

**KARAKTERISASI ENZIM L-ASPARAGINASE DARI
ISOLAT MC1A FUNGI ENDOFIT GENUS
ASPERGILLUS**



**ERIKE AVERINA IRAWAN LIMANTO
2443016035**

**PROGRAM STUDI S1
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS KATOLIK WIDYA MANDALA SURABAYA
2020**

**KARAKTERISASI ENZIM L-ASPARAGINASE DARI ISOLAT
MC1A FUNGI ENDOFIT GENUS ASPERGILLUS**

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi sebagian persyaratan
memperoleh gelar Sarjana Farmasi program Studi Strata 1
di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya

OLEH:

ERIKE AVERINA IRAWAN LIMANTO

2443016035

Telah disetujui pada tanggal 06 Juli 2020 dan dinyatakan LULUS

Pembimbing I,



Dr. F. V. Lanny Hartanti, S.Si., M.Si.
NIK. 241.00.0437

Pembimbing II,



Lisa Soegianto, S.Si.,M.Sc.,Apt.
NIK. 241.07.0609

Mengetahui,
Ketua Penguji



Prof. Dr. J.S. Ami Soewandi, Apt.
NIK. 241.02.0542

**LEMBAR PERSETUJUAN
PUBLIKASI KARYA ILMIAH**

Demi perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui skripsi/karya ilmiah saya, dengan judul: **Karakterisasi Enzim L-Asparaginase dari Isolat MC1A Fungi Endofit Genus Aspergillus** untuk dipublikasikan atau ditampilkan di internet atau media lain yaitu *Digital Library* Perpustakaan Unika Widya Mandala Surabaya untuk kepentingan akademik sebatas sesuai dengan Undang-Undang Hak Cipta.

Demikian pernyataan persetujuan publikasi karya ilmiah ini saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 06 Juli 2020



Erike Averina I. L.
2443016035

Saya menyatakan dengan sesungguhnya bahwa hasil tugas akhir ini adalah benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri. Apabila di kemudian hari diketahui bahwa skripsi ini merupakan hasil plagiarisme, maka saya bersedia menerima sanksi berupa pembatalan kelulusan dan atau pencabutan gelar yang saya peroleh.

Surabaya, 06 Juli 2020



Erike Averina I. L.
2443016035

ABSTRAK

KARAKTERISASI ENZIM L-ASPARAGINASE DARI ISOLAT MC1A FUNGI ENDOFIT GENUS ASPERGILLUS

ERIKE AVERINA IRAWAN LIMANTO
2443016035

L-Asparaginase telah dimanfaatkan dalam pengobatan Leukemia Limfoblastik Akut (LLA). Namun, L-Asparaginase dari *guinea pig serum* dan bakteri endofit memiliki kekurangan dari segi efisiensi maupun keamanan. Fungi endofit *Aspergillus* kode MC1A digunakan sebagai sumber enzim karena terbukti menghasilkan L-Asparaginase dalam waktu singkat dibandingkan isolat lain. Penelitian ini bertujuan mengkarakterisasi L-Asparaginase dengan menentukan profil kurva pertumbuhan dan kurva produksi, aktivitas spesifik pada suhu dan pH optimum, stabilitas suhu dan pH, serta skrining L-Glutaminase. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode Nessler. Profil kurva pertumbuhan dan kurva produksi optimal pada rentang 32-48 jam dan 120 jam. Berdasarkan hasil kajian literatur, L-Asparaginase dari *Aspergillus* memiliki suhu optimum pada 35 °C dan pH optimum pada pH 6 dengan aktivitas spesifik sebesar 6,59 U/mg. Aktivitas enzim dipertahankan 100% terhadap kontrol pada suhu inkubasi 70 °C dan pH 8.

Kata kunci: L-Asparaginase, *Aspergillus*, kurva produksi, aktivitas spesifik, stabilitas.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF L-ASPARAGINASE ENZYME FROM MC1A ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATES OF GENUS ASPERGILLUS

**ERIKE AVERINA IRAWAN LIMANTO
2443016035**

L-Asparaginase has been utilized in the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). However, L-Asparaginase from *guinea pig serum* and endophytic bacteria have deficiencies in terms of both efficiency and safety. *Aspergillus* endophytic fungi MC1A is used as the source of enzyme because it is proven to produce L-Asparaginase in a short time compared to other isolates. The aims of this study are to characterize L-Asparaginase by specifying the profile of the growth curve and production curve, specific activities at optimum temperature and pH, temperature and pH stability, and L-Glutaminase screening. The method used in this study was the Nessler method. The growth curve and production curve profiles were optimal in the range of 32-48 hours and 120 hours. Based on the literature study results, L-Asparaginase from *Aspergillus* has the optimum temperature at 35 °C and optimum pH at pH 6 with a specific activity of 6.59 U/mg. Enzyme activity is maintained 100% towards the control at incubation temperature 70 °C and pH 8.

