

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Leukemia adalah penyakit keganasan pada jaringan hematopoietik yang didanai dengan penggantian elemen sumsum tulang normal dengan sel darah abnormal (neoplastik) (McKenzie, 1996; Rendra, Yaswir, dan Hanif, 2013). Pada penderita leukemia, terjadi transformasi dan proliferasi ganas pada sel progenitor limfoid di sumsum tulang, darah dan ekstrasmedular (Terwilliger dan Hay, 2017). Di samping itu leukemia merupakan penyebab kematian yang cukup tinggi pada anak-anak meskipun penyebabnya belum diketahui secara pasti (Sahid *et al.*, 2013). Menurut data *Global cancer observatory* (Globocan) (2018), kanker leukemia merupakan peringkat kelima yang menyebabkan kematian sekitar 5,5% penduduk di Indonesia. Pada data terakhir tahun 2018, tercatat kasus baru kanker leukemia sebanyak kurang lebih 13.500 pasien mengalami penyakit tersebut (Globocan, 2018). Berdasarkan historisnya, leukemia dibagi menjadi dua yaitu akut dan kronik. Yang membedakan keduanya adalah tingkat kematangan suatu sel. Pada leukemia akut, sel yang berproliferasi adalah sel yang belum matang (*immature*), sedangkan leukemia kronik terjadi pada sel matang (*mature*) yang berproliferasi (Leather dan Poon, 2008). Berdasarkan asal dan maturitas sel, leukemia dibagi menjadi empat kategori, yaitu Leukemia limfoblastik akut (LLA), leukemia mieloid akut (LMA), leukemia limfositik kronik (LLK), dan leukemia granulositik kronik (LGK) (Febyan, Wijaya, dan Hudyono, 2015; Myers, 2009; Launder, Lawnicki, dan Perkins, 2002). Leukemia limfoblastik akut berkontribusi sebagai jenis kanker anak terbanyak dan dapat menyerang berbagai jenis

kelamin dan tingkatan usia di dunia (Permano, 2006; Hossain, Xie, dan McCahan, 2014; LLS, 2014).

L-asparaginase merupakan salah satu agen terapi dalam pengobatan kanker pada sistem limfatik, *Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL)*, *Hodgkin's Lymphoma* dan melanosarkoma (Singh *et al.*, 2013). L-asparaginase bekerja dengan cara menghidrolisis asam amino L-asparagin (Asn) menjadi asam L-aspartat (Asp) dan amonia (Nguyen *et al.*, 2018). L-asparagin merupakan suatu asam amino non-esensial (Lehninger, 1990) yang dibutuhkan sel untuk melakukan sintesis protein dan pertumbuhan. Sel kanker dalam berproliferasi dan bertahan hidup sangat bergantung pada sumber L-asparagin. Pada sel penderita leukemia limfoblastik akut, jumlah asparagin sintetase terbatas, sehingga ketersediaan asparagin bergantung dari luar sel (Konecna, Kledjus, dan Hrstkova, 2004), sedangkan pada sel normal asparagin sintetase dapat bekerja secara normal menghasilkan asparagin (Lehninger, 1990). Dengan demikian adanya enzim L-asparaginase dalam tubuh akan menurunkan konsentrasi asparagin dalam darah. Penurunan konsentrasi asparagin mengakibatkan sel kanker tidak memperoleh asupan untuk sintesis protein dan jumlahnya menjadi terbatas. L-asparaginase akan bekerja mempercepat proses hidrolisis dari L-asparagin agar dapat menghambat proliferasi dari sel kanker tersebut (Thangavel *et al.*, 2013). Dengan demikian, pertumbuhan sel kanker akan terhambat dan terjadi kematian sel kanker. Aktivitas yang dihasilkan oleh enzim L-asparaginase tidak mengganggu pada sel normal, karena sel normal dapat menghasilkan enzim asparagin sintetase dalam jumlah yang semestinya, sehingga kebutuhan asparagin akan dapat dipenuhi oleh sel normal itu sendiri (Lehninger, 1990).

