

QUORUM SENSING BAKTERI: MANIPULASI DAN POTENSI APLIKASINYA DALAM BIOTEKNOLOGI PERTANIAN

Alina Akhdiya

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber
Daya Genetik Pertanian

Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111, Indonesia

PENDAHULUAN

Penemuan komunikasi antarsel bakteri telah menimbulkan kesadaran bahwa bakteri mampu melakukan koordinasi aktivitas yang sebelumnya diyakini terbatas pada organisme multiselular. Kemampuan berperilaku kolektif sebagai suatu kelompok merupakan suatu keuntungan. Sebagai contoh, kemampuan untuk bermigrasi ke lingkungan yang lebih cocok atau lebih baik ketersediaan nutrisinya serta mengadopsi pola pertumbuhan baru seperti sporulasi atau pembentukan biofilm akan melindungi bakteri dari lingkungan yang dapat mematikannya (De Kievit & Iglewski 2000).

Quorum Sensing adalah komunikasi antar sel-sel bakteri yang dimediasi oleh molekul-molekul sinyal kecil yang bersifat mudah berdifusi untuk memicu atau mengontrol perubahan ekspresi gen sebagai respon terhadap peningkatan kepadatan populasi. Komunikasi bakteri tidak terbatas pada

komunikasi antar sel dalam spesies yang sama, tetapi juga antar spesies sehingga suatu spesies dapat menangkap dan menyebarkan pesan dari atau ke spesies lainnya untuk melakukan modifikasi/perubahan perilaku, baik untuk kepentingan komunal maupun untuk keuntungan suatu spesies terhadap spesies yang lain (Atkinson & William 2009).

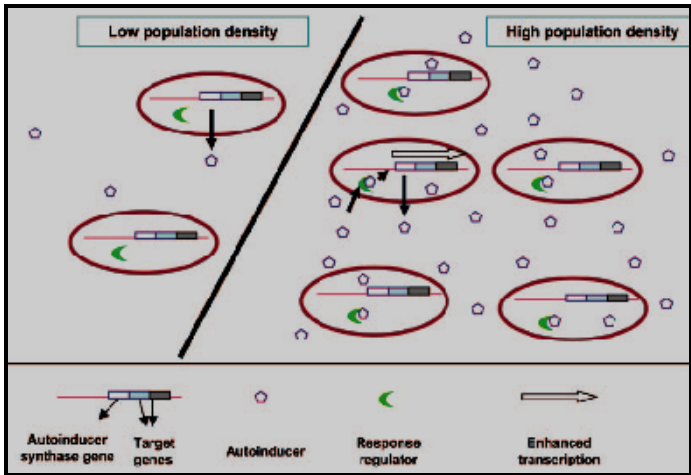
Bahasa yang digunakan dalam komunikasi antarsel bakteri berupa molekul sinyal kecil yang disebut *autoinducer*. Prinsip *quorum sensing* adalah ketika sel tunggal bakteri melepaskan *autoinducer* ke lingkungan, maka konsentrasi mereka terlalu rendah untuk dideteksi karena terencerkan di lingkungannya. Namun, ketika populasi bakteri cukup banyak, maka konsentrasi *autoinducer* yang diekresikan juga meningkat mencapai konsentrasi ambang di mana sel-sel bakteri dapat mendeteksinya kembali dan selanjutnya mengaktifkan ekspresi gen-gen target secara bersamaan (De Kievit & Iglewski 2000).

Mekanisme *quorum sensing* digunakan secara luas pada dunia bakteri untuk mengontrol ekspresi gen-gen penting yang terkait dengan virulensi, survival, simbiosis, dan lain sebagainya. Sejak ditemukannya mekanisme *Quorum sensing* hingga saat ini, telah banyak penelitian yang dilakukan baik untuk menggali lebih dalam tentang mekanisme dan komponen (senyawa) yang terlibat pada berbagai bakteri, manipulasi *Quorum sensing*, serta aplikasinya dalam berbagai bidang bioteknologi. Kajian dan riset tentang mekanisme *quorum sensing* bakteri semakin banyak mendapat perhatian terkait dengan upaya pencegahan serta penanganan yang tepat sasaran terhadap kasus *multi-drug resistant* pada bakteri-bakteri patogen seperti *Pseudomonas aeruginosa* (Oshri *et al.* 2018), *Salmonella* spp. (Campos-Galvao, *et al.* 2016), dan *M. tuberculosis* (Nigam *et al.* 2018) yang terus meningkat. Para

peneliti bidang biologi, pertanian, dan industri juga telah memanfaatkan manipulasi proses QS untuk pengendalian fitopatogen (Ban *et al.* 2009; Ouyang & Li 2016).

QUORUM SENSING PADA BAKTERI GRAM NEGATIF

Sistem *Quorum sensing* bakteri gram-negatif umumnya menggunakan N-asil Homoserin Lakton (AHL) sebagai molekul sinyalnya. Pada konsentrasi yang cukup tinggi molekul-molekul sinyal yang diekskresikan sel akan berdifusi kembali ke dalam sel kemudian mengikat dan mengaktifkan protein R yang merupakan suatu aktivator transkripsi (Gambar 3.23). Selanjutnya protein R yang teraktivasi akan



Gambar 3.23. Mekanisme Quorum Sensing pada bakteri Gram negatif. Pada populasi sel yang rendah, autoinduser yang diproduksi pada level basal segera mengalami pengenceran ketika dilepaskan ke lingkungan. Sebaliknya pada populasi sel yang tinggi, peningkatan jumlah sel bakteri akan meningkatkan konsentrasi dan akumulasi autoinduser sehingga mencapai konsentrasi ambang untuk mengaktifasi protein-protein regulator dan menginisiasi proses cascade yang dikendalikan melalui Quorum Sensing (Gonzales & Keshavan 2006)

menginduksi ekspresi gen-gen target (Gonzales & Keshavan 2006).

