

Isolasi dan Karakterisasi Awal Bakteri Penghasil Enzim L-Asparaginase dari Sponge Laut dari Laut Makassar

Isolation and Preliminary Characterization of L-Asparaginase Producing Bacteria from Marine Sponges Collected in the Makassar Sea

Ayyub Harly Nurung^{1*}, Siska Nuryanti¹, Iskandar Zulkarnain², Bintang Maharani³, Fauzia Surman³

¹Departement of Pharmaceutical Microbiology, Faculty of Pharmacy, Makassar, Universitas Muslim Indonesia, Indonesia

²Departement of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Makassar, Universitas Muslim Indonesia, Indonesia

³Undergraduate Program in Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Makassar, Universitas Muslim Indonesia, Indonesia

Article Info	ABSTRAK
Article history: Received 11 24, 2025 Revised 04 28, 2026 Accepted 01 29, 2026	Penelitian ini merupakan eksplorasi awal yang berfokus pada penemuan sumber baru L-asparaginase dari bakteri simbiosis sponge laut yang belum banyak dilaporkan dari perairan Makassar. Permasalahan yang diangkat adalah terbatasnya sumber enzim L-asparaginase yang memiliki potensi terapeutik dan kompatibilitas biologis yang lebih baik, sehingga diperlukan pencarian kandidat alternatif dari lingkungan laut. Isolasi dilakukan menggunakan media selektif M9 dan <i>Asparagine Glucose Salt Agar</i> untuk mengidentifikasi bakteri yang mampu menghidrolisis L-asparagin, ditandai oleh terbentuknya zona berwarna merah muda. Proses skrining menghasilkan tiga isolat terbaik (C6, B18, dan KH6), yang selanjutnya dianalisis aktivitas enzimnya menggunakan metode Nessler. Hasil menunjukkan bahwa isolat C6 memiliki aktivitas tertinggi (74,89 IU/mL), diikuti oleh B18 (58,44 IU/mL), sedangkan KH6 menghasilkan aktivitas rendah (9,57 IU/mL). Temuan ini menegaskan bahwa sponge laut merupakan reservoir mikroba yang berpotensi menghasilkan enzim L-asparaginase baru, dengan isolat C6 sebagai kandidat paling menjanjikan untuk pengembangan lebih lanjut melalui pemurnian dan karakterisasi lanjutan. Penelitian ini memberikan dasar ilmiah bagi pengembangan sumber L-asparaginase alternatif untuk aplikasi bioteknologi
Kata kunci aktivitas enzimatik; bakteri laut; L-asparaginase; <i>marine sponge</i> Keywords: enzymatic activity L-asparaginase marine bacteria <i>marine sponge</i>	ABSTRACT This study provides an initial exploration aimed at discovering new sources of L-asparaginase from marine sponge-associated bacteria, representing a novelty due to the limited reports from the Makassar Sea ecosystem. The research addresses the need for alternative L-asparaginase producers with improved therapeutic potential and biological compatibility by isolating candidate bacteria from marine sponges. Isolation was performed using M9 and Asparagine Glucose Salt Agar to detect bacteria capable of hydrolyzing L-asparagine, indicated by the formation of pink halo zones. Three isolates (C6, B18, KH6) exhibiting the strongest responses were selected for further enzymatic evaluation using the Nessler method. The results revealed that isolate C6 displayed the highest activity (74.89 IU/mL), followed by B18 (58.44 IU/mL), whereas KH6 showed low activity (9.57 IU/mL). These findings demonstrate that marine sponges represent a promising reservoir of novel L-asparaginase-producing bacteria, with isolate C6 emerging as the most promising candidate for future purification and biochemical characterization. This study provides an important basis for developing alternative L-asparaginase sources for biotechnological applications.

Corresponding Author:

Ayyub Harly Nurung

Departement of Pharmaceutical Microbiology, Faculty of Pharmacy,, Universitas Muslim Indonesia, Indonesia

Jl. Urip Sumoharjo Km. 05, Makassar, Sulawesi Selatan

email: ayyub.harlynurung@umi.ac.id ; ayyubnurung@gmail.com

This is an open-access article under the [CC BY-SA](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/) license.



Journal homepage: <http://jfi.setiabudi.ac.id>



1. PENDAHULUAN

L-asparaginase (L-ASNase) merupakan enzim terapeutik penting yang dapat mengkatalisis hidrolisis asparagine menjadi asam L-aspartat dan amonia, yang berfungsi sebagai komponen atau senyawa yang digunakan dalam pengobatan Leukimia Limfoblastik Akut (LAA) [1], [2], [3]. Mekanisme aksi dari enzim L-ASNase dengan mengurangi asparagin yang berada dalam sel, yang merupakan asam amino esensial yang tidak dapat disintesis oleh sel kanker, berbeda dengan sel normal [2], [4]. Leukimia limfoblastik akut merupakan kanker anak yang cukup umum ditemukan, sekitar 75-80% leukimia akut pada anak, dengan angka kejadian 3-4 kasus per 100.000 anak berusia dibawah 15 tahun [5]. Data global terbaru menunjukkan bahwa kasus LAA pada anak mencapai 168.879 pada tahun 2021, meningkat 59,06% dari tahun 1990, meskipun angka kematian telah menurun secara signifikan sebesar 66,71 pada periode yang sama [6].

Selain itu, L-asparaginase telah memperlihatkan potensi terapinya pada tumor ganas lainnya, seperti leukimia mieloid akut, kanker ovarium, kanker otak dan limfoma non-Hodgkin [7]. Kemampuan L-ASNase dalam menghambat pertumbuhan sel kanker menjadikannya kandidat penelitian lebih lanjut pada pengobatan jenis kanker lainnya, termasuk sarkoma dan leukemia limfoid kronik [7].

Jenis L-ASNase yang saat ini diformulasi umumnya berasal dari bakteri, khususnya *Escherichia coli* dan *Erwinia chrysanthemi* (sekarang *Dickeya dadantii*), yang telah menjadi standar pengobatan leukimia limfoblastik akut (LAA) hampir selama tiga dekade [1], [8], [9]. Enzim yang berasal dari bakteri ini diproduksi sebagai sediaan asli/ alami atau melalui modifikasi, termasuk modifikasi dengan PEGilasi yang dapat memperpanjang waktu paruh dan mengurangi imunogenitasnya [10]. Namun, enzim dari bakteri ini memiliki tantangan klinis yang signifikan yang membatasi efektivitas terapi dan toleransi pasien [11].

