

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enzim L-asparaginase merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis L-asparagin menjadi L-aspartat dan amonia serta menghambat sintesis protein. Kemampuan enzim ini dalam menghambat sintesis protein dapat menyebabkan terjadinya kekurangan protein plasma termasuk dalam proses koagulasi dan fibrinolisis (Kompoliti and Horn, 2007, Yadav *et al.*, 2014, Baskar and Kumar, 2009). Asparagin berperan dalam pertukaran asam amino ekstraseluler dan asam amino intraseluler terutama pada serin, arginin, histidin. Asparagin juga berperan pada sintesis protein dalam mengkoordinasi sistem protein dan nukleotida. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemeliharaan tingkat asparagin intraseluler berperan penting pada pertumbuhan sel kanker (Krall *et al.*, 2016). Hal ini yang menjadi dasar penggunaan L-asparaginase sebagai terapi sel leukimia limfoblastik, dan juga didasarkan pada fakta bahwa sel ini tidak memproduksi L-asparagin namun memperolehnya dari luar (Upadhyay *et al.*, 2012).

L-asparaginase merupakan salah satu agen kemoterapi dalam pengobatan kanker pada sistem limfatik, *Acute Lymphoblastic Leukemia* (ALL), *Hodgkin's Lymphoma* dan melanosarkoma (Singh *et al.*, 2013). L-asparagin memiliki karakteristik khusus sebagai enzim hidrolitik pada L-asparaginase yang dapat digunakan sebagai pengobatan ALL untuk anak-anak. Hal ini dikarenakan enzim ini mempunyai kemampuan dalam mengkatalisis hidrolisis L-asparagin, L-asparaginase efektif sebagai agen antineoplastik sehingga banyak digunakan untuk pengobatan kemoterapi

(Qiao *et al.*, 2009). Faktor klinis dan biologi yang menyebabkan terjadinya ALL antara lain: umur (baru lahir hingga ≥ 10 tahun), jumlah leukosit ($\geq 50 \times 10^9/L$), ras, jenis kelamin, serta T-sel *immunophenotype* (Inaba, Greaves, and Mullighan, 2013). Obat yang digunakan untuk terapi antara lain obat golongan anti tumor, *DNA-Repair enzyme inhibitors*, penghambat sintesis DNA, *DNA damaging agents*, enzim yang mencegah sel untuk hidup, tirosinase kinase *inhibitors*, anti metabolit, obat yang mencegah pembelahan sel, kortikosteroid dan antibodi monoklonal (Danielle, 2014). L-asparaginase juga dapat digunakan untuk menghambat pembentukan akrilamida.

Akrilamida merupakan senyawa karsinogen yang terbentuk dalam proses pengolahan produk pangan tinggi pati pada suhu tinggi. Asparaginase efektif untuk menurunkan kadar akrilamida pada pati. Namun penggunaan asparaginase yang berlebihan dapat mengganggu kualitas organoleptik produk pangan akibat terbentuknya produk samping berupa amonia. Asparaginase dapat menjadi solusi bagi industri pangan dalam menghasilkan produk yang lebih sehat dengan kadar akrilamida rendah (Harimadi *et al.*, 2018).

Menurut Kementerian Kesehatan Republik Indonesia pada tahun 2017 hampir 9 juta orang meninggal akibat kanker dan akan terus meningkat hingga 13 juta orang pertahun hingga tahun 2030. Berdasarkan Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) pada tahun 2013 terdapat 16.291 kasus kanker pada anak dengan kisar umur 0-14 tahun, jenis kanker yang banyak diderita merupakan leukimia (Kemenkes, 2013). Leukemia yang paling sering menyerang anak-anak adalah leukemia limfoblastik akut. Leukimia limfoblastik akut merupakan penyebab utama kematian pada anak-anak dengan kisaran umur 1-15 tahun (Novrianda *et al.*, 2016). Leukemia ini

merupakan salah satu tipe leukimia atau kanker yang menyerang leukosit, dimana terjadi keganasan proliferasi sel-sel limfoblas muda dan menunjukkan adanya jumlah limfoblas muda yang berlebihan pada sumsum tulang belakang, kelenjar limfe dan darah (Noviandra *et al.*, 2016).