L-asparaginase dapat ditemui pada jaringan hewan, tumbuhan, serta mikroorganisme (bakteri, fungi, dan khamir) (Talluri *et al.*, 2014). Biasanya

enzim L-asparaginase dapat diperoleh menggunakan bahan alam berupa simplisia, ekstrak maupun fraksi. Indonesia merupakan negara tropis yang memiliki keanekaragaman hayati, sehingga berpotensi besar dalam memperoleh L-asparaginase dari tumbuhan. Bahan alam yang pernah digunakan adalah rimpang temulawak (Puspitasari dan Wuryanti, 2010). Namun pada kenyataannya, penggunaan bahan alam memiliki beberapa kelemahan yaitu memerlukan bagian tanaman dengan jumlah yang cukup banyak untuk memperoleh sejumlah simplisia yang dibutuhkan. Sementara beberapa tanaman hanya tumbuh pada waktu tertentu saja yang dapat menghambat proses ekstraksi dan fraksinasi. Hal ini yang menjadi pertimbangan pada penelitian sebelumnya untuk menemukan alternatif lain yang dapat digunakan untuk menghasilkan enzim L-asparaginase. Alternatif lain seperti yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya, yaitu Winarto (2017) menggunakan mikroba endofit. Mikroba endofit adalah organisme hidup yang berukuran mikroskopis (bakteri dan jamur) yang hidup di dalam jaringan tanaman (*xylem* dan *phloem*), daun, akar, buah, dan batang (Simarmata, Lekatompessy, dan Sukiman, 2007; Verma *et al.*, 2007).

Beberapa mikroba endofit dapat menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif sebagai senyawa metabolit sekunder yang memiliki daya antimikroba, antimalaria, antikanker dan sebagainya. Menurut Tan dan Zou (2001), mikroba endofit memang dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang karakternya mirip atau sama dengan inangnya. Hal ini dikarenakan adanya pertukaran genetik yang terjadi antara inang dan mikroba endofit secara evolusioner. Mikroba endofit memiliki kemampuan untuk menghasilkan senyawa yang sama dengan inangnya, sehingga dapat digunakan sebagai sumber penghasil senyawa pengganti inangnya. Mikroba endofit yang didapat tentunya dapat diperbanyak setiap saat dan dapat digunakan sebagai stok kultur yang dapat disimpan dalam jangka waktu

yang lama. Keunggulan lain dalam pemanfaatan mikroba endofit yaitu mikroba endofit memiliki siklus hidup yang relatif lebih singkat dibandingkan dengan tumbuhan inangnya dan dapat diproduksi dalam skala besar (Tan dan Zou, 2001). Enzim L-asparaginase yang dihasilkan oleh organisme eukariotik seperti fungi memiliki reaksi pemicu alergi yang lebih rendah. Hal tersebut disebabkan kedekatan filogenik antara kedua organisme (fungi dan manusia) yang memiliki struktur protein yang mirip. Kemiripan inilah yang membuat tidak dikenali sebagai antigen oleh tubuh (Kumar dan Shoba, 2012). Menurut Doriya dan Kumar (2016), mikroorganisme eukariotik dalam menghasilkan enzim yang kompatibel dengan sistem kekebalan tubuh manusia karena kedekatannya secara evolusi, serta memiliki farmakokinetik yang lebih baik dan efek samping yang lebih rendah. Adapun fungi endofit (kapang) yang telah dilaporkan sebagai penghasil L-asparaginase adalah *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Curvularia sp* (Cachumba *et al.*, 2016).

Berdasarkan tingkat alergi kapang (fungi) yang lebih rendah, maka pada penelitian sebelumnya (Winarto, 2017) telah diisolasi 11 fungi endofit dari daun tomat (*Lycopersicum esculentum* Mill.). Keuntungan lainnya adalah produksi enzim secara ekstraseluler dianggap lebih menguntungkan dan disukai daripada tipe intraseluler karena akumulasi protein yang lebih tinggi dan ekstraksinya mudah. Ke-11 isolat fungi endofit ini menghasilkan enzim L-asparaginase secara ekstraselular, sehingga fungi endofit dapat menjadi sumber yang potensial untuk L-asparaginase. Berdasarkan penelitian sebelumnya (Winarto, 2017) diperoleh 11 fungi endofit yang dapat menghasilkan enzim L-asparaginase, salah satunya adalah Genus *Rhizopus*. Dari ke-11 isolat fungi endofit tersebut, dipilih isolat genus *Rhizopus* kode MC3-2B untuk diteliti lebih lanjut. Pemilihan genus *Rhizopus* dikarenakan penelitian menggunakan isolat jenis ini belum

