

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Penyakit kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama di seluruh dunia. Pada tahun 2012, kanker menjadi penyebab kematian sekitar 8,2 juta orang. Berdasarkan data *GLOBOCA, International Agency for Research on Cancer (IARC)* diketahui bahwa pada tahun 2012 terdapat 14.067.894 kasus baru kanker dan 8.201.575 kematian akibat kanker setiap tahunnya (Kementerian Kesehatan RI, 2015).

Sistem Registrasi Kanker di Indonesia (Srikandi) tahun 2005-2007 dalam Kemenkes (2013) mencatat angka kejadian kanker pada anak (0-17 tahun) adalah 9 per 100.000 anak-anak dengan prevalensi leukemia (kanker tertinggi pada anak) adalah 2,8 per 100.000 anak-anak. Di Indonesia terdapat sekitar 11.000 kasus kanker anak setiap tahunnya, dan terdapat sekitar 650 kasus kanker anak di Jakarta, dan sepertiga dari kanker anak adalah leukemia (Kementerian Kesehatan RI, 2015).

Leukemia adalah kelainan darah ganas yang menyerang sel-sel pembentuk darah muda di sumsum tulang (Morrison & Charles, 2012). Leukemia adalah neoplasma yang berasal dari sel hepatik yang pada awalnya berproliferasi di sumsum tulang sebelum menyebar ke darah tepi, limpa, kelenjar limfe, dan akhirnya, jaringan lain. Sel leukemia yang berproliferasi menumpuk di sumsum tulang, menekan hematopoiesis normal dan akhirnya menyebabkan unsur normal tersingkir (Isselbacher, 1994).

Salah satu fase pengobatan pada kanker Leukemia Limfositik Akut (ALL) yaitu induksi. Induksi umumnya berlangsung selama 8 minggu dan

terdiri dari gabungan dari beberapa obat yang masing-masingnya bekerja dengan cara yang berbeda untuk membunuh sel-sel leukemia. Salah satu regimen induksi saat ini untuk ALL yaitu penggunaan Elspar (*L-asparaginase*) (Morrison & Charles, 2012).

Enzim L-asparaginase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis L-asparagin menjadi L-aspartat dan amonia. L-asparagin merupakan asam amino non-esensial (Lehninger, 1982) yang dibutuhkan untuk sintesis protein dan pertumbuhan. Jumlah asparagin sintetase pada pada sel penderita leukemia sangat terbatas, sehingga ketersediaan asparagin tergantung dari luar sel (Shrivastava *et al.*, 2009), sedangkan pada sel normal asparagin sintetase dapat bekerja secara normal menghasilkan asparagin. Adanya L-asparaginase pada tubuh akan mengakibatkan penurunan konsentrasi asparagin dalam darah sehingga asupan asparagin bagi sel kanker tersebut menjadi sangat terbatas dan sintesis protein pada sel tersebut akan terganggu yang pada akhirnya akan menghambat pertumbuhan sel kanker dan mengakibatkan kematian sel kanker tersebut. Aktivitas L-asparaginase tidak akan mengganggu sel normal, karena sel normal memiliki enzim asparagin sintetase dalam jumlah yang semestinya, sehingga kebutuhan asparagin akan dapat dipenuhi oleh sel normal itu sendiri (Lehninger, 1982).

Meskipun enzim L-asparaginase telah dihasilkan dari banyak sumber, penemuan sumber enzim dari berbagai organisme atau sumber baru lainnya memungkinkan dihasilkannya enzim L-asparaginase baru dengan karakteristik yang berbeda. Namun, sejauh ini hanya enzim L-asparaginase yang berasal dari *E.coli* dan *Erwinia chrysanthemi* yang diproduksi dalam skala industri. L-asparaginase yang berasal dari prokariotik dapat menyebabkan hipersensitivitas pada penggunaan jangka panjang, seperti reaksi alergi dan anafilaksis (Dias *et al.*, 2016). Dari

penelitian terdapat 30% individu yang mengalami reaksi alergi terhadap penggunaan Asparaginase dari *E.coli* sehingga beralih ke *Erwinia chrysanthemi* (Egler *et al.*, 2016). Efek samping seperti reaksi anafilaktoid terjadi pada anak-anak dengan leukemia dan limfoma ketika pemberian asparaginase dari *E.coli* dan *Erwinia*. Reaksi hipersensitivitas terjadi pada sekitar 60% pasien selama terapi L-asparaginase dari *E.coli*, bahkan dengan asparaginase *monomethoxypolyethylene glycol* (PEG), seperti reaksi alergi, syok anafilaksis, gangguan koagulasi, edema, ruam, bronkospasme dan juga dapat menyebabkan hepatotoksitas, pankreatitis, dan hiperglikemia (Shrivastava *et al.*, 2015).

Karena hal tersebut maka perlu adanya upaya mencari L-asparaginase dari mikroorganisme eukariotik untuk mengatasi permasalahan resistensi dan hipersensitivitas tersebut. Pada penelitian sebelumnya oleh Winarto (2017), telah berhasil diisolasi 11 fungi endofit dari tanaman daun tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) yang semuanya memiliki enzim L-asparaginase, yaitu kode isolat MC1 dengan genus dugaan *Fusarium*, EMC1-A *Aspergillus*, MC2 *Oidiodendron*, MC3-2A *Pythium*, MC3-2A1 *Aspergillus*, MC3-2A2 *Penicillium*, MC3-2B *Rhizopus*, MC4-1 *Chaetosphaeria*, MC4-2 *Phialophora*, MC5 *Mycocentrospora* dan PB2 *Fusarium*. Pada kode isolat MC3-2A2 dan PB2 (*Fusarium*) menunjukkan kemampuan memproduksi enzim L-asparaginase paling cepat yaitu setelah inkubasi selama 8 jam. Sejak awal inokulasi hingga pengamatan setelah inkubasi selama 32 jam, isolat PB2 memiliki nilai rasio *zone index* paling besar dibandingkan dengan isolat lainnya.

