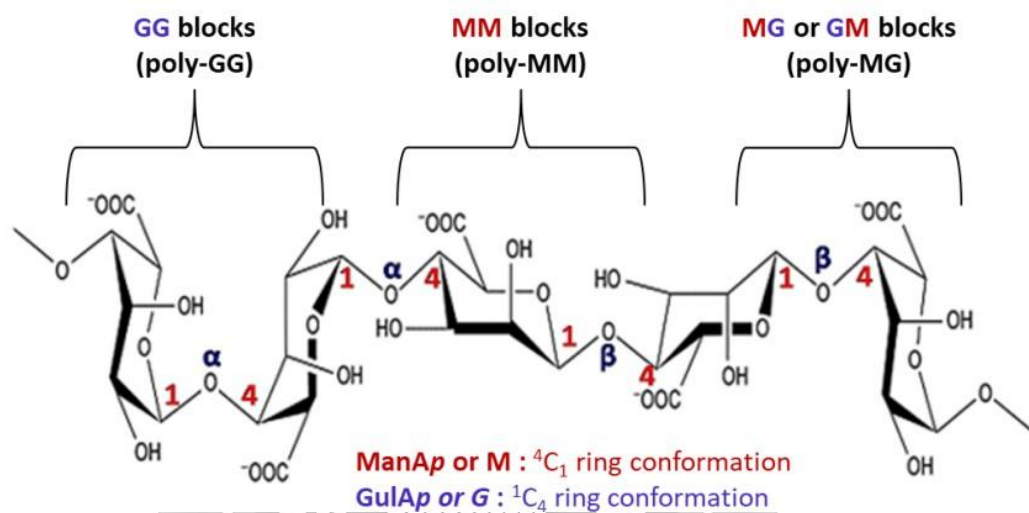
Gambar 2.2 Tahapan Pembentukan Biofilm *Pseudomonas aeruginosa*.

Sumber: Brindhadevi et al., 2020

2.1.3 Substrat Alginat

Alginat merupakan polisakarida yang umum ditemukan di semua spesies alga. Alginat memiliki polimer linier yang terdiri dari asam β -D-manuronat (M) dan asam α -L-guluronat (G) yang terhubung oleh ikatan 1,4 glikosidik (Cheng et al., 2020). Struktur alginat terdiri dari bagian-bagian yang hanya mengandung satu jenis asam, baik asam manuronat (M) maupun asam guluronat (G), serta segmen yang merupakan campuran dari

keduanya. Susunan alginat tidak memiliki pola pengulangan yang teratur, sehingga menghasilkan struktur yang bervariasi dan unik (Bennett et al., 2023). Alginat memiliki kemampuan membentuk gel ketika berinteraksi dengan ion divalen dalam kondisi fisiologis. Selain itu, alginat dikenal karena sifat biokompatibilitasnya yang menjadikannya salah satu material yang paling penting dalam berbagai aplikasi (Liu et al., 2023).



Gambar 2.3 Struktur Alginat Poly M, Poly G, dan Keduanya.

Sumber: Khajouei et al., 2022

Alginat juga memiliki peran dalam pembentukan biofilm oleh patogen salah satunya adalah bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Produksi alginat yang berlebih berperan dalam menciptakan struktur yang sangat terorganisir saat pembentukan biofilm. Sifat polimer dari alginat juga mendukung kemampuan biofilm untuk mempertahankan kelembaban dan menjaga kestabilan strukturnya di berbagai kondisi lingkungan (Van Rooyen et al., 2024). Alginat membentuk penghalang fisik yang efektif, yang menghambat penetrasi antibiotik ke dalam biofilm. Molekul antibiotik sering kali tidak dapat menembus matriks biofilm dengan efisien dikarenakan ukuran molekul yang relatif besar (Sharma et al., 2023).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa keberadaan alginat dalam EPS biofilm berkontribusi pada akumulasi senyawa pelindung. Senyawa pelindung ini dapat membantu memecah antibiotik sebelum

mencapai sel-sel bakteri yang berada di dalam biofilm (Panthi et al., 2024). Pengembangan agen yang mampu memecah alginat dalam matriks biofilm sangat diperlukan sehingga, dapat mengatasi resistansi bakteri terhadap antibiotik dan efektivitas pengobatan dapat lebih optimal (Saggu et al., 2019).

