

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar belakang

Penyakit kanker merupakan salah satu penyebab kematian yang terbesar di dunia. Menurut data *Globocan (Global of Cancer Observatory)*, angka kematian penduduk di Indonesia akibat penyakit kanker pada tahun 2018 adalah 207.210 dan prevalensi sebesar 775.120 setiap 5 tahun dari total populasi 266.794.986 penduduk (WHO, 2018). Sementara itu, di Indonesia terdapat sekitar 11.000 kasus kanker yang terjadi pada anak setiap tahunnya dan umumnya, sepertiga dari kanker tersebut adalah leukemia (Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan Indonesia, 2015). Penelitian yang ada hingga saat ini menunjukkan bahwa prevalensi leukemia akut di seluruh dunia mengalami peningkatan dengan beberapa jenis leukemia. Leukemia adalah penyakit keganasan pada jaringan hematopoietik yang ditandai dengan penggantian elemen sumsum tulang normal oleh sel darah abnormal atau sel leukemik. Hal ini disebabkan oleh proliferasi tidak terkontrol dari klon sel darah immatur yang berasal dari sel induk hematopoietik (Tjokroprawiro *et al.*, 2015).

Terdapat 3 jenis leukemia, yaitu leukemia mieloblastik akut (LMA), leukemia limfoblastik akut (LLA), dan leukemia mieloblastik kronik (LMK). Dari semua kasus leukemia tersebut, 78% di antaranya termasuk kasus leukemia akut (Hartoyo dan Kurniawan, 2016). LLA merupakan jenis leukemia yang paling sering terjadi pada anak-anak. Leukemia jenis ini sudah menyerang anak di bawah usia 15 tahun sebesar 25% dari semua jenis kanker. LLA paling sering terjadi pada anak berusia 3–5 tahun, tetapi kadang terjadi pada usia remaja dan dewasa. Saat ini terdapat sekitar 80.000.000 anak yang berusia di bawah 15 tahun di

Indonesia dan diperkirakan ada sekitar 3000 kasus LLA yang terjadi pada anak tiap tahunnya (Yakin *et al.*, 2017).

Pengobatan utama terhadap leukemia yang telah digunakan adalah kemoterapi dimana sel leukemik sensitif terhadap kemoterapi pada saat diagnosis (Rudolph, 2007). Kemoterapi merupakan perawatan secara berulang dan teratur yang diberikan dengan pengobatan lain, selama dua sampai tiga tahun bagi pasien LLA (Davey, 2005). Mekanisme kerja yang tidak selektif dari kemoterapi dan selalu dikombinasi menyebabkan toksisitas obat meningkat (Vassal, 2005). Senyawa dari bahan alam yang sering dimanfaatkan sebagai antikanker adalah senyawa *vinblastine* dan *vincristine*. *Vinblastine* dan *vincristine* adalah alkaloid *bisindole* yang diisolasi dari *periwinkle* Madagaskar, *Catharanthus roseus* G. Don. (*Apocynaceae*) yang mengawali pemanfaatan bahan tanaman sebagai antikanker. *Vinblastine* dan *vincristine* telah banyak dikombinasikan dengan obat kemoterapi lainnya dalam pengobatan leukemia, limfoma, kanker testis, kanker payudara dan kanker paru-paru, serta sarkoma Kaposi (Cragg dan Newman, 2005).

Banyak penelitian yang menunjukkan pengobatan leukemia dengan menggunakan bahan alam baik berupa simplisia, ekstrak, ataupun fraksi. Namun, penelitian tersebut juga memiliki kelemahan, yaitu jumlah bagian tanaman yang dibutuhkan cukup banyak untuk memperoleh simplisia yang dituju. Selain itu, jumlah ekstrak maupun senyawa murni yang diisolasi dari tanaman tersebut tidak sebesar jumlah bagian tanaman yang digunakan. Kelemahan lainnya adalah waktu yang diperlukan tanaman untuk menghasilkan metabolit sekunder cukup lama Berdasarkan banyak kelemahan itu, maka dibutuhkan cara lain untuk memperoleh metabolit sekunder yang diinginkan dalam waktu yang singkat dan jumlah yang

banyak. Salah satu alternatif tersebut adalah dengan memanfaatkan mikroba endofit.

