

SELEKSI KHAMIR YANG BERBASIS SELENIUM SEBAGAI SUMBER BAHAN BIOAKTIF DAN UJI MODULASI APOPTOSIS SELULER *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Titin Yulinery, W. R. Handayani dan Novik Nurhidayat
Bidang Mikrobiologi, P3B-LIPI Jl. Juanda no.18 Bogor 16002.

ABSTRACT

The selection of yeast from volcanic soil as bioactive source based on selenium and apoptosis modulation of *Saccharomyces cerevisiae* have been done. Isolation of yeast used the dilution method. Furthermore, the isolates were selected for resistance and accumulation test of selenium, catalyze test, resistance to high temperature and test of toxicity to garlic. The Inhibition activity was detected by using paper disc method. The result showed that 11 isolates from Kerinci and 4 isolates from Rinjani had been determined. 10 isolates were resistant to SeO_2 toxicity, could accumulate Se, and had the activity of catalyze. Isolates 15 and 394.1 were sensitive to garlic toxicity, could inhibit 3.71 cm and 4.16 cm, respectively. All the isolates collected were mesophylic, and could grow at the temperature 28–30 °C. The highest Se concentration of the isolates was 0.92 ppm and 0.78 ppm, which produced by isolate 53 and 15 respectively. Isolate 15 were lower than isolate 53 in apoptosis modulation yeast LIPIMC strain and yeast BJ 3505 strain (10.54% and 14.24%, respectively). The highest frequent of petite was BJ 3505 strain.

Key words: volcanic soil, yeast, selenium, apoptosis

PENGANTAR

Tanah vulkanis memiliki kandungan unsur mineral yang tinggi terutama belerang (S). Kandungan unsur S yang tinggi mengindikasikan tingginya kandungan selenium (Se) karena Se berikatan dengan S di alam. Selenium dieksplorasi dari sumber kekayaan alam Indonesia, terutama dari tanah, tanaman, dan mikroorganismenya. Kadar Se dalam tanah mencapai 40 mg kg^{-1} . Ketersediaan selenium pada tumbuhan mempunyai potensi untuk dimanfaatkan sebagai tumbuhan obat, misalnya pada tanaman bawang putih, jamur, dan biji-bijian (Dilaga, 1992).

Mikroorganisme yang hidup di tanah kaya Se akan mengabsorpsi dan mengakumulasi Se. Khamir merupakan salah satu mikroorganisme yang digunakan sebagai sumber Se. Khamir yang hidup di tanah kaya Se mempunyai mekanisme untuk menyerap dan mengakumulasi Se. Sejumlah *selenoaminoacid* telah diidentifikasi pada khamir. Lobinski *et al.* (2000) melaporkan *S. cerevisiae* mengandung Se dalam bentuk protein dan non protein. Pada khamir yang diperkaya Se, ditemukan lebih dari 20 komponen Se termasuk selenosistein, selenometionin, selenometilselenosistein, Se-adenosilseleno homosistein dan bentuk inorganik (Lobinski *et al.* 2000). Se dari khamir diserap lebih baik daripada Se dalam bentuk selenit (Anonim, 2003a). Inoue *et al.* (1999) mengidentifikasi gen *S. cerevisiae* dapat memproduksi Glutation Peroksidase (GPx).

Efek biologis selenium, pada awalnya hanya dipertimbangkan dari segi toksisitasnya saja, ketika jumlah

asupan elemen selenium melebihi kapasitas kebutuhannya (Alarcon *et al.*, 1994). Sebagai mikro elemen esensial bagi manusia keberadaan Se berperan penting sebagai komponen pembentuk sisi aktif selenoenzim, antioksidan, *radical scavenger*, pencegahan kanker (Lobinski *et al.*, 2000), penentu penting dalam pertumbuhan dan metabolisme testosteron (Rayman, 2002) serta aktivasi hormon tiroid (Anonim, 2003a).

Peran Se sebagai antioksidan berhubungan erat dengan enzim GPx (*Glutation peroksidase*). GPx mempunyai sisi aktif berupa selenosistein, Se terikat pada asam amino ke-45 (Ren *et al.*, 1997). Selenosistein dibentuk dari hasil konversi selenometionin bentuk organik Se yang paling dominan pada jaringan mamalia (Lobinski *et al.*, 2000) dan berfungsi sebagai pemburu radikal bebas (*free radical scavenger*), mereduksi senyawa peroksida sehingga dapat menurunkan radikal bebas dalam tubuh dan menghambat timbul dan berkembangnya kanker (Linder, 1992). Pemberian suplemen Se pada populasi yang defisiensi Se dapat menurunkan kejadian penyakit virus hepatitis, menstimulasi aktivitas komponen primer sel darah putih sebagai akibat peningkatan fungsi imun (Anonim, 2003a).

