

**DISERTASI**

**STUDI BIOAKTIVITAS ANTIMIKROBA DAN ANTIKANKER  
ENZIM L-ASPARAGINASE & L-GLUTAMINASE DARI BAKTERI  
SIMBION ALGA MERAH *Eucheuma spinosum***

**STUDY OF ANTIMICROBIAL AND ANTICANCER BIOACTIVITY OF  
L- ASPARAGINASE AND L- GLUTAMINASE ENZYME FROM  
MICROSYMBIONT RED ALGAE *Eucheuma spinosum***



**MUKRIANI  
C013192013**

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR**

**DISERTASI**

**STUDI BIOAKTIVITAS ANTIMIKROBA DAN ANTIKANKER  
ENZIM L-ASPARAGINASE & L-GLUTAMINASE DARI  
BAKTERI SIMBION ALGA MERAH *Eucheuma spinosum***

**STUDY OF ANTIMICROBIAL AND ANTICANCER  
BIOACTIVITY OF L- ASPARAGINASE AND  
L- GLUTAMINASE ENZYME FROM MICROSymbiont  
RED ALGAE *Eucheuma spinosum***

Disertasi

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Doktor  
Program Studi Ilmu Kedokteran

Disusun dan diajukan oleh

**MUKRIANI  
C013192013**

Kepada

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**DISERTASI**

**STUDI BIOAKTIVITAS ANTIMIKROBA DAN ANTIKANKER ENZIM L-ASPARAGINASE & L-GLUTAMINASE DARI BAKTERI SIMBION ALGA MERAH *Eucheuma spinosum***

**STUDY OF ANTIMICROBIAL AND ANTICANCER BIOACTIVITY OF L- ASPARAGINASE AND L- GLUTAMINASE ENZYME FROM MICROSymbiont RED ALGAE *Eucheuma spinosum***

Disusun dan diajukan oleh

**Mukriani**  
**C013192013**

*Telah dipertahankan di hadapan Penilai Ujian Promosi Doktor dalam rangka Penyelesaian Studi Program Doktor pada Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin pada tanggal, 6 September 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan*

Menyetujui

Promotor,

**Prof. Ahyar Ahmad, Ph.D**  
Nip. 19671231199103 1 020

Co. Promotor

**Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D, Sp.MK(K)**  
Nip. 19670910199603 1 001

Co. Promotor

**Prof. Dr.dr. Prihantono, Sp.B(K)Onk, M.Kes**  
Nip. 19740629200812 1 001

Ketua Program Studi S3  
Ilmu Kedokteran,

**Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes**  
Nip. 19671103199802 1 001

Dekan Fakultas Kedokteran  
Universitas Hasanuddin,



**Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid M.Kes., Sp.PD., KGH., FINASIM., Sp.GK.**  
Nip. 19680530199603 2 001

## PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Mukriani  
Nomor Mahasiswa : C013201012  
Program Studi : Kedokteran

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

Makassar , 26 Juli 2024

Yang menyatakan,

  
Mukriani

## KATA PENGANTAR

Puji & syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT, yang telah melimpahkan segala rahmat & karunia-Nya yang tak terhingga, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian yang berjudul : **“Studi Bioaktivitas Antimikroba Dan Antikanker Enzim L-Asparaginase & L-Glutaminase Dari Bakteri Symbion Alga Merah *Eucheuma Spinosum*.”** Penulisan hasil penelitian ini merupakan salah satu persyaratan dalam rangka penyelesaian Pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran Program Pasca sarjana Universitas Hasanuddin.

Segala wujud bakti & kasih sayang penulis persembahkan dengan penuh hormat kepada kedua orang tua tercinta yang telah melahirkan, mendidik & membesarkan serta senantiasa memberikan dorongan, semangat, motivasi, kasih sayang dan do'anya kepada penulis. Semoga Allah SWT memberikan rahmat, keselamatan, *Rabbighfirlil waliwaalidayya warhamhumaa kamaa rabbaayani shagiiraan.*

Kepada suami tercinta, terima kasih yang tak terhingga atas kesabaran mendampingi penulis berbagi suka dan duka, senantiasa memberi semangat, dukungan moril dan materiil serta curahan do'a selama penulis menempuh pendidikan dan kepada anak-anakku tersayang, terima kasih atas pengertian, celoteh & senyumannya serta do'a kalian yang menjadi bagian yang tak terpisahkan dari penyusunan disertasi ini. Semoga Allah meridhoi kalian menjadi anak yang shaleh & shalehah.

