

IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI ENDOFIT PENGHASIL L-ASPARAGINASE YANG DIISOLASI DARI MANGROVE BUTA-BUTA (*Excoecaria agallocha*)

Molecular Identification of L-asparaginase-Producing Endophytic Bacteria Isolated from Mangrove Buta-Buta (Excoecaria agallocha)

Asep Awaludin Prihanto^{1,2,3*}, Randy Fahrudin Ardiansyah¹, dan Ken Audia Pradarameswari²

¹Departemen Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran Malang 65145, Jawa timur, Indonesia

²BIO-SEAFOOD Research Unit, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran Malang 65145, Jawa timur, Indonesia

³Halal Thoyib Research Center, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran Malang 65145, East Java, Indonesia

*Korespondensi Penulis: asepa_awa@ub.ac.id

Diterima: 3 Januari 2019; Direvisi: 2 Mei 2019; Disetujui: 17 Mei 2019

ABSTRAK

L-asparaginase (EC 3.5.1.1) adalah enzim yang menghidrolisis asam amino L-asparagin menjadi amonia dan asam aspartat. Enzim ini mempunyai manfaat utama dalam bidang farmasi dan industri pangan. Enzim L-asparaginase tersebar secara luas pada mikroorganismenya. Mikroorganismenya yang mempunyai potensi menghasilkan enzim ini adalah mikroorganismenya endofit dari tumbuhan mangrove. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri endofit penghasil L-asparaginase dari tumbuhan mangrove Buta-butanya (*E. agallocha*). Skrining dilakukan dengan menggunakan medium selektif untuk mendapatkan bakteri penghasil enzim L-asparaginase. Identifikasi molekuler dilakukan dengan menggunakan analisis filogenetik berdasarkan data sekuen 16S rDNA. Dari hasil penelitian ini didapatkan lima isolat bakteri endofit penghasil enzim L-asparaginase, di mana isolat penghasil L-asparaginase tertinggi diidentifikasi secara molekuler. Hasil identifikasi filogenetik molekuler menunjukkan bahwa isolat kode D.104 teridentifikasi sebagai *Enterobacter cloacae*.

KATA KUNCI : L-asparaginase, mangrove Buta-butanya, endofit, *Enterobacter cloacae*

ABSTRACT

L-asparaginase (EC 3.5.1.1) is an enzyme which hydrolyze amino acid L-asparagine to aspartate and ammonia. Two main applications of this enzyme are in the pharmaceutical and food industries. The enzyme is widely distributed on microorganism. A potential source of L-asparaginase-producing bacteria is an endophytic bacteria from mangrove plant. This study aimed to isolate and identify L-asparaginase-producing endophytic bacteria from a mangrove plant, E. agallocha (Buta-butanya). A screening was carried out using a selective medium to obtain the L-asparaginase enzyme producing bacteria. Molecular identification was carried out using phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequence data. In this study, five isolates of the L-asparaginase-producing endophytic bacteria were obtained. The molecular phylogenetic identification showed that the highest L-asparaginase-producing bacterial isolate (code D.104) was identified as Enterobacter cloacae.

KEYWORDS: L-asparaginase, mangrove Buta-butanya, endophyte, *Enterobacter cloacae*

PENDAHULUAN

L-asparaginase mempunyai kemampuan untuk menghidrolisis L-asparagin menjadi amonia dan aspartat (Sanghvi et al., 2016). Enzim ini berpotensi untuk pengobatan leukemia limfoblastik akut (LLA) dan penyakit kanker lainnya (Shrivastava et al., 2016). L-asparaginase mengeksploitasi leukemia dengan

menguraikan nutrisi yang dibutuhkan oleh sel leukemia yakni L-asparagin, sehingga pertumbuhannya terhambat bahkan terjadi kematian pada sel leukemia tersebut (Narta, Kanwar & Azmi, 2007).

L-asparaginase dapat ditemui pada jaringan hewan, tumbuhan, serta mikroorganismenya (bakteri, fungi, dan khamir) (Talluri, Bhavana, Kumar, & Rajagopal, 2014).