2.1.4 Enzim Alginat Liase

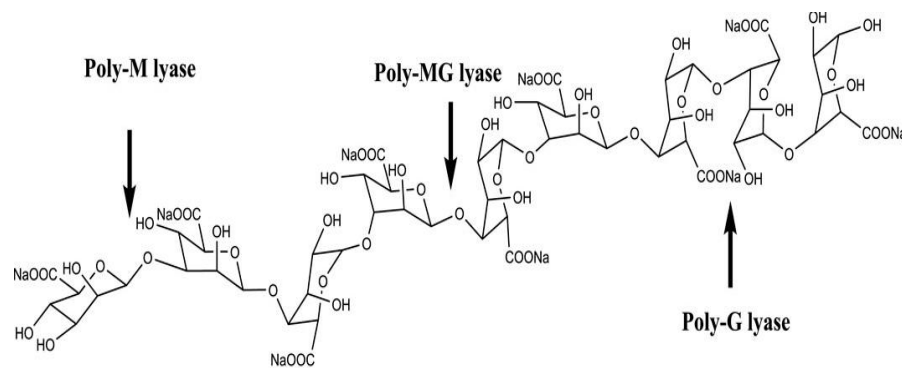
2.1.4.1 Sumber Enzim Alginat Liase

Enzim alginat liase diketahui merupakan enzim yang dapat mengurai alginat. Enzim ini telah banyak diisolasi dari berbagai sumber termasuk organisme laut seperti moluska laut, aktinobakter, dan bakteri laut, Hal ini dikarenakan alga sebagai sumber makanannya yang mengandung alginat (Zhang et al., 2021). Penelitian lain juga menunjukkan adanya aktivitas enzim alginat liase pada jamur, bakteri tanah dan virus (Zhu & Yin, 2015). Ukuran enzim alginat liase bisa beragam berdasarkan sumber isolatnya. Menurut Takeshita & Oda. (2016), ukuran enzim ini dibagi menjadi 3 grup yaitu ukuran besar > 60 kDa, ukuran sedang sekitar 40 kDa, dan ukuran kecil 25–30 kDa. Bakteri yang bersimbion pada organisme laut menunjukkan aktivitas enzim alginat liase yang berperan dalam membantu proses pencernaan alga yang mengandung alginat. Struktur dari enzim alginat liase dapat berbeda berdasarkan sumber isolat dan habitatnya (Jagtap et al., 2014).

2.1.4.2 Mekanisme Kerja Enzim

Enzim alginat liase merupakan enzim yang menggunakan alginat sebagai substratnya. Enzim ini mampu menguraikan alginat melalui mekanisme eliminasi ikatan β -D-manuronat dan α -L-guluronat pada ikatan glikosidik, menghasilkan oligosakarida tak jenuh yang memiliki ikatan rangkap di ujung non-pereduksi (Takeshita & Oda, 2016). Enzim ini dibedakan menjadi tiga kelompok berdasarkan spesifitas substratnya seperti pada Gambar 2.3 yaitu poli-G liase, poli-M liase, serta enzim yang memiliki kemampuan untuk mengekspresikan aktivitas poli-G dan poli-M liase (Zheng et al., 2022). Jika dibedakan berdasarkan cara kerja, enzim

