

**PEMURNIAN DAN KARAKTERISASI ENZIM L-ASPARAGINASE
DARI DAUN GULMA SIAM (*Chromolaena odorata* L.)
DAN POTENSINYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN
SERTA ANTIKANKER LK-2**

*PURIFICATION AND CHARACTERISATION OF
L-ASPARAGINASE ENZYME FROM LEAVES OF SIAM WEED
(*Chromolaena odorata* Linn) AND ITS POTENTIAL AS
ANTIOXIDANT AND ANTICANCER OF LK-2*

NURUL KHAERAH

H012181003



**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**PEMURNIAN DAN KARAKTERISASI ENZIM L-ASPARAGINASE DARI
DAUN GULMA SIAM (*Chromolaena odorata* L.) DAN POTENSINYA
SEBAGAI ANTIOKSIDAN SERTA ANTIKANKER LK-2**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Kimia

Disusun dan diajukan oleh:

NURUL KHAERAH

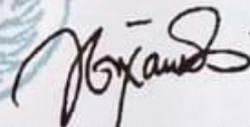
Kepada

**PROGAM STUDI MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

TESIS

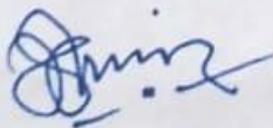
**PEMURNIAN DAN KARAKTERISASI ENZIM L-ASPARAGINASE DARI
DAUN GULMA SIAM (*Chromolaena odorata* L.) DAN POTENSINYA
SEBAGAI ANTIOKSIDAN SERTA ANTIKANKER LK-2**

Disusun dan diajukan oleh :

NURUL KHAERAH
Nomor Pokok : H012181003Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis
Pada Tanggal 06 April 2021
Dan dinyatakan telah memenuhi syaratMenyetujui,
Komisi PenasehatProf. Dr. Ahyar Ahmad
KetuaDr. Ruqaiyah Andi Arfah, M.Si
Anggota

Ketua Program Studi

Magister Kimia,

Dr. Hasnah Natsir, M.Si

Dekan Fakultas MIPA

Universitas Hasanuddin,

Dr. Eng. Amiruddin, M.Si

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nurul Khaerah
Nomor Mahasiswa : H012181003
Program Studi : Kimia

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 20 April 2021
Yang menyatakan



Nurul Khaerah

PRAKATA

Bismillahirrahmanirrahim, segala puji dan syukur kehadiran Allah yang telah memberikan rahmat, hidayah dan kemudahan yang selalu diberikan kepada hamba-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini dengan judul **“Pemurnian dan Karakterisasi Enzim L-Asparaginase dari Daun Gulma Siam (*Chromolaena odorata* L.) dan Potensinya sebagai Antioksidan serta Antikanker LK-2”** sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Sains. Sholawat dan salam kepada Nabi besar Muhammad S.A.W.

Kepada kedua orang tua tercinta, ayahanda **Tasman**, dan ibunda **Maryam Ali** terima kasih untuk setiap semangat, bantuan, kasih sayang, dan doa yang senantiasa tak henti-hentinya diberikan kepada saya, semoga Allah senantiasa memberikan rahmat berupa kasih sayang, keteguhan hati di atas agama Allah, dan kemuliaan bukan hanya di dunia tapi juga di akhirat Insya Allah.

Penulis menyadari bahwa banyak pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan penulisan tesis ini. Untuk itu, iringan doa dan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada **Prof. Dr. Ahyar Ahmad dan Dr. Rugaiyah A. Arfah , M.Si** selaku dosen pembimbing yang dengan penuh kesabaran, ketelatenan dan keikhlasan di tengah-tengah kesibukannya meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan serta pengarahan dalam menyelesaikan penelitian ini.

Penulis juga tak lupa mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada:

1. **Prof. Dr. Nunuk Hariani Soekamto, MS, Dr. Syarifuddin Liong, M.Si, dan Dr. Muhammad Zakir, M.Si**, selaku komisi penilai, terima kasih atas masukan yang telah diberikan demi penyempurnaan penulisan tesis.
2. **Dr. Hasnah Natsir, M.Si**, selaku ketua program studi ilmu kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin terima kasih atas motivasi dan bantuannya,
3. Dekan Fakultas MIPA, Ketua Jurusan Kimia FMIPA, dan seluruh dosen Kimia pascasarjana Universitas Hasanuddin yang telah membagi ilmunya serta seluruh staf Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin terima kasih atas bantuan dan kerjasamanya,
4. Kepala Laboratorium dan seluruh Staff Laboratorium Biokimia, Kimia Analitik, Kimia Anorganik, Kimia Fisika, Kimia Organik dan Laboratorium Terpadu dan Laboratorium Science Building FMIPA Universitas Hasanuddin. Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan FIKP, dan Laboratorium Perternakan Fakultas Perternakan Universitas Hasanuddin, terima kasih atas segala bantuan fasilitas yang telah diberikan selama proses penelitian.
5. Pak **Irsan** selaku staff Program Studi S2 Kimia yang selalu membantu dan memberikan masukannya dalam penyelesaian administrasi.
6. Rekan partner penelitian biokimia **Yusriadi, Rafsanjany Ramadan**,

dan Nada Pertiwi atas segala bantuan, dukungan, masukan, saran, doa dan semangatnya..

7. Teman-teman yang termasuk dalam Himpunan Mahasiswa Pasca Sarjana Kimia Unhas dan teman-teman seperjuangan Kimia Pascasarjana angkatan 2018: **Surya Pranowo, Yusriadi, Marinda, Nada Pertiwi, Rafsanjany Ramadan, Andi Fikrah A, Mifta Huljannah, Asriani Hayatun, Nur Afni, Felly Cytae E. A, Septaria Yolana K, Nur Awalia, Adji Permatasari, Musrifa Tahar, dan Sulfitri**, terima kasih atas bantuan dan semangatnya.
8. Semua pihak yang telah banyak membantu penulis selama menyelesaikan penelitian, terima kasih.

Penulis sadar bahwa tesis ini tidak sempurna dan banyak kekurangan baik materi maupun teknik penulisannya, karena sejatinya kesempurnaan hanyalah milik Allah SWT. Oleh karena itu, penulis berharap saran dan kritikan yang bersifat membangun dari pembaca, dan semoga dapat memberikan manfaat bagi siapa saja dalam pengembangan ilmu pengetahuan bidang biokimia.

Terima kasih

Makassar, Maret 2021
Penulis

Nurul Khaerah

ABSTRAK

NURUL KHAERAH: Pemurnian dan Karakterisasi Enzim L-Asparaginase dari Daun Gulma Siam (*C. odorata L.*) serta Potensinya sebagai Antioksidan dan Antikanker LK-2

(Dibimbing oleh Prof. Dr Ahyar Ahmad dan Dr. Rugaiyah A. Arfah, M.Si).