Penelitian klinis menunjukkan bahwa *E. coli*- asparaginase menginduksi koagulasi abnormal lebih tinggi dibandingkan *Erwinia*- asparaginase, dengan nilai 30,2% berbanding 11,9% [9]. Namun demikian, *E. coli*-asparaginase menunjukkan efektivitas terapi yang lebih baik, pasien yang diberikan *Erwinia*-asparaginase mengalami kegagalan dalam penyembuhan lebih tinggi (4,9% vs 2,0%), dan tingkat kekambuhan penyakit meningkat, sehingga menimbulkan kemungkinan hidup menurun [9]. Selain itu, pengobatan menggunakan enzim L-ASNase yang berasal dari *E. coli* dan *Erwinia sp.*, dibatasi dengan adanya imunogenisitas dan aktivitas glutaminase, yang keduanya ini dapat menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan [12], [13].

Keterbatasan dari konvensional L-asparaginase yang berasal dari bakteri inilah yang meningkatkan tingginya pencarian sumber mikroorganisme alternatif yang memiliki kemampuan terapeutik lebih tinggi, imunogenitas rendah, dan meningkatkan sifat biokimianya [13], [14], [15]. Bakteri dari laut muncul khususnya sebagai kandidat yang menjanjikan enzim dengan karakteristik imunologikal yang baru dan berpotensi memiliki efek terapi yang lebih baik [14], [16], [17], [18]. Beberapa invertebrata laut (*Marine Sponges (Porifera)*) merupakan inang yang kaya akan mikrobiom yang dapat menghasilkan metabolit sekunder atau biosintesis produk alami [19], [20]. Metabolit sekunder yang dihasilkan memiliki potensi sebagai senyawa aktif seperti antimikroba, antikanker dan pigmen sebagai pertahanan alami [19], [20]. Hal ini mengindikasikan bahwa bakteri laut yang bersimbiosis dengan hewan laut ini dapat menghasilkan enzim yang baru, seperti L-ASNase yang unik dan belum ditemukan pada organisme darat.



Beberapa bakteri seperti *Bacillus licheniformis*, *Bacillus xiamenensis* ASP-J1-4, dan *Bacillus australimaris* NJB19 yang diisolasi dari organisme laut dan sedimen laut terbukti dapat menghasilkan enzim L-ASNase dan memiliki aktivitas anti kanker yang kuat [14], [21], [22]. Penemuan ini menunjukkan potensi besar dari biosfer laut yang belum dieksplorasi dalam menghasilkan enzim L-ASNase berkualitas tinggi dan imunogenik rendah.

Meskipun potensi sumber L-asparaginase (L-ASNase) telah banyak dikaji, namun enzim L-ASNase baru yang berasal dari organisme laut masih perlu untuk dieksplorasi. Khususnya, adanya keterbatasan L-ASNase berasal dari organisme laut yang memiliki afinitas tinggi terhadap asparagine dengan imonugenitas rendah dan tidak memiliki aktivitas glutaminase. Kesenjangan (*gap*) ini menjadi dasar perumusan masalah dalam penelitian ini, yaitu untuk menemukan dan mengevaluasi bakteri penghasil enzim L-Asparaginase (L-ASNase) baru yang berasal dari laut. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri penghasil enzim L-Asparaginase dari organisme laut, serta melakukan karakterisasi awal aktivitas enzimnya

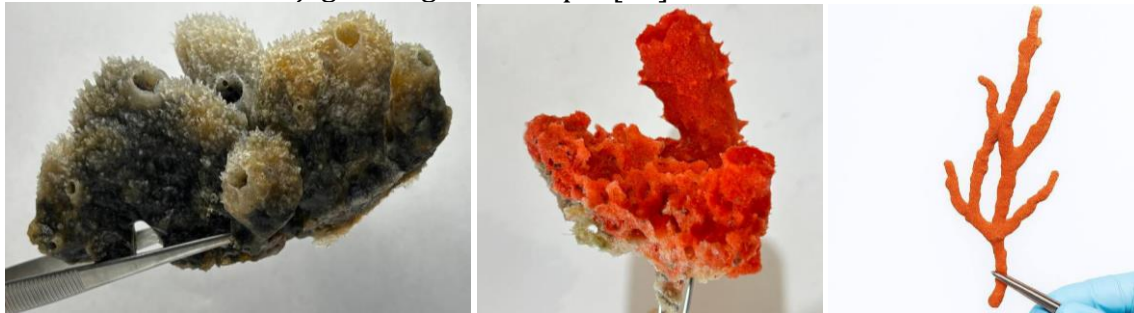
2. METODE

Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Autoklaf (SMIC Model YX-280), cawan petri, Erlenmeyer 100, 250 dan 500 mL, gelas ukur, gelas kimia, inkubator (Memmert), Laminar Air Flow (LAF), oven (Memmert), *shaker*, tabung reaksi, spoit 1, 5 dan 10 mL, timbangan analitik (Chyo), vial dan *waterbath*. Bahan yang digunakan pada penelitian yaitu, Aquadest, NaCl 90%, Nessler's reagent, malt yeast broth, M9 Medium M9 (pH 7,0): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 6,0 g; KH_2PO_4 , 3,0 g; NaCl, 0,5 g; L-asparagine, 5'0 g; 1M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,0 ml; 0,1M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,0 ml; 20% stok glukosa, 10,0 ml; agar 20,0 g dalam 1 Liter media dan ditambahkan *phenol red* 0,009% , disiapkan dalam stok 2.5% dengan pelarut etanol, medium asparagine glucose salt (AGS) agar: L-asparagine 1, glucose 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 gram, K_2HPO_4 0.05 gram, NaCl 0,05 gram, yeast 0,2 gram, *phenol red* 100 μl (0.009 in methanol), dan agar 2. Sampel yang digunakan *marine sponge*: *Hyrtios sp.*, dan *Porifera* dari Makassar.