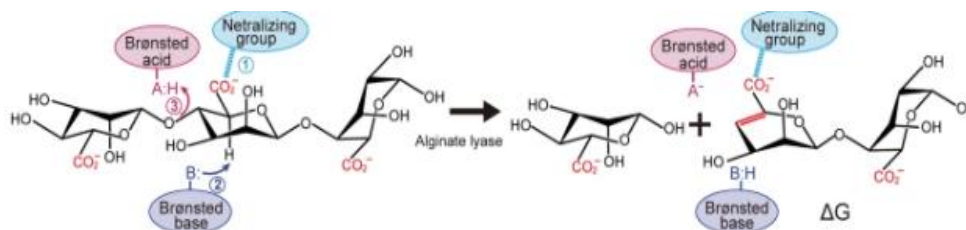
alginat liase dibagi menjadi dua kelompok yaitu endonuklease dan eksonuklease (Wong et al., 2000). Endonuklease memutus ikatan glikosidik dalam alginat dan menghasilkan oligosakarida tak jenuh seperti disakarida, trisakarida, dan tetrasakarida, sedangkan eksonuklease mampu lebih lanjut menguraikan oligosakarida menjadi monomer oligosakarida (Jagtap et al., 2014).



Gambar 2.4 Spesifitas Enzim Alginat Liase Berdasarkan Substratnya.

Sumber: Zheng et al., 2022

Mekanisme enzim alginat liase dalam mendegradasi alginat dapat dilihat pada Gambar 2.4 yang dimulai dengan pengenalan substrat alginat oleh enzim. Enzim akan memutus ikatan glikosidik dan menghasilkan oligosakarida dengan ujung tak jenuh. Oligosakarida tak jenuh memiliki ikatan rangkap pada ujung non-pereduksi. Produk ini bervariasi mulai dari disakarida, trisakarida, hingga tetrasakarida, tergantung pada enzim dan kondisi degradasi (Zhang et al., 2021). Enzim ini bekerja dengan mengubah struktur kimia alginat sehingga dapat dipecah menjadi bagian-bagian yang lebih kecil. Enzim ini juga dapat memecah alginat pada biofilm sehingga dapat mengurangi kemampuannya dalam memberikan perlindungan bakteri patogen.



Gambar 2.5 Mekanisme Degradasi Alginat oleh Enzim Alginat Liase.
Sumber: (Zhang et al., 2021).

2.1.5 Bakteri *Bacillus tequilensis*

Bakteri *Bacillus tequilensis* pertama kali diisolasi di makam berusia 2000 tahun di kota Tequila negara Meksiko (Wakui et al., 2024). Bakteri ini adalah bakteri Gram-positif, berbentuk batang, dan bersifat aerobik (Wardani et al., 2021). Genus *Bacillus* sendiri memiliki berbagai keunggulan yaitu ketahanan yang tinggi terhadap faktor eksternal yang merugikan, distribusi yang luas, dan kemampuan untuk berkembang dengan cepat (Yin et al., 2024). *Bacillus tequilensis* sendiri memiliki kemampuan membentuk endospora. Endospora ini memungkinkan bakteri bertahan dalam kondisi lingkungan yang ekstrem (Kwon et al., 2022). Endospora bakteri ini berbentuk bulat atau oval yang biasanya terletak di bagian tengah atau subterminal sel yang merupakan karakteristik penting untuk membedakan spesies ini dari spesies *Bacillus* lainnya (Cuellar et al., 2023). Dari segi struktur internal, *Bacillus tequilensis* memiliki nukleoid yang mengandung DNA dalam bentuk kromosom sirkular, serta ribosom 70S yang berfungsi dalam sintesis protein (Panda et al., 2021).

Bakteri ini dapat ditemukan di tanah, lingkungan perairan ataupun bersimbion dengan mahluk laut seperti *sponge* dan siput laut. Pada penelitian ini, *Bacillus tequilensis* yang diteliti bersimbion dengan siput laut (*nudibranchia*). Bakteri ditumbuhkan pada media *International streptomyces project 2* (ISP 2). Media ISP 2 merupakan media tumbuh yang kaya dan sering digunakan untuk menumbuhkan isolat bakteri dari laut (Gamaleldin et al., 2022). Habitat yang berada di laut membuat bakteri ini

dapat mentolerir kondisi yang tidak menguntungkan, seperti suhu tinggi, tekanan, salinitas, dan pH yang ekstrem (Rampelotto, 2010).