Molekul-molekul AHL memiliki rantai samping berupa asil dengan panjang antara 4-14 rantai karbon dengan atau tanpa substitusi gugus okso atau hidroksi pada karbon ketiganya. Terdapat dua jenis AHL yang mengandung ikatan rangkap yaitu: 7,8-*cis*-N-(3-hydroxytetradecenoyl) homoserine lakton dari *Rhizobium leguminosarum* (Gray *et al.* 1996; Schripsema *et al.* 1996) dan 7,8-*cis*-N-(tetradecenoyl) homoserine lakton dari *Rhodobacter sphaerhoides* (Puskas *et al.* 1997).

Pada penelitian-penelitian berikutnya berikutnya ditemukan molekul sinyal alternatif selain AHL pada bakteri Gram-negatif. Sebagai contoh, *Ralstonia solanacearum* menghasilkan metil ester 3-asam hidroksipalmitat sebagai yang molekul, sinyal bersama-sama dengan AHL yang digunakan untuk mengatur virulensi (Flavier *et al.* 1997). Pada *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, terdapat faktor ekstraselular diffusible (DSF) yang berperan sebagai sinyal (Barber *et al.* 1997). *Pseudomonas aeruginosa*, memiliki autoinducer ketiga berupa PQS (*Pseudomonas* sinyal quinolone), yaitu 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (Pesci *et al.* 1999) sedangkan pada *Pseudomonas aureofaciens* berupa senyawa butirolaktone (Gamard *et al.* 1997). Pada kultur *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. alcaligenes*, *Enterobacter agglomerans* dan *Citrobacter freundii* juga ditemukan famili senyawa sinyal baru yang diidentifikasi sebagai diketopiperazines (DKP) (Holden *et al.* 1999). Walaupun lemah, molekul-molekul sinyal alternatif mampu mengaktifkan biosensor dari famili LuxR. Beberapa DKP bersifat antagonis terhadap aktivitas N-3-(oxohexanoyl) homoserine lakton (3-oxo-C6-HSL). Hal ini menunjukkan bahwa mungkin DKP bersaing dengan 3-oxo-C6-HSL dalam mengikat LuxR.

Proses-proses selular bakteri Gram negatif yang regulasinya dikontrol melalui mekanisme *quorum sensing* antara lain adalah: virulensi dan pembentukan biofilm pada *P. aeruginosa*, virulensi pada *E. carotovora* dan *E. chrysanthemi*, patogenisitas pada *B. cepacia*, bioluminesens pada *V. fischeri*, nodulasi dan fiksasi N pada spesies *Rhizobium*, serta virulensi dan transfer TDNA pada *A. tumefaciens*

QUORUM SENSING PADA BAKTERI GRAM POSITIF

Bakteri gram positif juga memanfaatkan respon kepadatan populasi sel (*Quorum Sensing*) untuk meregulasi berbagai proses selularnya (Millers & Bassler 2001) (Gambar 3.24), namun bakteri Gram positif menggunakan senyawa sinyal yang berbeda dengan bakteri gram negatif. Bakteri Gram positif tidak memproduksi senyawa-senyawa AHL (Asil Homoserin Lakton). Sistem *quorum sensing* bakteri gram positif menggunakan senyawa-senyawa peptida kecil sebagai molekul sinyalnya (de Kievit & Iglewski 2000). Pada *Streptomyces* ditemukan senyawa *c-butyrolactones* yang dapat berperan sebagai sinyal (Ryan & Dow 2008).

Umumnya *signal peptide* disekresikan melalui *ATP-binding cassette (ABC) transporter*. Tidak seperti bakteri gram negatif yang menggunakan protein-protein tipe LuxR (LuxR family) sebagai sensor *autoinduser*nya, bakteri Gram positif menggunakan protein-protein histidin kinase untuk mendeteksi senyawa *autoinduser*-nya. Proses relay sinyal berlangsung melalui mekanisme reaksi fosforilasi berantai (Millers & Bassler 2001).

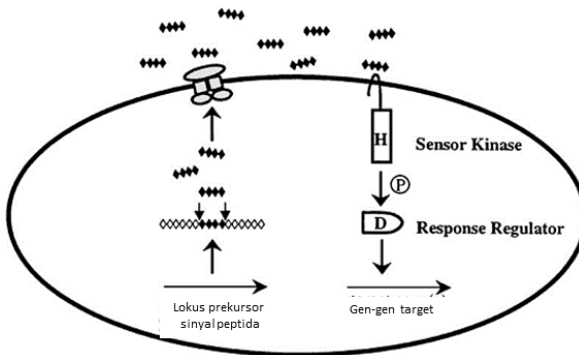
Senyawa peptida sinyal berinteraksi dengan elemen sensor pada *two-component signal transduction system* yaitu suatu protein histidin kinase. Interaksi tersebut menginisiasi suatu rangkaian reaksi fosforilasi yang berakhir pada fosforilasi *protein respon regulator*. Fosforilasi protein regulator mengakibatkan protein tersebut teraktivasi sehingga dapat mengikat sekuen DNA dan

mengaktivasi ekspresi gen-gen yang menjadi target regulasi *quorum sensing* (de Kievit & Iglewski 2000; Miller & Bassler 2001). Secara ringkas model mekanisme *quorum sensing* pada bakteri Gram positif dipaparkan pada Gambar 3.24.

Proses-proses selular yang regulasinya dikontrol melalui mekanisme *quorum sensing* pada bakteri Gram positif antara lain adalah: kompetensi dan pada *B. subtilis* dan *S. pneumoniae*, sporulasi pada *Bacillus*, konjugasi pada *E. faecalis*, serta virulensi pada *S. aureus* (de Kievit & Iglewski 2000; Miller & Bassler 2001).

