

## BAB II

### ***KETOSYNTHASE, BAKTERI ENDOFIT, DAN *Vetiveria zizanioides* L.***

#### **A. *Polyketide Synthase (PKS) dan Ketosynthase***

Studi genetika dan molekuler terkait gen penghasil metabolit sekunder pada mikroba telah berkembang besar dan banyak difokuskan ke dalam pendeteksian jalur sintesis poliketida dan *non-ribosomal* peptida. Poliketida diproduksi oleh kebanyakan fungi, tumbuhan, bakteri, dan organisme-organisme perairan. Superfamili dari berbagai macam produk senyawa aktif struktural ini telah banyak ditemukan dalam aplikasi bidang farmasi, diantaranya *rapamycin* (*immunosuppressant*), *erythromycin* (antibiotik) *lovastatin* (obat antikoolesterol), dan *epothilone B* (antikanker). Biosintesis poliketida dilakukan oleh enzim kompleks multimodular yang besar, yaitu *polyketide synthase* (Miller *et al.*, 2012).

*Polyketide synthase* (PKS) merupakan jenis enzim multifungsional yang terlibat dalam biosintesis senyawa poliketida dalam skala besar (Hopwood & Sherman, 1990). Banyak sekali macam-macam poliketida yang disintesis dari bakteri dan fungi serta memiliki kemampuan antibiotik atau mycotoksik (seperti *erythromycin*, *rifamycin* dan *aktinorhodin*). Senyawa poliketida juga bisa disintesis dari tumbuhan, dimana enzim ini memiliki berbagai macam fungsi termasuk perannya dalam pigmentasi bunga, pertahanan terhadap organisme patogen (*phytoalexins*), respons menerima cahaya tampak dan UV, dan perannya

dalam interaksi antara tumbuhan simbiotik dengan organisme patogen. Keragaman atau diversitas aktivitas biologis dari poliketida ini dapat membentuk sejumlah metabolit sekunder dan protein PKS dapat mensintesisnya, sehingga penting sekali untuk melakukan penelitian biofarmasi ini. PKS dan *Fatty acid synthase* (FAS) memiliki protein domain yang mirip dan secara umum jalur biosintesisnya memiliki beberapa ciri-ciri khusus. Secara struktural dan fungsional, *Polyketide synthase* (PKS) berhubungan erat dengan *Fatty acid synthase* (FAS), dimana kedua kelas enzim tersebut dapat mengkatalisis kondensasi metabolit primer aktif (asetil-CoA dan malonyl CoA) untuk membentuk polimer  $\beta$ -ketoacyl yang dihubungkan dengan enzim oleh ikatan thioester (Castoe *et al.*, 2006).

*Polyketide synthase* (PKS) dikategorisasikan berdasarkan jumlah sub unit yang dimilikinya (*single* atau *multiple*) dan berdasarkan cara sintesisnya (linear atau *iterative*). Berdasarkan tipe kategori tersebut, PKS diklasifikasikan menjadi tiga kelompok, diantaranya adalah sebagai berikut:

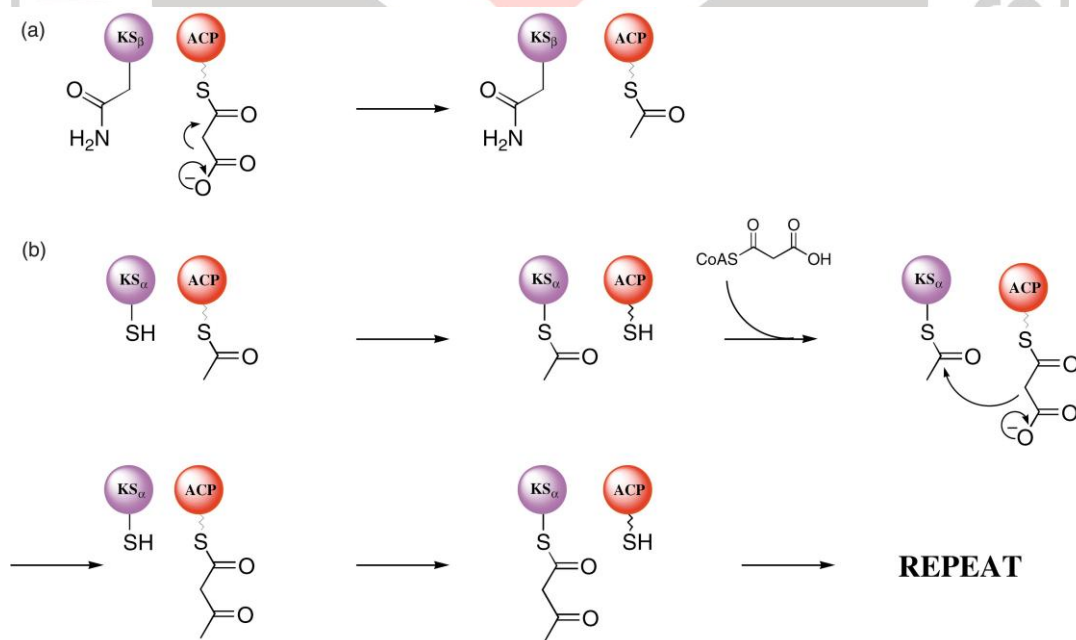
- 1) *Polyketide synthase* tipe I, merupakan kelompok protein multi modular besar dan tipe protein sederhana yang paling banyak ditemukan dalam biosintesis poliketida. Rantai polipeptida tunggalnya memiliki *multiple active site* yang dapat mengkatalisasi reaksi-reaksi yang berbeda, sehingga tipe enzim ini berperan sebagai domain enzimatik yang diperlukan dalam pembentukan poliketida. *Polyketide synthase* (PKS) tipe I terbagi lagi ke dalam PKS modular dan *iterative*.