Bakteri yang berasal dari lingkungan laut secara metabolik berbeda dari bakteri yang berasal dari darat, sehingga mereka memiliki kemampuan untuk menghasilkan senyawa bioaktif yang unik, yang tidak ditemukan pada bakteri di darat (Mondol et al., 2013). *Bacillus tequilensis* yang bersimbiosis dengan siput laut menghasilkan senyawa bioaktif unik, termasuk metabolit seperti enzim alginat liase. Alga yang menjadi sumber utama makanan siput laut menyediakan alginat yang mendukung aktivitas enzimatik bakteri simbiosis tersebut (Sari et al., 2017).

2.1.6 Purifikasi dan Karakterisasi Enzim Alginat Liase

2.1.6.1 Purifikasi Enzim

Purifikasi enzim merupakan proses pemisahan atau pemurnian enzim dari komponen lain yang bukan enzim. Purifikasi merupakan langkah awal yang sangat penting agar enzim bisa dikarakterisasi nantinya (Confortin et al., 2019). Purifikasi enzim memiliki banyak metode sehingga diperlukan optimalisasi dalam purifikasi. Penelitian ini mempurifikasi parsial enzim alginat liase dengan metode presipitasi amonium sulfat. Metode ini memisahkan protein dengan larutan garam yang tinggi. Metode ini sering digunakan dalam proses purifikasi karena sifatnya yang sangat larut, biaya yang murah, serta kemampuannya memberikan tingkat pemurnian yang tinggi. Selain itu, amonium sulfat tidak mempengaruhi pH larutan protein, sehingga dapat mencegah denaturasi protein (Laksanawati et.al., 2022).

Prinsip kerja presipitasi enzim dengan amonium sulfat yaitu dengan cara "penggaraman" protein dari larutan. Proses ini membuat protein tidak bisa lagi membentuk ikatan hidrogen dengan air, sehingga garam memfasilitasi interaksi antara protein itu sendiri. Akibatnya, protein akan berkumpul dan membentuk endapan yang kemudian mengendap keluar dari larutan (Grodzki & Berenstein, 2010). Protein dibiarkan mengendap lalu disentrifugasi untuk memisahkan dengan pengotor lainnya. Fase yang mengendap ini merupakan enzim yang harus dihilangkan kandungan

garamnya atau sering disebut dengan *desalting*. Salah satu metode *desalting* adalah penggunaan membran dialisis. Dialisis adalah metode yang umum digunakan untuk desalinasi. Prinsip dialisis adalah pemisahan molekul yang didorong oleh perbedaan potensi kimia, memungkinkan zat-zat dengan berat molekul rendah, seperti garam dan air, untuk bergerak melalui membran semipermeabel (Hadidi et al., 2022).

Purifikasi dilakukan dengan metode kromatografi penukar ion (*ion exchange chromatography*). Metode ini melakukan pemisahan yang didasarkan pada perbedaan muatan dan jumlah muatan molekul-molekul zat terlarut, serta proses pertukaran reversibel antara fase diam dan fase gerak (Wang et al., 2022). Penelitian ini menggunakan purifikasi dengan metode kromatografi pertukaran anion yang berarti kolom kromatografi akan diisi oleh resin yang dimodifikasi gugus kimia positif seperti aminia kuarterner atau dietilaminoetil. Penelitian ini menggunakan kolom *Quaternary Fast Flow (QFF) Coloumn anion exchange* 5 ml (Cytiva, USA). Enzim alginat liase memiliki muatan negatif saat kondisi netral karena struktur asam aminonya, sehingga harus memakai kolom anion yang bermuatan positif agar protein terikat (Barzkar et al., 2022). Pemisahan ini dilakukan dengan bantuan alat AKTA Go (GE Health Care, USA).