Se dapat ditemui dalam bentuk organik berikatan dengan protein sebagai asam amino berbentuk selenometionin dan selenosistein dan anorganik sebagai selenat (SeO_4^{2-}), selenit (SeO_3^{2-}), dan Se oksida (SeO_2) (Dilaga, 1992).

Saccharomyces cerevisiae dan *Schizosaccharomyces pombe* banyak digunakan untuk studi apoptosis. Apoptosis

merupakan mekanisme untuk regulasi jumlah sel dan mekanisme pertahanan untuk membuang sel yang berpotensi bahaya dan sel yang tidak diinginkan. Mitokondria memegang peran sentral dalam peristiwa apoptosis. Posisi penting mitokondria dalam kontrol apoptosis bukan pada hilangnya fungsi tetapi lebih pada proses aktif dalam meregulasi mekanisme efektor (Fleury *et al.*, 2002).

Apoptosis atau kematian sel terprogram terjadi secara alami pada setiap sel untuk mengimbangi proses mitosis yang terus menerus terjadi. Apoptosis diatur secara genetik dan distimulasi oleh faktor-faktor pertumbuhan. Sel yang sedang mengalami apoptosis memperlihatkan karakteristik morfologis berupa pengerutan sel, kondensasi kromatin, pembentukan badan apoptotik, fagositosis sel atau badan apoptotik oleh sel di dekatnya (Jalal, 1999). Apoptosis dapat terjadi secara normal maupun setelah mengalami penyempurnaan sistem imun, perkembangan embrionik, kehilangan hormon endokrin atau sel sensitif, stres suhu dan metabolik, pergantian jaringan normal, dan kerusakan DNA. Hambatan pada proses kematian sel terprogram merupakan salah satu faktor yang menimbulkan keganasan. Kasus ini terjadi pada sel kanker yang tidak mati dan terus menerus berkembang.

Seperti halnya sel mamalia, sel khamir juga mengalami apoptosis. *S. cerevisiae* yang mutan pada gen CDC 48 menunjukkan tanda apoptosis, antara lain pelepasan fosfatidil serin pada membran sitoplasma bagian luar, fragmentasi DNA, dan kondensasi kromatin. Khamir yang mengalami apoptosis akan memperlihatkan karakteristik morfologis berupa pengerutan sel yaitu ukuran sel menjadi lebih kecil (*petite*), sitoplasma dan organel lebih padat. Kondensasi kromatin terlihat dari terjadinya agregasi kromatin di pinggir nukleus di bawah membran inti, membentuk massa berbatas jelas dengan berbagai bentuk dan ukuran kemudian inti dapat pecah menjadi beberapa bagian. Pembentukan badan apoptosis terjadi ketika sel membentuk gelembung sitoplasma kemudian terbagi menjadi gelembung kecil terbungkus membran sitoplasma disebut badan apoptosis, berisi organel dan sitoplasma serta fragmen nukleus. Fagositosis badan apoptosis oleh sel di dekatnya, baik oleh sel parenkim maupun oleh makrofag (Jalal, 1999).

Fakta ini menunjukkan bahwa mekanisme apoptosis yang terjadi pada khamir *S. cerevisiae* merupakan model yang tepat untuk menemukan dasar apoptosis (Madedo *et al.*, 2002). Temuan ini membuka peluang untuk menjadikan khamir sebagai organisme uji terhadap senyawa bioaktif yang bersifat memodulasi apoptosis.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa khamir diperkaya Se dapat menginduksi apoptosis pada sel kanker

secara *in vivo* maupun *in vitro*. Penelitian terhadap 1300 orang yang diberi 200 μg khamir berbasis Se setiap hari selama 4,5 tahun menunjukkan adanya penurunan 50% kematian yang disebabkan kanker. Studi lain menemukan, pria yang mengkonsumsi makanan mengandung Se dapat menurunkan kasus kanker prostat sebesar 65% (Anonim, 2003a). Studi tentang selenium dan kanker melaporkan bahwa *methylselenic acid* (MSA) mampu mencegah atau menghambat pertumbuhan kanker (*cancer chemopreventive*) secara *in vitro*. Tiga puluh gen dipengaruhi oleh perlakuan 6 dan 12 jam MSA secara signifikan. Gen-gen tersebut dibagi dalam 3 kategori: gen kontrol siklus sel, gen regulator apoptosis, dan molekul signal (Dong *et al.*, 2002). Protein yang dihasilkan dari ekspresi gen-gen tersebut bekerja sama untuk menjalankan apoptosis.

Gambaran penting apoptosis adalah ketergantungannya pada aktivitas gen dan sintesis protein baru. Gen-gen spesifik yang diketahui menstimulasi apoptosis antara lain *ced-3* dan *ced-4* (*C.elegans*); *Bax* (mamalia); *apo-3*, *c-jun*, dan *cdk5/cyclin D1* (sel ambing manusia) (Dong *et al.*, 2002).