Penelitian yang dilakukan oleh Shrivastava *et al.*, (2010) menunjukkan bahwa enzim L-asparaginase dengan aktivitas (IU/ml) terbesar tidak berasal dari isolat yang memiliki rasio *zone indeks* terbesar,

tetapi isolat dengan rasio *zone indeks* terbesar ini menghasilkan enzim L-asparaginase dengan aktivitas yang tidak berbeda bermakna secara statistik dari enzim L-asparaginase dengan aktivitas terbesar. Atas dasar penelitian tersebut maka pada penelitian kali ini akan dilakukan pengamatan aktivitas spesifik mengenai enzim L-asparaginase yang terdapat pada isolat PB2 sehingga diharapkan mempunyai potensi yang besar sebagai antikanker, isolat PB2 akan diuji karakterisasinya lebih lanjut, yaitu mengenai aktivitas spesifik pada kondisi optimum, suhu optimum dan pH optimum. Juga akan ditentukan kurva pertumbuhan dan kurva produksi enzim L-asparaginase dari isolat PB2 untuk mengetahui waktu fermentasi optimum.

Penelitian ini diawali dengan melakukan optimasi terhadap fungsi endofit yang dihasilkan, yang kemudian akan dilakukan uji makroskopik, mikroskopik dan uji akktivitas enzim L-asparaginase. Uji aktivitas L-asparaginase dilakukan dengan menumbuhkan fungi endofit tersebut pada media Modified Czapek Dox's (MCD) Agar yang mengandung L-asparagin sebagai substrat. Daerah yang berwarna merah muda menunjukkan adanya L-asparaginase, karena suasana basa yang ditimbulkan dari terbentuknya amonia dari hasil hidrolisis L-asparagin karena media uji yang juga mengandung *phenol red*. Setelah itu dilanjutkan dengan menentukan kurva produksi L-asparaginase dengan memfermentasikan ke media Modified Czapek Dox's (MCD) tanpa agar, dan pada interval tertentu akan dilakukan sampling untuk diukur aktivitas enzim yang terbentuk selama proses fermentasi. Kemudian dilakukan karakterisasi pula terhadap enzim L-asparaginase yang meliputi pH optimum, suhu optimum, uji aktivitas spesifik, dan penentuan kadar protein dengan metode Bradford. NH_4Cl digunakan sebagai baku standar untuk uji aktivitas enzim.

Uji aktivitas enzim ditentukan dengan menggunakan metode Nessler, dengan mereaksikan enzim tersebut menggunakan substrat L-asparagin. Reaksi dihentikan dengan penambahan Asam Trikloroasetat. Filtrat kemudian ditambahkan akuades dan Nessler. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 450 nm (Imada *et al.*, 1973). Suhu optimum dan pH optimum ditentukan dengan cara menginkubasi campuran uji pada rentang suhu 25 sampai 50°C dan rentang pH 4 sampai 9, dilihat dengan mendeteksi aktivitas enzim pada setiap level (Patro *et al.*, 2012)

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana profil kurva pertumbuhan dan kurva produksi enzim L-Asparaginase yang berasal dari isolat fungi endofit PB2 genus *Fusarium* pada daun tomat (*Lycopersicum esculentum* Mill.)?
2. Berapakah suhu optimum dan pH optimum enzim L-Asparaginase yang berasal dari isolat fungi endofit PB2 genus *Fusarium* pada daun tomat (*Lycopersicum esculentum* Mill.)?
3. Bagaimana aktivitas spesifik enzim L-Asparaginase yang berasal dari isolat fungi endofit PB2 genus *Fusarium* pada daun tomat (*Lycopersicum esculentum* Mill.) pada kondisi optimum?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui profil kurva pertumbuhan dan kurva produksi enzim L-Asparaginase dari isolat fungi endofit PB2 genus *Fusarium* pada daun tomat (*Lycopersicum esculentum* Mill.)
2. Untuk mengetahui suhu optimum dan pH optimum enzim L-Asparaginase dari isolat fungi endofit PB2 genus *Fusarium* pada daun tomat (*Lycopersicum esculentum* Mill.).

3. Untuk mengetahui aktivitas spesifik enzim L-Asparaginase dari isolat fungi endofit PB2 genus *Fusarium* pada daun tomat (*Lycopersicum esculentum* Mill.) pada kondisi optimum.

1.4 Manfaat Penelitian

Pada penelitian kali ini diharapkan dapat mengetahui suhu optimum, pH optimum, aktivitas spesifik enzim L-Asparaginase dan kurva produksi enzim L-asparaginase dari isolat fungi endofit genus *Fusarium* yang diisolasi dari daun tomat (*Lycopersicum esculentum* Mill.) sehingga dapat dimanfaatkan untuk mengembangkan lebih lanjut enzim L-asparaginase dari fungi endofit genus *Fusarium* ini untuk kandidat bahan alternatif dalam terapi leukemia limfositik akut yang berbasis enzimatik.