Menurut El-Aziz et al. (2020), tahapan proses dalam kromatografi penukar ion adalah ekuilibrasi yaitu pengkondisian lingkungan kolom dengan buffer awal. Penelitian ini menggunakan buffer awal yaitu 50 mM Tris HCl pH 8.0 (Cabra et al., 2020). Proses ini bertujuan untuk menstabilkan kondisi kolom sehingga sampel dapat terikat dengan kolom bermuatan. Pada saat sampel dimasukan, sampel yang ditargetkan akan berikatan dengan kolom, sementara pengotor lain yang tidak berikatan akan terbuang. Tahap terakhir adalah proses elusi yang menggunakan garam untuk mengelusi sampel yang berikatan dengan kolom. Konsentrasi garam akan meningkat secara gradien sehingga, molekul yang terikat kuat dan memiliki kerapatan muatan permukaan yang lebih tinggi akan terelusi secara bertahap dari kolom. Alat AKTA Go akan menampilkan grafik pada

layar komputer. Grafik seperti puncak merupakan protein/pengotor yang terelusi dan tertangkap sinar UV pada absorbansi 280 nm. Selain itu 2 grafik lainnya menunjukkan perbedaan konsentrasi larutan dan penambahan larutan elusi secara gradien. Enzim yang telah dipurifikasi akan memiliki aktivitas yang lebih baik sehingga dapat dilakukan pengujian karakterisasi.

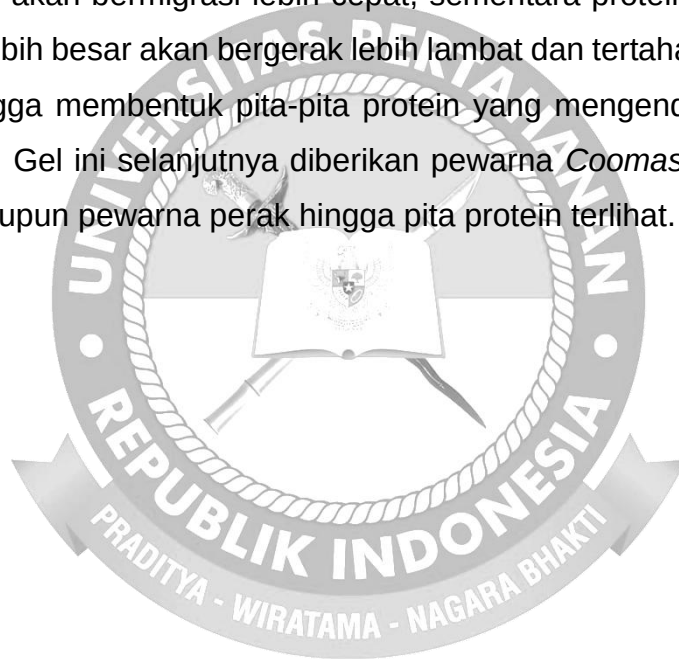
2.1.6.2 Karakterisasi Enzim

Karakterisasi enzim merupakan proses penting untuk mengetahui pH, suhu, dan kondisi optimum enzim agar dapat meningkatkan kinerja enzim (Baharuddin et al., 2022). Proses ini mencakup pengukuran aktivitas enzim yang dipengaruhi oleh berbagai faktor tertentu (Istia'nah et al., 2020). Enzim adalah katalis alami yang mempercepat reaksi kimia. Oleh karena itu, kondisi optimal akan membantu enzim meningkatkan laju reaksi dengan lebih efisien dengan meningkatkan aktivitasnya. Penelitian ini menggunakan perlakuan pH, suhu, konsentrasi NaCl, ion logam, dan senyawa kimia.