Selama ini, banyak penelitian mengenai enzim L-asparaginase dengan melakukan berbagai cara seperti isolasi, pemurnian dan karakterisasi enzim yang berasal dari berbagai macam tumbuhan serta mikroba (Kumala, 2014, Arpintasari *et al.*, 2008, Setiawan *et al.*, 2013). L-asparaginase dapat diisolasi dari berbagai macam mikroba seperti bakteri dan fungi. Beberapa contoh bakteri yakni *Erwinia carotovora*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Karnatakensis Streptomyces*, *Streptomyces venezuelae* dan beberapa fungi seperti *Aspergillus*, *Penicillium* dan *Fusarium* (Talluri *et al.*, 2014). Seperti pada penelitian Arpintasari (2008) dengan enzim L-asparaginase dapat diisolasi dari tumbuhan rimpang kunyit putih, serta pada penelitian Setiawan *et al.* (2013) dengan melakukan purifikasi L-asparaginase dari tumbuhan bawang bombay (*Allium cepa* L.) menggunakan kromatografi filtrasi gel *sephadex* G-100.

Pemurnian dilakukan untuk mendapatkan aktivitas enzim L-asparaginase dalam jumlah yang besar dan kemurnian yang lebih tinggi. Tingkat kemurnian enzim yang diperlukan tergantung pada aplikasi enzim, terkadang ekstrak kasar enzim saja dapat digunakan pada industri makanan tetapi untuk aplikasi di bidang industri farmasi diperlukan tingkat kemurnian yang lebih tinggi sehingga memerlukan beberapa tahapan pemurnian (Kumar and Sharma, 2015). Pemurnian pada enzim dilakukan untuk memisahkan enzim dari campuran protein yang tidak diperlukan dalam proses enzimatik dan dapat menghasilkan produk akhir yang dapat

bermanfaat (Zhang, Chisti and Youn, 1995). Setelah proses pemurnian diharapkan aktivitas spesifik enzim dapat meningkat karena kontaminan yang terdapat pada enzim telah dihilangkan. Hal ini menunjukkan bahwa tingkat kemurnian enzim meningkat dari sebelumnya. Strategi pemurnian yang ideal memiliki tujuan antara lain mampu menghasilkan *recovery* maksimum pada protein target, kehilangan aktivitas seminimal mungkin, biaya yang murah dan juga pemisahan protein pencemar secara maksimal. Pada langkah awal dilakukan pemurnian parsial menggunakan metode non kromatografi (pengendapan dengan garam, polimer atau pelarut organik) yang bertujuan untuk menghilangkan sebagian besar kontaminan pada enzim (Gunawan, 2017).

Pemurnian parsial enzim dengan menggunakan ammonium sulfat/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ merupakan salah satu metode yang paling sering digunakan untuk menghilangkan protein yang tidak diinginkan. Metode pengendapan dengan menggunakan garam ammonium sulfat bekerja berdasarkan prinsip *salting out* yakni dengan mengubah kelarutan protein untuk menghilangkannya dari larutan dengan penambahan garam dalam konsentrasi tinggi (Zhang, Chisti and Young, 1995). Pemurnian dengan menggunakan pengendapan ammonium sulfat didasarkan atas sifat-sifat garam seperti kelarutannya dalam mengendapkan protein. Penambahan garam dapat menyebabkan terjadinya peningkatan kekuatan ion dalam larutan yang dapat menyebabkan penurunan efek penolakan dari muatan yang serupa di antara molekul-molekul protein yang identik (Chaplin dan Bucke, 2004). Pemurnian dengan fraksinasi ammonium sulfat menghasilkan fraksi-fraksi yang mengandung beragam protein yang identik dan memiliki gaya menolak antar muatan serupa (Setiawan *et al.*, 2013). Metode pengendapan dengan ammonium sulfat ini sangat bergantung pada