QUORUM SENSING HIBRID

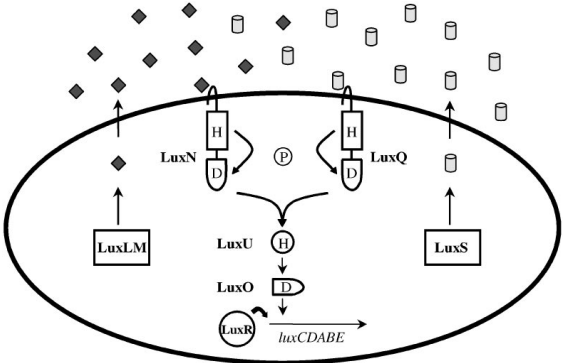
Komponen dan sistem sirkuit *quorum sensing hybrid* merupakan kombinasi antara tipe *quorum sensing* pada bakteri gram



Gambar 3.24. Model *quorum sensing* menggunakan peptide sebagai senyawa sinyal pada bakteri Gram positif. Prekursor peptide sinyal (◊◊◊◊◊◊) hasil translasi dipotong-potong sehingga dihasilkan sinyal *autoinduser peptide* (◆◆◆◆). Peptida sinyal ditranspor keluar sel melalui ABC transporter. Ketika akumulasi dan konsentrasi peptide sinyal telah mencapai ambang stimulasi maka sinyal terdeteksi oleh suatu protein sensor kinase (bagian dari *two-component regulatory system*) dan menyebabkan autofosforilasi pada residu histidannya. Selanjutnya melalui reaksi berantai gugus fosfat tersebut ditransfer ke residu aspartat pada suatu protein regulator. Selanjutnya protein regulator yang telah terfosforilasi akan mengaktivasi ekspresi gen-gen target (Miller & Bassler 2001)

negatif dan gram positif (Gambar 3.25). Tipe *quorum sensing* ini terdapat pada bakteri gram negative *Vibrio harveyi* yang merupakan patogen pada udang. Sebagaimana bakteri gram negatif lainnya, *V. harveyi* dapat memproduksi dan merespon homoserin lakton (HSL) yaitu *N*-(3-*hidroksibutanoil* lakton (*AI-1*).

Namun sistem transduksi sinyalnya menggunakan *two-component transduction signal* seperti pada bakteri gram positif



Gambar 3.25. Skema sistem quorum sensing hybrid HSL-two component transduction signal pada regulasi bioluminesens *V. harveyi*. *V. harveyi* menggunakan dua jenis autoinduser yaitu AI-1 dan AI-2. Dua jenis protein sensor kinase (LuxN dan LuxQ) mendeteksi masing-masing autoinduser. Selain LuxQ, suatu protein terikat membran (LuxP) diperlukan untuk mendeteksi AI-2 (tidak digambarkan). LuxN dan LuxQ masing-masing merupakan protein yang mengandung 2 domain yaitu satu domain sensor kinase dan satu domain respon regulator. Informasi dari sinyal yang diterima kedua sensor tersebut mengaktifkan fosfatase dan melalui reaksi defosforilasi berantai dari LuxN dan LuxQ ke suatu protein integrator yang merupakan suatu fosfotransferase (LuxU) yang selanjutnya mendefosforilasi protein respon regulator (LuxO). LuxO yang terdefosforilasi tidak dapat berperan sebagai represor ekspresi operon *luxCDABE* sehingga LuxR yang merupakan protein aktivator operon *luxCDABE* dapat mengaktifkan ekspresi bioluminesens. Sebaliknya pada densitas sel yang rendah, tidak ada autoinduser yang berinteraksi dengan LuxN dan LuxQ sehingga kedua protein ini mengalami autofosforilasi dan secara berantai meneruskan reaksi fosforilasi tersebut sampai LuxO. LuxO terfosforilasi bekerja sebagai represor ekspresi operon *luxCDABE* (Miller & Bassler 2001)

(Miller & Bessler 2001). Di samping itu, *V. harveyi* juga memiliki molekul sinyal lain (AI-2) berupa senyawa isomer metil-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran. Sinyal *autoinduser* kelompok AI-2 dihasilkan oleh bakteri gram negatif maupun gram positif. Autoinduser jenis ini merupakan sinyal *autoinduser* antar spesies (Ryan & Dow 2008).

MANIPULASI *QUORUM SENSING*

Penemuan *quorum sensing* sebagai suatu mekanisme yang digunakan secara luas dalam dunia bakteri untuk mengontrol perilaku populasinya telah membangkitkan berbagai ide para peneliti di seluruh dunia untuk memanfaatkannya (memanipulasinya) bagi kepentingan dan kesejahteraan manusia. Didorong oleh tingginya kebutuhan akan senyawa-senyawa antimikroba dan teknik-teknik baru yang aman untuk mengendalikan virulensi bakteri patogen baik untuk kebutuhan terapi ataupun aplikasi praktis lainnya (seperti biokontrol dalam bidang pertanian dan perikanan), para peneliti mulai menggali berbagai ide tentang cara untuk membungkam mekanisme sinyal-sinyal komunikasi populasi tersebut. Diawali oleh penelitian Dong *et al.* (2000) yang berhasil menemukan enzim AHL-laktonase pada *Bacillus* sp. yang dapat menghambat ekspresi virulensi pada *E. carotovora*.

Dalam perkembangan selanjutnya upaya pengacauan/pembungkaman *quorum sensing* ini disebut sebagai *Quorum Sensing Inhibition/Interference* (QSI) atau *Quorum Quenching*. Berdasarkan komponen utama dan mekanisme kerja *quorum sensing*, terdapat 3 target strategis QSI yang dapat dikembangkan, yaitu penghambatan produksi sinyal (*targeting signal generation*), penghambatan penyebaran atau inaktivasi sinyal (*targeting signal dissemination/inactivation of signal molecules*), dan penghambatan terhadap penerimaan sinyal atau *targeting signal reseptor* (Rasmussen & Givskov 2006).