Bakteri adalah sumber L-asparaginase yang lebih baik dibandingkan dengan sumber lainnya, karena proses mengkultur bakteri lebih mudah sehingga proses ekstraksi dan pemurniannya lebih mudah dilakukan (Savitri, Asthana, & Azmi, 2003). Bakteri yang pernah dilaporkan sebagai penghasil enzim L-asparaginase adalah *Escherichia coli*, *Erwinia aroideae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter* sp., dan *Bacillus* sp. (Kamble et al., 2012). Berbagai strain dari bakteri-bakteri tersebut merupakan bakteri endofit yang berasosiasi dengan berbagai jenis tumbuhan. Bakteri ini tidak mengganggu inangnya melainkan lebih meningkatkan pertumbuhan inangnya dan melindunginya dari serangan hama, penyakit dan kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan (Joshi & Kulkarni, 2004).

Tumbuhan mangrove mempunyai potensi sebagai inang bakteri endofit yang menghasilkan L-asparaginase. Menurut Duke (2011) mangrove adalah salah satu ekosistem pesisir yang dominan di dunia, terdiri dari pohon dan semak berbunga yang secara unik beradaptasi dengan kondisi pasang surut air laut. Lingkungan mangrove menurut Eldeen dan Effendy (2013), memiliki nutrisi yang baik bagi pertumbuhan kelompok bakteri tertentu, termasuk bakteri endofit yang berasosiasi dengan tumbuhan-tumbuhan di daerah mangrove. Interaksi endofit di bawah kondisi lingkungan mangrove ini dapat menyebabkan adaptasi khusus, termasuk menghasilkan metabolit-metabolit atau enzim-enzim yang penting bagi industri farmasi, pangan, dan industri berbasis bioteknologi lainnya. Kurniawan et al. (2018) melaporkan beberapa jenis bakteri potensial yang sukses diisolasi dari sedimen daerah mangrove seperti *Bacillus pumilus*, *B. amyloliquefacien*, *B. alvei*, *B. coagulans*, dan *Pseudomonas* sp. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi, penapisan, dan identifikasi bakteri endofit penghasil L-asparaginase yang sangat penting bagi industri farmasi dan pangan.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bagian mangrove yang digunakan untuk sampel adalah batang, akar, dan daun tumbuhan mangrove Buta-buta (*E. agallocha*) yang diambil dari Pantai Bajulmati, Kecamatan Bantur, Kabupaten Malang (8°25'5301" LS, 112°38'801" BT). Bahan yang digunakan antara lain alkohol 70 %, garam natrium fisiologis steril 0,9 %, *Luria Bertani Agar* (LBA). Medium M9 modifikasi: agar bakteriologi, NaCl, L-asparagin, *D-glucose*, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , *Bromothymol blue*.

Metode

Pengambilan sampel

Pengambilan sampel menggunakan metode Pihanto, Fatchiyah, Kartikaningsih, dan Pradarameswari, (2011) yang telah dimodifikasi. Beberapa bagian batang, akar, dan daun dari *E. agallocha* diambil secara acak dan dikemas di dalam plastik *polyethylene*, dan dibawa ke laboratorium. Sampel tersebut kemudian disimpan di dalam lemari pendingin dengan suhu 4 °C.

Isolasi bakteri endofit

Isolasi bakteri menggunakan metode Pihanto et al. (2011). Tiga bagian tumbuhan mangrove (akar, batang, dan daun) dipotong dengan *cutter* steril. Setiap sampel dimasukkan ke dalam kantong plastik dan diangkut ke laboratorium dalam box dengan suhu 4 °C. Masing-masing bahan ditimbang sebanyak 1 g dan dilakukan pengenceran sampai koloni mudah untuk dihitung dan dipisahkan (10^{-5}). Sampel sebanyak 1 mL ditanam dengan metode *pour plate* dan diinkubasi selama 72 jam pada suhu 35 °C. Koloni yang tumbuh dimurnikan pada media LBA. Selanjutnya biakan murni disimpan pada agar miring sampai digunakan untuk pengujian lanjut.