Pengambilan sampel

Sampel *Marine Sponges* diperoleh dari laut sekitar Makassar, Sulawesi Selatan, tepatnya pada kepulauan Barrang Lompo, dengan koordinat lokasi longitude 119°19.516'E and latitude 5°03.227'S. Sampel diambil pada kedalaman >10 meter, untuk memperoleh spons yang tumbuh pada kondisi lingkungan yang relatif stabil serta meminimalkan pengaruh fluktuasi suhu, cahaya, dan aktivitas di permukaan perairan. Sampel yang diperoleh kemudian dimasukkan kedalam plastik steril berisi air laut kemudian disimpan dalam *cooler box* untuk menjaga kesegaran sampel [22].



Gambar 1. Sampel marine sponge yang diambil di perairan Makassar.

Isolasi bakteri dari *Marine Sponges* dan screening awal bakteri penghasil enzim L-asparaginase

Isolasi bakteri dilakukan dengan metode dilusi. Setiap sampel spons diproses secara terpisah. Setiap jenis spons dipotong secara aseptik dan ditimbang sebanyak 1 g, kemudian dimasukkan ke dalam 10 mL larutan NaCl 0,9% steril dan diencerkan hingga 10^4 . Setiap pengenceran diambil 1 mL dimasukkan ke dalam cawan petri kemudian ditambahkan medium M9 sebanyak 9 mL. Cawan petri diinkubasi pada suhu 25°C selama 3-4 hari [22], [23], [24].

Pemurnian sampel dan screening lanjutan isolat bakteri penghasil L-asparaginase

Isolat bakteri yang diperoleh yang memiliki zona bewarna merah muda kemudian dipindahkan ke dalam media M9 yang baru dengan metode gores. Warna merah muda terbentuk akibat aktivitas enzim L-asparaginase yang menghidrolisis L-asparagin menjadi L-aspartat dan amonia. Amonia yang dihasilkan meningkatkan pH medium sehingga indikator fenol red berubah warna menjadi merah muda di sekitar koloni. Mikroorganisme murni kemudian diuji pada media *asparagine glucose salt* agar (AGSA) yang telah dimodifikasi. Sampel yang telah murni diambil dengan menggunakan pencadangan, kemudian diletakkan terbalik (isolat menempel pada medium). Cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 2-4 hari. Selama inkubasi pembentukan zona merah muda diamati setiap 24 jam. Cawan petri tanpa L-asparagin dan fenol red digunakan sebagai kontrol negatif untuk memastikan bahwa pembentukan zona merah muda hanya terjadi akibat aktivitas enzim L-asparaginase pada medium uji. [24], [25].

Fermentasi isolat bakteri penghasil L-asparaginase

Isolat bakteri yang memiliki diameter zona dengan warna merah muda paling besar dipilih untuk difermentasi untuk menghasilkan enzim L-asparaginase. Isolat yang terpilih diinokulasi pada 20 mL media *Malt Yeast Broth*, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Kemudian 1 mL inokulum dipindahkan ke dalam 100 mL media fermentasi (L-asparagine 0,1, glukosa 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05, K_2HPO_4 0,05, yeast 0,2, pH 6,8, b/v). Isolat kemudian di-shaker pada *rotary incubator shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 96 jam. Fermentasi dilakukan selama 96 jam agar diperoleh produksi enzim L-asparaginase yang optimal. Setelah fermentasi berakhir, hasil fermentasi disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 20 menit, untuk memperoleh ekstrak enzim bebas sel [25], [26].

Uji enzimatik

Aktivitas enzimatik L-asparaginase ditentukan dengan menggunakan Nessler's reagent. Reaksi dimulai dengan mencampur 500 μL ekstrak enzim isolat dengan 500 μL L-asparagin (0,04 M) dan 500 μL buffer Tris HCl 50 mM (pH 8,5), kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 10 menit, karena suhu tersebut merupakan kondisi optimum untuk reaksi enzim L-asparaginase. Setelah itu, reaksi dihentikan dengan menambahkan 500 μL asam trikloroasetat (TCA) 1,5 M dan didiamkan selama 5-10 menit, kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 8000 rpm suhu 4°C . Supernatan yang dihasilkan diambil sebanyak 100 μL dan diencerkan dengan 3,7 mL akuadest, dan ditambah 200 μL Nessler's reagent. Kadar amonia diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 450 nm [25], [26].

Metode Olahan Data Hasil Penelitian



Hasil penelitian dianalisis dengan menilai aktivitas L-asparaginase yang dinyatakan sebagai jumlah amonia yang dihasilkan oleh 1 mL enzim yang digunakan untuk menghidrolisis substrat, dengan menggunakan persamaan[26]:

$$IU/mL = \frac{y - b}{a} \times \frac{Vt}{Va} \times \frac{1}{Ve} \times \frac{1}{Ti}$$

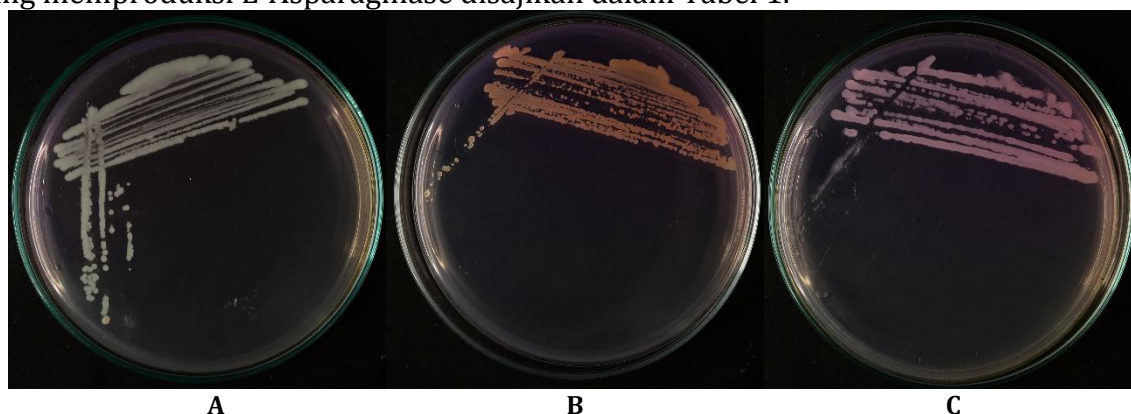
Keterangan:

y : absorbans Va : volume total (0,1 mL)
a : slope Ve : volume enzim (0,5 mL)
b : intercept Ti : waktu inkubasi enzim (10 menit)

3. HASIL

Isolasi dan Skrining Awal Isolat Bakteri Penghasil L-Asparaginase

Isolasi bakteri dilakukan untuk memperoleh kandidat penghasil L-asparaginase dari *Hyrtios violaceus* dan dua spesies Porifera lainnya. Proses inokulasi dan pemurnian pada media selektif menghasilkan komunitas bakteri dengan karakter fenotipik yang bervariasi. Contoh hasil pemurnian pada medium selektif ditampilkan pada gambar 2 sebagai representasi visual, sedangkan ringkasan karakteristik secara morfologi isolat yang memproduksi L-Asparaginase disajikan dalam Tabel 1.