Penghambatan produksi sinyal

Produksi molekul sinyal (AHL) dapat dihambat menggunakan beberapa senyawa analog prekursor AHL seperti holo-ACP, L/D-adenosilhomosistein, *sinefungin*, *butiril-S-adenosilmetionin* (Rasmussen & Givskov 2006).

Penghambatan penyebaran atau inaktivasi sinyal

Strategi inaktivasi atau degradasi sempurna molekul sinyal yang dihasilkan bakteri. Proses degradasi atau inaktivasi sinyal dapat terjadi melalui reaksi secara kimiawi atau fisik, dan enzimatis.

Inaktivasi atau degradasi secara kimiawi atau fisik. Beberapa jenis alga di antaranya *Laminaria digitata* menghasilkan senyawa halogen untuk melindunginya dari serangan bakteri. Senyawa-senyawa halogen seperti asam *hypobromous* dan asam *hypochlor* mendegradasi AHL melalui reaksi oksidasi. Salah satu cara yang paling mudah untuk mendegradasi AHL adalah dengan cara menaikkan pH lebih tinggi dari 7. Pada pH di atas 7, aktivitas biologis AHL akan rusak karena laktonolisis (pembukaan cincin lakton). Byers *et al.* (2002) menyatakan bahwa luka pada jaringan tumbuhan akan mengalami kenaikan pH sebagai respon pertama terhadap infeksi artifisial menggunakan *E. carotovora*. Selain pH tinggi, pembukaan cincin lakton menjadi semakin cepat pada suhu yang tinggi (Rasmussen & Givskov 2006).

Inaktivasi atau degradasi secara enzimatis. Molekul AHL dapat diinaktivasi oleh enzim oksidoreduktase melalui reaksi oksidasi reduksi atau pada rantai *acyl*. Aktivitas oksidoreduktase menyebabkan modifikasi pada molekul AHL tanpa menyebabkan terdegradasinya molekul sinyal tersebut (Utari *et al.* 2017). Dua enzim utama pendegradasi AHL adalah AHL-laktonase dan AHL acyclase (amino acyclase atau amidohidrolase). AHL-

laktonase mendegradasi AHL melalui katalisis reaksi pembukaan cincin lakton. Beberapa bakteri di antaranya *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis* (Dong, *et al.* 2000; Dong *et al.* 2001; Wang *et al.* 2004; Lee *et al.* 2002) diketahui menghasilkan enzim AHL-laktonase, sedangkan *P. aeruginosa* PAI-A, *Arthrobacter* sp., dan *K. pneumoniae*, *A. tumefaciens*, dan *Rhodococcus* sp. menghasilkan protein enzim yang homolog dengan protein AiiA atau AHL-laktonase (Uroz *et al.* 2003, Carlier *et al.* 2003; Park, *et al.* 2003; Huang, *et al.* 2003). Selain AHL-laktonase yang diproduksi oleh bakteri, aktivitas laktonase juga ditemukan pada beberapa protein dalam serum darah mamalia. Famili enzim laktonase asal mamalia tersebut disebut *paraoxonase* (Aybey & Demirkan 2016; LaSarre & Federle 2013).

Berbeda dengan AHL-laktonase, degradasi AHL oleh enzim amino *acyclase* (AiiD) terjadi melalui reaksi pemotongan ikatan peptida pada rantai samping *acyl* dan cincin homoserin lakton. Beberapa bakteri di antaranya *Variovorax paradoxus* dan *P. aeruginosa* PAI-A diketahui menghasilkan enzim amino *acyclase*. Hasil degradasi AHL digunakan oleh bakteri-bakteri penghasil enzimnya sebagai sumber karbon, nitrogen, dan donor energi (Huang *et al.* 2003; Leadbetter & Greenberg 2000).

Penghambatan penerimaan sinyal

Strategi ketiga untuk mengacaukan *quorum sensing* adalah dengan cara menghalangi proses penerimaan sinyal oleh reseptor misalnya dengan memblok atau merusak *Protein reseptor* yang homolog dengan LuxR. Strategi untuk ini dapat dilakukan menggunakan:

1. Penggunaan senyawa Quorum Sensing Interference (QSI) sintetik

Bloking reseptor menggunakan senyawa analog molekul sinyal (AHL) merupakan metode yang paling banyak dieksplorasi. Pada dasarnya pengembangan senyawa analog sintetik dapat dilakukan diantaranya dengan beberapa cara berikut (Rasmussen & Givskov, 2006):

- a. Mengubah/substitusi cincin lakton tanpa mengubah rantai samping misalnya substitusi atom C4 menghasilkan senyawa analog yang tidak dapat berinteraksi dengan protein` homolog LuxR
- b. Mengubah/substitusi rantai samping asil tanpa mengubah cincin lakton Beberapa senyawa analog sintetik jenis ini yang berhasil dibuat diantaranya:
 1. Substitusi atom karbon paling luar dengan gugus asilalkil siklik atau nonsiklik menghasilkan senyawa analog yang terbukti dapat menjadi competitor AHL.
 2. Substitusi atom C3 dengan sulfur meghasilkan senyawa analog yang dapat memblok reseptor yang mengontrol ekspresi LuxR dan LasS
 3. Substitusi atom C paling luar dengan gugus aril

Eksplorasi senyawa-senyawa dengan potensi aktivitas *Interference with signal reseptor* (QSIs) dapat dilakukan melalui *screening of random compound libraries*. Dengan cara ini Rasmussen, *et al.* (2005) berhasil mengidentifikasi beberapa senyawa QSIs seperti 4-nitro-piridin-N-oksida (4-NPO), p-benzoquinon, 2,4,5-tribromoimidazol, indol, dan 3-nitrobenzen sulfonamid. Di antara kelima senyawa tersebut, 4-NPO paling efektif memblok sistem QS hybrid LuxR pada *E. coli*. Analisa dengan teknik *microarray* berbasis transkriptomik menunjukkan bahwa 4-NPO dapat menurunkan ekspresi gen-gen yang diregulasi via

mekanisme *quorum sensing* pada *P. aeruginosa* secara signifikan (37%).