- 2) *Polyketide synthase* tipe II, merupakan sekumpulan dari monofungsional protein.
- 3) *Polyketide synthase* tipe III, berbeda dengan dua tipe lainnya karena tidak membutuhkan *acyl carrier protein* (ACP) dalam reaksinya.

Kelompok atau gugus terbaik dari *polyketide synthase* adalah PKS tipe I. *Polyketide synthase* tipe I merupakan kelompok enzim kompleks multifungsional terbesar dengan enzim kompleks tunggal yang bertanggung jawab dalam biosintesis poliketida. Enzim ini dapat ditemukan pada bakteri atau fungi. Pemanjangan rantai senyawa poliketida membutuhkan tiga bagian inti domain dari *polyketide synthase*, yaitu domain *acyltransferase* (AT), *acyl carrier protein* (ACP), dan domain *ketosynthase* (KS). Ketiga domain tersebut semuanya berasal dari *polyketide synthase* tipe I yang bertanggung jawab dalam biosintesis poliketida (Miller *et al.*, 2012).

*Polyketide synthase* tipe I diketahui dapat memproduksi jenis poliketida yang penting dalam skala besar untuk kepentingan medis. Domain *ketosynthase* (KS) diperlukan untuk proses kondensasi pada unit pemanjangan rantai poliketida selama proses biosintesis poliketida tersebut berlangsung. *Ketosynthase* (KS) merupakan salah satu domain PKS yang berupa superfamili enzim kompleks biosintesis yang berasosiasi dan biasanya ditemukan pada fungi, bakteri dan tumbuhan. Perkembangan biologi molekuler terkini memberikan kemajuan untuk penelitian enzim tersebut. Domain enzim *ketosynthase* (KS) kurang lebih memiliki ukuran 700 pb (Moffit & Neilan, 2002).

Amplifikasi fragmen gen KS diketahui dapat digunakan untuk penyelidikan homologi hibridisasi yang secara signifikan dapat memfasilitasi kloning biosintesis antibiotik. Selain itu, analisis filogenetik bakteri berdasarkan fragmen KS dapat menunjukkan evolusi species bakteri yang mensintesis *ketosynthase* tersebut atau hanya evolusi molekuler dari gen biosintesis antibiotik saja. Filogenetik yang tidak sama menunjukkan bahwa itu merupakan evolusi tersendiri dari poliketida aromatik (Metsa-Ketela *et al.*, 2002). Analisis filogenetik berdasarkan gen *ketosynthase* ini dapat mengindikasikan perbedaan suatu gugus atau kelompok PKS dengan PKS yang lain, sehingga analisis evolusioner ini bisa menghasilkan pemahaman yang lebih baik mengenai diversitas sistem biosintesis dan produksi bioaktif dari poliketida (Moffit & Neilan, 2002)



**Gambar 2.1.** Contoh Sintesis Poliketida Aromatik, *Ketosynthase* (KS) Berperan Sebagai Unit Katalitik atau Pemanjangan pada Proses Kondensasi Poliketida.