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menyeleksi khamir dari tanah vulkanis yang bersifat akumulator Se sebagai sumber bahan bioaktif berbasis Se dan melakukan uji apoptosis seluler.

BAHAN DAN CARA KERJA

Isolasi Khamir

Khamir diisolasi dari tanah yang berasal daerah vulkanis Gunung Rinjani dan Gunung Kerinci. Tanah tersebut dibuat ekstrak tanah dengan cara 1 g sampel tanah dilarutkan dalam 100 ml akuades lalu dihomogenkan dan dididihkan lalu disaring.

Media yang digunakan untuk isolasi khamir ialah media ekstrak malt dan ragi (3 g ekstrak malt, 20 g *bacto agar*, 5 g *bacto peptone*, 3 g ekstrak ragi, dan 10 g glukosa yang dilarutkan dalam 1000 ml akuades) yang ditambah 5% ekstrak tanah, kemudian disterilisasi dengan outoklaf. Setelah didinginkan hingga suhu 40–60 °C, ditambahkan streptomisin 20 mg/L lalu dituang ke petri steril.

Isolasi khamir dilakukan dengan cara 1 g sampel tanah disuspensikan ke dalam 9 ml akuades steril kemudian diencerkan sampai 10^{-4} . Sampel sebanyak 100 μl ditumbuhkan dalam petri dengan metode cawan sebar, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 1–3 hari. Koloni yang berbeda ditumbuhkan kembali pada media yang baru dan dimurnikan menggunakan metode kuadran, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 1–3 hari. (Genhardt, 1994; Kurtzman, 1998)

Uji Resistensi dan Akumulasi Se (Inoue *et al.*, 1999)

Khamir yang diperoleh diseleksi kemampuannya dalam mengakumulasi Se. SeO_2 merupakan jenis toksik sekaligus dapat digunakan sebagai indikator (merah). Media yang digunakan ialah media ekstrak malt dan ragi ditambah 0,01% (b/v) SeO_2 . Satu ose isolat khamir diinokulasi pada media yang mengandung SeO_2 dan diinkubasikan pada suhu 28–30 °C selama 2 hari. Khamir yang mengakumulasi Se, pada media akan terlihat berwarna merah.

Uji Katalase (Hadioetomo, 1993)

Pengujian khamir mereduksi peroksida secara kualitatif dilakukan dengan cara 3% hidrogen peroksida diteteskan pada isolat khamir yang dapat mengakumulasi Se hingga merata. Uji katalase menunjukkan positif apabila terbentuknya gelembung-gelembung oksigen ketika direaksikan dengan H_2O_2 3%.

Uji Ketahanan terhadap Suhu Tinggi (Genhardt, 1994)

Masing-masing satu ose isolat khamir dipindahkan ke medium cair (media ekstrak malt dan ragi) kemudian diinkubasikan pada suhu 56 °C selama 1–3 hari. Khamir termofil akan dapat bertahan hidup pada kondisi suhu tinggi.

Uji Resistensi terhadap Toksisitas Bawang Putih (Genhardt, 1994)

Khamir akumulator Se ditumbuhkan pada medium cair (media ekstrak malt dan ragi), diinkubasikan dengan *shaker* pada suhu kamar selama ± 48 jam. Kemudian 100 μl suspensi biakan ditumbuhkan pada media padat dengan metode cawan sebar. *Paper disk* yang telah direndam ekstrak bawang putih : akuades (1 : 4) selama 10 menit diletakkan di bagian tengah media yang telah diinokulasi dengan khamir. Untuk blanko, ekstrak bawang putih diganti dengan akuades steril. Pengukuran diameter daerah hambat (DDH) dilakukan setiap 24 jam selama 3 hari.

Pengukuran Se

Isolat khamir ditumbuhkan pada media cair dan digojog selama 48 jam. Biakan disuspensikan kemudian dipindahkan ke tabung endorf dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 6 menit. Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Sebanyak 0,5 gram pelet ditimbang dan didestruksi dengan 10 ml asam campur ($\text{HClO}_4 : \text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{SO}_4 = 6 : 6 : 1$) sampai jernih. Larutan diencerkan dengan akuades hingga 20 ml kemudian

diukur dengan AAS pada panjang gelombang (λ) 196 nm. Konsentrasi Se dapat dihitung sebagai berikut:

$$\text{Konsentrasi Se} = [\text{absorbansi}] \times \frac{\text{volume}}{\text{gram contoh}}$$

Pembuatan Ekstrak Khamir (Inoue *et al.*, 1999)

Khamir terpilih (akumulator Se) diinokulasi dan ditumbuhkan pada medium cair, digojog selama ± 48 jam pada suhu kamar. Biakan dihomogenkan dengan cara divortek lalu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 6 menit. Pelet dicuci dengan larutan NaCl 0,85% dan disuspensikan kembali dalam buffer fosfat 10 mM (pH 7) lalu disonikasi selama ± 10 menit pada suhu 4 °C. Sel yang sudah terpecah disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit. Supernatan merupakan ekstrak khamir, disimpan pada suhu 4 °C.