banyak diketahui dan diteliti secara detail, serta genus *Rhizopus* dapat menghasilkan daerah berwarna merah muda pada media di sekitar pertumbuhan koloni (Doriya dan Kumar, 2016; Winarto, 2017). Hal tersebut menunjukkan terjadi hidrolisis substrat L-asparagin menjadi asam aspartat. Beberapa penelitian berupa skrining genus *Rhizopus* dapat menghasilkan enzim L-asparaginase, genus *Rhizopus* memiliki pertumbuhan yang unik. Pertumbuhan genus *Rhizopus* berbeda dengan pertumbuhan fungi endofit lainnya, karena pertumbuhan koloninya menyebar. Pertumbuhan koloni yang menyebar menunjukkan zona index yang cenderung kecil, namun aktivitas enzimnya belum tentu memberikan hasil yang sebanding dengan skrining. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang aktivitas enzim L-asparaginase yang dihasilkan dari fungi endofit genus *Rhizopus*. Penelitian lain juga pernah dilakukan oleh Doriya dan Kumar (2016) tentang isolasi dan skrining enzim L-asparaginase, L-glutaminase dan urease yang berasal dari spesies fungi. Hasil penelitian tersebut menunjukkan terdapat genus *Rhizopus* yang digunakan dengan kode yang berbeda memberikan hasil yakni keduanya menghasilkan enzim L-asparaginase tidak mengandung L-glutaminase dan urease, sedangkan Raj *et al.* (2016) menyebutkan bahwa pada genus *Rhizopus* dapat menghidrolisis enzim L-asparaginase dan L-glutaminase. Hal tersebut menjadi dasar dilakukan skrining L-glutaminase untuk mengetahui pada genus *Rhizopus* yang digunakan dalam penelitian ini terdapat L-glutaminase atau tidak. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui karakter enzim L-asparaginase dari genus *Rhizopus* agar dapat dimanfaatkan lebih optimal.

Penelitian ini merupakan gabungan data hasil penelitian dan kajian literatur. Data hasil penelitian merupakan data yang diperoleh melalui hasil kerja di laboratorium FF UKWMS. Kajian literatur merupakan data hasil

penelitian yang berasal dari jurnal-jurnal penelitian terkait tahapan yang belum dilakukan selama pdanemi COVID-19. Pada tahapan penelitian penentuan kurva pertumbuhan dan produksi enzim L-asparaginase menggunakan data hasil penelitian yang diperoleh dari data hasil di laboratorium. Pada pengamatan kurva pertumbuhan digunakan pengamatan bobot isolat fungi terhadap waktu, sedangkan pada penentuan kurva produksi dilakukan pengamatan terhadap jumlah produksi aktivitas enzim L-asparaginase terhadap waktu. Hal tersebut bertujuan mengetahui waktu terbaik, dalam melakukan produksi enzim L-asparaginase. Kemudian skrining enzim L-glutaminase dari isolat fungigenus *Rhizopus*. Enzim L-asparaginase dan L-glutaminase memiliki struktur enzim yang hampir sama. Adanya L-glutaminase dapat menyebabkan terjadinya efek samping. Apabila genus *Rhizopus* dapat menghasilkan enzim L-glutaminase, maka kdanungan L-glutaminase tidak perlu untuk dihilangkan. Kdanungan L-glutaminase dapat dipastikan tidak mengganggu pengamatan dengan cara mengatur substrat yang digunakan pada reaksi enzimatisnya. Perlu dilakukan skrining aktivitas saat karakterisasi isolat fungi endofit dikarenakan adanya aktivitas L-glutaminase dapat menyebabkan efek samping yang beragam selama terapi antara lain alergi, pankreatitis, diabetes, dan kelainan koagulasi (Saxena, Upaydhyay dan Kango, 2015). Tahap penelitian selanjutnya adalah menggunakan data hasil kajian literatur karakterisasi enzim L-asparaginase dengan cara menentukan kondisi optimum enzim berupa pH, suhu, serta kestabilan enzim L-asparaginase terhadap pengaruh pH dan suhu. Tujuan dilakukan karakterisasi enzim L-asparaginase untuk mengetahui kondisi optimum serta kestabilan aktivitas enzim L-asparaginase dari fungi endofit genus *Rhizopus*. Penentuan kondisi optimum enzim L-asparaginase menggunakan metode Nessler dengan cara menentukan jumlah ammonia yang terbentuk selama hidrolisis L-asparagin