Mikroba endofit merupakan mikroorganisme (dapat berupa kapang, khamir, ataupun bakteri) yang tinggal dalam bagian tanaman selama jangka waktu tertentu, dapat berkolonisasi di dalam jaringan tanaman tanpa merugikan tanaman inangnya (Kumala, 2014). Mikroba endofit tersebut dapat menghasilkan metabolit sekunder seperti enzim dengan bioaktivitas yang sama dengan inangnya sehingga dapat dikembangkan menjadi obat. Beberapa mikroba endofit menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif sebagai senyawa metabolit sekunder yang berfungsi sebagai antimikroba, antimalaria, antikanker dan sebagainya (Simarmata *et al.*, 2007).

Salah satu enzim yang dihasilkan oleh mikroba endofit adalah L-Asparaginase. Enzim tersebut juga terdapat pada *guinea pig serum* serta tanaman (Da-Silva *et al.*, 2016). L-Asparaginase adalah enzim golongan amidase (*L-Asparagine aminohydrolase*) dengan efektivitas tinggi dan telah disetujui oleh FDA (*Food and Drug Administration*) untuk pengobatan LLA. Enzim ini mengkatalisis hidrolisis L-Asparagin menjadi asam L-Aspartat dan ammonia. Enzim ini juga yang membantu penipisan kumpulan sirkulasi L-Asparagin, sehingga menghambat sintesis protein dalam sel tumor yang diakhiri oleh proses apoptosis (Abhini *et al.*, 2016). Namun, *guinea pig serum* kurang sesuai digunakan untuk produksi enzim L-Asparaginase dalam skala besar dibandingkan dengan mikroba endofit (Ibrahim *et al.*, 2018). Hal ini menunjukkan perlunya dikembangkan L-Asparaginase dari sumber-sumber baru, khususnya yang berasal dari fungi endofit.

Penggunaan mikroba endofit dalam menghasilkan enzim memiliki keuntungan, yaitu mengurangi jumlah tanaman yang digunakan untuk

produksi enzim dalam jumlah besar. Hal ini dikarenakan mikroba endofit penghasil senyawa bioaktif bisa didapatkan dari sejumlah kecil bagian tanaman saja. Mikroba endofit yang tumbuh dapat diperbanyak kapanpun dan dapat dijadikan *stock* kultur untuk jangka waktu yang panjang. *Stock* kultur mempermudah memperbanyak mikroba endofit tanpa menumbuhkan ulang dari tanaman inangnya. Keuntungan lain dari penggunaan mikroba endofit adalah siklus hidupnya yang singkat dan senyawa bioaktif yang dapat diproduksi dalam skala besar melalui proses fermentasi (Prihatiningtias dan Wahyuningsih, 2006).

Bakteri endofit telah cukup banyak digunakan sebagai penghasil enzim L-Asparaginase dengan tujuan terapi LLA. Namun, penggunaan bakteri endofit mulai jarang karena efek buruk yang disebabkan oleh L-Asparaginase dari jenis mikroba endofit ini. L-Asparaginase yang bersumber dari bakteri endofit dapat menimbulkan efek yang tidak diharapkan, seperti alergi dan respon imun ringan sampai sedang pada pasien LLA (Abhini *et al.*, 2016). Pasien dapat mengalami reaksi hipersensitivitas, bahkan syok anafilaksis sebagai dampaknya. Efektivitas enzim sebagai obat juga dapat menurun ataupun hilang akibat pembentukan antibodi yang menginaktifkan dan membersihkan obat enzim (Lavie *et al.*, 2017). Fungi endofit sekarang lebih banyak digunakan sebagai penghasil L-Asparaginase karena kemungkinan menimbulkan efek yang tidak diharapkan relatif lebih rendah dibandingkan dengan bakteri endofit (Abhini *et al.*, 2016). Kelebihan fungi endofit tersebut yang mendasari pemilihan fungi endofit sebagai penghasil L-Asparaginase dalam penelitian ini. Keberadaan L-Asparaginase tidak jarang disertai dengan kandungan L-Glutaminase. Namun, penelitian Nagarethinam *et al.* (2012) menyatakan bahwa L-Asparaginase yang berasal dari fungi tidak selalu disertai oleh Glutaminase. Sedangkan L-Asparaginase yang berasal dari bakteri lebih