Penapisan Bakteri Penghasil Enzim L-asparaginase

Penapisan bakteri penghasil L-asparaginase dilakukan dengan menggunakan metode yang dijelaskan oleh Gulati, Saxena, dan Gupta, (1997). Aktivitas L-asparaginase diuji secara kualitatif berdasarkan pembentukan zona biru pada media M9 ditambahkan indikator *Bromothymol blue* (BTB) sebanyak 0,007 g/L. Selanjutnya pH medium diatur antara 5,5 sampai 6,5. Zona biru yang terbentuk di sekitar koloni bakteri diamati setelah bakteri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35 °C. Pembentukan zona biru di sekitar koloni bakteri mengindikasikan adanya aktivitas ekstraseluler enzim L-asparaginase. Diameter zona biru diperoleh dari pengukuran dari tepi koloni yang tumbuh ke tepi zona biru pada media (Ashok et al., 2018). Pengukuran diulang sebanyak tiga kali untuk memastikan data konsisten. Isolat bakteri penghasil zona biru terbesar kemudian diidentifikasi secara molekuler.

Pewarnaan gram

Pewarnaan Gram bakteri dilakukan dengan mengacu kepada Hadioetomo (1983). Isolat bakteri ditempatkan di atas gelas objek, difiksasi dan ditetesi

dengan larutan kristal violet (2 menit). Gelas objek dicuci dan dikeringkan. Preparat kemudian ditetesi yodium (2 menit), dicuci dan dikeringkan. Selanjutnya preparat ditetesi alkohol 95 %, sampai warna ungu menghilang, kemudian preparat dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Preparat ditetesi safranin dan didiamkan selama 30 detik. Selanjutnya preparat dicuci dan dikeringkan.

Identifikasi Bakteri Secara Molekuler Berdasarkan Sekuen 16s rDNA

Identifikasi bakteri secara molekuler dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan oleh Nursyam dan Prihanto (2018). DNA genom dari bakteri diamplifikasi menggunakan primer 27F (5'-AGAGTTTGCATGGCTCAG-3'), dan 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGA-3'). Sampel DNA sebanyak 1 µL dicampur dengan 18,5 µL *Double Distilled Water* (DDW), 2,5 µL *Buffer B* dengan Mg²⁺ 10X, 1 µL dNTPs, 1 µL primer *forward*, 1 µL primer *reverse* dan 0,2 µL *Taq polymerase*. Reaksi dijalankan pada thermocycler (denaturasi: 94 °C, 45 detik, penempelan: 61 °C, 45 detik, pemanjangan: 72 °C, 2 menit). Proses amplifikasi dilakukan sebanyak 32 siklus. Hasil PCR dicek dengan teknik elektroforesis gel.

Hasil PCR dimurnikan menggunakan *DNA extraction kit*. Fragmen DNA murni ditambah larutan buffer Hi-DiTM *Formamide* (*Genetic Analysis Grade-Applied Biosystem*), dilanjutkan dengan sekuensing menggunakan ABIPRISM® 310 *Genetic Analyzer*. Hasil sekuen dianalisis menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) di situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, analisis filogenetik dilakukan secara online dengan situs <http://www.phylogeny.fr> (Dereeper et al., 2008).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Endofit dan Penapisan Bakteri Penghasil Enzim L-asparaginase