Keywords: L-Asparaginase, *Aspergillus*, production curve, specific activity, stability.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya, sehingga skripsi dengan judul **“Karakterisasi Enzim L-Asparaginase dari Isolat MC1A Fungi Endofit Genus Aspergillus”** dapat terselesaikan. Penyusunan skripsi ini dimaksudkan untuk memenuhi persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini dapat diselesaikan dengan bimbingan, bantuan serta dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan terima kasih sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah membantu proses pembuatan naskah skripsi ini, khususnya kepada :

1. Tuhan Yesus Kristus atas penyertaan dan berkat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. Dr. F.V. Lanny Hartanti, S.Si., M.Si. dan Lisa Soegianto, S.Si., M.Sc., Apt. selaku dosen pembimbing atas saran, nasihat, semangat, kesabaran dan waktu yang telah diluangkan untuk mendampingi penulis selama proses pengerjaan dan penyusunan naskah skripsi ini.
3. Prof. Dr. J.S. Ami Soewandi, Apt. dan Henry Kurnia Setiawan, S.Si., M.Si., Apt. selaku tim penguji skripsi atas saran yang diberikan guna penyempurnaan skripsi ini.
4. Drs. Kuncoro Foe, G.Dip.Sc., Ph.D., Apt selaku Rektor Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya atas kesempatan yang diberikan untuk menempuh pendidikan di Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.

5. Sumi Wijaya, S.Si., Ph.D., Apt selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya atas kesempatan yang diberikan untuk menempuh pendidikan di Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.
6. Catherine Caroline, S.Si., M.Si., Apt. dan Senny Yesery Esar, S.Si., M.Si., Apt. selaku penasihat akademik yang telah memberikan dukungan, masukan, motivasi, dan pengarahan dari awal hingga akhir masa studi kepada penulis.
7. Papa Hendri Sepudi, Mama Laurensia, Kakak Dionisius Reyhan yang telah menyayangi, mendampingi, mendoakan dan memberikan dukungan bagi penulis.
8. Dosen-dosen dan staf pengajar yang tidak dapat disebutkan satu per satu, atas ilmu pengetahuan, keahlian dan pengalaman yang telah diberikan.
9. Laboran di laboratorium penelitian, laboratorium bioanalisis, laboratorium steril, dan laboratorium mikrobiologi yang telah membantu selama proses pengerjaan penelitian ini.
10. Teman-teman seperjuangan endofit-enzim Refos Junio, Elisabeth, Yoanita, Ricky.
11. Winda Winarto, Seviyana Bestari, Fransisca Risza Regar yang membantu dalam memberi masukan atas penelitian ini.
12. Teman-teman “FAL2YSEDN”, Lidya Cynthia, Yusanti Agustina, Nisrina Dea, Natalia Margaretha, Yohana Larasati, Fani Christina, Sindhy Dewi, Ayu Febriani, serta teman-teman FF 2016 yang telah berjuang bersama dan senantiasa memberikan semangat untuk menyelesaikan penelitian ini.

Akhir kata, sangat disadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Skripsi ini saya persembahkan kepada almamater tercinta Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya. Semoga skripsi ini dapat memberikan sumbangan yang bermanfaat bagi masyarakat pada umumnya dan bagi perkembangan ilmu kefarmasian pada khususnya.

Surabaya, Juni 2020

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I : PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	9
1.3 Pertanyaan Kajian Literatur	9
1.4 Tujuan Penelitian	9
1.5 Hipotesis Penelitian	10
1.6 Manfaat Penelitian	10
BAB II : TINJAUAN PUSTAKA	11
2.1 Tinjauan tentang Enzim L-Asparaginase	11
2.1.1 Struktur Enzim L-Asparaginase	13
2.1.2 Klasifikasi Enzim L-Asparaginase Berdasarkan <i>Enzyme Commission Number</i>	15
2.1.3 Klasifikasi Umum Enzim L-Asparaginase	16
2.1.4 Produksi L-Asparaginase secara Komersial	17
2.2 Tinjauan Tentang Mikroba Endofit	17
2.3 Tinjauan tentang Aspergillus	18
2.4 Tinjauan tentang Identifikasi Fungi Endofit dan Uji Biokimia	19