Uji Apoptosis: Frekuensi *Petite* (Wadskog *et al.*, 2003)

Organisme uji *S. cerevisiae* strain LIPIMC dan strain BJ 3505 ditumbuhkan pada media cair ekstrak malt dan ragi dan diinkubasi selama ± 48 jam pada suhu kamar. Setelah itu, suspensi sel khamir dipanen dengan cara disentrifugasi selama 6 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Pelet dicuci dengan akuades steril 3 kali kemudian direndam dan disuspensikan dalam 1 ml ekstrak khamir selama ± 10–15 menit. Setelah diberi perlakuan dengan ekstrak, masing-masing suspensi organisme uji diambil 100 μl dan ditumbuhkan kembali dalam medium *petite* (0,1% glukosa, 2% etanol, 1% ekstrak ragi, 2% pepton) dan diinkubasikan pada suhu kamar selama ± 48 jam. Frekuensi *petite* dihitung dengan metode hitungan mikroskopis langsung menggunakan counting chamber. Sebagai kontrol, ekstrak khamir diganti dengan akuades.

HASIL

Dari hasil isolasi tanah daerah vulkanis didapatkan 15 isolat merupakan isolat khamir (Tabel 1 dan Tabel 2). Selanjutnya isolat-isolat tersebut akan diseleksi untuk uji resistensi dan akumulasi Se; katalase; ketahanan terhadap suhu tinggi; dan resistensi terhadap toksisitas bawang putih.

Tabel 1. Isolat khamir dari tanah Rinjani

Ketinggian	Kode Isolat
2590 m dpl	144.1
1500 m dpl	394.1
1500 m dpl	394.3
2170 m dpl	413.1
Jumlah isolat: 4	

Tabel 2. Isolat khamir dari tanah Kerinci-Sumbar

Ketinggian	Kode Isolat
1495 m dpl	13
1495 m dpl	15
1495 m dpl	17
1690 m dpl	23
1700 m dpl	17k (4.2)
1700 m dpl	17k (4.2F)
1900 m dpl	37
1790 m dpl	18k4.1
2100 m dpl	45
2100 m dpl	46
815 m dpl	53
Jumlah isolat : 11	

Tabel 3. Isolat-isolat khamir yang dapat mengakumulasi Se

Kode isolat	Media + Se O ₂ 0,01%
144.1	+
394.1	+
394.3	+
413.1	-
13	+
15	+
17	-
23	-
17k4.2	-
17k(4.2F)	-
18k4.1	+
37	+
45	+
46	+
53	+

Keterangan: + = tumbuh
- = tidak tumbuh

Tabel 4. Data uji katalase isolat dan ketahanan terhadap suhu tinggi

Kode isolat	Uji katalase	Suhu	
		Ruang (28-30 °C)	56 °C
144.1	+	Tumbuh	Tidak tumbuh
394.1	+	Tumbuh	Tidak tumbuh
394.3	+	Tumbuh	Tidak tumbuh
413.1	-	Tumbuh	Tidak tumbuh
13	+	Tumbuh	Tidak tumbuh
15	+	Tumbuh	Tidak tumbuh
17	-	Tumbuh	Tidak tumbuh
23	-	Tumbuh	Tidak tumbuh
17k4.2	-	Tumbuh	Tidak tumbuh
17k(4.2F)	-	Tumbuh	Tidak tumbuh
18k4.1	+	Tumbuh	Tidak tumbuh
37	+	Tumbuh	Tidak tumbuh
45	+	Tumbuh	Tidak tumbuh
46	+	Tumbuh	Tidak tumbuh
53	+	Tumbuh	Tidak tumbuh

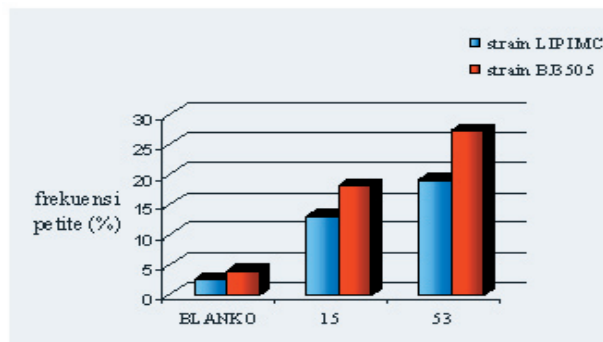
Tabel 5. Diameter zona bening uji resistensi isolat khamir terhadap bawang putih

Kode Isolat	Diameter zona bening (cm)
13	2,51
15	3,71
18k4.1	2,01
37	2,27
45	1,93
46	0,97
53	1,95
144.1	3,45
394.1	4,16
394.3	1,60