2. Senyawa-senyawa QSI alami

Sepanjang jutaan tahun sejarah perkembangannya, tumbuhan dan fungi telah hidup berdampingan dengan bakteri patogen, Dan sepanjang itu pula tumbuhan dan fungi mengembangkan mekanisme untuk menurunkan patogenisitas bakteri di sekitarnya. Oleh karena itu senyawa-senyawa QSI dapat diisolasi dari kedua organisme tersebut. Asam penisilat yang dihasilkan oleh fungi *Penicillium radicolica* dan Patulin dari *P. coprobium* adalah 2 senyawa QSI asal fungi yang sangat potensial (Rasmussen & Givskov 2006).

Bawang putih, wortel, kedelai, lili air, tomat, habanero, biji polong-polongan, dan biji/bibit alfalfa adalah kelompok tumbuhan yang telah diidentifikasi sebagai penghasil senyawa QSI. Di antara senyawa QSI asal tumbuhan, senyawa bisulfur siklik merupakan senyawa QSI yang sangat tinggi efektivitasnya. Biji polong-polongan mengandung senyawa QSI L-cavanine dalam konsentrasi yang tinggi, yaitu mencapai 5% dari berat keringnya. (Gonzales & Kashavan 2006; Rasmussen *et al.* 2005),

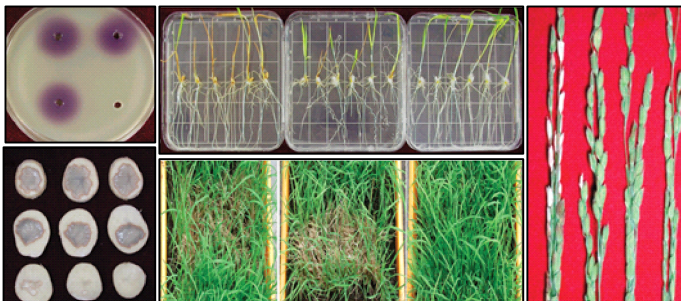
Kelompok senyawa QSI alami yang banyak diteliti adalah senyawa furanon terhalogenasi yang diisolasi dari mikroalga laut *Delisea pulchra* (Givskov *et al.* 1996). Efektivitas furanon bromide tersebut tidak disebabkan oleh reaktivitas atom bromide tapi disebabkan interaksinya dengan reseptor menyebabkan induksi perubahan konformasi protein reseptor yang pada akhirnya mempercepat proses *turn over* reseptor tersebut (Manefield *et al.* 2002).

APLIKASI MANIPULASI *QUORUM SENSING* DALAM BIOTEKNOLOGI PERTANIAN

Quorum sensing (QS) memegang peranan penting dalam interaksi tumbuhan-bakteri. Bentuk interaksi tersebut bersifat simbiotik maupun patogenik. Pada bagian sebelumnya telah disebutkan hasil-hasil penelitian yang menunjukkan adanya berbagai senyawa yang dihasilkan oleh bakteri dan organisme eukaryot yang dapat mempengaruhi proses *quorum sensing*. Hal ini memberikan peluang pengembangan strategi baru dalam manajemen penyakit tumbuhan untuk meningkatkan produktivitas pertanian. Beberapa teknologi berbasis manipulasi QS dalam bidang pertanian yang sangat potensial untuk dikembangkan sebagai agen biokontrol di lapangan di antaranya adalah:

1. Aplikasi mikroba nonpatogenik penghasil enzim pendegradasi AHL

Mikroba-mikroba penghasil enzim AHL-laktonase atau *amino acyclase* (AHL *acyclase*) dapat digunakan sebagai komponen agensia biokontrol di antaranya *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *Variovorax*, *Rhodococcus*, *Comamonas*, dan *Pseudomonas*. Aplikasi *B. thuringiensis* SGT3g penghasil AHL-laktonase pada daun anggrek bulan terbukti efektif mengendalikan penyakit busuk lunak yang ditimbulkan oleh *Dickeya dadantii* pada daun anggrek tersebut (Sari *et al.* 2016). Selain penggunaan bakteri yang secara alami memproduksi enzim pendegradasi AHL (Cho *et al.* 2007) telah melaporkan hasil rekayasa genetik bakteri endofitik *Burkholderia glumae* nonpatogenik dengan gen penyandi enzim AiiA dari *E. carotovora*. Hasil penelitian tersebut menunjukkan *Burkholderia glumae* transgenik tersebut secara signifikan mampu menurunkan gejala penyakit yang ditimbulkan oleh *Burkholderia glumae* patogenik pada tanaman padi (bibit dan malai padi) serta busuk lunak yang disebabkan oleh *E. carotovora* pada umbi kentang (Gambar 3.26).



Gambar 3.26. Aplikasi *B. glumae* nonpatogenik hasil rekayasa genetik mampu menekan virulensi *B. glumae* patogenik pada umbi kentang dan padi (Cho *et al.* 2007)

2. Aplikasi mikroba nonpatogenik penghasil senyawa *autoinduser* analog

Mikroba-mikroba penghasil senyawa analog AHL dapat digunakan sebagai komponen agensia biokontrol. Sebagaimana telah dijelaskan di bagian sebelumnya, senyawa-senyawa analog AHL dapat berkompetisi dengan sinyal-sinyal bakteri/mikroba patogen sehingga mengacaukan atau menggagalkan proses QS pada mikroba-mikroba *pathogen* tumbuhan. Kegagalan atau kekacauan proses QS dapat menurunkan bahkan menggagalkan proses inisiasi patogenisitas bakteri *pathogen*. Mikroba penghasil senyawa *autoinduser* analog dapat diperoleh dari alam (tanpa rekayasa) atau melalui rekayasa secara genetik untuk meningkatkan kemampuannya.