Gambar 2. Hasil pemurnian koloni bakteri dari marine sponge pada medium M9. (A) isolat negatif (pigmen non orange-merah muda), (B) isolat dengan pigmentasi orange (positif), (C) isolat dengan pigmentasi merah muda (positif)

Tabel 1. Karakteristik morfologi isolat bakteri penghasil L-ASNase yang diperoleh dari marine sponge

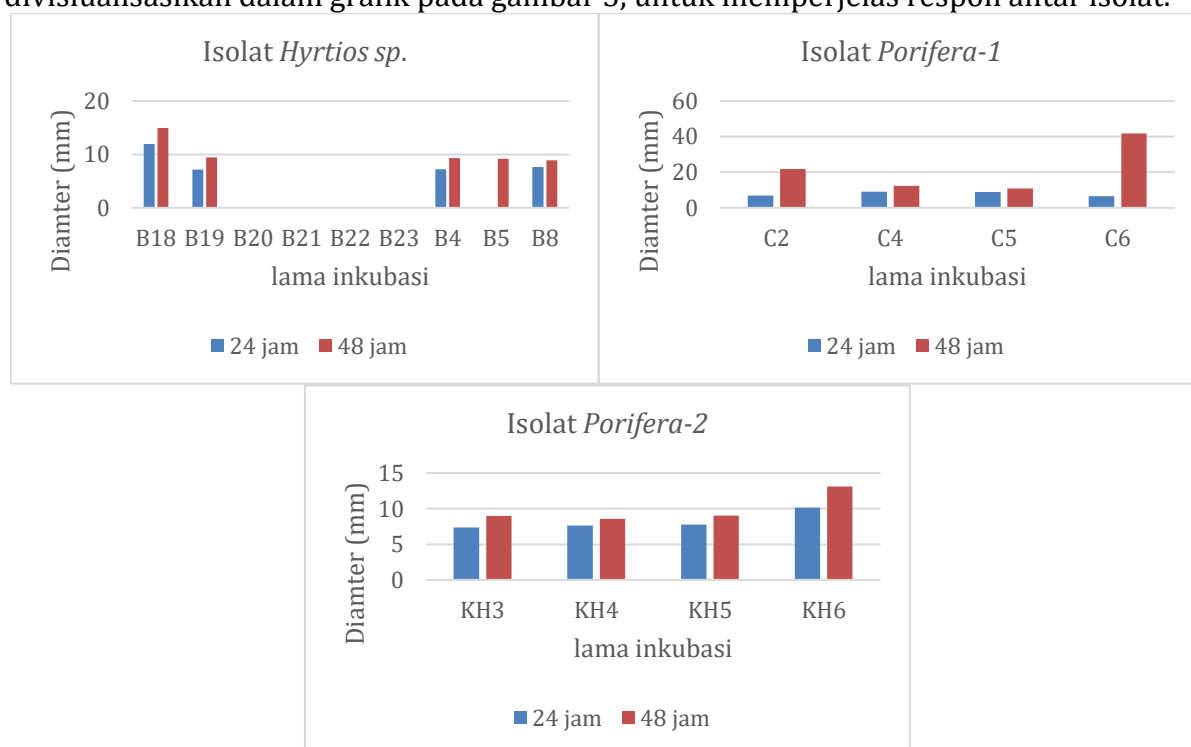
Kode Isolat	Asal Isolat	Bentuk Koloni	Bentuk Tepi	Bentuk Elevasi	Warna Koloni
B18	<i>Hyrtios sp.</i>	Round	Wavy	Convex	Merah muda
B19	<i>Hyrtios sp.</i>	Round	Wavy	Convex	Merah muda
B20	<i>Hyrtios sp.</i>	Irregular	Irregular	Helvy	Merah muda
B21	<i>Hyrtios sp.</i>	Round	Wavy	Helvy	Kuning
B22	<i>Hyrtios sp.</i>	Round	Wavy	Flat	Merah muda
B23	<i>Hyrtios sp.</i>	Round	Wavy	Flat	Kuning
B4	<i>Hyrtios sp.</i>	Round	Wavy	Raised	Merah muda
B5	<i>Hyrtios sp.</i>	Round	Wavy	Flat	Kuning



Kode Isolat	Asal Isolat	Bentuk Koloni	Bentuk Tepi	Bentuk Elevasi	Warna Koloni
B8	<i>Hyrtios sp.</i>	Round	Wavy	Raised	Merah muda
C2	<i>Porifera-1</i>	Round	Wavy	Flat	Merah muda
C4	<i>Porifera-1</i>	Round	Lobate	Raised	Merah muda
C5	<i>Porifera-1</i>	Round	Wavy	Convex	Merah muda
C6	<i>Porifera-1</i>	Round	Lobate	Flat	Putih
KH3	<i>Porifera-2</i>	Round	Smooth	Raised	Merah muda
KH4	<i>Porifera-2</i>	Round	Wavy	Raised	Merah muda
KH5	<i>Porifera-2</i>	Round	Wavy	Raised	Merah muda
KH6	<i>Porifera-2</i>	Round	Smooth	Raised	Merah muda

Screening Lanjutan Isolat Bakteri Penghasil L-Asparaginase

Isolat bakteri yang menunjukkan perubahan warna menjadi merah muda pada media M9 kemudian dipurifikasi dan diuji lebih lanjut pada media AGSA untuk memastikan kemampuannya dalam menghasilkan enzim L-ASNase. Hasil *screening* lanjutan divisualisasikan dalam grafik pada gambar 3, untuk memperjelas respon antar isolat.