Tabel 6. Kadar Se isolat khamir dari tanah vulkanis (Rinjani dan Kerinci)

No	Kode isolat	Kadar Se [ppm]
1.	13	0,00
2.	15	0,92*
3.	37	0,58
4.	45	0,21
5.	46	0,74
6.	53	0,78*
7.	18k4.1	0,29
8.	144.1	0,62
9.	394.1	0,08
10.	394.3	0,31
11.	Blanko	0,00
12.	Bawang putih Rinjani	3,55-5,09

Keterangan: * isolat dengan kadar Se tinggi dapat digunakan sebagai kandidat sumber bahan bioaktif uji apoptosis seluler

**Gambar 1.** Diagram hubungan antara frekuensi *petite* *S. cerevisiae* terhadap ekstrak isolat khamir 15 & 53 dari tanah vulkanis

PEMBAHASAN

Uji Resistensi dan Akumulasi Se

Pada Tabel 3 terlihat bahwa dari 15 isolat khamir, sebanyak 10 isolat dapat tetap bertahan hidup dan beradaptasi dalam media yang mengandung Se dioksida, yang ditandai dengan koloni khamir yang tumbuh menjadi warna merah, hal ini menunjukkan bahwa khamir-khamir tersebut dapat

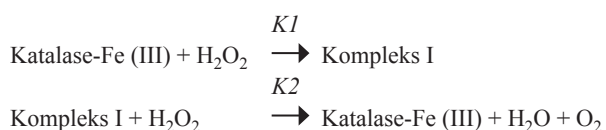
mengakumulasi Se eksternal, dikonversi menjadi bentuk Se yang lain dan diakumulasikan di dalam sel. Apabila Se inorganik yang masuk melebihi kebutuhan untuk sintesis selenoprotein, maka unsur Se tersebut akan diekskresikan. Jika eksresi Se berlebihan, maka terjadi bentuk toksik Se di dalam jaringan (Dilaga, 1992). Lima isolat khamir yang tidak dapat tumbuh, berarti sensitif terhadap toksisitas Se berlebih di dalam jaringan atau tidak mempunyai mekanisme akumulasi Se.

Fenomena khamir akumulator Se diamati secara mikroskopis dengan pewarnaan safranin untuk melihat granulanya. Khamir yang telah mengakumulasi Se dari SeO_2 yang ditambahkan ke dalam media, vakuolanya menjadi lebih kecil namun granulanya tampak makin banyak yang tampak sebagai bulatan-bulatan kecil berwarna hitam. Sel khamir memperkecil vakuolanya untuk mengatasi toksisitas SeO_2 . Vakuola yang kecil akan membatasi kuantitas SeO_2 yang masuk ke dalam sel. Hal ini berarti sel khamir mempunyai mekanisme untuk mengubah SeO_2 yang toksik menjadi bentuk Se elemental atau selenoprotein (organik) yang tidak lagi bersifat toksik dan diakumulasikan di dalam sel.

Uji Katalase: Reduksi Peroksida Kualitatif

Sepuluh isolat khamir akumulator Se selanjutnya diuji daya reduksi peroksida. Hasilnya kesepuluh isolat khamir akumulator Se menunjukkan reaksi positif terhadap uji katalase (Tabel 4). Adanya enzim katalase yang dihasilkan oleh khamir menyebabkan H_2O_2 terurai menjadi gelembung udara.

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui adanya aktivitas antioksidan, katalase yang dapat mereduksi hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Mekanisme reaksi perombakan H_2O_2 menjadi oksigen dan air oleh katalase melalui dua tahap reaksi:



Katalase termasuk enzim antioksidan yang bersifat preventif, berfungsi menekan pembentukan radikal bebas. Mineral selenium berfungsi sebagai antioksidan dalam tubuh. Peran selenium sebagai antioksidan berhubungan dengan enzim glutathion peroksidase. Tiap satu molekul glutathion peroksidase mengandung empat atom selenium organik, sehingga membuat selenium menjadi komponen penting dalam ketahanan tubuh untuk melawan efek degeneratif.

Uji Ketahanan terhadap Suhu Tinggi

Hasil pengujian terhadap suhu tinggi (Tabel 4) menunjukkan bahwa semua isolat khamir tidak dapat tumbuh pada suhu inkubasi 56°C tetapi khamir tumbuh baik pada inkubasi suhu kamar. Berdasarkan hal tersebut isolat-isolat khamir tersebut merupakan spesies khamir mesofil. Kurtzman (1998) menggolongkan khamir berdasarkan temperatur pertumbuhannya menjadi psikrofil, mesofil, dan termofil. Khamir psikrofil dapat tumbuh pada suhu $5-18^\circ\text{C}$, obligat psikrofil tumbuh pada suhu maksimal 20°C atau di bawahnya. Khamir mesofil dapat tumbuh minimal suhu 0°C dan maksimal suhu 48°C . Temperatur minimum untuk pertumbuhan khamir termofil pada 20°C atau lebih.