	Halaman
2.5	Karakterisasi Enzim L-Asparaginase 21
2.5.1	Sumber L-Asparaginase 21
2.5.2	Aktivitas Enzim 23
2.5.3	Metode Uji Aktivitas Enzim dengan Penetapan Nessler Langsung (<i>Direct Nesslerization Assay</i>) 26
2.5.4	Kurva Produksi 27
2.5.5	Kurva Pertumbuhan Mikroorganisme 28
2.6	Tinjauan tentang Enzim L-Glutaminase 29
2.6.1	Klasifikasi Enzim L-Glutaminase 29
2.6.2	Aktivitas Enzim L-Glutaminase 30
BAB III : METODOLOGI PENELITIAN 33	
3.1	Jenis Penelitian 33
3.2	Bahan dan Alat Penelitian 34
3.2.1	Bahan Penelitian 34
3.2.2	Alat Penelitian 36
3.3	Metode Penelitian 36
3.3.1	Penelitian di Laboratorium 36
3.3.2	Kajian Literatur 37
3.4	Variabel Penelitian 39
3.4.1	Penentuan Kurva Produksi dan Kurva Pertumbuhan 39
3.4.2	Penentuan pH Optimum 39
3.4.3	Penentuan Suhu Optimum 39
3.4.4	Penentuan Stabilitas pH 40
3.4.5	Penentuan Stabilitas Suhu 40
3.5	Tahapan Penelitian 40
3.5.1	Pembuatan Media Peremajaan dan Media Uji 41

	Halaman
3.5.2	Pembuatan Buffer Universal 42
3.5.3	Pembuatan Kurva Baku NH ₄ Cl 43
3.5.4	Pembuatan Reagen Bradford 44
3.5.5	Pembuatan Reagen Nessler 44
3.5.6	Optimasi Isolat Fungi Endofit 44
3.5.7	Karakterisasi Isolat Fungi Endofit MC1A 45
3.5.8	Penentuan Kurva Pertumbuhan dan Kurva Produksi Enzim L-Asparaginase pada Isolat Fungi Endofit MC1A 48
3.5.9	Uji Aktivitas Enzim L-Asparaginase 48
3.5.10	Penentuan pH Optimum 49
3.5.11	Penentuan Suhu Optimum 50
3.5.12	Penentuan Stabilitas pH Enzim 51
3.5.13	Penentuan Stabilitas Suhu Enzim 51
3.5.14	Penentuan Kurva Standar Protein 52
3.5.15	Penentuan Kadar Protein Ekstrak Kasar Enzim L-Asparaginase 53
3.5.16	Penentuan Aktivitas Spesifik pada Kondisi Optimum dan Stabilitas Enzim 53
3.5.17	Skrining Enzim L-Glutaminase 53
3.5.18	Kajian Literatur 54
3.6	Analisa Data 54
3.6.1	Validasi Isolat Fungi Endofit 54
3.6.2	Kurva Produksi Enzim dan Kurva Pertumbuhan Isolat Fungi 55
3.6.3	Penentuan Kadar Protein 56
3.6.4	Aktivitas Spesifik Enzim pada Penentuan Kondisi Optimum dan Stabilitas Enzim 56

	Halaman
3.7 Skema Kerja	59
BAB IV : HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	60
4.1 Hasil Penelitian	60
4.1.1 Karakterisasi Isolat Fungi Endofit Genus Aspergillus Kode Isolat MC1A	60
4.1.2 Kurva Baku NH ₄ Cl	66
4.1.3 Kurva Pertumbuhan dan Kurva Produksi Enzim L-Asparaginase Fungi Endofit	68
4.1.4 pH Optimum L-Asparaginase dari Fungi Endofit Aspergillus	71
4.1.5 Suhu Optimum L-Asparaginase dari Fungi Endofit Aspergillus	72
4.1.6 Stabilitas pH terhadap L-Asparaginase dari Fungi Endofit Aspergillus	72
4.1.7 Stabilitas Suhu terhadap L-Asparaginase dari Fungi Endofit Aspergillus	73
4.1.8 Aktivitas Spesifik L-Asparaginase dari Fungi Endofit Aspergillus	73
4.2 Pembahasan	74
BAB V: KESIMPULAN DAN SARAN	91
5.1 Kesimpulan	91
5.2 Saran	91
DAFTAR PUSTAKA	92
LAMPIRAN	102