Sebanyak enam isolat bakteri endofit berhasil diisolasi dari tumbuhan *E. agallocha*. Dari keenam isolat yang diperoleh, pada umumnya berasal dari sampel batang. Hasil dari penapisan bakteri penghasil enzim L-asparaginase terhadap 6 isolat bakteri endofit menunjukkan bahwa 5 dari 6 isolat tersebut menghasilkan enzim L-asparaginase (Tabel 1). Penelitian serupa dilaporkan oleh Prihanto et al. (2018), bahwa 6 dari 12 isolat bakteri endofit mangrove *Avicennia marina* mensekresikan L-asparaginase. Menurut Mahajan, Saran, Saxena, dan Srivasta, (2013) L-asparaginase menghidrolisis asparagin menjadi asam L-aspartat dan amonia. Pelepasan amonia menyebabkan peningkatan pH medium. Pada pH asam BTB akan berwarna dan menjadi biru pada pH basa. Karena pembentukan amonia, pH filtrat kultur menjadi basa dan pewarna berubah warnanya menjadi biru. Pewarna BTB memberikan kontras warna yang tajam (biru tua dan kuning cerah) antara asparagin yang terhidrolisis dan yang tidak terhidrolisis.

Sampel yang memiliki zona aktivitas L-asparaginase paling lebar adalah isolat bakteri dengan kode D.104, sedangkan di sekitar isolat bakteri A.104 tidak menunjukkan adanya zona biru. Aktivitas enzim ditunjukkan dengan terbentuknya zona biru. Semakin lebar zona biru yang terbentuk, semakin tinggi aktivitas enzimnya sebagai akibat dari semakin banyaknya ammonia yang dihasilkan. Berdasarkan hasil tersebut, isolat D.104 memiliki zona yang paling lebar maka selanjutnya isolat ini diidentifikasi spesiesnya. Beberapa isolat bakteri dilaporkan menghasilkan L-asparaginase, yaitu isolat

Tabel 1. Hasil penapisan isolat bakteri penghasil enzim L-asparaginase
Table 1. The result of screening of L-asparaginase-producing bacteria

Kode bakteri/ <i>Bacterial code</i>	Asal Isolat/ <i>Isolate Origin</i>	Diameter zona biru/ <i>Blue-Zone Diameter</i> (mm)
D.104	Daun	6.8±1.2
D.105	Daun	5.0±0.2
B.103	Batang	5.3±0.7
B.104	Batang	3.9±0.6
B.105	Batang	4.0±1.0
A.104	Akar	-

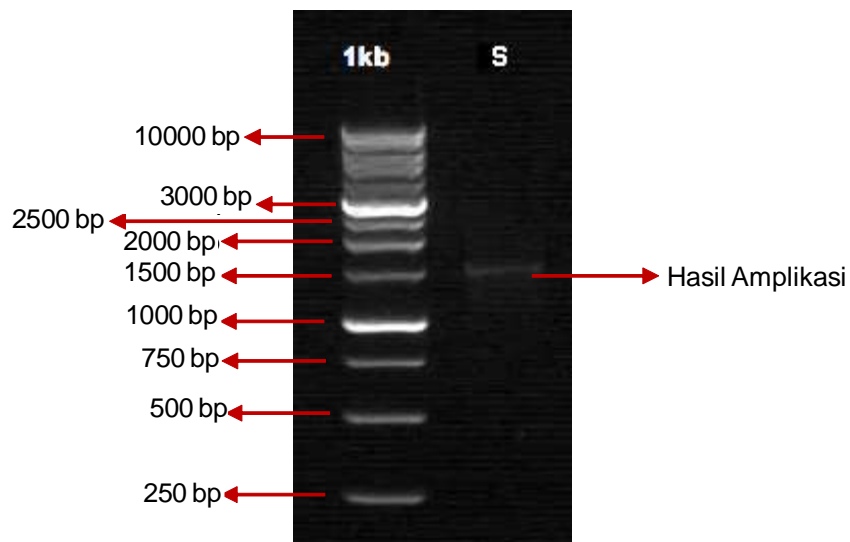
Enterobacter sp. (Erva, Goswami, Suman, Vedanabhatla, & Rajulapati, 2017), *Escherichia coli*, *Erwinia chrysanthemi*, *Pseudomonas fluorescens* (Cachumba et al., 2016), *Erwinia carotovora*, *Proteus vulgaris*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Streptomyces karnatakensis*, *Streptomyces venezuelae* dan beberapa kelompok jamur seperti *Aspergillus*, *Penicillium* dan *Fusarium* (Sarquis, Oliveira, Santos, & daCosta, 2004).