Daun gulma siam (*C. odorata L.*) adalah tumbuhan pengganggu pertumbuhan tanaman lain yang digunakan sebagai obat luka dan antioksidan dan mengandung enzim L-asparaginase sebagai antioksidan dan antikanker LK-2. Tujuan penelitian ini yaitu memurnikan dan mengkarakterisasi enzim L-asparaginase dari daun *C. odorata L.* serta menguji potensi aktivitasnya terhadap antioksidan dan antikanker LK-2. Metode yang dilakukan meliputi isolasi, karakterisasi, dan pemurnian dengan kromatografi penukar ion dan kromatografi filtrasi gel, serta uji potensi antioksidan dengan metode DPPH dan antikanker dengan metode BSLT dan MTT dari enzim L-asparaginase daun *C. odorata L.* Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas spesifik ekstrak enzim L-asparaginase murni adalah 6,37 UI/mg dengan 1,32 kali tingkat kemurnian. Hasil karakterisasinya yaitu pH, suhu, waktu inkubasi optimum dan pengaruh penambahan ion logam adalah pH 8, 37°C, 30 menit dan ion K⁺ sebagai aktivator yang mampu meningkatkan 41,03% aktivitas enzim serta ion Cu⁺² sebagai inhibitor yang mampu menghambat 66,23% aktivitas enzim serta berat molekul enzim sebesar 11,18 kDa. Hasil uji potensi antioksidan dengan metode DPPH dengan nilai IC₅₀ 18,8 µg/mL yang bersifat sangat toksik, dan uji potensi antikanker dengan metode BSLT menunjukkan nilai LC₅₀ sebesar 5,806 µg/mL yang bersifat sangat toksik dan nilai IC₅₀ dari uji MTT sebesar 226,464 µg/mL dalam kategori sitotoksik lemah. Penelitian ini menunjukkan bahwa enzim L-asparaginase dapat dimurnikan dan dikarakterisasi dari daun *C. odorata L.* serta menunjukkan adanya potensi untuk sebagai antioksidan dan antikanker LK-2.

Kata Kunci: Enzim L-asparaginase, *C. odorata L.*, Antioksidan, Antikanker.

ABSTRACT

NURUL KHAERAH: *Purification and Characterisation of L-Asparaginase Enzyme from Leaves of Siam Weed (C. odorata L.) and its Potential as Antioxidant and Anticancer of LK-2*

(Supervised by Prof. Dr Ahyar Ahmad dan Dr. Rugaiyah A. Arfah, M.Si).

The leaves of Siamese weed (C. odorata L.) are another plant growth disruptor that is used as wound medicine and antioxidants and contains the enzyme L-asparaginase as an antioxidant and anti-cancer agent of LK-2. The purpose of this study was to purify and characterize the L-asparaginase enzyme from C. odorata L. leaves and to test its potential activity against antioxidants and anti-cancer agents of LK-2. The methods carried out included isolation, characterization, and purification stages using ion exchange chromatography and gel filtration chromatography, as well as the antioxidant potential test using the DPPH and anticancer methods using the BSLT and MTT methods from the extract of the enzyme L-asparaginase leaves of C. odorata L. The results showed that the specific activity of the pure L-asparaginase enzyme extract was 6.37 IU/mg with 1.32 times the level of purity. The results of characterization, namely pH, temperature, optimum incubation time, and the effect of adding metal ions were pH 8, 37°C, and 30 minutes respectively, and ions K⁺ as an activator so that it increased 41.03% of enzyme activity and Cu⁺² was an inhibitor capable of inhibiting 66,23% of enzyme activity and the molecular weight of the enzyme was 11.18 kDa. The results of the antioxidant potency test using the DPPH method with an IC₅₀ value of 18.8 µg/mL which was very toxic and the anticancer potential test using the BSLT method shows an LC₅₀ value of 5.806 µg/mL which is very toxic and the IC₅₀ value of the MTT test was 226.464 µg/mL in the category weak cytotoxic. This study proves that the L-asparaginase enzyme could be purified and characterized from the leaves of C. odorata L. and shows the potential as an antioxidant and anti-cancer agent for LK-2.

Keywords: L-asparaginase enzyme, C. odorata L., Antioxidant, Anticancer

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	iii
PRAKATA	iv
ABSTRAK	vii
ABSTACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	5
D. Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
A. Tumbuhan Gulma Siam (<i>C. odorata</i> L.)	6
B. Kanker Paru-Paru	8
C. Enzim L-asparaginase	12
D. Isolasi Enzim L-asparaginase	14

E. Pemurnian Enzim L-asparaginase	15
F. Antioksidan	22
G. Uji Sitotoksitas	23
H. Kerangka Pikir	25
I. Hipotesis Penelitian	26
BAB III METODE PENELITIAN	28
A. Waktu dan Tempat Penelitian	28
B. Alat dan Bahan	28
1. Alat	28
2. Bahan	29
C. Prosedur Kerja	30
1. Pembuatan Reagen	30
2. Isolasi Enzim	31
3. Uji Kadar Protein	32
4. Uji Aktivitas Enzim L-asparaginase	33
5. Karakterisasi Enzim L-asparaginase	35
6. Pemurnian Enzim L-asparaginase	37
7. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH	41
8. Uji Toksisitas Enzim L-asparaginase dengan Metode BSLT	42
9. Uji Sitotoksitas dengan Metode MTT	43
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	45
A. Isolasi Enzim L-asparaginase dari Daun <i>C. odorata</i> L.	45
B. Karakterisasi enzim L-asparaginase dari daun <i>C. odorata</i> L.	49

C. Pemurnian Enzim L-asparaginase dari Daun <i>C. odorata</i> L.	57
1. Pemurnian dengan Fraksinasi dan Dialisis	57
2. Pemurnian dengan Kromatografi Penukar ion	62
3. Pemurnian dengan Kromatografi Filtrasi Gel	64
4. Penentuan Bobot Molekul dengan Metode SDS-PAGE	68
D. Uji Antioksidan Enzim L-asparaginase dari Daun <i>C. odorata</i> L.	71
E. Uji Toksisitas Enzim L-asparaginase dengan metode BSLT	73
F. Uji Sitotoksitas Enzim L-asparaginase terhadap Sel Kanker LK-2 dengan Metode MTT	75
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	 79
DAFTAR PUSTAKA	81
LAMPIRAN	86

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Tumbuhan <i>C. odorata</i> L	6
2. Reaksi reagen Nessler dengan amoniak	47
3. Reaksi reagen Lowry dengan protein enzim	48
4. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim L-asparaginase dari daun <i>C. odorata</i> L. pada [S] = 0,01 M; 37°C dan 30 menit inkubasi	50
5. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim L-asparaginase dari daun <i>C. odorata</i> L. pada [S] = 0,01 M; pH 8 dan 30 menit inkubasi	52
6. Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim L-asparaginase dari daun <i>C. odorata</i> L. pada [S] = 0,01 M; pH 8 dan 37°C	54
7. Pengaruh penambahan ion logam aktivitas enzim L-asparaginase dari daun <i>C. odorata</i> L. pada [S] = 0,01 M; pH 8; 37°C dan 30 menit inkubasi	57
8. Pengaruh tingkat kejenuhan amonium sulfat terhadap Enzim L-asparaginase dari daun <i>C. odorata</i> L.	59
9. Kromatografi hasil pemisahan enzim L-asparaginase menggunakan kromatografi penukar ion DEAE-selulosa dengan kecepatan alir, 1 mL/menit, pH 8 dan suhu 18°C	63
10. Kromatografi hasil pemisahan enzim L-asparaginase menggunakan kromatografi filtrasi gel Sephadex G-100 dengan kecepatan alir, 1 mL/menit, pH 8 dan suhu 18°C	66
11. Elektrogram hasil elektroforesis gel SDS-PAGE setiap tahap pemurnian enzim L-asparaginase dari daun <i>C. odorata</i> L. divisualisasikan dengan pewarnaan <i>Coomasie Blue</i> R-250	70
12. Hubungan konsentrasi sampel enzim L-asparaginase dari <i>C. odorata</i> L. dengan persen sel hidup dari sel kanker LK-2	77

DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1.	Tingkat toksisitas bahan	23
2.	Hasil pemurnian enzim L-asparaginase dari daun <i>C. odorata</i> L. dengan metode fraksinasi dan dialisis	58
3.	Tahap pemurnian enzim L-asparaginase dari daun <i>C. odorata</i> L. pada ekstrak kasar, fraksinasi, dialisis, kromatografi ion, dan kromatografi filtrasi gel	66
4.	Tahap Spesifik Enzim dari Sumber Daun	67

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Tahapan Penelitian	88
2. Isolasi Enzim L-asparaginasei dari daun <i>C. odorata</i> L.	89
3. Uji Kadar Protein Enzim L-asparaginase	90
4. Uji Aktivitas Enzim L-asparaginase dari daun <i>C. odorata</i> L.	91
5. Karakterisasi enzim L-asparaginase	92
6. Pemurnian Enzim L-asparaginase dari daun <i>C. odorata</i> L.	93
7. Uji Antioksidan L-asparaginase dari daun <i>C. odorata</i> L.	94
8. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT Enzim L-asparaginase dari daun <i>C. odorata</i> L.	95
9. Uji Siotoksik Enzim L-asparaginase dari daun <i>C. odorata</i> L.	96
10. Penentuan Kadar Protein L-asparaginase dari daun <i>C. odorata</i> L.	97
11. Penentian Aktivitas enzim L-asparaginase dari daun <i>C. odorata</i> L.	98
12. Karakterisasi enzim L-asparaginase dari daun <i>C. odorata</i> L.	100
13. Penentian dengan Amonimum Sulfat	102
14. Kromotografi Penukar Ion	103
15. Kromotografi Fitrasi Gel	104
16. Kromotografi SDS-Page	106
17. Pengujian Antioksidan dengan Metode DPPH	107
18. Pengujian Toksitas dengan Metode BSLT	108
19. Pengujian Sitoksitas dengan Metode MTT	109
20. Dokumentasi penelitian	110

DAFTAR SINGKATAN

Lambang/Singkatan	Arti dan Keterangan
μL	Mikroliter
$\mu\text{g/mL}$	Mikrogram/mililiter
<i>A. salina</i> Leach	<i>Artemia salina</i> Leach
Ab	Antibodi
ACS	<i>American Canser Society</i>
Ag	Antigen
APS	Amonium persulfat
AS	Asparagin Sintase
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BSLT	<i>Brine Shrime Lethality Test</i>
<i>C. odorata</i> L.	<i>Chromolaena odorata</i> Linn
CBB G-250	<i>Comasie Brilliant Blue G-250</i>
CCRC	<i>Cancer Chemoprevention Research Center</i>
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
IC ₅₀	<i>Inhibition Concentration</i> pada 50%
IEC	<i>Ion-Exchange Chromatography</i>
IU/mL	Internasional unit/mililiter
IU/mg	Internasional unit/miligram
kDa	KiloDalton
LC ₅₀	<i>Lethaly Concentration</i> pada 50%
mg/mL	miligram/mililiter
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide
NSCLC	<i>Non-Small Cell Lung Cancer</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
pH	power of hydrogen
rpm	Kecepatan putaran tiap menit
S	substrat
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SCLC	<i>Small Cell Lung Cancer</i>
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i>
TEMED	N,N,N',N' tetrametiletilediamin
WHO	<i>World Health Organization</i>
LK-2	<i>Lung cancer cell</i>

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Indonesia merupakan negara maritim dan negara hutan tropis serta diakui dunia sebagai komunitas yang paling kaya akan keanekaragaman hayatinya. Keanekaragaman hayati khususnya tumbuhan memiliki banyak manfaat salah satunya dapat digunakan sebagai tumbuhan obat. Tanaman obat untuk pengobatan maupun pencegahan terhadap suatu penyakit sudah digunakan secara luas oleh masyarakat. Hanya saja informasi yang mendasari penggunaannya sebatas bukti-bukti empiris (Rahardhian, 2018).

Salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai obat adalah daun gulma siam (*Chromolaena odorata* L.). Daun gulma siam adalah tumbuhan yang mengganggu pertumbuhan tanaman lain dan mengurangi kesuburan tanah. Tumbuhan ini oleh masyarakat wilayah Makassar digunakan sebagai obat luka dan antioksidan (Fitrah, 2016). Daun gulma siam dalam 100 gram protein, mengandung asam amino diantaranya arginin 5,61%, aspartat 8,51%, serin 4,21% dan glutamat 11,95 (Ngozi dkk, 2009). Pada 100 gr protein daun gulam siam mengandung asam aspartat yang merupakan biosintesis enzim L-asparaginase, sehingga dapat diasumsikan bahwa daun gulma mengandung enzim enzim L-asparaginase.

Enzim L-asparaginase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis L-asparagin menjadi L-aspartat dan amonia. L-asparagin merupakan asam amino non-esensial yang dibutuhkan oleh sel untuk sintesis protein dan pertumbuhan. Enzim L-asparaginase telah umum digunakan di bidang klinis karena enzim ini dapat melawan kanker (Herawati, 2001).

Kanker adalah tumor ganas yang ditandai dengan pertumbuhan abnormal dalam tubuh. Menurut World Health Organization (WHO) 2002, terdapat lebih dari 10 juta kasus kanker pertahun di dunia (Tjindarbumi dan Mangunkusumo, 2002). Salah satu penyebab penyakit kanker adalah radikal bebas yang menyerang sel tubuh manusia. Radikal bebas diduga merupakan penyebab kerusakan sel yang mendasari timbulnya penyakit kanker (Risky dan Suyatno, 2014). Senyawa yang dapat menunda, menghambat atau mencegah oksidasi bahan atau senyawa yang mudah teroksidasi oleh radikal bebas dan mengurangi stres oksidatif adalah antioksidan (Dai dan Mumper 2010). Antioksidan telah terbukti bermanfaat dalam pencegahan sel kanker (Chaudhary, dkk. 2015). Menurut penelitian Moharam, dkk (2010) enzim L-asparaginase memiliki sifat antioksidan sebesar 325,4 $\mu\text{g/mL}$ yang dikategorikan sebagai antioksidan lemah dari *Bacillus* sp.

Enzim L-asparagenase selain sebagai antioksidan dapat sebagai antikanker untuk yang menghambat sel kanker. Adanya L-asparaginase dalam tubuh akan mengakibatkan penurunan konsentrasi asparagin dalam

darah sehingga asupan asparagin bagi sel kanker menjadi sangat terbatas dan sintesis protein pada sel tersebut akan terganggu yang pada akhirnya akan menghambat pertumbuhan sel kanker, dan mengakibatkan kematian sel kanker. Selain itu aktivitas L-asparaginase tidak mengganggu sel normal, karena sel normal mampu menghasilkan enzim asparagin sintetase dalam jumlah yang semestinya, sehingga kebutuhan asparagin akan dapat dipenuhi oleh sel normal itu sendiri (Puspitasari dan Wuryanti, 2010). Enzim L-asparaginase diperoleh dari isolasi daun gulma siam yang diperoleh ekstrak kasar. Ekstrak kasar enzim L-asparaginase dimurnikan untuk memisahkan enzim dari protein-protein lain sehingga enzim yang diperoleh adalah enzim L-asparaginase dan untuk menentukan kondisis optimum enzim L-asparaginase bekerja secara maksimum dilakukan karakterisasi enzim.

