

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Leukemia adalah suatu penyakit keganasan sel darah dimana terjadi proliferasi sel-sel darah putih dari sumsum tulang belakang sehingga dapat ditemukan adanya sel-sel abnormal dalam darah tepi. Sel-sel darah putih yang berproliferasi dengan tidak teratur dan tidak terkendali menyebabkan fungsinya pun menjadi tidak normal. Akibatnya fungsi-fungsi lain dari sel-sel darah normal menjadi terganggu dan menimbulkan gejala leukemia yang kita kenal (Dorland, 2012). Leukimia dapat diklasifikasikan menjadi 2 kelompok yaitu leukemia akut dan leukemia kronik. Pada leukemia akut, sel-sel darah putih yang berproliferasi merupakan sel darah yang belum matang (*immature*) sedangkan pada leukemia kronik, sel-sel darah putih yang berproliferasi merupakan sel darah yang lebih matang namun tidak sepenuhnya normal (DiPiro *et al.*, 2017).

Pada anak-anak leukemia akut terjadi hampir mencapai 80% dari semua kasus leukemia pada anak dan sekitar 20% lainnya menyerang pada dewasa. Leukemia akut terdiri dari dua tipe yaitu leukemia limfoblastik akut (LLA) sebanyak 82% dan leukemia mieloblastik akut (LMA) sebanyak 18% (Papadakis *and* McPhee, 2013). Leukimia limfoblastik akut terjadi ketika limfoblas mengalami kegagalan proses pematangan menjadi limfosit sehingga sebagian besar limfoblas tidak berubah menjadi limfosit. Dengan demikian limfoblas semakin banyak dan memenuhi sumsum tulang hingga kemudian keluar dari sumsum tulang belakang dan memasuki ke aliran darah. Sedangkan leukimia mieloblastik akut terjadi ketika myeloblast mengalami kegagalan proses pematangan menjadi mieloid. Salah satu terapi penunjang pada anak-anak yang terkena LLA adalah terapi induksi remisi

menggunakan vinkristin, kortikosteroid, dan L-asparaginase dan/atau antrasiklin (DiPiro *et al.*, 2017; Poermono dkk., 2006).

Dari beberapa obat-obat tersebut, L-asparaginase merupakan salah satu obat anti kanker yang berbasis enzimatis (Labrou, 2019). Pada sel normal, sel mampu mensintesis asam amino L-asparagin dengan bantuan enzim asparagin sintetase. Sel kanker tidak mampu mensintesis asam amino L-asparagin sehingga mensuplai dari ekstraseluler untuk bertahan hidup. Enzim L-asparaginase menurunkan konsentrasi L-asparagin, sehingga sel kanker mati akibat kekurangan suplai asam amino L-asparagin (Siddalingeshwara and Lingappa, 2011). Menurut penelitian Labrou (2019) terdapat 2 tipe asparaginase yaitu tipe I asparaginase murni (EC 3.5.1.1) dan tipe II glutaminase-asparaginase (EC 3.5.1.38). Tipe I asparaginase murni memiliki spesifitas tinggi terhadap substrat asparaginnya dan menghidrolisis menjadi asam aspartat dan ammonia dengan afinitas terhadap substrat milimolar. Pada tipe II glutaminase-asparaginase selain mampu menghidrolisis asparagin menjadi asam aspartat dan ammonia, juga mampu menghidrolisis glutamin menjadi asam glutamat serta ammonia pula dengan affinitas terhadap substrat mikromolar. Oleh karena itu pada L-asparaginase tipe II dapat diartikan bahwa L-asparaginase tipe II memiliki efisiensi tinggi untuk substrat yang pertama kali berikatan dengan enzim (Labrou, 2019). Menurut Chan *et al.* (2014) glutaminase memiliki aktivitas sebagai anti kanker yang terlihat dari ekspresi asparagin sintetase yang signifikan pada sel kanker, namun pada sel kanker yang tidak memiliki asparagin sintetase akan lebih tinggi aktivitas anti kankernya jika menggunakan anti kanker tunggal dari L-asparaginase tanpa glutaminase.

Dalam beberapa tahun terakhir ini, telah banyak dilakukan penelitian mengenai tanaman yang memiliki enzim L-asparaginase untuk dilakukan pengisolasian, pemurnian, amobilisasi dan karakterisasi enzim.

Seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Arpintasari, Wuryanti dan Rahmanto (2008), mereka melakukan pengisolasian enzim L-asparaginase dari 1 kg serbuk rimpang kunyit putih (*Curcuma manga* Vall). Penelitian serupa dilakukan pula oleh Puspita dan Wuryanti (2010) dengan melakukan pengisolasian enzim L-asparaginase dari 1 kg serbuk rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). Kekurangan dari penelitian tersebut adalah diperlukan tanaman dalam jumlah besar untuk memperoleh sejumlah enzim yang dianggap cukup. Padahal, tidak semua jenis tanaman dapat tumbuh sepanjang tahun dan tanaman memiliki siklus hidup yang relatif lebih panjang. Salah satu alternatif yang digunakan untuk mengatasi permasalahan ini adalah dengan menggunakan mikroba endofit (Kumala, 2014).

Mikroba endofit mempunyai peluang yang besar untuk dikembangkan karena organisme renik yang hidup di dalam tanaman (atau inang yang lain) ini dapat menghasilkan metabolit sekunder yang sama dan mirip seperti inangnya. Mikroba endofit mampu menghasilkan metabolit sekunder karena terjadinya transfer genetik dari tanaman ke mikroba yang hidup di dalamnya. Penelitian lain melaporkan bahwa bakteri endofit mampu menghasilkan berbagai enzim termasuk silanase, amilase, dan selulase, serta zat yang mengatur pertumbuhan tanaman. Dengan memanfaatkan bakteri, kapang atau khamir yang diisolasi dari daun, batang, akar atau bagian lain dari tanaman obat, tidak perlu lagi digunakan bagian tanaman dalam jumlah besar, sehingga tak perlu lagi menebang tanaman aslinya untuk penyediaan simplisia karena untuk memperoleh mikroba endofit penghasil senyawa bioaktif hanya diperlukan sejumlah kecil bagian tanaman (Kumala, 2014).

Salah satu mikroba endofit yang dapat digunakan untuk bahan baku obat berupa enzim adalah fungi (Kumala, 2014). Fungi merupakan

suatu mikroorganisme eukariotik yang tergolong dalam fungi berfilamen dan multiseluler. Fungi endofit dapat ditemukan di semua spesies dari tanaman. Selain mudah dalam memperoleh dari tanaman inangnya, metabolit sekunder yang dihasilkan oleh fungi pada umumnya akan disekresikan keluar dari tubuhnya menuju lingkungan sekitar (Talaro *and* Chess, 2012). Sifat inilah juga yang akan membantu memudahkan dalam pengamatan dan produksi enzim tersebut sehingga dapat dengan mudah memperoleh ekstrak kasar enzim L-asparaginase dari media pertumbuhan fungi endofit. Menurut Keating *et al.* (1993) enzim L-asparaginase yang bersumber dari bakteri *E. coli* dan *Erwinia carotovora* saat ini banyak digunakan untuk terapi limfoblastik leukemia akut. Enzim L-asparaginase dapat diproduksi dari mikroorganisme prokariotik dan eukariotik, namun L-asparaginase yang berasal dari prokariotik dapat menyebabkan hipersensitivitas pada penggunaan jangka panjang, seperti reaksi alergi dan anafilaksis (Reynold and Taylor, 1993). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa mikroorganisme eukariotik seperti kapang dan khamir memiliki potensi sebagai sumber L-asparaginase (Wade, Robinson and Philips, 1971).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Winarto (2017), telah diisolasi sebelas fungi endofit dari daun segar tanaman tomat (*Lycopersicum esculentum* Mill.). Sebelas isolat fungi endofit ini telah dilakukan uji skrining aktivitas enzim L-asparaginase dan diperoleh hasil positif memiliki aktivitas enzim L-asparaginase. Salah satu dari sebelas endofit fungi yang memiliki aktivitas enzim L-asparaginase adalah endofit fungi dengan kode MC2 dan diduga genus *Oidiodendron*. Fungi endofit ini merupakan fungi dengan urutan kelima terbesar daerah rasio hidrolisisnya, yaitu >2,73. Selain itu isolat endofit fungi ini memiliki kelebihan dalam pertumbuhan dimana pertumbuhan endofit ini cukup cepat dibandingkan dengan endofit