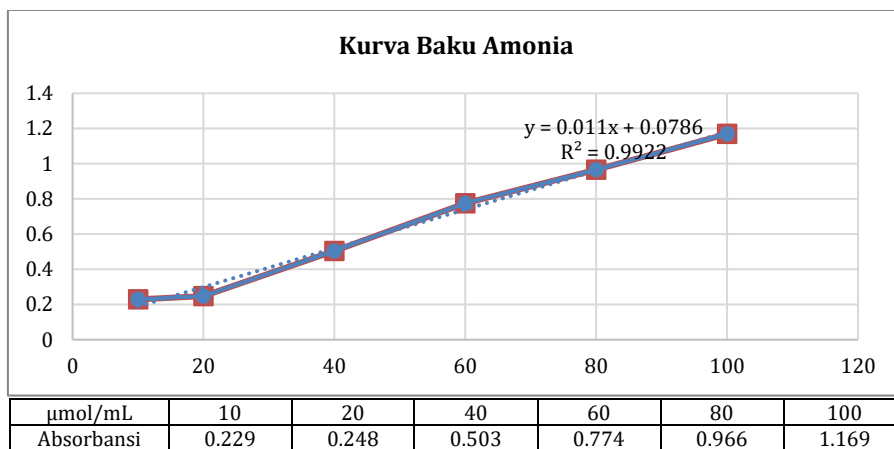
Gambar 3. Grafik diameter zona hari ke-24 dan ke-48 *screening* lanjutan aktivitas L-ASNase dari isolat bakteri yang diperoleh dari marine sponge (*Hyrtios sp.*, dan 2 jenis polifera)

Uji enzimatik

Sebelum uji enzimatik, dipilih 1 isolat dari masing-masing isolat marine sponge, yaitu KH6, C6, dan B18 yang memiliki diameter zona berwarna pink terbesar. Ketiga isolat kemudian difermentasi untuk memperoleh ekstrak kasar enzim. Supernatan hasil fermentasi kemudian digunakan sebagai sumber enzim pada analisis L-ASNase menggunakan metode Nessler. Untuk mendukung hasil perhitungan kadar amonia yang dihasilkan, disusun pula kurva baku amonia untuk menentukan hubungan antara



konsentrasi amonia dan absorbansi. Kurva baku ditampilkan pada gambar 4, dan hasil pengujian enzimatis isolat pada tabel 3.



Gambar 4. Kurva Baku Amonia dengan menggunakan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Tabel 2. Hasil perhitungan aktivitas enzim L-ASNase (IU) berdasarkan nilai absorbansi hasil uji spektrofotometer dengan reagen Nessler.

Sampel	y	a	b	y-b	y-b/a	IU
KH6	0,1050	0,0110	0,0786	0,0264	2,3922	9,568783
C6	0,2850	0,0110	0,0786	0,2064	18,7213	74,88505
B18	0,2397	0,0110	0,0786	0,1610	14,6088	58,43503

4. PEMBAHASAN

Hasil penelitian eksploratif ini menunjukkan keberhasilan isolasi bakteri simbiosis spons laut yang berpotensi menghasilkan enzim L-asparaginase. Sebanyak 17 isolat bakteri berhasil diperoleh dari tiga jenis spons laut. Hal ini ditandai dengan terbentuknya zona berwarna merah muda (*pink halo*) di sekitar koloni bakteri pada media selektif M9 dan AGSA yang mengandung L-asparagin sebagai satu-satunya sumber nitrogen. Perubahan warna medium menjadi merah muda disebabkan oleh peningkatan pH akibat akumulasi amonia hasil hidrolisis L-asparagin, sehingga zona merah muda tersebut secara *in situ* mengindikasikan aktivitas enzim L-asparaginase oleh isolat bakteri [27]. Dengan kata lain, isolat dari sponge *Hyrtios sp.*, *Porifera-1*, dan *Porifera-2* mampu memecah L-asparagin di medium dan melepaskan amonia yang menyebabkan indikator berubah warna menjadi merah muda, menegaskan produksi awal L-asparaginase secara kualitatif pada tahap skrining ini [27]. Temuan ini sejalan dengan metode deteksi L-asparaginase pada bakteri laut lain, di mana zona merah muda di medium selektif merupakan ciri umum koloni yang menghasilkan L-asparaginase.

Karakter morfologi isolat yang diperoleh menunjukkan keragaman yang mencolok, baik dari segi penampakan koloni maupun ciri mikroskopis sel. Perbedaan warna, bentuk, dan tekstur koloni antar-isolat, serta variasi hasil pewarnaan Gram dan bentuk sel, mengindikasikan bahwa bakteri yang berhasil diisolasi kemungkinan berasal dari genus atau spesies yang berbeda. Keragaman morfologi ini konsisten dengan fakta bahwa sponge laut merupakan habitat bagi berbagai kelompok mikroorganisme yang sangat beragam [28]. Spesies sponge umumnya menjalin simbiosis dengan komunitas



mikroba kompleks; bahkan dilaporkan sponge dapat mengandung hingga 18 filum prokariotik yang berbeda dalam jaringannya[28]. Dengan demikian, wajar apabila sampel sponge *Hyrtios* sp. maupun dua sponge lain dalam studi ini menghasilkan isolat bakteri dengan karakter yang berbeda-beda. Penelitian terdahulu pada sponge genus *Hyrtios* di lokasi berbeda juga mendukung hal ini, di mana isolasi intensif berhasil memperoleh puluhan strain bakteri dari berbagai genera (misalnya *Actinoalloteichus*, *Brachybacterium*, *Micromonospora*, *Streptomyces*, dll.) yang berasosiasi dengan sponge tersebut[28]. Hal ini menegaskan bahwa sponge laut, termasuk *Hyrtios* sp., berperan sebagai reservoir mikroba yang kaya, sehingga potensi menemukan beragam bakteri penghasil metabolit pada satu sponge adalah tinggi.