banyak disertai oleh Glutaminase. Apabila terdapat aktivitas Glutaminase, maka dapat mengakibatkan terjadinya disfungsi hati, pankreatitis, leukopenia, kejang neurologis, dan kelainan koagulasi pada pasien. Oleh karena itu, L-Asparaginase yang tidak mengandung Glutaminase diperlukan untuk terapi pada manusia (Chan *et al.*, 2014, Lee *et al.*, 2016).

Beberapa penelitian telah melaporkan keberadaan enzim L-Glutaminase bersamaan dengan L-Asparaginase yang berasal dari bakteri dan fungi endofit. Penelitian yang dilakukan oleh Arévalo-Tristancho *et al.* (2019) menyimpulkan terdapat 25 strain bakteri yang memiliki kandungan L-Asparaginase sekaligus L-Glutaminase dari total 78 strain bakteri dari *Actinobacteria* yang diisolasi dari Sungai Arauca. Penelitian lain (Tadimalla *et al.*, 2009) menemukan ada 30 isolat dari 35 isolat bakteri yang memproduksi L-Glutaminase. Bakteri yang digunakan dalam penelitian tersebut berasal dari tanah dan air laut di Visakhapatnam. Penelitian-penelitian ini menjadi bukti banyaknya bakteri endofit yang juga memproduksi L-Glutaminase, selain L-Asparaginase.

Selain bakteri endofit, banyak juga penelitian yang telah dilakukan untuk mengetahui kandungan L-Glutaminase dalam L-Asparaginase yang dihasilkan fungi endofit. Penelitian terdahulu (Elzainy dan Ali, 2006) membuktikan bahwa fungi dengan spesies *Aspergillus niger*, *Penicillium politans* dan *Penicillium chrysogenum* menghasilkan enzim L-Asparaginase dan L-Glutaminase. Kehadiran enzim tersebut menyebabkan spesies fungi ini digunakan sebagai antikanker pada Leukemia Limfoblastik Akut (LLA) dan Leukemia Myeloblastik Akut (LMA). Di sisi lain, terdapat penelitian yang menunjukkan adanya fungi endofit dari genus *Aspergillus* dan *Rhizopus* yang hanya memiliki L-Asparaginase, tanpa kandungan L-Glutaminase (Doriya dan Kumar, 2016). Hal ini yang mendorong

pentingnya dilakukan skrining L-Glutaminase pada L-Asparaginase yang dihasilkan oleh mikroba endofit.

Penelitian ini menggunakan fungi endofit dengan genus *Aspergillus* karena *Aspergillus* telah dilaporkan mampu menghasilkan enzim L-Asparaginase (De-Angeli *et al.*, 1970, Arima *et al.*, 1972, Imada *et al.*, 1973, Curran *et al.*, 1985). Berbagai kelebihan dari L-Asparaginase yang dihasilkan oleh *Aspergillus* membuat genus ini sering diteliti. Banyak penelitian yang melaporkan kemampuan fungi endofit tersebut dalam membunuh sel-sel kanker. Salah satunya pada penelitian Fawzy (2011), *Aspergillus* telah terbukti memiliki aktivitas sebagai antikanker yang efektif. Hal ini disimpulkan berdasarkan hasil pengujian aktivitas sitotoksik dari ekstrak ekstraseluler yang dihasilkan oleh *Aspergillus* yang signifikan terhadap aktivitas sitotoksik obat penyakit kanker, yaitu Doxorubicin. Namun, diperlukan penelitian lanjutan untuk memastikan efek utama dari enzim ini (Lee *et al.*, 2016). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Winarto (2017), terdapat beberapa genus fungi endofit dari daun tanaman tomat yang memproduksi L-Asparaginase. Telah diperoleh 11 isolat fungi endofit dari daun tanaman tomat yang menghasilkan enzim L-Asparaginase. Salah satu genus fungi endofit penghasil L-Asparaginase dari penelitian tersebut adalah *Aspergillus*. Keberadaan enzim ini ditandai dengan warna merah muda pada media MCD (*Modified Czapek Dox's*) di sekitar pertumbuhan koloni. Pada penentuan rasio *zone index*, isolat *Aspergillus* menunjukkan daerah berwarna merah muda sejak 24 jam masa inkubasi dan terus bertambah ukurannya hingga menutupi permukaan lempeng agar secara penuh. Perubahan warna dari kuning menjadi merah muda tersebut disebabkan oleh kandungan indikator pH *phenol red* di dalam media uji. Indikator *phenol red* menunjukkan perubahan warna menjadi merah muda hingga merah pada rentang pH 7,8-8,2 (Medalia, 1920).