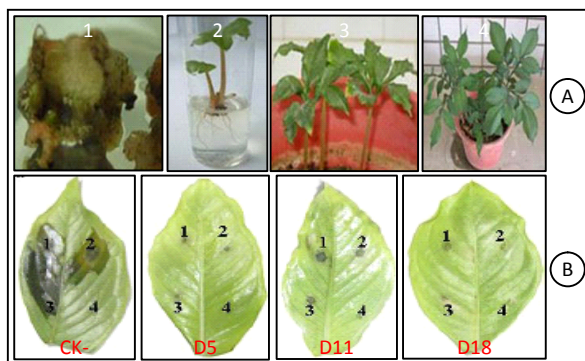
4. Perakitan tanaman transgenik

Beberapa peneliti telah melaporkan perakitan tanaman transgenik yang dapat menghasilkan senyawa yang mampu mendegradasi AHL, memblokir produksi AHL, atau bahkan memproduksi AHL (Fray *et al.* 1999; De Kievit & Iglewski 2000; Dong *et al.* 2001; Ban *et al.* 2009). Integrasi gen *aiia* telah berhasil dilakukan pada tanaman kentang, tembakau (Dong *et al.* 2001), porang (*Amorphophallus konjac*) (Ban *et al.* 2009) dan *Eucalyptus* (Ouyang

& Li 2016). Tanaman *A. konjac* yang mengandung gen *aiia* tersebut dapat memproduksi enzim laktonase (AiiA) sehingga menjadi lebih tahan terhadap serangan *E. carotovora* (Gambar 3.27). Di luar dugaan, selain lebih tahan terhadap serangan *Erwinia carotovora* ssp. *zeae* (Sabet) dan *R. solanacearum*, integrasi *aiiA* pada *Eucalyptus* juga menyebabkan peningkatan ketahanannya terhadap penyakit hawar yang disebabkan oleh fungi fitopatogenik *Phytophthora capsici* (Gambar 3.28) dan *Cylindrocladium quinquesepatum* (Ouyang & Li 2016).

STATUS TERKINI RISET MANIPULASI *QUORUM SENSING* DI INDONESIA DAN BB BIOGEN

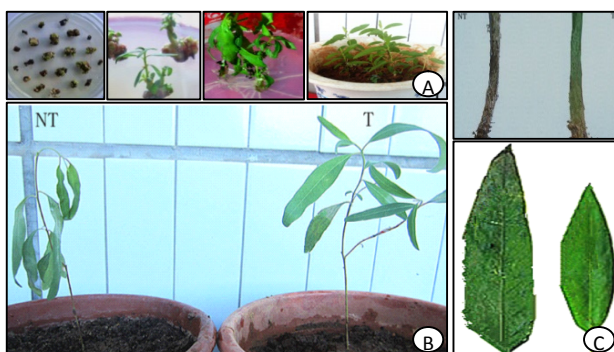
Secara umum, riset tentang pemanfaatan dan manipulasi mekanisme QQ bakteri patogen di Indonesia telah dilakukan di UNS, BB Biogen, dan IPB (Akhdiya *et al.* 2017; Khoiri *et al.* 2017; Novitasari *et al.* 2014; Sari *et al.* 2016; Satwika *et al.* 2018). Pengujian terhadap ekstrak lengkuas membuktikan bahwa rempah ini



Gambar 3.27. Hasil integrasi *aiiA* pada *Amorphophallus konjac*. (A) *A. konjac* transgenik pada tahap kalus, kultivasi invitro dan aklimatisasi serta (B) uji terhadap daun beberapa tanaman transgenik *A. konjac* (D5, D11, & D18) yang menunjukkan peningkatan ketahanan terhadap daun beberapa tanaman transgenik *A. konjac* (D5, D11, & D18) yang menunjukkan peningkatan ketahanan terhadap penyakit busuk lunak (Ban *et al.* 2009)

terbukti mengandung senyawa yang memiliki aktivitas anti *quorum sensing* terhadap *Aeromonas hydrophyla* (Novitasari *et al.* 2014). Bakteri penghasil AHL-laktonase juga terbukti efektif untuk mengendalikan penyakit pada budi daya ikan lele (Novita *et al.* 2015).

Saat ini BB Biogen dan IPB menjadi *leader* di Indonesia untuk riset pemanfaatan QQ pada bidang pertanian. Eksplorasi dan bioprospeksi bakteri rizosfer penghasil enzim AHL-laktonase juga telah dilakukan oleh peneliti BB Biogen bersama IPB. Eksplorasi bakteri tersebut dilakukan dari berbagai pulau dan ekosistem di Indonesia (Akhdiya *et al.* 2017; Satwika *et al.* 2018). Uji potensi biokontrol secara *in vitro* menunjukkan beberapa *Bacillus* spp. indigenus yang telah diseleksi kemampuan dan efektivitas AHL-laktonasanya mampu menurunkan kejadian penyakit busuk lunak pada planlet kentang yang diinfeksi secara artifisial dengan *P. carotovorum*. Penyemprotan *Bacillus* spp. tersebut juga terbukti mampu menurunkan virulensi *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *glycines*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, dan *Dickeya dadantii* pada daun tembakau dan



Gambar 3.28. Hasil integrasi aiiA pada Eucalyptus. (A) Perkembangan konstruksi Eucalyptus transgenik dari tahap kalus, differensiasi, planlet dan aklimatisasi serta (B) uji ketahanan terhadap penyakit layu bakteri, dan (C) uji ketahanan terhadap hawar yang disebabkan oleh *P. capsicii* (Ouyang & Li 2016)

anggrek bulan (Akhdiya *et al.* 2017; Sari *et al.* 2016). Uji efikasi yang dilakukan pada pembibitan kentang menunjukkan bahwa bakteri-bakteri tersebut sangat efektif dan potensial dikembangkan sebagai agen biokontrol untuk mengendalikan penyakit busuk lunak. Enzim-enzim AHL-laktonase dari bakteri-bakteri terseleksi tersebut telah dikarakterisasi, gen penyandinya telah diisolasi dan dikonstruksi dalam *expression vector* (pET) maupun pCAMBIA 2300 (Rusmana *et al.* 2017), serta telah diintroduksi ke *A. tumefaciens*. Mengingat stigma negatif terhadap tanaman pangan transgenik yang masih melekat kuat pada mayoritas masyarakat, maka selanjutnya aplikasi teknik rekayasa genetik untuk memanipulasi *quorum sensing* fitopatogen lebih baik jika dilakukan pada komoditas nonpangan seperti nilam atau tanaman hias.