Hasil dari uji aktivitas L-Asparaginase menunjukkan diantara ketiga isolat bakteri laut yang diuji C6 memiliki aktivitas tertinggi (74,89 IU/mL), diikuti oleh B18 (58,44 IU/mL), sedangkan KH6 menunjukkan aktivitas yang jauh lebih rendah (9,57 IU/mL). Dari hasil ini memperlihatkan isolat C6 merupakan penghasil L-asparaginase yang jauh lebih kuat dibandingkan dua isolat lainnya. Secara biologis, perbedaan ini dapat disebabkan oleh variasi dalam ekspresi enzim atau efisiensi sekresi antar isolat [29], [30]. Selain itu, adanya perbedaan dalam kestabilan termal enzim serta parameter kondisi enzim secara seperti pH atau suhu yang optimum juga membuat isolat C6 menghasilkan enzim L-ASNase lebih optimal diproduksi [31].

Hasil penelitian ini jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa aktivitas L-ASNase dari isolat C6 dan B18 berada pada kisaran menengah jika dibandingkan dengan bakteri lain yang telah dilaporkan, sedangkan isolat KH6 berada pada kisaran rendah. Beberapa isolat yang dilaporkan sebelumnya bahkan menghasilkan aktivitas yang jauh lebih kecil dibandingkan KH6. Misalnya, *Salinicoccus* sp. yang diisolasi dari tanah hanya menghasilkan sekitar 15,9 IU/mL [32], dan *Bacillus altitudinis* asal lingkungan laut menghasilkan sekitar 2,54 IU/mL pada ekstrak kasar [33], keduanya lebih rendah dibandingkan ketiga isolat yang diperoleh dalam penelitian ini. Di sisi lain, aktivitas yang dicapai oleh B18 dan C6 sebanding dengan beberapa produsen L-asparaginase yang telah dilaporkan dalam studi terbaru. Sebagai contoh, penelitian tahun 2025 terhadap bakteri dari Teluk Persia melaporkan *Bacillus xiamenensis* dengan aktivitas sekitar 53,2 IU/mL [34], yang relatif dekat dengan aktivitas B18 (58,44 IU/mL) dan hanya sedikit di bawah nilai yang ditunjukkan oleh C6 (74,89 IU/mL).

Namun demikian, sejumlah isolat menunjukkan aktivitas yang jauh lebih tinggi, terutama pada kondisi teroptimasi atau setelah proses pemurnian enzim. *Chryseomicrobium amylolyticum* yang diisolasi dari organisme laut, misalnya, menghasilkan sekitar 115,7 IU/mL pada tahap awal[35], dan aktivitas tersebut meningkat hingga 281,6 IU/mL setelah dilakukan optimasi kultur secara statistik. L-asparaginase rekombinan dari *Nocardiopsis alba* yang diekspresikan dalam *Escherichia coli* dilaporkan mencapai sekitar 158,1 IU/mL setelah pemurnian [36], sedangkan *Bacillus licheniformis* yang berasosiasi dengan rumput laut menghasilkan hingga 229 IU/mL pada fraksi enzim yang telah dimurnikan [37].

Sebagai kesimpulan, pada penelitian ini diperoleh 2 isolat bakteri laut, khususnya isolat C6 yang diisolasi dari marine sponge *Porifera* menunjukkan aktivitas L-ASNase yang tinggi, sehingga memenuhi tujuan awal untuk menemukan sumber baru yang potensial dalam memproduksi enzim L-ASNase. Aktivitas isolat C6 yang 8 kali lebih tinggi dibanding KH6 dan dibanding beberapa hasil isolasi bakteri pada penelitian lainnya



menunjukkan adanya nilai strategis untuk dikembangkan lebih lanjut. Temuan ini semakin relevan dengan meningkatnya kebutuhan L-ASNase baru dalam bidang medis maupun pangan, Enzim yang berasal dari bakteri laut umumnya memiliki sifat yang lebih kuat secara alami seperti tahan terhadap perubahan suhu halofisilitas dan stabil pada kondisi lingkungan ekstrem sehingga memiliki keunggulan yang penting dalam formulasi farmasi maupun diproses industri. Namun demikian, penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan. Aktivitas enzim yang diperoleh masih berbasis ekstrak kasar dengan metode Nessler, yang memberikan nilai aktivitas total (IU/mL) tetapi belum menggambarkan aktivitas spesifik per mg protein maupun parameter kinetika enzim. Penelitian ini juga belum menentukan apakah enzim yang dihasilkan bersifat ekstraseluler atau terikat sel, serta belum mengevaluasi karakteristik biokimia maupun urutan gen pengkode L-asparaginase. Aktivitas samping seperti glutaminase atau aktivitas non-spesifik lainnya juga belum dievaluasi pada tahap skrining awal ini. Oleh karena itu, penelitian lanjutan perlu diarahkan pada proses pemurnian dan karakterisasi lebih mendalam terhadap L-asparaginase dari isolat C6 dan B18. Sebagai kesimpulan, aktivitas L-asparaginase yang tinggi pada isolat C6, dan pada tingkat yang lebih rendah B18, menunjukkan bahwa keduanya merupakan kandidat yang menjanjikan untuk dimanfaatkan dalam aplikasi bioteknologi. Dengan optimasi dan karakterisasi lanjutan, enzim dari bakteri laut ini berpotensi memberikan kontribusi pada pengembangan terapi L-asparaginase yang lebih baik maupun agen pemrosesan pangan yang lebih aman, sehingga memperluas ketersediaan L-asparaginase untuk kebutuhan klinis dan industri.

5. KESIMPULAN

Penelitian ini berhasil mengisolasi bakteri penghasil L-asparaginase dari sponge laut Makassar dan mengidentifikasi tiga kandidat terbaik (C6, B18, dan KH6) berdasarkan zona merah muda pada media selektif. Uji lanjutan menunjukkan bahwa isolat C6 memiliki aktivitas tertinggi (74,89 IU/mL), diikuti B18 (58,44 IU/mL), sementara KH6 (9,57 IU/mL) menunjukkan aktivitas rendah. Temuan ini menegaskan bahwa marine sponge merupakan sumber potensial bakteri penghasil L-asparaginase baru, dengan isolat C6 sebagai kandidat paling menjanjikan untuk dikembangkan lebih lanjut melalui pemurnian dan karakterisasi lanjutan guna mendukung aplikasi bioteknologi dan medis.

6. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Rektor Universitas Muslim Indonesia serta Lembaga Penelitian dan Pengembangan Sumber Daya (LP2S) Universitas Muslim Indonesia atas dukungan dan pendanaan melalui skema Penelitian Dosen Pemula (PDP) 2025, sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

REFERENCES

- [1] A. Nafisaturrehman, A. Susilowati, and A. Pangastuti, "Optimization of L-Asparaginase Production from Endophytic Bacteria Isolated from the Mangrove *Rhizophora mucronata*," *Nusantara Bioscience*, vol. 15, no. 2, Nov. 2023, doi: 10.13057/nusbiosci/n150215.
- [2] S. Rajan and B. Deivasigamani, "Screening, Production and Characterization of extracellular glutaminase free L-Asparaginase producing endo-symbiotic bacteria from the gut of Mugil cephalus (Mullet fish)," *Asian J Pharm Pharmacol*, vol. 4, no. 3, pp. 288–292, 2018, doi: 10.31024/ajpp.2018.4.3.8.
- [3] J. Lubkowski and A. Wlodawer, "Structural and biochemical properties of L-asparaginase," *FEBS J*, vol. 288, no. 14, pp. 4183–4209, Jul. 2021, doi: 10.1111/febs.16042.
- [4] M. Chiu, G. Taurino, M. G. Bianchi, M. S. Kilberg, and O. Bussolati, "Asparagine Synthetase in Cancer: Beyond Acute Lymphoblastic Leukemia," *Front Oncol*, vol. 9, Jan. 2020, doi: 10.3389/fonc.2019.01480.



- [5] D. W. Lustosa de Sousa, F. V. de Almeida Ferreira, F. H. Cavalcante Félix, and M. V. de Oliveira Lopes, "Acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: prognostic factors and analysis of survival," *Rev Bras Hematol Hemoter*, vol. 37, no. 4, pp. 223–229, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.bjhh.2015.03.009.
- [6] F. Ding, L. Deng, J. Xiong, Z. Cheng, and J. Xu, "Analysis of global trends in acute lymphoblastic leukemia in children aged 0–5 years from 1990 to 2021," *Front Pediatr*, vol. 13, Mar. 2025, doi: 10.3389/fped.2025.1542649.
- [7] A. Badoei-Dalfard, "L-asparaginase production in the pseudomonas pseudoalcaligenes strain JHS-71 isolated from Jooshan Hot-spring," *Mol Biol Res Commun*, vol. 5, no. 1, pp. 1–10, Mar. 2016.
- [8] J. J. M. Cachumba, F. A. F. Antunes, G. F. D. Peres, L. P. Brumano, J. C. Dos Santos, and S. S. Da Silva, "Current applications and different approaches for microbial l-asparaginase production," *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 47, pp. 77–85, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.004.
- [9] M. Duval *et al.*, "Comparison of Escherichia coli-asparaginase with Erwinia-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer—Children's Leukemia Group phase 3 trial," *Blood*, vol. 99, no. 8, pp. 2734–2739, 2002, doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V99.8.2734>.
- [10] J. Ramirez-Paz *et al.*, "Thiol-maleimide poly(ethylene glycol) crosslinking of L-asparaginase subunits at recombinant cysteine residues introduced by mutagenesis," *PLoS One*, vol. 13, no. 7, p. e0197643, Jul. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0197643.
- [11] M. J. Burke and B. Zalewska-Szewczyk, "Hypersensitivity Reactions to Asparaginase Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia: Immunology and Clinical Consequences," *Future Oncology*, vol. 18, no. 10, pp. 1285–1299, Mar. 2022, doi: 10.2217/fon-2021-1288.
- [12] K. Tsegaye, B. A. Tsehai, and B. Getie, "Desirable L-asparaginases for treating cancer and current research trends," *Front Microbiol*, vol. 15, Mar. 2024, doi: 10.3389/fmicb.2024.1269282.
- [13] M. Van Trimpont *et al.*, "Novel Insights on the Use of L-Asparaginase as an Efficient and Safe Anti-Cancer Therapy," *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 4, p. 902, Feb. 2022, doi: 10.3390/cancers14040902.
- [14] S. A. Alrumman, Y. S. Mostafa, K. A. Al-izran, M. Y. Alfaifi, T. H. Taha, and S. E. Elbehairi, "Production and Anticancer Activity of an L-Asparaginase from Bacillus licheniformis Isolated from the Red Sea, Saudi Arabia," *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-40512-x.
- [15] P. Shirazian, S. Asad, and M. A. Amoozegar, "The potential of halophilic and halotolerant bacteria for the production of antineoplastic enzymes: L-asparaginase and L-glutaminase," *EXCLI J*, vol. 15, pp. 268–79, 2016, doi: 10.17179/excli2016-146.
- [16] W. Bakeer, M. Amer, W. G. Hozayen, N. S. Kotb, and M. H. A. Hassan, "Isolation of asparaginase-producing microorganisms and evaluation of the enzymatic antitumor activity," *Egyptian Pharmaceutical Journal*, vol. 21, no. 3, pp. 282–292, Jul. 2022, doi: 10.4103/epj.epj_11_22.
- [17] D. E. Mathew, A. Soni, P. B. Shinde, and V. A. Mantri, "A Potent Drug l-Asparaginase from Marine Origins: A Comprehensive Review," in *Marine Bioactive Molecules for Biomedical and Pharmacotherapeutic Applications*, Singapore: Springer Nature Singapore, 2023, pp. 141–159. doi: 10.1007/978-981-99-6770-4_8.
- [18] Herwin *et al.*, "Molecular Analysis And Bioactive Compounds Of Endophytic Fungus IFATL-05 Isolate From Helminthostashys Zeylanica Linn. Roots As Antibacterial," *IOSR Journal Of Pharmacy And Biological Sciences (IOSR-JPBS) e-ISSN*, vol. 20, no. 1, pp. 61–68, 2025, doi: 10.9790/3008-2001016168.
- [19] C. Ramesh, B. R. Tulasi, M. Raju, N. Thakur, and L. Dufossé, "Marine Natural Products from Tunicates and Their Associated Microbes," *Mar Drugs*, vol. 19, no. 6, p. 308, May 2021, doi: 10.3390/md19060308.
- [20] T. R. A. Thomas, D. P. Kavlekar, and P. A. LokaBharathi, "Marine Drugs from Sponge-Microbe Association—A Review," *Mar Drugs*, vol. 8, no. 4, pp. 1417–1468, Apr. 2010, doi: 10.3390/md8041417.
- [21] G. M. Al-Harbi *et al.*, "Isolation and Characterization of L-Asparaginase-Producing Bacteria from the Arabian-Persian Gulf Region: First Report on Bacillus xiamenensis ASP-J1-4 as a Producer and Its Potential Application," *Mar Drugs*, vol. 23, no. 5, p. 194, Apr. 2025, doi: 10.3390/md23050194.
- [22] N. Chakravarty, Priyanka, J. Singh, and R. P. Singh, "A potential type-II L-asparaginase from marine isolate Bacillus australimaris NJB19: Statistical optimization, in silico analysis and structural