Kepada saudara-saudaraku yang telah memberikan semangat, dorongan, motivasi dan do'a serta bantuan yang begitu berarti selama penulis menempuh pendidikan sampai selesainya disertasi ini, *syukron jazakumullah khairan katsiran.*

Penulis menyadari bahwa disertasi ini tidak akan selesai tanpa bantuan dari pihak lain, baik berupa bantuan moril maupun materiil. Untuk itu penulis menyampaikan terima kasih yang tulus dan sedalam-dalamnya kepada **Prof. Ahyar Ahmad, Ph.D** Sebagai Promotor. **Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D, Sp.MK(K)** dan **Prof. Dr.dr. Prihantono, Sp.B(K)Onk, M.Kes** sebagai Co-Promotor yang penuh kesabaran telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran dalam memberikan bimbingan dan arahan serta semangat kepada penulis sejak penyusunan konsep, pelaksanaan hingga penyelesaian disertasi ini.

Terima kasih sebesar-besarnya juga penulis haturkan kepada tim penguji **Dr. Mansur Ibrahim, M.Kes, S.Si., Apt., Prof. Dr. Elly Wahyudi, DEA., Prof. dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K)., Prof. dr. Upik Anderiani Miskad, Ph.D, Sp.PA(K).**, atas masukan, koreksi dan bimbingan yang telah diberikan sehingga disertasi ini menjadi lebih sempurna.

Melalui kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan setinggi – tingginya kepada :

1. Bapak Gubernur Sulawesi Selatan yang telah memberikan izin kepada penulis untuk mengikuti pendidikan
2. Bapak Direktur RSKD Dadi Prov. Sulsel beserta staf yang telah memberikan kesempatan & dukungan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan.
3. Bapak **Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc** selaku Rektor Universitas Hasanuddin
4. Ibu **Prof. Dr.dr. Haerani Rasyid, M.Sc, Sp.PD-KGH, Sp.GK, FINASIM.** selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
5. Bapak **Prof. dr. Agussalim Bukhari, Ph.D, Sp.GK(K)**, sebagai wakil Dekan Bidang Akademik dan Kemahasiswaan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
6. Bapak **Dr.dr. Irfan Idris, M.Kes** selaku Ketua Program Studi Doktor Kedokteran Universitas Hasanuddin
7. Dosen dan Staf Program S3 Kedokteran yang telah dengan sabar memberikan arahan & bimbingan selama penulis menempuh pendidikan di Universitas Hasanuddin.
8. Seluruh staf serta teman peneliti di laboratorium Biokimia Departemen Kimia Universitas Hasanuddin, Laboratorium Penelitian Terpadu Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin, Laboratorium HUMRC Universitas Hasanuddin & Laboratorium Terpadu Universitas Padjadjaran Bandung, yang telah membantu selama penelitian berjalan hingga selesainya disertasi ini.

9. Terima Kasih kepada teman-teman seperjuangan Program Doktor Ilmu Kedokteran khususnya angkatan 2019 batch 2 atas segala bantuan, motivasi dan kebersamaannya. Kalian adalah teamwork yang hebat.

Ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi – tingginya juga penulis sampaikan kepada seluruh pihak yang Namanya tidak tercantum dalam prakata ini namun telah banyak membantu dan memberikan dukungan kepada penulis dalam menyelesaikan disertasi ini. Semoga Allah SWT memberikan balasan yang jauh lebih baik dan melipatgandakan amal kebaikan seluruh pihak yang telah membantu penyelesaian disertasi ini dan semoga disertasi ini dapat mendatangkan manfaat dan kemaslahatan bagi banyak orang.

Kami senantiasa mengharapkan bimbingan, saran guna pengembangan dan penyempurnaan hasil penelitian disertasi ini. Akhirul kalam hanya kepada Allah SWT kami bermunajat dan berdoa semoga segala usaha dan kerja keras Penulis dalam rangka penyusunan dan penyelesaian hasil penelitian disertasi ini dicatat sebagai amal shalih dan menjadi ilmu yang bermanfaat yang tiada putus pahalanya & senantiasa mendapat ridho-Nya sehingga berguna bagi pengembangan khasanah keilmuan .