.Berdasarkan penelitian Arpintasari, dkk (2008), enzim L-asparaginase yang diisolasi dari rimpah kunyit putih memiliki aktivitas spesifik tertinggi pada kondisi optimum pada fraksi ke- 5 (80-100%) yaitu sebesar 2195,715 unit/mg protein dan mempunyai potensi yang baik sebagai antikanker leukemia dengan LC_{50} pada konsentrasi penambahan enzim L-asparagenase 9,410 $\mu\text{g/ml}$. Sedangkan menurut penelitian Puspitasari dan Wuryanti (2010), isolasi enzim L-asparaginase dari rimpang tamulawak memiliki aktivitas tertinggi pada fraksi ke 4 (60-80%) yaitu 77,18 unit/mg protein pada kondisi optimum dan kurang potensial sebagai antikanker denan nilai IC_{50} yaitu 534,89 $\mu\text{g/ml}$.

Berdasarkan penelitian Yusriadi dkk, (2020), bahwa enzim L-asparaginase dari ekstrak daun gulma siam mempunyai aktivitas spesifik 11,25 IU/mg. Pada Penelitian tersebut tidak melakukan pengujian antioksidan.

Enzim L-asparaginase mampu menghambat serta mematikan sel kanker dapat dilihat dari berkurangnya sel kanker setelah penambahan enzim L-asparaginase, namun menurut NCI (*National Cancer Institute*) jika suatu uji sitotoksik suatu senyawa menghasilkan harga $LC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$ maka senyawa tersebut dinyatakan memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai senyawa antikanker.

Berdasarkan latar belakang maka dilakukan penelitian pemurnian dan karakteristik enzim L-asparaginase dari daun gulma siam (*C. odorata L.*) dan uji aktivitasnya terhadap antioksidan dan antikanker.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka rumusan masalah penelitian ini adalah:

1. Berapa aktivitas spesifik enzim L-asparaginase hasil pemurnian dari daun gulma siam (*C. odorata L.*)?
2. Bagaimana karakteristik enzim L-asparaginase dari daun gulma siam (*C. odorata L.*)?
3. Berapa aktivitas antioksidan enzim L-asparaginase dari daun gulma siam (*C. odorata L.*)?

4. Berapa aktivitas antikanker LK-2 enzim L-asparaginase dari daun gulma siam (*C. odorata L.*)?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. menentukan aktivitas spesifik enzim L-asparaginase hasil pemurnian dari daun gulma siam (*C. odorata L.*),
2. enentukan karakteristik enzim L-asparaginase dari daun gulma siam (*C. odorata L.*),
3. menentukan aktivitas antioksidanenzim L-asparaginase dari daun gulma siam (*C. odorata L.*).
4. menentukan aktivitas antikanker LK-2 enzim L-asparaginase dari daun gulma siam (*C. odorata L.*).

D. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. sebagai sumber informasi mengenai enzim L-asparaginase yang dapat diisolasi dari daun gulma siam (*C. odorata L.*) potensinya terhadap antioksidan dan antikanker LK-2.
2. menjadi bahan masukan bagi peneliti selanjutnya yang berkaitan dengan penelitian.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tumbuhan Gulma Siam (*C. odorata* L.)

1. Deskripsi Gulma Siam

Gulma siam adalah gulma yang awalnya berasal dari Amerika Selatan dan Tengah, menyebar ke daerah tropis Asia, Afrika dan Pasifik, digolongkan sebagai gulma invasif, semak berkayu yang berkembang cepat yang dapat mencegah pertumbuhan jenis tumbuhan lainnya (Prawiradiputra, 2007). Tumbuhan Gulma siam dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Tumbuhan Gulma Siam (*C. odorata* L.)

Tumbuhan gulma siam ini tumbuh dengan tinggi 1-2 m, batang tegak, berkayu, ditumbuhi rambut-rambut halus. Helai daun berbentuk segitiga dengan pangkal agak membulat dan ujung runcing, tepinya bergigi, mempunyai tulang daun tiga sampai lima, permukaan daun gulma siam

berbulu pendek dan bila diremas terasa bau yang menyengat. Perbungaan majemuk berbentuk malai rata (corymbus) yaitu kepala bunga kira-kira berada pada satu bidang, lebarnya 6-15 cm, berbentuk bongkolan, warnanya lembayung kebiru-biruan (Nasution, 1986).

Menurut Pink (2004) Taksonomia tumbuhan gulma siam adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Kelas : Dicotyledonae
Ordo : Asterales
Famili : Asteraceae
Genus : *Chromolaena*
Spesies : *Chromolaena odorata* L.
Nama Lokal : Gulma Siam

2. Khasiat tumbuhan

Khasiat dari daun gulma siam adalah untuk menangani gigitan lintah, luka jaringan lunak, luka bakar, infeksi kulit. Daun gulma siam secara tradisional digunakan sebagai obat dalam penyembuhan luka, obat kumur untuk pengobatan sakit pada tenggorokan, obat batuk, obat malaria, antibakteri, sakit kepala, antidiare, astringent, antispasmodik, antihipertensi, antiinflamasi, mengobati diabetes, antikolesterol, antioksidan dan diuretik (Ikewachi and Ikewachi, 2011). Daun gulma siam juga telah diaplikasikan

pada manusia untuk membantu pembekuan darah akibat luka bisul atau borok (Hadiroseyani, 2005).

3. Kandungan Kimia

Daun gulma siam mengandung senyawa aktif seperti alkaloid, flavanoid, saponin, dan tanin (Ikewachi dan Ikewachi, 2011). Flavonoid seperti eriodiktol-7-4'-dimetil eter; naringenin-4'-metil eter; dan 2',4-dihidroksi-4',5',6'-trimetoksi kalkon (Johari, dkk., 2012). Selain itu, Daun gulma siam mengandung beberapa asam-asam amino, seperti yang dilaporkan oleh Ngozi, dkk (2009) bahwa dalam 100 gram protein dari daunnya, mengandung asam amino esensial diantaranya Lisin 4,43%, Histidin 2,54%, Treonin 3,50%, Valin 4,50%, Metionin 1,35%, Isoleusin 4,37%, Leucin 8,10%, Fenilalanin 4.39%), Arginin 5,61% dan asam amino non esensial antaralain, Aspartat 8,51%, Serin 4,21%, Glutamat 11,95%, Prolin 4,00%, Glisin 4,35%, Alanin 4,53%, sistein 1,26%, Tirosin 3,22%, total asam amino essensial 33,18%, total asam amino nonessensial 47,64%, total asam amino yang mengandung sulfur 2,61% dan total asam amino aromatik 7,61%.

B. Kanker Paru-Paru

1. Definisi dan Faktor Penyebab Kanker Paru-Paru

Kanker merupakan pertumbuhan sel yang tidak terkontrol diikuti proses invasi ke jaringan sekitar dan penyebarannya (metastasis) ke bagian

tubuh yang lain (King, 2000). Pada penyakit kanker, di dalam organ tubuh timbul dan berkembang biak sel-sel baru yang tumbuh abnormal, cepat, dan tidak terkendali dengan bentuk, sifat dan gerakan yang berbeda dengan sifat asalnya, serta merusak bentuk dan fungsi organ asalnya (Dalimartha, 2004). Sel-sel kanker akan kehilangan diferensiasinya dan mulai tumbuh secara otonom dan akhirnya akan memusnahkan tubuh sendiri (Mutschler, 1999).