- p modeling,”
- Int J Biol Macromol*
- , vol. 174, pp. 527–539, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.01.130.
- [23] W.-J. Yu *et al.*, “The Characterization of L-Asparaginase with Low L-Glutaminase Activity Produced by the Marine *Pseudomonas* sp. Strain GH-W2b,” *Microbiol Res (Pavia)*, vol. 16, no. 1, p. 2, Dec. 2024, doi: 10.3390/microbiolres16010002.
- [24] W. A. Mohammed Hadi, B. T. Edwin, and A. Jayakumaran Nair, “Isolation and identification of marine *Bacillus altitudinis* KB1 from coastal Kerala: asparaginase producer,” *Journal of the Marine Biological Association of India*, vol. 63, no. 2, pp. 43–48, Jan. 2021, doi: 10.6024/jmbai.2021.63.2.2195-06.
- [25] W. Bakeer, M. Amer, W. G. Hozayen, N. S. Kotb, and M. H. A. Hassan, “Isolation of asparaginase-producing microorganisms and evaluation of the enzymatic antitumor activity,” *Egyptian Pharmaceutical Journal*, vol. 21, no. 3, pp. 282–292, Jul. 2022, doi: 10.4103/epj.epj_11_22.
- [26] M. Muzuni, J. Jamaluddin, S. Suriana, A. Ardiansyah, and N. A. Yanti, “Skrining Bakteri Termohalofilik Penghasil L-asparaginase dari Sumber Air Panas Wawolesea Sulawesi Tenggara dan Uji Aktivitas Enzimnya,” *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*, vol. 20, no. 1, p. 12, Mar. 2024, doi: 10.20961/alchamy.20.1.73523.12-21.
- [27] A. Badoei-Dalfard, “L-asparaginase Production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* Strain JHS-71 Isolated from Jooshan Hot Spring,” *Mol Biol Res Commun*, vol. 5, no. 1, pp. 1–10, Mar. 2016.
- [28] U. R. Abdelmohsen *et al.*, “Isolation, Phylogenetic Analysis and Anti-infective Activity Screening of Marine Sponge-Associated Actinomycetes,” *Mar Drugs*, vol. 8, no. 3, pp. 399–412, Feb. 2010, doi: 10.3390/md8030399.
- [29] S. Miyauchi *et al.*, “Visual Comparative Omics of Fungi for Plant Biomass Deconstruction,” *Front Microbiol*, vol. 7, Aug. 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.01335.
- [30] G. D’Souza *et al.*, “Cell Aggregation Is Associated with Enzyme Secretion Strategies in Marine Polysaccharide-Degrading Bacteria,” *ISME J*, vol. 17, no. 5, pp. 703–711, May 2023, doi: 10.1038/s41396-023-01385-1.
- [31] N. Lefin *et al.*, “Current State of Molecular and Metabolic Strategies for the Improvement of L-Asparaginase Expression in Heterologous Systems,” *Front Pharmacol*, vol. 14, Jun. 2023, doi: 10.3389/fphar.2023.1208277.
- [32] M. R. Bhat, J. S. Nair, and T. Marar, “Isolation and Identification of L-Asparaginase Producing *Salinicoccus* sp. M KJ997975 from Soil Microbial Flora,” *Int J Pharm Sci Res*, vol. 6, no. 8, p. 3599, 2015, doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.6(8).3599-05.
- [33] W. A. Mohammed Hadi, B. T. Edwin, and A. Jayakumaran Nair, “Isolation and Identification of Marine *Bacillus altitudinis* KB1 from Coastal Kerala: Asparaginase Producer,” *Journal of the Marine Biological Association of India. Marine Biological Association of India*, vol. 63, no. 2, pp. 43–48, 2021, doi: 10.6024/jmbai.2021.63.2.2195-06.
- [34] G. M. Al-Harbi *et al.*, “Isolation and Characterization of L-Asparaginase-Producing Bacteria from the Arabian–Persian Gulf Region: First Report on *Bacillus xiamenensis* ASP-J1-4 as a Producer and Its Potential Application,” *Mar Drugs*, vol. 23, no. 5, p. 194, Apr. 2025, doi: 10.3390/md23050194.
- [35] V. P. Lailaja, T. G. Sumithra, S. R. K. Sharma, M. A. Mohammed, U. Sivan, and V. N. Anusree, “Tapping the untapped: type II L-asparaginase from marine crustacean-derived *Chryseomicrobium amylolyticum* as a potential bio better for blood cancer therapy,” *Sci Rep*, vol. 15, no. 1, Dec. 2025, doi: 10.1038/s41598-025-08962-8.
- [36] B. Meena *et al.*, “Molecular Expression of L-Asparaginase Gene from *Nocardioopsis alba* NIOT-VKMA08 in *Escherichia coli*: A Prospective Recombinant Enzyme for Leukaemia Chemotherapy,” *Gene*, vol. 590, no. 2, pp. 220–226, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.gene.2016.05.003.
- [37] D. E. Mathew, S. A. Siddiqui, A. Soni, A. K. Vala, P. B. Shinde, and V. A. Mantri, “Glutaminase-Free L-Asparaginase from Seaweed-Associated *Bacillus licheniformis* with Promising Therapeutic Potential,” *Discover Oceans*, vol. 2, no. 1, p. 53, Oct. 2025, doi: 10.1007/s44289-025-00089-y.