Uji Resistensi terhadap Toksisitas Bawang Putih

Bawang putih telah diketahui mengandung berbagai senyawa bioaktif. Alisin yang terkandung dalam bawang putih mampu mencegah timbulnya sel tumor dan menghambat pertumbuhan sel kanker serta bersifat antibakteri. Dialilsulfida merupakan komponen S yang mampu menghancurkan kolesterol. Metilalil trisulfida berfungsi mencegah perleketaan sel darah merah (Anonim, 2003b). Senyawa-senyawa S tersebut terdapat pada bawang putih dalam jumlah yang besar sehingga menyebabkan bau yang khas.

Bawang putih rinjani memiliki bau yang lebih tajam dibandingkan bawang putih biasa, hal ini mengindikasikan adanya senyawa-senyawa sulfida dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Tingginya konsentrasi S pada bawang putih merupakan indikasi tingginya kadar Se karena Se berikatan dengan S di alam. Hal ini terlihat pada konsentrasi Se bawang rinjani yang mencapai 5,09 ppm (Tabel 6).

Sifat toksisitas senyawa yang terkandung dalam bawang putih dapat memengaruhi pertumbuhan khamir. Isolat khamir yang sensitif terhadap toksisitas bawang putih (isolat 15, 394.1) memiliki zona hambat yang besar yakni 3,71 cm dan 4,16 cm. Sedangkan isolat yang resisten terhadap toksisitas bawang putih (isolat 46, 53, 394³) memiliki zona hambat yang kecil (Tabel 5). Isolat khamir bersifat resisten dikarenakan sudah beradaptasi dengan kondisi tersebut atau di dalam sel khamir terdapat senyawa yang mirip dengan senyawa pada bawang putih. Isolat ini yang dicari karena memiliki potensi sebagai sumber bahan bioaktif.

Pengukuran kadar Se

Kadar Se isolat khamir terseleksi ditentukan dengan metode spektroskopi absorpsi atom (AAS) pada panjang gelombang 196 nm. AAS merupakan teknik analisis unsur

secara kuantitatif. Pemakaiannya cukup luas dalam berbagai bidang karena prosedurnya paling selektif, spesifik, sensitivitasnya tinggi dalam kisaran ppm sampai ppb, waktu yang diperlukan cepat dan mudah dilakukan. Teknik AAS didasarkan pada absorpsi radiasi elektromagnetik oleh sampel yang telah teratomisasi (Nur dan Adijuwana, 1989).

Kadar Se yang terkandung dalam isolat khamir bervariasi dari 0,00 ppm hingga 0,92 ppm. Bervariasinya kadar Se pada isolat khamir disebabkan oleh perbedaan efisiensi akumulasi Se oleh sel. Isolat 15 dan 53 mempunyai kadar Se yang cukup tinggi masing-masing 0,92 ppm dan 0,78 ppm (Tabel 6). Isolat 15 memiliki mekanisme akumulasi Se yang paling efisien.

Uji Apoptosis Seluler : Frekuensi *Petite*

Khamir sangat berguna sebagai model apoptosis. Khamir mempunyai mekanisme apoptosis yang sama dengan mamalia walaupun tidak punya gen regulator (seperti Bcl-2 family, caspases) tetapi hanya dengan substansi sitotoksik yang lebih sederhana (Madeo *et al.*, 1999).

Media *petite* yang digunakan untuk uji apoptosis seluler memiliki komposisi yang sedikit berbeda dengan media standar ekstrak malt dan ragi. Konsentrasi glukosa pada media *petite* dibuat seminimal mungkin untuk sekadar menumbuhkan sel khamir yang *petite*. Sel khamir yang apoptosis mengalami kerusakan pada mitokondria sehingga tidak dapat memanfaatkan etanol tetapi hanya dapat memanfaatkan glukosa sebagai sumber karbon. Dengan konsentrasi glukosa yang minimum, sel khamir yang telah mengalami apoptosis dapat tetap tumbuh namun dengan ukuran mini. Sedangkan sel yang tidak mengalami apoptosis dapat memanfaatkan etanol sebagai sumber karbon karena mitokondria tidak mengalami kerusakan sehingga khamir tetap tumbuh dengan baik. Dengan demikian dapat dibedakan antara sel yang apoptosis dengan sel yang tidak mengalami apoptosis berdasarkan ukurannya.

Mitokondria memegang peran penting dalam proses apoptosis. Bahan bioaktif yang terdapat dalam ekstrak khamir memicu ekspresi gen apoptosis. Protein yang dihasilkan terlokalisasi pada membran mitokondria dan mengganggu permeabilitas membran, perubahan gradien H^+ , potensial transmembran dan menginduksi pelepasan sitokrom c mitokondria. Peristiwa tersebut digabungkan dengan pelepasan Ca^{2+} dan glutathion dari matriks mitokondria, *uncoupling* reaksi fosforilasi oksidatif dan sintesis ATP, dan hiperproduksi oksigen radikal (ROS) oleh *uncouple* rantai respirasi. Perubahan ini secara universal menyebabkan proses apoptosis.