Kanker paru-paru merupakan tumor ganas yang berkembang di sistem pernapasan bagian bawah, termasuk sel-sel di dinding bronkus dan bronkiolus. Kanker paru dapat disebabkan karena berbagai faktor, antara lain yaitu asap rokok dan perubahan genetik. Merokok adalah penyebab utama terjadinya kanker paru pada 80-90% kasus kanker paru meskipun hanya 10-15% perokok terserang kanker paru (Kopper and Timar, 2005). Asap rokok telah terbukti merupakan penyebab utama timbulnya kanker paru, baik pada perokok aktif maupun pasif. Angka kesakitan dan kematian akibat kanker paru meningkat sebanding dengan jumlah rokok yang dihisap setiap hari, usia saat mulai merokok, dalamnya hisapan, lama kebiasaan merokok dan tingginya zat-zat karsinogen dalam tar pada asap rokok. Zat-zat karsinogen tersebut antara lain naftilamin, pirena, toluidin, dibenzacridin, kadmium, benzo[a]pirena, vinilklorida, dan polonium-210 (Serpi, 2003). Selain itu asap rokok diketahui mengandung lebih dari 20 jenis karsinogen terutama tobacco-specific nitrosamine⁴ – (methylnitrosamino) -1 – (3-pyrydyl) -1- butanon (NKK). Zat karsinogenik

tersebut dapat menyebabkan perubahan sel-sel epitel bronkus kearah keganasan.

2. Pengobatan Kanker

a. Alkilator

Sitostatika pengalkilasi adalah sitostatika yang dapat bereaksi, umumnya mempunyai dua gugus fungsi, yang kerjanya berdasarkan alkilasi asam nukleat (Mutschler, 1999). Alkilator bersifat sitotoksik dengan membentuk zat antara imonium atau karbonium reaktif yang bekerja mengadakan alkilasi kelompok basa DNA nukleofilik sehingga menghambat replikasi sel melalui pembentukan ikatan kovalen basa yang terdapat dalam DNA inti (Katzung, 1994).

b. Antimetabolit

Antimetabolit mengusir secara kompetitif senyawa dasar metabolit alami atau memblok enzim dan dengan cara ini menghambat metabolisme dan pertumbuhan sel. Kerjanya amat tidak spesifik artinya senyawa akan menyerang semua sel yang membelah dengan cepat dengan cara yang sama (Mutschler, 1999).

c. Alkaloid Tumbuhan

Alkaloid vinka berikatan secara spesifik dengan tubulin, komponen protein mikrotubulus, *spindle* mitotik dan memblok polimerisasinya sehingga sel terhenti dalam metafase (*spindle poison*) (Nafrialdi dan Gan, 1995).

d. Antibiotik Antitumor

Beberapa golongan antibiotik yang berbeda secara kimiawi mempunyai aktivitas antikanker termasuk antrasiklin, aktinomisin dan bleomisin. Antrasiklin berinterkalasi dengan heliks DNA sehingga gagal berpilin serta membentuk DNA dan RNA. Selain itu dapat merusak membran sel dan membentuk radikal bebas berupa lipid peroksid (Roger, 1990). Aktinomisin memblok polimerasi RNA yang dependen terhadap DNA karena terbentuknya kompleks antara obat dengan DNA dan juga dapat menyebabkan putusny rantai DNA. Sedangkan bleomisin bersifat sitotoksik berdasarkan daya memecah DNA (Nafrialdi dan Gan, 1995).

e. Enzim

Asparaginase merupakan suatu enzim katalisator yang berperan dalam hidrolisis asparagin menjadi asam aspartat dan amonia. Dengan demikian sel kanker kekurangan asparagin yang berakibat kematian sel (Nafrialdi dan Gan, 1995).

f. Hormon

Hormon dan antagonis hormon bukan sitotoksik dalam arti yang sesungguhnya, walaupun demikian dapat digunakan dengan sangat berhasil pada tumor yang pertumbuhannya bergantung pada adanya hormon. Ini berlaku dalam persentase tinggi pada karsinoma prostat, payudara dan korpus uterus (Mutschler, 1999).

C. Enzim L-Asparaginase

Enzim merupakan sekelompok protein yang mengatur dan menjalankan perubahan-perubahan kimia dalam sistem biologi. Enzim dihasilkan oleh organ-organ pada hewan dan tanaman yang secara katalitik menjalankan berbagai reaksi, seperti hidrolisis, oksidasi, reduksi, isomerasi, adisi, transfer radikal, pemutusan rantai karbon (Supriyatna, 2015).

Menurut Faktor-faktor yang mempengaruhi kerja enzim antara lain seperti konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, suhu, pengaruh pH dan pengaruh inhibitor (Poedjiadi, 2012).

Sekarang ini penggunaan enzim telah semakin luas yaitu di bidang pangan dan kesehatan. Salah satu enzim yang sangat berperan di dalam bidang kesehatan yaitu L-asparaginase (Puspitasari, 2010).

Enzim L-asparaginase adalah enzim yang telah umum digunakan di bidang klinis karena enzim ini dapat melawan kanker. Sel-sel kanker adalah sel-sel yang telah kehilangan daya aturnya. Untuk pertumbuhan selnya, sel kanker membutuhkan asam amino asparagin. Karena sel kanker tidak mempunyai enzim sintetase asparagin yang berfungsi untuk mensintesis asparagin dari asam aspartat, maka sel kanker mengambil asparagin dalam darah. Asparaginase yang diberikan akan menghambat sintesis protein sel kanker dengan menguraikan asparagin menjadi asam aspartat dan ammonia sehingga sel kanker akan kekurangan asparagin yang berakibat kematian sel ini (Herawati, 2001).

Asam amino L-asparagin dihasilkan di dalam sel oleh enzim asparagin sintetase atau dapat diserap dari lingkungan luar, yaitu dari sumber makanan. Sel leukimia membutuhkan L-asparagin dalam jumlah banyak untuk menjaga pertumbuhan sel malignan. Oleh karena itu, kemoterapi dengan menggunakan enzim L-asparaginase dapat menghambat pertumbuhan sel leukimia karena konsentrasi enzim L-asparagin berkurang. Sel leukimia memiliki sifat defisiensi terhadap aktivitas L-asparagin sintetase, sehingga mencegah kemampuan sel leukimia untuk mensintesis L-asparagin. Oleh karena itu, pertumbuhan sel leukimia sangat tergantung dari L-asparagin yang bersirkulasi di plasma darah (Manikandan dkk, 2010). Hal tersebut berbeda dengan sel normal yang dapat menghasilkan L-asparagin dari L-asparagin sintetase untuk memenuhi kebutuhan metabolisme sel (Verma, 2007).

Asam mono L-asparagin adalah asam amino non-esensial yang dapat disintesis oleh tubuh melalui mekanisme biokimia yang rumit. Umumnya biosintesis asam-asam amino non esensial ini diatur oleh ketersediaan asam amino tersebut dalam makanan. Pada manusia L-asparagin dapat disintesis pada jumlah yang cukup. L-asparagin dalam tubuh untuk menjamin pertumbuhan yang optimum pada anak-anak dan mempertahankan keseimbangan nitrogen (Schumm, 1992).

Reaksi biosintesis L-asparagin dikatalis oleh L-Asparagin sintetase. Dalam tubuh L-asparagin terdapat dalam beberapa jaringan dan di dalam sel kanker L-asparagin terdapat dalam jumlah yang sedikit. Keberadaan L-

asparagin yang berlebih dalam sel kanker akan menyebabkan pertumbuhan sel ini tidak dapat dikendalikan (Schumm, 1992).