KESIMPULAN

Penemuan *quorum sensing* (QS) sebagai mekanisme komunikasi antar sel bakteri telah membuka cakrawala baru dalam pengembangan teknik dan strategi pengendalian patogenisitas bakteri. Pembungkaman atau penghambatan komunikasi merupakan prinsip dasar pengendalian patogenisitas bakteri patogen melalui manipulasi proses QS. Berbeda dengan prinsip pengendalian menggunakan agen bakterisida yang bersifat membunuh, manipulasi QS bertujuan untuk membuat bakteri patogen kehilangan virulensinya melalui penghambatan produksi sinyal (*targeting signal generation*), penghambatan penyebaran atau inaktivasi sinyal (*targeting signal dissemination/inactivation of signal molecules*), dan penghambatan terhadap penerimaan sinyal atau *targeting signal reseptor*. Kelebihan strategi pengendalian berbasis manipulasi QS adalah penekanan terhadap munculnya *strains* yang semakin resisten terhadap antibiotik atau agen bakterisida lain seperti pestisida. Penurunan atau hilangnya virulensi bakteri

patogen akibat manipulasi QS meningkatkan sensitivitasnya terhadap bakterisida dan antibiotik. Pada kondisi tertentu, sinergi strategi pengendalian patogen melalui manipulasi QS bersama dengan antibiosis menjadi solusi untuk meningkatkan efektivitas pengendalian tanpa kekhawatiran akan berkembangnya resistensi dan dampak negatif atas residu pestisida yang tinggi. Oleh karena itu penghambatan atau manipulasi QS layak dipertimbangkan sebagai bagian dari pengembangan strategi pengendalian penyakit manusia, hewan, dan tumbuhan.

DAFTAR PUSTAKA

- Atkinson S, Williams P. (2009). Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J Royal Soc Interface*. 6, 959–978. doi:10.1098/rsif.2009.0203.
- Akhdiya A, Sukmadjaja D, Rusmana I. (2017). Boprospecting of AHL-Lactonase-Producing *Bacillus* spp. for Biocontrol Agents of Phytopathogenic Bacteria. *Proceeding of Workshop International Seminar on Innovation of Environmental Friendly Pesticides to Support Food Self-Sufficiency*. Pati 6-7 September.
- Aybey A, Demirkan E. (2016). Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* by human serum paraoxonase. *J Med Microbiol*. 65:105-113. doi 10.1099/jmm.0.000206.
- Ban H, Chai X, Lin Y, Zhou Y, Peng D, Zhou Y, Zou Y, Yu Z, Sun M. (2009). Transgenic *Amorphophallus konjac* expressing synthesized acyl-homoserine-lactonase (aiia) gene exhibit enhanced resistance to soft rot disease, *Plant Cell Reports*. 28:1847-1855.
- Barber CE, Tang JL, Fend JX, Pan MQ, quorum-sensing signaling molecules. *J Bacteriol*. 184:1163-1171.

- Byers JT, Lucas C, Salmond GPC, Welch M. (2002). Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* Quorum-Sensing signaling molecule. *J Bacteriol.* 84:1163-1171.
- Campos-Galvao ME, Ribon AO, Araujo EF, Vanetti MC. (2016). Changes in *Salmonella enteritidis* enteritidis phenotypes in presence of acyl homoserine lactone quorum sensing signals. (2016). *J Basic Microbiol.* 56:493-501. doi:10.1002/jobm.201500471.
- Carlier A, Uroz S, Smadja B, Fray R, Latour X, Dessaux Y, Faure D. (2003). The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an attM-paralogous gene, *aiiB*, also encoding N-acyl homoserinylactonase activity. *Appl Environ Microbiol.* 69:4989-4993.
- Cho HS, Park SY, Ryu CM, Kim JF, Kim JG. (2007). Interference of quorum sensing and virulence of the rice pathogen *Burkholderia glumae* by an engineered endophytic bacterium. *FEMS Microbiology and Ecology*, 60,14–23. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00280.x>
- De Kievit TR, Iglewski BH. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun.* 69:4839-4849. doi: 10.1128/IAI.68.9.4839-4849.2000.
- DongYH, Xu JI, Li XZ, Zhang H. (2000). AiiA, an enzymes that inactivates the acylhomoserine lactone quorum sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America.* 97:3526-3531. doi :10.1073/pnas.060023897.
- DongYH, Xu JI, Li XZ, Zhang H, Zang HB, Zhang XF, Zang LH. (2001). Quenching-quorum sensing dependent bacterial infection by an N-acylhomoserinylactonase. *Nature.* 411:813-817.