Khamir untuk organisme uji apoptosis harus bersifat sensitif terhadap senyawa bioaktif terutama yang memodulasi apoptosis. *Schizosaccaromyces pombe* dan *S. cerevisiae* banyak digunakan pada beberapa penelitian studi apoptosis. Organisme uji apoptosis yang digunakan ialah *S. cerevisiae* strain LIPIMC dan strain BJ 3505. Keduanya memiliki kesamaan yaitu berbentuk bulat tetapi strain BJ 3505 berukuran sedikit lebih besar dari strain LIPIMC. Penggunaan khamir sebagai organisme uji sangat menguntungkan mengingat khamir relatif cepat dan mudah ditumbuhkan serta tahan kontaminasi.

Isolat khamir yang bersifat resisten (isolat 15 dan 53) digunakan sebagai sumber bahan bioaktif. Se dalam ekstrak khamir isolat 15 dan 53 masih dalam bentuk campuran sehingga pemberian ekstrak dapat menimbulkan beberapa efek, yaitu spesies Se sebagai antioksidan dapat mencegah terbentuknya radikal bebas dan memperbaiki sel yang rusak yang berarti juga dapat menghambat apoptosis. Kedua, spesies Se yang berfungsi sebagai *radical scavenger*, akan membersihkan radikal bebas yang terbentuk di dalam sel sehingga dapat mencegah proses apoptosis. Spesies Se yang termetilasi berfungsi mencegah terjadinya atau berkembangnya sel atau disebut *chemopreventive* (Lobinski *et al.*, 2000). Spesies Se termetilasi akan memicu sel untuk bunuh diri (apoptosis) sehingga spesies ini mempunyai potensi untuk terapi kanker dengan menggunakan mekanisme apoptosis seluler.

Uji apoptosis frekuensi *petite* akibat perlakuan ekstrak khamir vulkanis memperlihatkan hasil positif, kedua ekstrak memberikan pengaruh untuk membuat sel khamir menjadi *petite*. *Petite*-nya sel menunjukkan indikasi terjadinya apoptosis. Hal ini sejalan dengan teori yang menyebutkan bahwa sel yang sedang mengalami apoptosis akan menunjukkan karakteristik morfologis antara lain pengerutan sel atau *petite* (Jalal, 1999). Berarti pula dalam ekstrak khamir terdapat spesies Se termetilasi yang bersifat apoptosis modulator seluler.

Mekanisme metilselenol dalam memodulasi apoptosis dipelajari secara *in vitro* dengan menggunakan *methylselenic acid* (MSA). Riset tersebut menemukan bahwa MSA dapat menghambat pertumbuhan sel kanker. Aktivitas MSA berpengaruh pada tiga target. Pertama, Se menghambat siklus sel pada fase G_0-G_1 sehingga sel tidak dapat tumbuh, berkembang dan membelah. Kedua, Se meningkatkan ekspresi gen regulator apoptosis mengakibatkan sel menjalani proses apoptosis. Proses apoptosis menghasilkan badan-badan apoptosis yang berukuran mini (*petite*). Untuk membersihkan badan apoptosis maka target ketiga Se adalah mengaktifkan protein kinase (Dong *et al.*, 2002).

S. cerevisiae strain LIPIMC dan BJ 3505 tanpa perlakuan ekstrak (blanko) mengalami *petite* dalam persentase yang kecil. Sel yang *petite* pada blanko disebabkan oleh proses normal sel untuk melaksanakan kematian sel terprogram. Ekstrak isolat 53 memberikan pengaruh yang lebih besar daripada ekstrak 15, terlihat pada kedua organisme uji. Ekstrak 53 menyebabkan 16,56% *S. cerevisiae* strain LIPIMC dan 23,28% strain BJ 3505 menjadi *petite*. Ekstrak 15 mampu membuat 10,54% *S. cerevisiae* strain LIPIMC dan 14,23% strain BJ 3505 menjadi *petite*. Isolat 53 mempunyai kadar Se lebih rendah dari isolat 15 (Tabel 6) tetapi mampu memodulasi apoptosis lebih besar. Faktor spesies Se berpengaruh pada kejadian tersebut. Ekstrak 53 diperkirakan mengandung lebih banyak spesies Se termetilasi daripada spesies Se yang lain. Untuk ekstrak yang sama, frekuensi *petite* pada strain BJ 3505 relatif lebih tinggi dari pada strain LIPIMC, berarti strain BJ 3505 lebih sensitif terhadap apoptosis, sehingga akan lebih baik untuk dijadikan sebagai organisme uji (Gambar 1).