Setiap enzim memiliki pH optimum yang paling mendukung untuk pengikatan ke substrat lebih efisien. Penurunan aktivitas enzim dapat diakibatkan oleh perubahan pH karena adanya perubahan keadaan ionisasi pada substrat dan enzim (Robinson, 2015). Suhu optimal enzim umumnya berada pada suhu 40 °C, namun hal ini tergantung pada adaptasi enzim tersebut. Menurunnya aktivitas enzim setelah suhu optimal terjadi akibat enzim yang sudah mulai terdenaturasi (Zhang et al., 2020). Pengaruh konsentrasi NaCl diuji karena enzim alginat liase diproduksi dari bakteri yang habitatnya di laut, sehingga memungkinkan adanya peran NaCl dalam aktivitas enzim (Li et al., 2016). Enzim alginat liase juga diuji pengaruhnya dengan ion logam dan senyawa kimia untuk mengetahui ion logam yang membantu kerja enzim (kofaktor) sehingga meningkatkan efisiensi kinerja enzim (Salirawati, 2017) Ion logam dapat memengaruhi kinerja enzim dan stabilitas molekulnya. Konsentrasi tertentu pada ion logam dapat mengubah interaksi antara enzim dan substrat. Interaksi ini membuat ion

logam dapat berfungsi sebagai aktivator atau inhibitor enzim (Anggraini et al., 2013).

Ukuran molekul enzim alginat liase diestimasi dengan metode *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Metode ini relatif lebih singkat dan dapat memisahkan protein melalui matriks gel dengan pemberian arus listrik, protein dengan ukuran molekul lebih kecil akan bermigrasi lebih cepat, sementara protein dengan ukuran molekul lebih besar akan bergerak lebih lambat dan tertahan dalam matriks gel sehingga membentuk pita-pita protein yang mengendap (Salsabila et al., 2024). Gel ini selanjutnya diberikan pewarna *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) ataupun pewarna perak hingga pita protein terlihat.



2.2 Hasil Penelitian Terdahulu

Penelitian ini didasarkan pada studi terdahulu yang memiliki relevansi dengan topik yang diteliti. Penelitian sebelumnya digunakan sebagai acuan dalam pengembangan metode dan analisis. Hasil penelitian terdahulu yang menjadi acuan dalam penelitian ini disajikan dalam Tabel 2.1

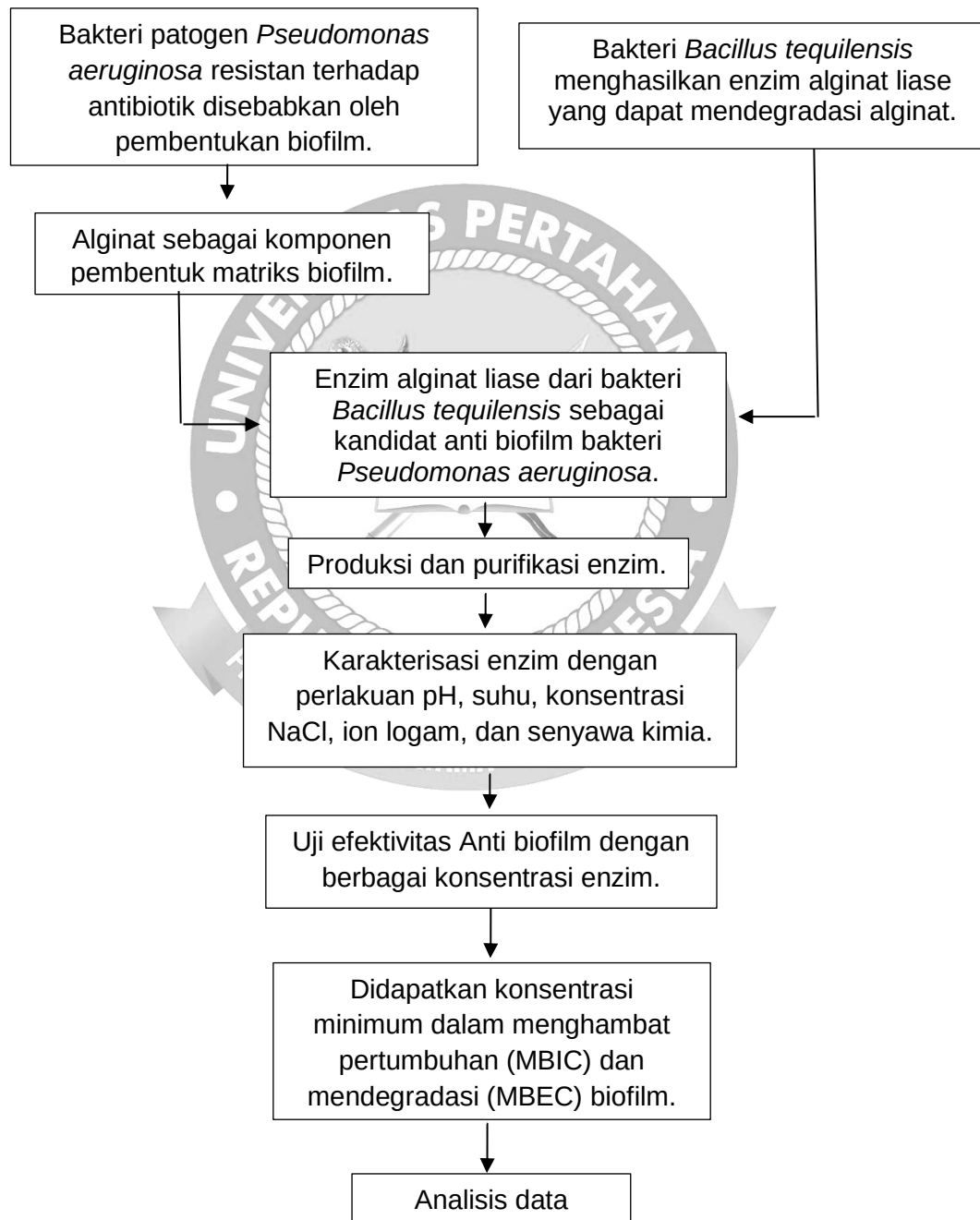
Tabel 2.1 Hasil Penelitian Terdahulu.