- Flavier AB, Clough SJ, Schell MA, Denny TP. (1997). Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol*. 26:251-259.
- Fray RG, Troup JP, Daykin M, Wallace A, Williams P, Stewart GS, Grierson D. (1999). Plant genetically modified to produce N-acyl-homoserine lactones communicate with bacteria. *Nat Biotechnol*. 17:1017-1020.
- Gamard P, Sauriol F, Benhamou N, Belanger RR, Paulitz TC. (1997). Novel butyrolactones with antifungal activity produced by *Pseudomonas aureofaciens* strain 63-28. *J Antibiot*. 50:742-749.
- Gonzales JE, Kashavan ND. (2006). Messing with Bacterial Quorum Sensing. *Microbiol Mol Biol Rev*. 70:859-875. doi:10.1128/MMBR.00002-06
- Givskov M, de Nys R, Manefield M, Gram L, Maximilien R, Eberl L, Molin S, Steinberg PD, Kjelleberg S. (1996). Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J Bacteriol*. 178:6618-6622.
- Gray KM, Pearson JP, Downie JA, Boboye BEA, Greenberg EP. (1996). Cell-to-cell signaling in the symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium leguminosarum*: autoinduction of stationary phase and rhizosphere-expressed genes. *J Bacteriol*. 178:372-376.
- Holden MTG, Chhabra SR, de Nys R, Stead P, Bainton NJ, Hill PJ, Manefield M, Kumar N, Labatte M, England D, Rice S, Givskov M, Salmond GPC, Stewart GSAB, Bycroft BW, Kjelleberg S, Williams P. (1999). Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides

- from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Mol Microbiol.* 33:1254-1266.
- Huang JJ, Han JL, Zhang LH, Leadbetter JR. (2003). Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Env Microbiol.* 69:5941-5949.
- Khoiri S, Damayanti TA, Giyanto. (2017). Identification of quorum quenching bacteria and its biocontrol potential against soft rot disease bacteria, *Dickeya dadantii*. *Agrivita.* 39:45-55.
- LaSarre B, Federle MJ. 2013. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev.* 77:73-110.
- Leadbetter JR, Greenberg EP. (2000). Metabolism of acylhomoserinelactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J Bacteriol.* 182:6921-6926.
- Lee SJ, Park SY, Lee JJ, Yum DY, Koo BT, Lee JK. (2002). Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are wide spread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Env Microbiol.* 68:3919-3924.
- Manefield M, Rasmussen TB, Henzter M, Andersen JB, Steinberg P, Kjelleberg S, Givskov M. (2002). Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turn over. *Microbiology.* 148,1119–1127. doi: 10.1099/00221287-148-4-1119.
- Miller MB, Bassler BL. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Ann Rev Microbiol.* 55:165-199. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>.
- Nigam A, Kumar S, Engelberg-Kulka H. (2018). Quorum Sensing extracellular death peptides enhance the endoribonucleolytic

- activities of *Mycobacterium tuberculosis* MazF Toxins. *mBio*, 9(3), 1–11. doi:10.1128/mBio.00685–18
- Novita H, Rusmana I, Yuhana M, Pasaribu FH. (2015). Karakterisasi bakteri anti Quorum Sensing (AQS) sebagai penghambat virulensi penyakit pada ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*). *J Riset Akuakult*. 10:89-98.
- Novitasari Y, Pangastuti A, Rakhmawati R. (2014). Penghambatan produksi enzim eksoprotease pada sistem quorum sensing *Aeromonas hydrophila* dengan pemberian ekstrak metanol rimpang segar dan rimpang kering lengkuas (*Alpinia galanga*). *Biofarmasi*. 12:51-61.
- Ouyang LJ, Li LM. (2016). Effect of an inducible *aiiA* gene on disease resistance in *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis*. *Transgen Res*. 4:441-52. doi: 10.1007/s11248–016–9940–x.
- Oshri RD, Zrihen KS, Shner I, Bendori SO, Elda A. (2018). Selection for increased quorum-sensing cooperation in *Pseudomonas aeruginosa* through the shut-down of a drug resistance pump. *The ISME Journal*, 12:2458–2469 <https://doi.org/10.1038/s41396–018–0205–y>.
- Park SY, Lee SJ, Oh TK, Oh JW, Koo BT, Yum DY, Lee JK. (2003). AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology*. 149:1541-1550.
- Pesci EC, Milbank JB, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, Iglewski BH. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America*. 96:11229-11234.

- Puskas A, Greenberg EP, Kaplan S, Schaefer AL. (1997). A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. J Bacteriol. 179:7530-7537.
- Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Skindersoe ME, Hentzer M, Kristoffersen P, Kote M, Nielse J, Eberl L, Givskov M. (2005). Screening for quorum sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. J Bacteriol. 187:1799-1814.
- Rasmussen TB, Givskov M. (2006). Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. Microbiology. 152:895-904.
- Rusmana I, Asmarany A, Wahyudi AT. (2017). Cloning and expression of acyl homoserine lactone (AHL) lactonase genes of *Bacillus cereus* INT1c and *Bacillus thuringiensis* SGT3g in *Escherichia coli*. Afr J Biotechnol. 16:1895-1901.
- Ryan RP, Dow JM. (2008). Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. Microbiology. 154:1845-1858.
- Sari PE, Rusmana I, Akhdiya A. (2016). AHL-lactonase characteristics of *Bacillus thuringiensis* SGT3g and its effectiveness in inhibiting pathogenicity of *Dickeya dadantii*. Malays J Microbiol. 12:315-321.
- Satwika TD, Rusmana I, Akhdiya A. (2018). Potensi Quorum Quenching bakteri filosfer dan rizosfer terhadap *Dickeya dadantii*. J AgroBiogen. 13:101-110.
- Schripsema J, de Rudder KEE, van Vliet TB, Lankhorst PP, deVroom E, Kijne JW, van Brussel AAN. (1996). Bacteriocin small of *Rhizobium leguminosarum* belongs to the class of N-acyl-L-homoserine lactone molecules, known as autoinducers and as quorum sensing co-transcriptional factors. J Bacteriol. 178:366-371.

- Uroz S, D'Angelo-Picard C, Carlier A, Elasri M, Sicot C, Petit A, Oger P, Faure D, Dessaux Y. (2003). Novel bacteria degrading N-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria. *Microbiology*. 149:1981-1989.
- Utari PD, Vogel J, Quax WJ. (2017). Deciphering physiological functions of AHL quorum quenching acylases. *Frontiers in Microbiology*, 8(1123), 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2017.01123.
- Wang LH, Weng LX, Dong YH, Zhang LH. (2004). Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching N-Acyl Homoserine Lactone Lactonase (AHL-lactonase). *J Biol Chem*. 279:13645-13651.