Intensitas warna merah muda pada media uji *Aspergillus* yang terbentuk akibat dihasilkannya ammonia pada MCD lebih kuat dibandingkan pada isolat lain. Hal ini menunjukkan aktivitas hidrolisis L-Asparagin yang mungkin lebih besar dari isolat lainnya. Beberapa penelitian lainnya juga mengatakan bahwa *Aspergillus* mampu menghasilkan L-Asparaginase dengan aktivitas yang paling besar di antara banyak genus lain (Farag *et al.*, 2015, Doriya dan Kumar, 2016). Fungi endofit dari genus *Aspergillus*, antara lain *Aspergillus terreus* dan *Aspergillus niger* telah dijadikan sebagai sumber utama enzim L-Asparaginase karena produktivitas enzim yang tinggi (Rathish *et al.*, 2016). Penelitian lain juga menyatakan bahwa *Aspergillus oryzae* mengalami peningkatan produksi L-Asparaginase dengan aktivitas yang sangat besar dengan L-Asparagin sebagai sumber nitrogen (Silpa *et al.*, 2017). L-Asparaginase yang diisolasi dari *Aspergillus* juga memiliki efek karsinostatik lebih besar pada tumor statik, dimana efek tersebut setara dengan L-Asparaginase yang telah dipurifikasi dari deuteromycetes *Fusarium tricinctum* (Doriya dan Kumar, 2016). Selain produktivitas dan aktivitas antikanker yang tinggi, L-Asparaginase yang berasal dari *Aspergillus* juga dilaporkan selektif dalam menghidrolisis L-Asparagin. Enzim yang dihasilkan dari *Aspergillus* tersebut tidak menunjukkan aktivitas terhadap L-Glutamin (Nagarethinam *et al.*, 2012).

Pada penelitian ini, dilakukan karakterisasi enzim L-Asparaginase dari fungi endofit *Aspergillus* untuk mengetahui karakter spesifik dari enzim. Data diperoleh melalui pengerjaan di laboratorium dan kajian literatur. Tahapan karakterisasi yang dilakukan di laboratorium menggunakan isolat MC1A fungi endofit yang diduga bergenus *Aspergillus*. Tahapan tersebut meliputi pengamatan makroskopis, pengamatan mikroskopis, uji biokimia, skrining aktivitas L-Asparaginase, skrining aktivitas L-Glutaminase, kurva pertumbuhan serta kurva produksi