(a) Pemanjangan Rantai oleh Domain  $KS_{\beta}$  ; (b) Gugus Acetyl Lepas dari ACP Menuju *Active Site Cysteine* pada  $KS_{\alpha}$ .

## B. Bakteri Endofit

Mikroorganisme endofit didefinisikan sebagai mikroorganisme yang selama siklus hidupnya berada dalam jaringan tumbuhan dan dapat membentuk koloni tanpa menimbulkan kerusakan pada tumbuhan tersebut (Strobel & Daisy, 2003). Pendapat tersebut hampir sama dengan yang disampaikan oleh Rosenblueth & Martinez-Romero (2006), bahwa bakteri endofit dapat didefinisikan sebagai bakteri yang hidup pada jaringan internal tumbuhan yang tidak menimbulkan efek negatif pada tumbuhan tersebut. Mikroba endofit yang umum ditemukan adalah berupa bakteri dan fungi.

Tumbuhan tingkat tinggi dapat mengandung beberapa bakteri endofit yang mampu menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder yang diduga sebagai akibat koevolusi atau transfer genetik (*genetic recombination*) dari tumbuhan inangnya ke dalam bakteri endofit sepanjang waktu evolusinya (Tan & Zhou, 2001). Banyak penelitian yang mempelajari tentang kemampuan mikroba endofit berada di dalam tumbuhan dan hubungannya dengan inang. Endofit di dalam tumbuhan berada di ruang antar sel. Endofit awalnya ada di luar tubuh tumbuhan yang kemudian masuk jika terjadi luka pada tumbuhan. Jika sudah berada dalam tumbuhan, endofit akan menetap. Endofit berkembang biak di dalam tumbuhan tanpa menyebabkan penyakit bagi tumbuhan inangnya (Strobel & Daisy, 2003).

Potensi-potensi yang dimiliki mikroba endofit telah dikaji untuk berbagai tujuan, salah satunya adalah untuk memproduksi senyawa bioaktif



sebagai agen proteksi tumbuhan yang biasanya terdapat dalam suatu sistem jaringan seperti daun, batang, atau akar tumbuhan (Strobel & Daisy, 2003).

Bakteri endofit dapat bermanfaat bagi inangnya dengan memproduksi sejumlah produk alami yang dapat dimanfaatkan untuk kepentingan-kepentingan di bidang pengobatan, pertanian, atau industri. Selain itu, bakteri endofit juga menunjukkan bahwa mikroorganisme tersebut memiliki potensi untuk menghilangkan kontaminan-kontaminan pada tanah dengan mempertinggi fitoremediasi dan ikut serta dalam proses fertilitas tanah seperti fiksasi nitrogen (Ryan *et al.*, 2007). Mekanisme peningkatan pertumbuhan tanaman oleh bakteri endofit dapat terjadi melalui beberapa cara diantaranya melarutkan senyawa fosfat, fiksasi nitrogen, merangsang pertumbuhan akar lateral, dan menghasilkan hormon pertumbuhan (Rosenblueth & Martinez-Romero, 2006).

### C. *Vetiveria zizanioides* L. (Akar Wangi)

Jenis rumput *Vetiveria*, khususnya species *Vetiveria zizanioides* L. telah diketahui sebagai tumbuhan yang bermanfaat selama ribuan tahun. Orang telah memanfaatkan tumbuhan ini selama berabad-abad, khususnya minyak dari akarnya, akar tumbuhan itu sendiri, serta daunnya. Tumbuhan ini berasal dari daerah India Selatan dan telah tersebar di seluruh dunia yang dikenal dengan minyak aromatiknya. *Vetiveria* merupakan genus tumbuhan aromatik yang penting, termasuk ke dalam familia *Poaceae* (*Graminae*) dan memiliki 10 species. *Vetiveria zizanioides* (L.), yang dikenal juga sebagai rumput vetiver atau rumput

*Khus* (Akar Wangi-melayu) tersebar luas di India, Burma, Ceylon dan juga tersebar dari Asia Barat Daya sampai Afrika Tropis (Maffei, 2002).

Berikut ini merupakan klasifikasi dari *Vetiveria zizanioides* L menurut Backer & Brink (1968).