oleh L-asparaginase (Labrou, 2019). Aktivitas enzim dihentikan dengan penambahan asam trikloroasetat (Jain *et al.*, 2011). Hames dan Hooper (2005) menyatakan bahwa terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim yakni pH dan suhu. Enzim dapat bermuatan positif, negatif ataupun bermuatan gdana (*zwitter ion*). Pengaruh perubahan pH lingkungan akan sangat berpengaruh pada sisi aktif dari enzim karena L-asparaginase cenderung lebih stabil pada kondisi alkali daripada asam yang mempengaruhi aktivitas L-asparaginase itu sendiri. Pada suhu optimum kecepatan reaksi enzimatis adalah maksimum. Pada suhu melewati suhu optimumnya dapat terjadi denaturasi enzim sehingga menurunkan kecepatan reaksi. Setiap enzim memiliki suhu dan pH optimum yang berbeda-beda karena enzim merupakan protein yang dapat mengalami perubahan bentuk atau bahkan kehilangan fungsi (terjadi kerusakan) jika terjadi perubahan pada suhu dan keasaman. Di luar suhu dan pH yang sesuai, enzim tidak dapat bekerja secara optimal atau strukturnya akan mengalami kerusakan (Ahira, 2011). Penelitian ini dilakukan dengan tujuan dapat menjadi proses tahapan penelitian selanjutnya, yakni purifikasi enzim L-asparaginase agar nantinya dapat digunakan untuk terapi LLA.

## **1.2 Rumusan Masalah**

- a. Bagaimana profil kurva pertumbuhan enzim L-asparaginase yang berasal dari isolat fungi endofit genus *Rhizopus* pada daun tanaman tomat?
- b. Bagaimana hasil skrining L-glutaminase dari isolat fungi endofit genus *Rhizopus* kode MC3-2B?

### **1.3 Pertanyaan Kajian Literatur**

- a. Bagaimana profil kurva produksi yang berasal dari fungi genus *Rhizopus*?
- b. Bagaimana karakter enzim L-asparaginase ditinjau dari pH optimum, suhu optimum serta kestabilan aktivitas enzim terhadap pH dan suhu yang berasal dari berbagai fungi?

### **1.4 Tujuan Penelitian**

- a. Mengetahui profil kurva pertumbuhan enzim L-asparaginase yang berasal dari isolat fungi endofit genus *Rhizopus* pada daun tanaman tomat berada pada fase dan waktu tertentu.
- b. Mengetahui isolat fungi endofit menghasilkan enzim selain L-asparaginase yakni L-Glutaminase.
- c. Mengetahui profil kurva produksi enzim L-asparaginase yang berasal dari isolat fungi endofit genus *Rhizopus* pada daun tanaman tomat berada pada fase dan waktu tertentu.
- d. Untuk mengetahui karakter dari enzim L-asparaginase yang berasal dari berbagai fungi berupa pH optimum, suhu optimum serta kestabilan aktivitas enzim terhadap pH dan suhu.

### **1.5 Hipotesis Penelitian**

- a. Kurva pertumbuhan enzim L-asparaginase yang berasal dari isolat fungi endofit genus *Rhizopus* pada daun tanaman tomat optimal pada fase stasioner saat waktu tertentu.
- b. Hasil skrining L-glutaminase dari isolat fungi endofit genus *Rhizopus* negatif.
- c. Kurva produksi enzim L-asparaginase dari genus *Rhizopus* berada saat fase stasioner pada waktu tertentu.

- d. Karakterisasi enzim L-asparaginase dari berbagai fungi berupa rentang pH optimum 6,0-7,0, rentang suhu optimum 30-40°C serta kestabilan enzim berada dalam rentang pH 6,0-8,0 dan suhu 30-40°C.

## **1.6 Manfaat Penelitian**

Menambah informasi ilmiah tentang kurva pertumbuhan dan kurva produksi dapat diketahui kondisi optimal pertumbuhan dan aktivitas terbesar enzim L-asparaginase. Serta dapat diketahui karakterisasi enzim L-asparaginase melalui pH optimum, suhu optimum, dan aktivitas enzim L-asparaginase yang berasal dari isolat fungi endofit MC3-2B, yang menjadi dasar dari aplikasi lebih lanjut dari enzim ini. Melalui karakteristik enzim yang telah diketahui, dapat dilakukan tahap selanjutnya, yaitu purifikasi enzim L-asparaginase.