Asam amino L-asparagin diperlukan oleh sistem saraf untuk menjaga kesetimbangan dalam transformasi asam amino. Berperan pula dalam sintesis amonia. Asparagin yang berasal dari luar (dari rebung asparagus) bersifat sebagai pengurai asparagin yang diproduksi oleh tubuh. Hasil uraiannya menjadi asam aspartat dan ammoniak. Sifat seperti ini adalah sifat enzim asparaginase, suatu enzim yang aktif melawan tumor/kanker. Sementara itu sel kanker memanfaatkan asparagin sebagai makanannya. Karena adanya penguraian. Akibatnya sel kanker berhenti tumbuh, atau kehilangan kapasitas untuk mensintesis asparagin. Akhirnya sel kanker akan mati cepat atau lambat (Winardiana, 2014).

D. Isolasi Enzim L-asparaginase

Enzim dapat diperoleh dari sel-sel hidup dan dapat bekerja baik untuk reaksi-reaksi yang terjadi di dalam sel maupun di luar sel. Pemanfaatan enzim untuk reaksi-reaksi yang terjadi di luar sel sekarang banyak diaplikasikan dalam dunia industri. Pemanfaatan enzim dapat dilakukan secara langsung menggunakan enzim hasil isolasi maupun dengan cara pemanfaatan mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim yang diinginkan (Harti, 2015). L-asparaginase umumnya dijumpai pada jaringan hewan, bakteri, tanaman, dan dalam serum tikus, namun tidak dijumpai pada manusia. L-asparaginase dihasilkan dengan jumlah

yang besar oleh beberapa mikroorganisme termasuk *Eschericia coli*, *Erwinia cartova*, *Enterobacter aerogenes*, *Corynebacterium glutamicum*, *Candida utilities*, dan *Pisum sativum* (El-Bessoumy, dkk, 2004).

Metode ekstraksi merupakan salah satu faktor penting yang perlu diperhatikan dalam memproduksi enzim. Penentuan metode ekstraksi enzim biasanya bergantung pada sumbernya. Umumnya enzim dapat diperoleh dari berbagai sumber, salah satunya yaitu tanaman. Enzim yang bersumber dari biji-bijian dapat diekstraksi dengan menghaluskannya menjadi tepung, lalu mencampurkannya dengan media cair, sedangkan enzim yang berasal dari bagian tanaman yang lunak dapat diekstraksi dengan dipotong kecil-kecil, dihaluskan, kemudian disaring dengan kain atau kertas saring. Teknik lain yang juga dapat digunakan untuk mengekstrak enzim dari bagian tanaman yaitu dihomogenasi dalam media cair dengan menggunakan blender (Li, dkk, 2006). Metode ekstraksi enzim dari tanaman seringkali menggunakan *buffer* yang berfungsi mempertahankan pH. Terdapat beberapa jenis *buffer* yang biasa digunakan, diantaranya yaitu *buffer* tris-hidroksimetil amino metan, Tris-HCl, glisin, dan fosfat (Paul, dkk, 1994).

E. Pemurnian Enzim L-asparaginase

1. Pengendapan Enzim dengan Menggunakan Amonium Sulfat

Metode yang umum digunakan untuk pemurnian enzim yakni dengan prinsip *salting out* menggunakan amonium sulfat yang biasa digunakan

untuk purifikasi protein. Garam amonium sulfat sering digunakan dalam proses pemurnian karena sifatnya yang sangat larut, murah, dan memiliki tingkat pemurnian tertinggi serta tidak mengubah pH larutan protein sampel menjadi ekstrim yang dapat mengakibatkan denaturasi protein. Proses ini menggunakan kadar garam tinggi untuk mengendapkan protein, di mana kelarutan protein akan menurun apabila berada pada kondisi tersebut (Matthews, dkk., 1999).

Prinsip *salting out* didasari oleh kompetisi antara ion garam dan molekul protein untuk berikatan dengan air. Oleh sebab itu, pada konsentrasi garam yang tinggi, air akan cenderung terikat dengan garam dibandingkan dengan molekul protein. Konsentrasi garam yang ditambahkan ke dalam ekstrak kasar enzim dibuat variatif dan dilakukan pada suhu rendah. Kondisi suhu rendah mampu meningkatkan presipitasi protein saat penambahan garam kadar tinggi (Sorensen, dkk., 1999).

2. Dialisis

Proses fraksinasi tidak menghendaki adanya kelebihan garam, oleh karena itu kelebihan garam yang tersisa dari proses fraksinasi dengan garam ammonium sulfat dipisahkan dengan cara dialisis. Dialisis adalah proses yang umum digunakan untuk menghilangkan molekul pengotor seperti garam atau ion lain yang berukuran kecil (Natsir, dkk., 2010).

Proses dialisis dilakukan pada suhu dingin untuk mencegah terjadinya kerusakan protein enzim yang dimurnikan. Prinsip dialisis adalah

difusi, yaitu terjadinya perpindahan zat terlarut dari larutan berkonsentrasi tinggi ke larutan berkonsentrasi yang rendah. Konsentrasi buffer di luar membran selofan lebih rendah dari pada konsentrasi bufer di dalam membran selofan sehingga amonium sulfat dapat berdifusi ke luar membran selofan dan terpisah (Sinatari, 2013).

3. Kromatografi Pertukaran Ion

Kromatografi penukar ion merupakan teknik pemisahan molekul ion-ion polar yang didasarkan pada perbedaan muatan, yakni antara molekul bermuatan di dalam larutan dengan senyawa yang tidak reaktif yang muatannya berlawanan sebagai pengisi kolom. Protein terdiri dari muatan positif dan muatan negatif tergantung pada rantai asam amino asam atau basa (Haris dan Angal, 1993).

Pengerjaan kromatografi penukar ion didahului dengan mengelusi protein enzim dengan buffer yang pH nya telah diatur sebelumnya. Protein diharapkan terikat kuat pada kolom dan protein lain dibiarkan terelusi terlebih dahulu. Protein yang terikat pada kolom dilepaskan dengan cara mengubah pH buffer atau kekuatan ion pelarut. Matriks penukar ion mengikat secara kovalen gugus fungsional yang bermuatan positif pada penukar anion atau gugus fungsional yang bermuatan negatif pada penukar kation. Matriks berupa polimer elastis dan mengandung senyawa resin sintetik terbuat dari bahan dekstran, selulosa atau sephadex. Contoh

matriks kation dan anion masing-masing adalah karboksimetil selulosa (CMC) dan dietilaminoetil (DEAE) selulosa (Scopes, 1993).

4. Kromatografi Filtrasi Gel

Kromatografi filtrasi gel merupakan pemisahan molekul menurut ukuran molekulnya. Pemisahan akan berlangsung di dalam kolom yang berisi gel dalam bentuk granula dan terdiri atas struktur tiga dimensi dari polimer yang berikatan silang. Ikatan silang ini menghasilkan pori-pori di dalam granula. Ukuran pori dipengaruhi oleh tingkatan ikatan silang, makin besar tingkatan ikatan silang makin kecil ukuran pori (Nur, dkk. 1992).

Matriks fil trasi gel berupa gel yang berpori seperti dextran, agarosa atau poliakrilamida, shepadex, dan sheparose. Pori-pori matriks dapat menampung molekul berukuran kecil. Molekul berukuran kecil akan memasuki pori-pori matriks, molekul berukuran besar tidak terperangkap ke dalam pori matriks dan akan keluar terlebih dahulu dari kolom (Scopes, 1993).