lainnya yaitu pada 8 jam pertama diameter kapang telah mencapai 1,62 mm sedangkan fungi endofit lainnya berkisar 1,07-1,44 mm pada 8 jam pertama (Winarto, 2017). Menurut Kumala (2014) pembentukan metabolit sekunder dibentuk setelah fase pertumbuhan sempurna, sehingga jika pertumbuhan endofit cepat maka akan cepat pula metabolit enzim yang terbentuk dan produksi enzim dapat dilakukan dalam waktu yang singkat. Untuk memperoleh produksi enzim dalam kondisi paling optimum maka perlu diketahui beberapa karakteristik enzim L-asparaginase seperti ada tidaknya aktivitas enzim L-glutaminase, waktu produksi enzim L-asparaginase, pH optimum, suhu optimum, dan kestabilan enzim terhadap pengaruh pH dan suhu.

Pada penelitian ini, pertama akan dilakukan penentuan kurva pertumbuhan dan kurva produksi enzim L-asparaginase menggunakan fungi endofit MC2 yang diambil dari stok fungi di dalam parafin. Tujuan dari penentuan kurva pertumbuhan ini untuk mengetahui profil kurva pertumbuhan fungi endofit MC2 dalam kurun waktu tertentu. Sedangkan tujuan dari penentuan kurva produksi adalah untuk mengetahui profil kurva jumlah enzim L-asparaginase yang dihasilkan oleh fungi endofit selama pertumbuhannya dalam kurun waktu tertentu. Info ini selanjutnya akan bermanfaat untuk menentukan waktu panen enzim untuk produksi dan pengembangan enzim lebih lanjut. Selain itu dilakukan juga karakterisasi enzim L-asparaginase dari fungi endofit MC2 yaitu penentuan pH optimum, suhu optimum, dan kestabilan enzim terhadap pengaruh pH dan suhu. Penentuan pH, suhu, dan kestabilan ini menggunakan prinsip pengujian aktivitas enzim L-asparaginase yang dilakukan dengan metode penetapan Nessler secara langsung. Metode ini dipilih karena merupakan metode yang paling sederhana dalam menentukan aktivitas enzim L-asparaginase yaitu dengan menentukan jumlah ammonia ( $\text{NH}_3$ ) yang terbentuk selama proses

hidrolisis substrat L-asparagin oleh enzim L-asparaginase. Reaksi hidrolisis ini lalu akan dihentikan reaksinya menggunakan asam trikloroasetat (TCA) sehingga tergolong dalam metode penentuan aktivitas enzim secara *stop method* (Labrou, 2019). Menurut Zhao *et al.* (2019) dalam penelitiannya menggunakan metode Nessler, hasil yang diperoleh mendekati nilai konsentrasi ammonia sebenarnya dan juga dapat digunakan pada larutan dengan pH asam, netral dan alkali. Selain itu penelitian ini juga merupakan penelitian dalam bentuk kelompok sehingga diperlukan metode analisa yang sama di dalam satu kelompok fungi endofit. Jika melihat sifat dari fungi endofit yang mensekresikan metabolit sekunder keluar dari tubuhnya menuju lingkungan sekitar, maka besar kemungkinan metode ini akan sangat efektif dalam melakukan karakterisasi enzim L-Asparaginase. Karakterisasi ini dilakukan dengan harapan dapat diketahui keadaan paling optimum mengenai pH optimum, suhu optimum, dan kestabilan enzim L-asparaginase dari fungi endofit MC2 terhadap pengaruh pH dan suhu. Dengan diketahuinya pH optimum, suhu optimum, dan kestabilan enzim terhadap pengaruh pH dan suhu maka proses pengembangan enzim pada tahap selanjutnya seperti proses pemurnian enzim dapat dilakukan.