hidrofobisitas protein, akibatnya setiap protein akan mengendap pada kejenuhan ammonium sulfat yang berbeda dan akhirnya dapat terjadi fraksinasi protein (Puspaningsih, 2004). Penambahan garam pada konsentrasi tinggi dapat menyebabkan molekul air yang semula terikat pada permukaan hidrofobik protein kemudian berikatan dengan garam. Molekul air yang berikatan dengan garam mengakibatkan protein saling berinteraksi, teragregasi dan akhirnya mengendap (Sinaga, Nugroho dan Dahliaty, 2010). Kemudian enzim yang telah diendapkan dengan ammonium sulfat dilakukan proses dialisis, proses ini bertujuan untuk menghilangkan garam dan zat terlarut lainnya yang mempunyai berat molekul yang lebih rendah daripada protein enzim yang masih tertinggal pada proses pengendapan ammonium sulfat lalu diuji aktivitasnya menggunakan metode Nessler. Metode Nessler memiliki prinsip reagen Nessler akan bereaksi dengan amonia sehingga membentuk larutan berwarna kuning coklat. Metode Nessler ini merupakan metode yang sering digunakan karena sederhana dan akurasinya yang bagus. Kemudian dilanjutkan dengan proses pemurnian kedua menggunakan metode kromatografi. Dilakukan pemurnian kedua ini untuk menghilangkan protein pengotor yang masih tertinggal dan memastikan bahwa enzim L-asparaginase telah lebih murni.

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan bahwa enzim L-asparaginase dapat dimurnikan secara parsial dengan menggunakan metode pengendapan ammonium sulfat pada bakteri dan fungi. Digunakannya bakteri dan fungi karena mikroba ini merupakan mikroba yang sering ditemukan pada kehidupan sehari-hari. Pemurnian ditunjukkan oleh peningkatan aktivitas spesifik enzim. Enzim yang memiliki kemurnian lebih tinggi memiliki aktivitas spesifik enzim lebih tinggi. Selain itu efektivitas dan efisiensi kemurnian juga ditentukan dari tingkat kemurnian serta

rendemen hasil enzim yang diperoleh. Dari review ini diharapkan diperoleh informasi yang membantu proses pemurnian secara parsial enzim L-asparaginase dengan metode pengendapan ammonium sulfat, meliputi konsentrasi kejenuhan ammonium sulfat yang efektif serta *feasibilitas* metode pengujian aktivitas enzim dengan menggunakan metode Nessler untuk memonitor enzim pada proses pemurnian dengan pengendapan ammonium sulfat.

1.2 Rumusan masalah

1. Apakah enzim L-asparaginase dapat dimurnikan secara parsial menggunakan metode pengendapan ammonium sulfat?
2. Berapa persentase kejenuhan ammonium sulfat yang dapat menghasilkan aktivitas enzim L-asparaginase tertinggi?
3. Apakah metode Nessler dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan atau jumlah L-asparaginase dengan metode pemurnian ammonium sulfat?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui apakah enzim L-asparaginase dapat dimurnikan secara parsial menggunakan metode pengendapan ammonium sulfat.
2. Untuk mengetahui persentase kejenuhan ammonium sulfat yang menghasilkan aktivitas enzim L-asparaginase tertinggi.
3. Untuk mengetahui apakah metode Nessler dapat digunakan untuk mendeteksi enzim L-asparaginase.

1.4 Manfaat

1. Melalui penelitian ini diharapkan dapat membuktikan bahwa metode pengendapan ammonium sulfat dapat dilakukan proses pemurnian parsial pada enzim L-asparaginase.
2. Pada penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang pemurnian enzim L-asparaginase dengan metode pengendapan ammonium sulfat.