Identifikasi Bakteri Secara Molekuler

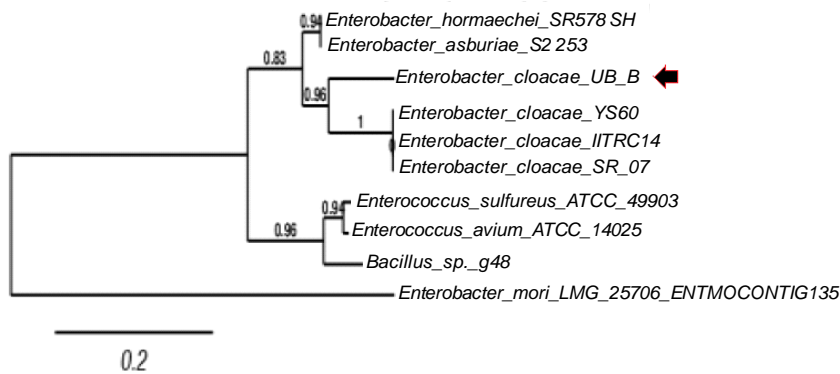
Hasil dari amplifikasi menggunakan metode PCR dan visualisasi menggunakan elektroforesis gel agarosa menunjukkan bahwa amplicon mempunyai ukuran sekitar 1600 bp (Gambar 1). Menurut

Nuroniya dan Surya (2012), molekul fragmen gen 16S rRNA bakteri memiliki ukuran sekitar 1500 bp. Berdasarkan pernyataan tersebut dapat disimpulkan bahwa proses amplifikasi fragmen gen 16S rDNA isolat bakteri D.104 berhasil dilakukan.

Penentuan spesies dilakukan dengan menggunakan analisis filogenetik. Hasil BLAST menunjukkan bahwa sekuen DNA dari isolat D.104 memiliki homologi yang tinggi dengan sekuen-sekuen *E. cloacae* (similaritas 99%). Sekuen-sekuen homolog ini kemudian diunduh untuk dianalisis secara filogenetik (Gambar 2). Pohon filogenetik menunjukkan bahwa sekuen dari isolat D.104 (*E. cloacae* UB_B) berada satu klas dengan sekuen *E. cloacae* strain YS60, *E. cloacae* strain IITRC14, dan *E. cloacae*



Gambar 1. Amplicon fragmen gen 16S rRNA dari isolat bakteri D.104
 Figure 1. Amplicon of fragmen gen 16S rRNA from D.104 bacteria isolate



Gambar 2. Pohon filogenetik isolat D.104 (*E. cloacae* strain UB_B)
 Figure 2. Phylogenetic tree of D.104 isolate (*E. cloacae* strain UB_B)



Gambar 3. Hasil pewarnaan *E. cloacae* UB_B
Figure 3. Gram stain of *E. cloacae* UB_B

strain SR_07. Pewarnaan Gram mengindikasikan bahwa isolat D. 104 adalah Gram negatif dan berbentuk batang (Gambar 3). Hasil ini mendukung hasil identifikasi molekuler yaitu isolat D.104 termasuk genus *Enterobacter*; sebagaimana dinyatakan oleh Humann et al. (2011) dan Mbai, Magiri, Matiru, & Nyambati, (2013), bahwa *Enterobacter* merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki morfologi berbentuk batang.