Wabah pandemi Covid-19 yang terjadi di Indonesia khususnya di daerah Surabaya membuat tidak memungkinkannya dilakukan penelitian secara langsung di laboratorium sehingga diperlukan metode lain untuk tetap dapat menentukan kemungkinan profil kurva produksi enzim L-asparaginase, pengujian aktivitas spesifik dari enzim L-asparaginase, dan karakterisasi enzim L-asparaginase dari fungi endofit. Oleh karena itu metode yang dapat digunakan yaitu kajian ulang literatur. Di dalam metode ini dilakukan pencarian, pengumpulan, analisa dan evaluasi data-data yang berasal literatur sekunder. Kajian ulang literatur ini diharapkan dapat memberikan kajian yang lengkap mengenai profil kurva produksi enzim L-

asparaginase, uji aktivitas enzim L-asparaginase dan karakteristik enzim L-asparaginase meliputi pH optimum, suhu optimum dan kestabilan enzim L-asparaginase terhadap pengaruh pH dan suhu sehingga dapat menjadi dasar literatur pada penelitian berikutnya

## **1.2 Rumusan Masalah**

- a. Apakah fungi endofit MC2 genus *Oidiodendron* yang telah diisolasi dari daun segar tanaman tomat (*Lycopersicum esculentum* Mill.) menghasilkan aktivitas enzim L-glutaminase?
- b. Bagaimana profil kurva pertumbuhan fungi endofit MC2 genus *Oidiodendron* yang telah diisolasi dari daun segar tanaman tomat (*Lycopersicum esculentum* Mill.)?

## **1.3 Pertanyaan Kaji Ulang Literatur**

- a. Bagaimana kurva produksi enzim L-asparaginase dari fungi endofit?
- b. Bagaimana karakteristik enzim L-asparaginase dari fungi endofit yaitu berupa pH optimum dan suhu optimum aktivitas enzim L-asparaginase serta kestabilan aktivitas enzim terhadap pengaruh pH dan suhu?

## **1.4 Tujuan Penelitian**

- a. Untuk mengetahui ada atau tidak adanya aktivitas enzim L-glutaminase yang dihasilkan oleh fungi endofit MC2 genus *Oidiodendron* yang telah diisolasi dari daun segar tanaman tomat (*Lycopersicum esculentum* Mill.)

- b. Untuk mengetahui profil kurva pertumbuhan fungi endofit MC2 genus *Oidiodendron* yang telah diisolasi dari daun segar tanaman tomat (*Lycopersicum esculentum* Mill.).
- c. Untuk mengetahui profil kurva produksi enzim L-asparaginase dari fungi endofit berdasarkan kajian ulang literatur yang dilakukan.
- d. Untuk mengetahui karakteristik enzim L-asparaginase dari fungi endofit yaitu berupa pH optimum dan suhu optimum aktivitas enzim L-asparaginase serta kestabilan aktivitas enzim terhadap pengaruh pH dan suhu berdasarkan kajian ulang literatur yang dilakukan.

### **1.5 Hipotesis Penelitian**

- a. Fungi endofit MC2 genus *Oidiodendron* yang telah diisolasi dari daun segar tanaman tomat (*Lycopersicum esculentum* Mill.) tidak menghasilkan aktivitas enzim L-glutaminase.
- b. Profil kurva pertumbuhan fungi endofit MC2 genus *Oidiodendron* yang telah diisolasi dari daun segar tanaman tomat (*Lycopersicum esculentum* Mill.) mengikuti fase-fase pertumbuhan sesuai teori pertumbuhan mikroorganisme.

### **1.6 Manfaat Penelitian**

- a. Pada penelitian secara langsung di laboratorium ini diharapkan karakteristik fungi endofit genus *Oidiodendron* yang telah diisolasi dari daun segar tanaman tomat (*Lycopersicum esculentum* Mill.) seperti ada tidaknya aktivitas enzim L-glutaminase dan profil kurva pertumbuhan fungi endofit dapat ditentukan, sehingga proses-proses pada tahap selanjutnya seperti profil kurva produksi enzim,



uji aktivitas enzim, karakteristik enzim hingga pemurnian enzim L-asparaginase dapat dilakukan.

- b. Pada kaji ulang literatur ini diharapkan dapat memberikan kajian yang lengkap mengenai profil kurva produksi enzim L-asparaginase, uji aktivitas enzim L-asparaginase dan karakteristik enzim L-asparaginase meliputi pH optimum, suhu optimum dan kestabilan enzim L-asparaginase terhadap pengaruh pH dan suhu sehingga dapat menjadi dasar literatur pada penelitian berikutnya.