**Gambar 2.2** *Vetiveria zizanioides* L.  
(Sumber: Permatasari, 2011)

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Classis	: Liliopsida
Ordo	: Poales
Family	: Poaceae
Genus	: <i>Vetiveria</i>
Species	: <i>Vetiveria zizanioides</i>
Synonim	: <i>Andropogon</i>

*Vetiveria* adalah tumbuhan perennial yang dapat ditumbuhkan di daerah tropis maupun subtropis. *Vetiveria zizanioides* L. merupakan rumput yang tumbuh setiap tahun yang membentuk rumpun yang besar, memiliki rimpang dan sistem akar serabut yang dalam. Rumpun tumbuh hingga mencapai tinggi 15-30 cm dan berdiameter 2-8 mm. Daun berbentuk pita dan ujung runcing, pipih, kaku, permukaan bawah daun licin, pelepah memeluk batang. Perbungaan malai (tandan majemuk) terminal, tiap tandan memiliki panjang mencapai 10 cm, ruas yang terbentuk antara tandan dengan tangkai bunga berbentuk benang, namun di bagian apeksnya menebal. *Vetiveria zizanioides* L. dapat tumbuh baik pada kondisi lingkungan sangat basah atau sangat kering, dengan curah hujan tahunan berkisar

pada 300-700 mm. Rata-rata suhu maksimum yang mendukung pertumbuhannya adalah pada rentang 15°-35°C. *Vetiveria zizanioides* L. tetap dapat tumbuh pada kondisi tanah tandus dan pada tipe tanah yang beragam. Rumput dan akar *Vetiveria* mengandung minyak esensial yang dapat dijadikan parfum, sabun, deodoran, dan bahan kosmetik lain. Minyak *Vetiveria* dan akarnya dapat berkhasiat sebagai penangkal serangga. Di sebelah selatan India, secara tradisional, rumput *Vetiveria* ditanam di sepanjang jalur tertentu sebagai batas permanen antar lahan (Maffei, 2002).

*Vetiveria* banyak dikultivasi karena kemampuan uniknya, yaitu dapat memproduksi minyak aromatik esensial dan senyawa kompleks dari *sesquiterpene* alkohol dan hidrokarbon dalam sejumlah kelompok atau gugus. Dikarenakan kompleksitas tersebut, minyak esensial yang dihasilkan tersebut sulit untuk direproduksi melalui formula kimia aromatik secara sintetis. Lokasi produksi minyak esensial pada akar tumbuhan *Vetiveria* dewasa terdapat dalam membran pertama korteks luar endoderm, dimana terdapat bakteri yang bergabung dan berasosiasi dengan minyak esensial tersebut. Hubungan yang dekat antara produksi minyak aromatik dengan bakteri tersebut menghasilkan hipotesis bahwa ada keterlibatan langsung bakteri endofit dalam produksi minyak esensial pada tumbuhan *Vetiveria* (Giudice, 2008).

Studi terakhir mengenai kajian ini adalah terkait karakterisasi dari komunitas mikroba pada akar *Vetiveria* dan investigasi terkait kemungkinan keterlibatan bakteri endofit akar tumbuhan tersebut dalam metabolisme minyak esensial *vetiveria*. Dari hasil isolasi bakteri endofit akar *Vetiveria* dan melalui



hasil identifikasi analisis sekuen gen *16S rRNA*, telah diketahui bahwa terdapat 10 taksa total dari bakteri endofit akar *vetiveria*. Sebanyak 10 taksa bakteri tersebut mencakup empat strain dari kelompok *Pseudomonadocae*, empat strain kelompok *Aeromonadaceae*, dan satu kelompok *Micrococcaceae*. Selain identifikasi bakteri tersebut, telah dianalisis juga mengenai kemampuan bakteri endofit tersebut untuk tumbuh dalam media yang telah diperkaya minyak esensial *Vetiveria*. Hasilnya menunjukkan bahwa bakteri-bakteri tersebut akan semakin banyak tumbuh dalam media dengan komposisi minyak esensial yang banyak pula. Hal ini mengindikasikan bahwa bakteri endofit akar tumbuhan *Vetiveria* ini memang memiliki kemampuan yang potensial untuk terlibat dalam produksi minyak esensial *Vetiveria*, terutama bakteri endofit dari genus *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter* dan *Arthrobacter* (Giudice, 2008).

Telah banyak informasi mengenai kemampuan farmakologi dari tumbuhan *Vetiveria zizanioides*, terutama kemampuan dari minyak esensial yang dikandungnya. Penelitian pada *Vetiveria zizanioides* L. di India menunjukkan bahwa senyawa yang terkandung dalam akar *Vetiveria zizanioides* L. memiliki sifat biologis yang dapat diaplikasikan sebagai antifungi, antioksidan, dan antibakteri (Maffei, 2002).