Makassar, Juli 2024

Penulis,

**MUKRIANI**

## DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
ABSTRAK .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
ABSTRACT .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
DAFTAR ISI .....	v
DAFTAR GAMBAR .....	ix
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN .....	xvi
BAB I PENDAHULUAN .....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah.....	7
C. Tujuan Penelitian .....	8
1. Tujuan Umum .....	8
2. Tujuan Khusus .....	8
D. Manfaat Penelitian.....	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	10
A. Tinjauan Umum Alga .....	10
1. Tinjauan Umum Alga Merah .....	11
2. Tinjauan Umum Alga Merah <i>Eucheuma spinosum</i> .....	14
B. Tinjauan Umum Bakteri Simbion Alga .....	16
C. Tinjauan Bahan Antimikroba.....	19
1. Jenis dan Klasifikasi Antibiotik .....	22
2. Mekanisme Aktivitas Antimikroba.....	29
3. Metode Pengujian Antimikroba .....	30



4. Resistensi Antimikroba.....	33
D. Aktivitas Biologis Penghambatan Sel Kanker .....	37
E. Mekanisme Pembentukan Kanker .....	40
1. Kanker.....	40
2. Faktor Risiko Kanker Payudara.....	42
3. Klasifikasi Kanker Payudara.....	49
4. Mekanisme Terbentuknya Kanker Payudara .....	51
5. MCF 7 .....	53
6. Karakteristik BCL-2 .....	53
F. Pengujian Antikanker .....	55
G. Tinjauan Umum Enzim L-Glutaminase dan L-Asparaginase .....	59
1. Enzim L-Glutaminase.....	59
2. Enzim L–Asparaginase .....	64
H. Struktur L-Glutamin dan L–Asparagin.....	67
I. Tinjauan Umum Teknik Isolasi dan Pemurnian Enzim.....	68
1. Pemecahan (Lisis) Sel .....	69
2. Sentrifugasi .....	70
3. Fraksinasi dan Presipitasi .....	71
4. Dialisis.....	73
5. Kromatografi Kolom .....	74
J. Kerangka Teori.....	78
K. Hipotesis.....	80
L. Kerangka Konsep dan Definisi Operasional .....	80
1. Kerangka Konsep.....	80
2. Definisi Operasional .....	81
M. Kerangka Pikir .....	82
<b>BAB III METODE PENELITIAN.....</b>	<b>84</b>

A. Waktu dan Tempat Penelitian.....	84
B. Alat dan Bahan .....	84
1. Alat.....	84
2. Bahan.....	85
C. Populasi dan Sampel.....	85
1. Populasi .....	85
2. Sampel.....	86
D. Rencana Penelitian.....	87
E. Prosedur Kerja.....	88
1. Preparasi Sampel.....	88
2. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Simbion Makroalga.....	88
3. Identifikasi Molekuler Isolat Bakteri simbion.....	89
4. Optimasi Produksi Enzim Pada Proses Kultur Bakteri Simbion.....	91
5. Produksi dan Isolasi Enzim .....	92
6. Pemurnian Enzim.....	93
7. Penentuan Aktivitas Enzim, Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik dari Isolat Bakteri Simbion Alga merah <i>Eucheuma spinosum</i> .....	94
8. Karakterisasi Enzim L-Glutaminase dan L-Asparaginase .....	97
9. Uji Aktivitas Antimikroba dari Isolat Bakteri Simbion Alga Merah <i>Eucheuma spinosum</i> .....	97
10. Uji Aktivitas Antikanker secara <i>in vitro</i> .....	99
F. Analisis Data dan Statistik .....	101
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	103
A. Hasil Penelitian pada Enzim L-Asparaginase .....	103
1. Isolat Bakteri Penghasil Enzim L-Asparaginase dari Alga Merah ( <i>Eucheuma spinosum</i> ) .....	103
2. Identifikasi Isolat Bakteri Simbion Makroalga ( <i>Eucheuma spinosum</i> ) .....	106
3. Optimasi Produksi Enzim pada proses kultur bakteri simbion.....	113