Hasil penelitian menunjukkan khamir yang diisolasi dari sampel tanah Kerinci menghasilkan 11 isolat dan dari tanah Rinjani menghasilkan 4 isolat. Sepuluh isolat resisten terhadap toksisitas SeO₂, mampu mengakumulasi Se, dan mempunyai aktivitas katalase. Isolat 15 dan 394.1 sensitif terhadap toksisitas bawang putih, memiliki zona hambat yang besar yakni 3,71 mm dan 4,16 mm. Semua isolat khamir yang diperoleh merupakan khamir mesofil, tumbuh pada suhu 28–30 °C. Kadar Se isolat khamir bervariasi antara 0,00–0,92 ppm. Kadar Se tertinggi didapatkan pada isolat khamir isolat khamir 15 yakni 0,92 ppm dan isolat 53 yakni 0,78 ppm. Ekstrak khamir isolat 53 dan 15 mampu memodulasi (memicu) apoptosis sel *S. cerevisiae* strain LIPIMC dan BJ 3505. Kemampuan ekstrak 15 dalam memodulasi apoptosis khamir strain LIPIMC dan BJ 3505 relatif lebih rendah (10,54% dan 14,24%) dari ekstrak 53 (16,56% dan 23,28%) Untuk ekstrak yang sama, frekuensi *petite* strain BJ 3505 lebih tinggi dari strain LIPIMC.

KEPUSTAKAAN

- Anonim, 2003a. *Selenium*. www.healthwell.com. [27 Juni 2004].
- Anonim, 2003b. *Antioksidan*. <http://berita.penabur.org/200205/artikel/bawang.htm>. [27 Juni 2004].
- Alarcon DJP, Navaro AM, Lopez Garcia de la SH, and Lopez Martinez MC, 1994. Determination of Se levels in Vegetables and Fruits by Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 42: 2848–2851.
- Dilaga SH, 1992. Nutrisi Mineral pada Ternak. *Kajian Khusus Unsur Selenium*. Akademika Presindo, Jakarta.
- Dong Y, Ganther HE, Steart C, dan Clement IP, 2002. *Identification of Molecular Target Associated with Selenium-induced Growth Inhibition in Human Breast Cell Using cDNA Microarrays* 62: 708–714.
- Fleury C, pampin M, Tarze A, dan Mignotte B, 2002. Yeast as a model to study apoptosis? *Bioscience Report*. 22(1): 59–79.
- Genhardt P, 1994. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Editor in-chief RGE Murray, Willis A, Wood, Noel R Krieg. American Society for Microbiology, Washington DC.
- Hadioetomo RS, 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktikum*. Gramedia, Jakarta, 136–137
- Inoue Y, Matsuda T, Sugiyama K, Izawa S, Kimura A, 1999. Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol Chem.* 274(38): 27002–27009.
- Jalal EA, 1999. Apoptosis dan Dasar Molecular Kematian Sel Terprogram. *J. Kedokteran YARSI* 7(1): 35–41.
- Kurtzman PC, 1998. *The Yeast, A Taxonomic Study*. 4th edition. Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Singapore, Tokyo, 75–77
- Linder MC, 1992. *Biokimia Nutrisi dan metabolisme dengan Pemahaman Secara Klinis*. Penerjemah A. Parakkasi. UI Press, Jakarta.
- Lobinski R, Edmonds JS, Suzuki KT, dan Uden PC. 2000. Species-selective Determination of Selenium Compounds in Biological Material. *Pure Appl. Chem.* 72(3): 447–461.
- Madeo F, Frohlich E, Ligr M, Grey M, Sigrist SJ, Wolf DH, dan Frohlich K, 1999. Oxygen Stress: A Regulator of Apoptosis in Yeast. *J. Cell Biol.* 145: 757–767.
- Madeo F, Engelhardt S, Herker E, Lehmann N, Maldener C, Proksch A, Wising S, dan Frohlich K, 2002. Apoptosis in Yeast: a New Model System with Application in Cell Biology and Medicine. *Curr. Genet.* 41: 208–216.
- Nur MA dan Adijuwana H, 1989. *Teknik Spektroskopi dalam Analisis Biologis*. Bogor: IPB.
- Rayman M, 2002. Se for Human. *Feeding Times* 7(2): 3–6.
- Ren B, Huang W, Akesson B, dan Ladenstein R, 1997. The Crystal Structure of Seleno-glutathione Peroxidase from Human Plasma at 2,9Å Resolution. *J. Mol. Biol.* 268: 869–885.
- Wadskog I, Maldener C, Proksch A, Madeo F, dan Adler L, 2003. Yeast Lacking the Sro7/sop1-encoded Tumor Suppressor Homologue Show Increased Susceptibility to Apoptosis Like Cell Death on Exposure to Nacl Stress. www.ncbi.com [12 September 2004].
- WHO, 1987. *Selenium Environmental Health Criteria* 58. WHO, Geneva.