enzim L-Asparaginase. Penelitian diawali dengan proses optimasi dengan meremajakan fungi endofit dalam PDY dan MEA. Kemudian dilakukan karakterisasi ulang terhadap isolat fungi endofit untuk memastikan identitas fungi. Tahap ini meliputi pengamatan makroskopis, mikroskopis fungi, uji aktivitas L-Asparaginase dengan media MCD agar dan uji biokimia. Selanjutnya, dilakukan karakterisasi L-Asparaginase dengan menentukan profil kurva pertumbuhan dan kurva produksi dengan menginokulasikan fungi yang telah diremajakan selama 5 hari dalam PDY ke dalam Erlenmeyer berisi MCD cair. Setiap 8 jam selama 2 hari dan 12 jam selama 3 hari berikutnya dilakukan pengambilan cuplikan. Cuplikan sampel diamati dengan spektro UV-VIS dengan penambahan reagen Nessler. Pada tahap skrining L-Glutaminase, digunakan media dan metode uji yang sama dengan tahapan uji aktivitas L-Asparaginase. Namun, pada skrining L-Glutaminase digunakan substrat berupa L-Glutamin. Skrining ini dimaksudkan untuk mengetahui resiko terjadinya efek samping pada imunitas tubuh apabila terkandung enzim L-Glutaminase. Skrining aktivitas L-Glutaminase pada L-Asparaginase yang dihasilkan oleh fungi endofit dari daun tanaman tomat belum pernah dilakukan oleh peneliti terdahulu sehingga dengan dilakukannya tahapan penting ini akan sangat bermanfaat untuk pemastian keamanan terapi LLA. Apabila hasil penelitian menunjukkan adanya aktivitas L-Glutaminase, penelitian dapat dilanjutkan dengan proses pemurnian enzim L-Asparaginase. Pemurnian enzim L-Asparaginase bertujuan untuk meminimalkan kemungkinan timbulnya efek samping pada saat enzim digunakan untuk terapi di waktu mendatang.

Sementara, tahap penentuan suhu optimum, pH optimum, stabilitas pH, stabilitas suhu, dan aktivitas spesifik L-Asparaginase pada kondisi optimum dilakukan terhadap fungi bergenus *Aspergillus* melalui kajian literatur. Kajian literatur dilakukan terhadap literatur yang memenuhi

berbagai kriteria dengan data hasil karakterisasi enzim L-Asparaginase dari fungi endofit *Aspergillus* secara umum.

## **1.2 Rumusan Masalah**

- a. Bagaimana profil kurva pertumbuhan dan kurva produksi dari isolat *Aspergillus* kode MC1A?
- b. Apakah isolat *Aspergillus* kode MC1A menghasilkan L-Glutaminase?

## **1.3 Pertanyaan Kajian Literatur**

- a. Berapa suhu optimum dan pH optimum L-Asparaginase dari *Aspergillus*?
- b. Berapa aktivitas spesifik L-Asparaginase dari *Aspergillus* pada suhu dan pH optimum?
- c. Berapa suhu dan pH yang dapat mempertahankan stabilitas aktivitas enzim L-Asparaginase dari *Aspergillus*?

## **1.4 Tujuan Penelitian**

- a. Untuk mengetahui profil kurva pertumbuhan dan kurva produksi dari isolat *Aspergillus* kode MC1A.
- b. Untuk mengetahui ada tidaknya L-Glutaminase yang dihasilkan oleh isolat *Aspergillus* kode MC1A.
- c. Untuk mengetahui suhu optimum dan pH optimum L-Asparaginase dari *Aspergillus*.
- d. Untuk mengetahui aktivitas spesifik L-Asparaginase dari *Aspergillus* pada suhu dan pH optimum.
- e. Untuk mengetahui suhu dan pH yang dapat mempertahankan stabilitas aktivitas L-Asparaginase dari *Aspergillus*.

## **1.5 Hipotesis Penelitian**

- a. Profil kurva pertumbuhan dan kurva produksi dari isolat *Aspergillus* kode MC1A menunjukkan hasil paling optimal setelah inkubasi selama 72 jam.
- b. Isolat *Aspergillus* kode MC1A tidak menghasilkan L-Glutaminase.

## **1.6 Manfaat Penelitian**

- a. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai profil kurva produksi enzim dan kurva pertumbuhan dari isolat *Aspergillus* kode MC1A, sehingga dapat mempermudah dalam proses produksi enzim L-Asparaginase berskala besar.
- b. Penelitian ini diharapkan dapat membantu memastikan ada atau tidaknya L-Glutaminase yang dihasilkan oleh isolat *Aspergillus* kode MC1A sehingga dapat diketahui efek samping yang ditimbulkan pada pengobatan kanker khususnya LLA dengan L-Asparaginase yang dihasilkan oleh fungi endofit *Aspergillus*.
- c. Penelitian ini diharapkan dapat menunjukkan karakteristik enzim L-Asparaginase yang dihasilkan oleh *Aspergillus* sehingga dapat diaplikasikan dalam berbagai kebutuhan di industri khususnya di bidang farmasi.