Penulis (Tahun Terbit)	Judul	Hasil
Wardani (2024)	Isolasi Enzim Alginat liase Bakteri Asosiasi Nudibranchia dari Perairan Kapoposan, Sulawesi Utara Sebagai Kandidat Anti Biofilm Untuk Mendukung Kesehatan Nasional	Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri asosiasi nudibranchia yang memiliki aktivitas enzim alginat liase yang tinggi berkerabat erat dengan <i>Bacillus tequilensis</i> . Bakteri ini optimal tumbuh di media ISP 2 dan juga berpotensi dalam mendegradasi biofilm.
Chen et al. (2018)	<i>Purification and characterization of a novel alginate lyase from the marine bacterium bacillus sp. Alg07</i>	Penelitian ini menunjukkan berat molekul enzim alginat liase yang diproduksi oleh bakteri laut <i>Bacillus</i> sp. adalah 60 kDa.

Cabra et al. (2020)	<i>Characterization of different alginate lyases for dissolving Pseudomonas aeruginosa biofilm.</i>	Hasil penelitian diperoleh protein murni menggunakan kromatografi penukar anion dan menggunakan buffer Tris HCl pH 8.0 dalam prosesnya.
Zhang et al. (2020)	<i>Characterization and Application of an Alginate Lyase, Aly1281 from Marine Bacterium Pseudoalteromonas carrageenovora ASY5.</i>	Penelitian ini menjadi acuan dalam melakukan karakterisasi dan penggunaan konsentrasi NaCl untuk mengetahui hubungannya dengan bakteri habitat laut
Yang et al. (2020)	<i>Purification and Characterization of a Novel Endolytic Alginate Lyase from Microbulbifer sp. SH-1 and Its Agricultural Application</i>	Penelitian ini memberikan gambaran dalam pemberian konsentrasi amonium sulfat pada enzim alginat liase

2.3 Kerangka Berpikir

Kerangka berpikir dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 2.6 berikut.



Gambar 2.6 Diagram Alur Kerangka Berpikir.