Polimer yang membentuk gel matrik harus mempunyai syarat: tidak mudah bereaksi; harus stabil di dalam kisaran pH yang lebar, suhu, dan kekuatan ionik; kandungan gugus ion harus kecil untuk mencegah efek pertukaran ion; mempunyai rigiditas mekanik yang tinggi untuk menahan laju aliran yang cepat; ukuran partikel harus seragam; dan tersedia untuk berbagai jenis gel sehingga dapat membedakan ukuran protein yang

beraneka ragam. Komposisi dan pori-pori partikel gel dapat diatur dengan memilih bahan dan kepekatan yang sesuai (Nur, dkk.,1992).

5. Elektroforesis

Pemisahan protein adalah tahap yang harus dilakukan untuk mempelajari sifat dan fungsi protein. Protein dapat dipisahkan dari protein jenis lain atau dari molekul lain berdasarkan ukuran, kelarutan, muatan, dan afinitas ikatan. Salah satu teknik yang digunakan untuk melihat profil protein dan menentukan bobot molekulnya adalah dengan menggunakan teknik SDS-PAGE (Wilson dan Walker, 2000).

Elektroforesis adalah suatu teknik pemisahan dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada suatu medium yang megandung sampel yang akan dipisahkan. Kecepatan gerak molekul tergantung pada rasio muatan terhadap massanya, serta tergantung pada bentuk molekulnya. Elektroforesis dapat digunakan untuk keperluan preparatif, selain bersifat analitik, bentuknya ada yang bersifat kolom, ada pula lempengan. Salah satu jenis elektroforesis elektroforesis SDS-PAGE (Yuwono, 2005).

Salah satu metode PAGE yang umumnya digunakan untuk analisa campuran secara kualitatif adalah SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electroforesis*). Prinsip penggunaan metode ini adalah migrasi komponen akril amida. SDS-PAGE adalah teknik untuk memisahkan rantai polipeptida pada protein berdasarkan kemampuannya untuk bergerak dalam arus listrik, yang merupakan fungsi dari panjang

rantai polipeptida atau berat molekulnya. Hal ini dicapai dengan menambahkan deterjen SDS dan pemanasan untuk merusak struktur tiga dimensi pada protein dengan terpecahnya ikatan disulfide yang selanjutnya direduksi menjadi gugus sulfidhidril (Wilson dan Walker, 2000).

Pada mekanisme SDS PAGE, protein bereaksi dengan SDS yang merupakan deterjen anionik membentuk kompleks yang bermuatan negatif. Protein akan terdenaturasi dan terlarut membentuk kompleks berikatan dengan SDS, berbentuk elpis atau batang dan berukuran sebanding dengan berat molekul protein. Protein dalam bentuk kompleks yang bermuatan negatif ini terpisahkan berdasarkan muatan dan ukurannya secara elektroforesis di dalam matriks gel poliakrilamid. Berat molekul protein dapat diukur dengan menggunakan protein standar yang telah diketahui berat molekulnya (Garfin, 2003).

Analisis menggunakan SDS-PAGE ini, gel poliakrilamid yang digunakan terdiri dari 2 yaitu *stacking gel* dan *resolving gel*. *Stacking gel* berfungsi sebagai gel tempat meletakkan sampel, terdapat beberapa *well*, sedangkan *resolving gel* merupakan tempat di mana protein akan bergerak/berpindah menuju anoda. *Stacking gel* dan *resolving gel* memiliki komposisi yang sama, yang membedakan hanya konsentrasi gel poliakrilamid pembentuknya, di mana konsentrasi *Stacking gel* lebih rendah daripada *resolving gel* (Wilson dan Walker, 2000).

Menurut Wilson dan Walker (2000), komponen yang membentuk gel poliakrilamida adalah:

1. Akrilamida sebagai senyawa utama yang menyusun gel dan merupakan senyawa karsiogenik.
2. Bisakrilamida berfungsi sebagai *cross-linking agent* yang membentuk kisi-kisi bersama polimer poliakrilamida. Perbandingan antara poliakrilamida dengan bisakrilamida dapat sesuai dengan berat molekul protein yang dipisahkan. Semakin rendah berat molekul protein yang dipisahkan maka semakin tinggi konsentrasi akrilamida yang digunakan agar kisi-kisi yang terbentuk semakin rapat.
3. Amonium persulfat (APS), berfungsi sebagai inisiator yang mengaktifkan akrilamida agar bereaksi dengan molekul akrilamida yang lainnya membentuk rantai polimer panjang.
4. TEMED (N,N,N',N' tetrametilamin) berfungsi sebagai katalisator reaksi polimerisasi poliakrilamida menjadi gel poliaktrilamida sehingga dapat digunakan dalam pemisahan protein.

Penggunaan poliakrilamida mempunyai keunggulan dibandingkan dengan gel lainnya, seperti: tidak bereaksi dengan sampel, tidak membentuk matris dengan sampel, tidak menghambat pergerakan sampel yang memungkinkan pemisahan protein secara sempurna, dan mempunyai daya pemisahan yang cukup tinggi (Wilson dan Walker, 2000).

F. Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang dapat mencegah terjadinya proses oksidasi, proses oksidasi dapat melemahkan sistem kekebalan tubuh. antioksidan dapat membantu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas dengan meredam dampak negatif senyawa tersebut. Antioksidan berfungsi mengatasi atau menetralsir radikal bebas sehingga diharapkan dengan pemberian antioksidan tersebut dapat mencegah terjadinya kerusakan tubuh dari timbulnya penyakit degeneratif (Hernani, dkk, 2005).

Radikal bebas merupakan atom atau gugus atom apa saja yang memiliki satu atau lebih elektron tak berpasangan sehingga bersifat sangat reaktif. Radikal bebas secara terus menerus terbentuk didalam tubuh, jika jumlahnya didalam tubuh sangat banyak dapat berpotensi menonaktifkan berbagai enzim, mengoksidasikan lemak dan mengganggu DNA tubuh sehingga terjadi mutasi sel yang merupakan awal timbulnya kanker (Astuti, 2009).

Manusia membutuhkan antioksidan yang dapat melindungi tubuh dari serangan radikal bebas, mengingat begitu banyaknya radikal bebas yang berasal dari luar tubuh, seperti makanan yang banyak mengandung asam lemak tidak jenuh, bahan pengawet, pestisida, dan pewarna (Zuhra, dkk. 2008; Parwata dkk, 2010). Oleh karena itu, asupan makanan yang mengandung antioksidan dibutuhkan oleh tubuh agar dapat menagkal serangan radikal bebas. Antioksidan alami tersebut berupa vitamin C, tokoferol (vitamin E), betakaroten, dan antioksidan fitokimia dari golongan

fenolik (Ikhlas, 2013). Sumber antioksidan alami sebagian besar berasal dari tumbuhan. Antioksidan alami terdapat dalam beberapa bagian tumbuhan, seperti pada kayu, kulit kayu, akar, daun, buah, bunga, biji dan serbuk sari (Moelyono, dkk 2016).

G. Uji Sitotoksisitas

1. Uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach merupakan uji pendahuluan yang mengarah pada uji sitotoksik. Korelasi antara uji toksitas akut ini dengan uji sitotoksik adalah jika mortalitas terhadap *A. salina* Leach yang ditimbulkan memiliki harga $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$. Tingkat toksisitas bahan ditunjukkan dalam Tabel 1 (Mayer, dkk., 1982).