Bakteri telah dibuktikan sebagai alternatif penghasil L-asparaginase (Dalfard, 2016). Genus *Enterobacter* merupakan genus yang telah dilaporkan sebagai penghasil enzim L-asparaginase, seperti *E. cloacae* dan, *E. aerogen* dengan kemampuan bekerja pada substrat glutamin (Erva et al., 2017; Nawaz, Zhang, Khan, & Cerniglia, 1998; Sharma & Hussain, 2015). Enzim asparaginase yang dihasilkan oleh bakteri *E. cloacae* bekerja optimum pada pH dan suhu berturut-turut 7,0 dan 40 °C (Sharma & Hussain, 2015). Hasil tersebut berbeda dengan L-asparaginase dari *P. geniculata*, *P. stutzeri*, dan *Aspergillus niger* yang mampu hidup pada kondisi pH 9.0 (Hanaa & Gamal, 2016). Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dari *Avicennia marina* juga dilaporkan menghasilkan L-asparaginase (Prihanto et al., 2018)

KESIMPULAN

Bakteri endofit yang berasosiasi dengan tumbuhan mangrove Buta-butua (*E. agallocha*) dapat digunakan sebagai sumber isolat bakteri penghasil enzim L-asparaginase. Isolat bakteri penghasil enzim L-asparaginase tertinggi teridentifikasi secara molekuler sebagai *Enterobacter cloacae*.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashok, A., Kruthi, D., Jyothi, V. R., Asif, Q., Anoop, K. T. & Devarai, S. K. (2018). Microbes Producing L-Asparaginase free of glutaminase and urease isolated from extreme locations of antarctic soil and moss. *Scientific Reports*, 9, 1423. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38094-1>
- Cachumba, J.G.M., Felipe A.F.A., Guilherme, F.D.P., Larissa, P.B., Júlio, C.D.S., & Silvio, S.D.S. (2016). Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 77-85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.004>
- Dalfard, A. B. (2016). L-asparaginase production in the *Pseudomonas pseudocaligenes* strain JH-71 isolated from Jooshan Hot-Spring. *Molecular Biology Research Communications*, 5, 1-10. doi: 10.22099/mbr.2016.3379
- Dereeper A, Guignon V., Blanc G., Audic S., Buffet S., Chevenet F., Dufayard J.F., Guindon S., Lefort V., Lescot M., Claverie J.M., & Gascuel O. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 36: W465–W469. doi: 10.1093/nar/gkn180
- Duke, N. C. (2011). Mangrove. In D. Hopley (ed.), *Encyclopedia of modern coral reefs. structure, form and process* (pp. 663). Dordrecht, Germany: Springer.
- Eldeen, I. M. S., & Effendy, M. A. W. (2013). Antimicrobial agents from mangrove plants and their endophytes. In A. Méndez-Vilas (ed.), *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, 2, 872-882. Spain: Formatex Research Center.
- Erva, R. R., Goswami, A. N., Suman, P., Vedanabhatla, R., & Rajulapati, S. B. (2017). Optimization of L-asparaginase production from novel *Enterobacter* sp., by submerged fermentation using response