4. Produksi Enzim L-Asparaginase .....	117
5. Pemurnian Enzim L-Asparaginase dari bakteri simbion <i>Alcanivorax marinus</i> dengan Fraksinasi dan Dialisis Enzim.....	117
6. Karakterisasi Enzim L-Asparaginase .....	119
7. Uji Bioaktivitas Antimikroba Enzim L-Asparaginase dari bakteri simbion <i>Alcanivorax marinus</i> .....	126
8. Uji Toksisitas Enzim L-Asparaginase dari Bakteri Simbion <i>Alcanivorax marinus</i> menggunakan Metode BSLT .....	132
9. Uji Sitotoksitas Enzim L-Asparaginase dari Bakteri Simbion <i>Alcanivorax marinus</i> terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 .....	133
B. Hasil Penelitian pada Enzim L-Glutaminase.....	135
1. Isolasi Bakteri Simbion dari Alga Merah <i>Eucheuma spinosum</i> .....	135
2. Identifikasi Isolat Bakteri Simbion Makroalga.....	137
3. Penentuan Waktu Produksi Optimum Enzim L-Glutaminase .....	142
4. Pemurnian Enzim L-Glutaminase dari Bakteri Simbion.....	145
5. Penentuan Aktivitas Enzim, Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik Enzim L-Glutaminase dari Isolat Bakteri Simbion .....	152
6. Karakterisasi Enzim L-Glutaminase .....	153
7. Uji Antimikroba Enzim L-Glutaminase dari Bakteri Simbion .....	160
8. Uji Toksisitas Enzim L-Glutaminase dari bakteri simbion.....	162
9. Uji Sitotoksitas Enzim L-Glutaminase dari bakteri simbion <i>Cobetia marina</i> terhadap sel kanker payudara MCF-7 .....	164
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	168
A. Kesimpulan.....	168
B. Saran.....	169
DAFTAR PUSTAKA .....	170
LAMPIRAN .....	183

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Morfologi <i>Eucheuma spinosum</i> .....	15
2. Struktur Molekul Beberapa Jenis Antibiotik $\beta$ -laktam .....	26
3. Struktur Molekul Kanamisin & Eritromisin.....	26
4. Struktur Molekul Tetrasiklin .....	27
5. Struktur Molekul Pristinamisin IIA dan Pristinamisin IA .....	28
6. Struktur Molekul Daptomisin.....	29
7. Metode Difusi Silinder Pipih pada Pengujian Antimikroba.....	31
8. Metode Difusi Kertas Saring pada Pengujian Antimikroba .....	32
9. Metode Dilusi pada Penentuan MIC Aktivitas Antimikroba.....	33
10. Ilustrasi Mekanisme Resistensi .....	36
11. Reaksi Penghambatan rantai DNA yang mengandung adenin, guanin dan sitosin.....	40
12. Fase Perkembangan Sel Kanker.....	53
13. Reaksi Hidrolisis L-Glutamin menjadi L-asam glutamat oleh enzim L-Glutaminase.....	59
14. Mekanisme selektif enzim L-Glutaminase .....	63
15. Reaksi Hidrolisis L-Asparagin menjadi L-aspartat oleh L-Asparaginase .....	65
16. Mekanisme umum toksisitas selektif enzim L-Asparaginase.....	67
17. Struktur Molekul Asam Amino L-Glutamin dan L-Asparagin .....	68
18. Klasifikasi Detergen Ionik & Detergen Nonionik .....	70
19. Alat Sentrifugasi untuk Isolasi dan Pemurnian Enzim .....	70
20. Metode <i>Salting in</i> dan <i>Salting out</i> pada Presipitasi Protein Enzim .....	73
21. Proses Dialisis Protein dengan Kantong Selophan .....	74
22. Prinsip Kerja Kromatografi Kolom Penukar Ion .....	76
23. Prinsip Kerja Kromatografi Filtrasi Gel untuk Pemurnian Protein .....	78
24. Kerangka Teori Penelitian .....	79

25. Kerangka Konsep .....	80
26. Alur Kerangka Pikir Penelitian .....	83
27. Diagram Alir Tahapan Penelitian .....	87
28. Isolat bakteri penghasil enzim L-Asparaginase dari <i>Eucheuma Spinosum</i> .....	104
29. Isolat bakteri penghasil enzim L-Asparaginase dari <i>Eucheuma Spinosum</i> (P:1000x) .....	104
30. Hasil pembacaan urutan nukleotida ( <i>sequencing</i> ) dan BLASTN isolate 2.2.2 .....	112
31. Analisis Pohon filogenetik dari isolat bakteri ES 2.2.2 yang diisolasi dari alga merah <i>Eucheuma spinosum</i> .....	113
32. Pengaruh Konsentrasi L-Asparagin terhadap aktivitas enzim L-Asparaginase dalam produksi L-asparaginase dari bakteri simbion <i>Alcanivorax marinus</i> .....	114
33. Pengaruh waktu pertumbuhan bakteri simbion <i>Eucheuma spinosum</i> ( <i>Alcanivorax marinus</i> ) terhadap OD dan aktivitas enzim L-Asparaginase .....	115
34. Pengaruh Perubahan Suhu terhadap Aktivitas Enzim L-Asparaginase.....	120
35. Pengaruh pH terhadap Aktivitas Enzim L-Asparaginase pada Suhu optimum .....	122
36. Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim L-Asparaginase dari <i>Eucheuma spinosum</i> .....	123
37. Pengaruh penambahan logam (0,01 M) terhadap aktivitas enzim L-asparaginase pada kondisi optimum .....	124
38. Hubungan kontrol negatif (DMSO); kontrol positif (Cisplatin) dan konsentrasi enzim L-Asparaginase dari bakteri simbion <i>Alcanivorax marinus</i> dengan persen viabilitas sel dari sel kanker payudara MCF-7 .....	134
39. Isolat bakteri simbion penghasil enzim L-glutaminase dari <i>Eucheuma spinosum</i> .....	136
40. Isolat bakteri simbion penghasil enzim L-glutaminase dari <i>Eucheuma Spinosum</i> (P:1000x) .....	137
41. Hasil pembacaan urutan nukleotida ( <i>sequencing</i> ) dan BLASTN isolate 2.1.1 yang menunjukkan kemiripan yang tinggi dengan spesies bakteri <i>Cobetia marina</i> .....	141
42. Analisis pohon pilogenetik dari Isolat bakteri <i>Cobetia marina</i> yang diisolasi dari bagian dalam alga merah <i>Eucheuma spinosum</i> .....	142