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Bakteri, fungi, dan khamir penghasil L-Asparaginase	22
Tabel 2.2 Actinomycetes, tanaman, dan algae penghasil L-Asparaginase	23
Tabel 3.1 Pengamatan aktivitas spesifik enzim pada variasi suhu	57
Tabel 3.2 Pengamatan aktivitas spesifik enzim pada variasi pH	58
Tabel 4.1 Hasil pengamatan makroskopis isolat fungi endofit	61
Tabel 4.2 Hasil pengamatan mikroskopis isolat fungi endofit	61
Tabel 4.3 Hasil pengamatan uji hidrolisis amilum, lemak, dan kasein isolat fungi endofit	62
Tabel 4.4 Hasil pengamatan diameter isolat MC1A, <i>zone diameter</i> , dan <i>zone index</i> setiap 8 jam untuk aktivitas L-Asparaginase	64
Tabel 4.5 Hasil pengamatan diameter isolat MC1A, <i>zone diameter</i> , dan <i>zone index</i> setiap 8 jam untuk aktivitas L-Glutaminase	65
Tabel 4.6 Hasil pengamatan absorbansi kurva baku NH ₄ Cl dengan spektrofotometer UV-VIS	67
Tabel 4.7 Kurva pertumbuhan isolat fungi endofit kode MC1A	69
Tabel 4.8 Kurva produksi enzim L-Asparaginase dari isolat fungi endofit kode MC1A	70
Tabel 4.9 pH optimum L-Asparaginase yang berasal dari <i>Aspergillus</i>	71
Tabel 4.10 Suhu optimum L-Asparaginase yang berasal dari <i>Aspergillus</i>	72
Tabel 4.11 Stabilitas pH L-Asparaginase yang berasal dari <i>Aspergillus</i>	72

Halaman

Tabel 4.12 Stabilitas suhu L-Asparaginase yang berasal dari
Aspergillus 73

Tabel 4.13 Aktivitas spesifik L-Asparaginase yang berasal dari
Aspergillus 73

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Mekanisme hidrolisis L-Asparagin oleh L-Asparaginase	12
Gambar 2.2 Struktur sekunder L-Asparaginase dari <i>Erwinia chrysanthemi</i> dengan kode PDB: 107J	14
Gambar 2.3 Struktur tetramerik dari L-Asparaginase	14
Gambar 2.4 Bagian-bagian dari <i>conidial head</i> fungi endofit <i>Aspergillus</i> kode MC1A secara mikroskopis yang terdiri dari (1) konidia; (2) vesikel; (3) konidiofor	19
Gambar 2.5 Struktur molekul dari L-Asparagin (a) dan L-Glutamin (b)	31
Gambar 3.1 Skema kerja penelitian	59
Gambar 4.1 Grafik zone index dari L-Asparaginase dan L-Glutaminase selama 72 jam	66
Gambar 4.2 Hasil pengujian statistik terhadap data kurva baku NH_4Cl (3x replikasi) dengan metode <i>One-Way Anova</i>	67
Gambar 4.3 Grafik kurva baku NH_4Cl (data diperoleh dari 3x replikasi)	68
Gambar 4.4 Hasil pengujian statistik terhadap data kurva pertumbuhan (3x replikasi) dengan metode <i>One-Way Anova</i>	69
Gambar 4.5 Profil kurva pertumbuhan isolat fungi endofit kode MC1A (data diperoleh dari 3x replikasi)	70
Gambar 4.6 Profil kurva pertumbuhan isolat fungi (rata-rata dari 3x replikasi) dan kurva produksi enzim L-Asparaginase (data 1x replikasi) dari ekstrak kasar fungi endofit kode MC1A	71
Gambar 4.7 Efek variasi pH terhadap produksi enzim L-Asparaginase dari <i>Aspergillus terreus</i>	87

	Halaman
Gambar 4.8 Efek variasi suhu terhadap produksi enzim L-Asparaginase dari <i>Aspergillus terreus</i>	88
Gambar 4.9 Efek pH terhadap kestabilan L-Asparaginase	88
Gambar 4.10 Efek suhu terhadap kestabilan L-Asparaginase	89

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Kontrol Negatif Uji Biokimia	102
Lampiran 2. Kontrol Negatif Skrining Aktivitas Enzim L-Asparaginase	103
Lampiran 3. Kurva Baku NH_4Cl	104
Lampiran 4. Kurva Pertumbuhan	105
Lampiran 5. Penentuan Aktivitas L-Asparaginase pada Kurva Produksi	108