Tabel 1. Tingkat toksisitas bahan

Kategori	LC_{50} (ppm)
Sangat toksik	< 30
Toksik	30-1000
Tidak Toksik	>1000

BSLT merupakan pengujian senyawa secara umum yang dapat mendeteksi beberapa bioaktivitas dalam suatu ekstrak. Korelasi positif ditemukan antara toksisitas BSLT dan sitotoksisitas terhadap 9 kB sel karsinoma nasofaring manusia maupun untuk sel P-388 leukemia secara *in vivo*. Diantaranya adalah antikanker. Antitumor, antimalaria, antimikroba, *immunosuppressive*, *antifeedant*, dan residu pestisida (Colegate dan

Molyneux, 2007). Larva udang *A. salina* Leach memiliki kesamaan dengan mamalia seperti tipe *DNA-dependent* RNA polimerase (DNA yang mengarahkan proses transkripsi RNA). Hal ini yang menyebabkan senyawa atau ekstrak yang memiliki aktivitas pada sistem tersebut dapat dideteksi melalui metode ini. Beberapa kelebihan dengan metode BSLT adalah cepat waktu ujinya sederhana (tanpa teknik aseptik), murah, jumlah organisme banyak, memenuhi kebutuhan validasi statistik dengan sampel. Mekanisme kematian larva berhubungan dengan fungsi senyawa-senyawa yang terkandung dalam selnya yang dapat menghambat daya makan larva (Mayer, dkk., 1982).

2. Uji 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide (MTT)

Salah satu metode uji sitotoksik adalah MTT yang menggunakan garam kuning tetrazolium seperti MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide]. MTT akan direduksi oleh mitokondria pada sel yang hidup dan tidak larut dalam air oleh sistem *suksinate tetrazolium reduktase*. Sel yang hidup dapat ditunjukkan dengan terjadinya reduksi senyawa MTT menjadi formazan yang menyebabkan terjadinya perubahan warna menjadi ungu. Absorbansi larutan berwarna ini kemudian dapat diukur menggunakan *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) reader* pada panjang gelombang antara 500 dan 600 nm. MTT memiliki kelebihan yaitu relatif cepat, sensitif, akurat, digunakan untuk mengukur sampel dalam

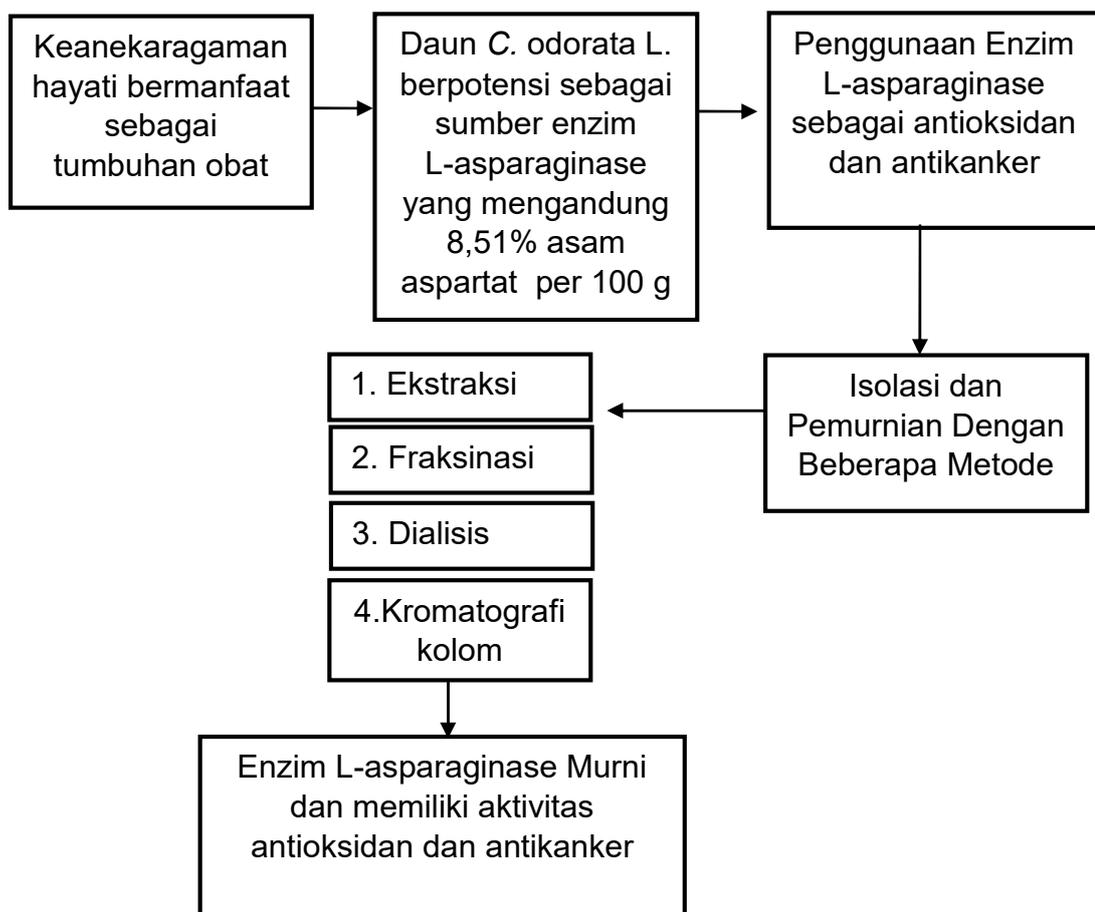
jumlah besar dan hasilnya dapat digunakan untuk memprediksi sifat sitotoksik suatu bahan (Padmi, 2008).

Parameter yang diperhatikan dalam uji sitotoksik adalah nilai *Inhibitory Concentration* (IC₅₀). Nilai IC₅₀ menunjukkan nilai dosis yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel dan sebagai patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel. Semakin besar nilai IC₅₀ maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Melannisa, 2004).

H. Kerangka Pikir

Keanekaragaman hayati khususnya tumbuhan memiliki banyak manfaat salah satunya dapat digunakan sebagai tumbuhan obat. Tanaman yang dapat digunakan sebagai obat adalah daun gulma siam (*Chromolaena odorata* L), yang merupakan tumbuhan yang mengganggu pertumbuhan tanaman lain dan mengurangi kesuburan tanah yang digunakan sebagai obat luka dan antioksidan (Fitrah, 2016). Diketahui dalam 100 gram daun gulma siam terkandung 8,51% asam aspartat yang merupakan biosintesis enzim L-asparaginase (Ngozi, dkk., 2009). Enzim L-asparaginase digunakan dalam bidang klinis untuk melawan kanker dan menghambat kanker. Salah satu penyebab kanker adalah radikal bebas. Senyawa yang menangkap radikal bebas adalah senyawa antioksidan. Peneliti menyimpulkan bahwa daun gulma siam tanaman berpotensi untuk

dikembangkan sebagai antikanker dan antioksidan yang diasumsikan daun gulma siam mengandung enzim tersebut.



I. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kajian pustaka dirumuskan hipotesis sebagai berikut:

1. Enzim *L-Asparaginase* dapat diisolasi dari daun gulma siam (*C. Odorata* L.) dan memiliki aktivitas tertinggi.
2. Enzim *L-Asparaginase* dari daun gulma siam (*C. Odorata* L.) memiliki suhu, pH dan waktu inkubasi optimum.

3. Enzim L-*Asparaginase* dari daun gulma siam (*C. Odorata* L.) memiliki aktivitas sebagai antioksidan.
4. Enzim L-*Asparaginase* dari daun gulma siam (*C. Odorata* L.) memiliki aktivitas sebagai antikanker.