- surface methodology. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(3), 219-228. doi:10.1080/10826068.2016.1201683
- Gulati, R., Saxena, R. K., & Gupta, R. A. (1997). Rapid plate assay for screening L-asparaginase producing microorganisms. *Letters in Applied Microbiology*, 24, 23-26.
- Hadioetomo, R. S. (1993). *Mikrobiologi dasar dalam praktek teknik dan prosedur dasar laboratorium*. Jakarta: Gramedia.
- Hanaa, H. B. & Gamal, S. B. (2016). Optimization of growth conditions for purification and production of L-asparaginase by *Spirulina maxima*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-7. doi:10.1155/2016/1785938
- Humann, J. L., Wildung, M., Cheng, C., Lee, T., Stewart, J. E., Drew, J. C., Triplett, E. W., Main, D., & Schroder, B.K. (2011). Complete genome of the onion pathogen *Enterobacter cloacae* ECWSU1. *Standards in Genomic Sciences*, 5, 279-286. doi: 10.4056/sigs.2174950
- Joshi, M. R. D., & Kulkarni, N. S. (2014). Isolation of L-asparaginase producing endophytic bacteria from plants recommended for cancer therapy. *International Journal of Science and Research*, 3, 506-509.
- Kamble, K. D., Bidwe, P. R., Muley, V. Y., Kamble, L. H. Bhadange, D. G., & Musaddiq, M. (2012). Characterization of L-asparaginase producing bacteria from water, farm and saline soil. *Bioscience Discovery*, 3, 116-119.
- Kurniawan, A., Prihanto, A. A., Sari, S. P., Febriyanti, D., Kurniawan, A., Sambah, A. B., & Asriani, E. (2018). Isolation and Identification of cellulolytic bacteria from mangrove sediment in Bangka Island. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 137, 012070. doi:10.1088/1755-1315/137/1/012070
- Mahajan, R. V., Saran, S., Saxena, R. K., & Srivasta, A. K. (2013). A rapid, efficient and sensitive plate assay for detection and screening of L-asparaginase-producing microorganisms. *FEMS Microbial Letter*, 341(2), 122-6. doi: 10.1111/1574-6968.12100
- Mbai, F. N., Magiri, E. N., Matiru, V. N., & Nyambati, V. C. S. (2013). Isolation and characterisation of bacterial root endophytes with potential to enhance plant growth from kenyan basmati rice. *American International Journal of Contemporary Research*, 3, 25-40.
- Narta, U. K., Kanwar, S. S., & Azmi, W. (2007). Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 61, 208-221. doi: 10.1016/j.critrevonc.2006.07.009.
- Nawaz, M. S., Zhang, D. A. A., Khan, C. E., & Cerniglia. (1998). Isolation and characterization of *Enterobacter cloacae* capable of metabolizing asparagine. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50(5), 568-572. doi: 10.1007/s002530051336
- Nuroniayah, T., & Surya, R. P. (2012). Identifikasi spesies isoat bakteri s1 dengan metode analisa skuen fragamen gen 16S. *Jurnal Teknik Pomits*, 1, 1-6.
- Nursyam, H., & Prihanto, A. A. (2018). Identifikasi molekuler bakteri endofit mangrove *Rhizopora mucronata* penghasil gelatinase (MMP₂). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 21(1),143-147. doi: 10.17844/jphpi.v21i1.21537
- Prihanto, A.A., Firdaus, M., & Nurdiani, R. (2011). Endophytic fungi isolated from mangrove (*Rhizopora mucronata*) and its antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Food and Engineering*, 1, 386-389.
- Prihanto. A. A., Fatchiyah, A., Kartikaningsih, H. dan Pradarameswari, K. A. (2018). Identifikasi Bakteri Endofit Mangrove Api-Api Putih (*Avicennia marina*) Penghasil Enzim L-asparaginase. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 10(2),84-90. <http://doi.org/10.20473/jipk.v10i2.10467>
- Sanghvi, G., Bhimani, K, Vaishnav, D., Oza, T., Dave, G., Kunjadia, P., & Sheth, N. (2016). Mitigation of acrylamide by L-asparaginase from *Bacillus subtilis* KDPS1 and analysis of degradation products by HPLC and HPTLC. *Springer Plus*, 5, 1-11. Doi: 10.1186/s40064-016-2159-8
- Sarquis, M. I., Oliveira, E. M. M., Santos, A. S., & daCosta, G. L. (2004). Production of L-asparaginase by filamentous fungi. *MemInstOswaldoCruz*, 99, 489-492. [Http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762004000500005](http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762004000500005).
- Savitri., N., Asthana, W., & Azmi. (2003). Microbial L-asparaginase: a potent antitumour enzyme. *Indian Journal of Biotechnology*, 2, 184-194. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/285775631>
- Sharma, A., & Hussain, I. (2015). Optimization of medium components for extracellular glutaminase free asparaginase from *Enterobacter cloacae*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(1), 296-309.
- Shrivastava, A., Khan, A. A., Khurshid, M., Kalam, M. A., Jain, S. K., & Singhal, P. K. (2016). Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 100, 1-10. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.01.002
- Talluri, V. P., Bhavana, M., Kumar, M. M., & Rajagopal, S. V. (2014). L-aspariganse: an ultimate anti-neoplastik enzyme. *International Letters of Natural Sciences*, 15, 23-35. doi:10.18052/www.scipress.com/ILNS.15.23