43. Pengaruh waktu pertumbuhan bakteri simbion <i>Eucheuma spinosum</i> ( <i>Cobetia marina</i> ) terhadap OD dan aktivitas enzim L-Glutaminase .....	143
44. Reaksi Folin-ciocalteu pada metode Lowry .....	151
45. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim L-glutaminase .....	154
46. Pengaruh suhu inkubasi terhadap aktivitas enzim L-glutaminase .....	156
47. Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim L-glutaminase.....	157
48. Nilai aktivitas relatif terhadap penambahan ion logam .....	159
49. Hubungan kontrol negatif (DMSO); kontrol positif (Cisplatin) dan konsentrasi enzim L-glutaminase dari bakteri simbion <i>Cobetia marina</i> dengan persen viabilitas sel dari sel kanker payudara MCF-7 .....	165

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Bakteri simbion alga merah ( <i>Rhodophyceae</i> ).....	18
2. Sejarah pengenalan kelas-kelas baru antibiotik .....	22
3. Beberapa subkelas dan senyawa antibiotik $\beta$ -laktam.....	25
4. Beberapa penelitian bakteri penghasil L-asparaginase dan L-glutaminase .....	60
5. Hasil pengamatan pertumbuhan isolat-isolat bakteri hasil isolasi.....	105
6. Karakterisasi Morfologi Isolat Bakteri Hasil Isolasi .....	106
7. Karakteristik Hasil Metabolisme Isolat Bakteri ES 2.2 .....	108
8. Hasil Pemurnian enzim L-Asparaginase dari bakteri simbion <i>Alcanivorax marinus</i> dengan fraksinasi Amonium sulfat dan dialisis.....	119
9. Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas enzim L-Asparaginase.....	120
10. Pengaruh pH terhadap Aktivitas enzim L-Asparaginase.....	121
11. Perbandingan dari beberapa penelitian bakteri dan jamur penghasil enzim L-Asparaginase & enzim L-Glutaminase .....	125
12. Bioaktivitas ekstrak kasar dan fraksi enzim L-Asparaginase dari bakteri simbion <i>Alcanivorax marinus</i> terhadap <i>Eschericia coli</i> .....	127
13. Bioaktivitas ekstrak kasar dan fraksi enzim L-Asparaginase dari bakteri simbion <i>Alcanivorax marinus</i> terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> .....	129
14. Nilai LC <sub>50</sub> Ekstrak kasar dan hasil dialisis L-Asparaginase bakteri simbion <i>Alcanivorax marinus</i> .....	132
15. Tingkat inhibisi vialibitas sel kanker payudara MCF-7 dari fraksi enzim L-asparaginase murni dari bakteri simbion <i>Alcanivorax marinus</i> .....	133
16. Nilai IC <sub>50</sub> fraksi enzim terhadap sel kanker payudara MCF-7 .....	135
17. Karakteristik Hasil Metabolisme Isolat Bakteri ES 1.1 .....	137
18. Kadar Protein Dialisat Enzim L-Glutaminase.....	151
19. Aktivitas Enzim L-Glutaminase pada Tiap Dialisat Enzim .....	152

20. Diameter Hambatan Rata-rata dari Fraksi Enzim Ekstraseluler L-glutaminase Bakteri Simbion .....	161
21. Nilai Perhitungan LC <sub>50</sub> terhadap Larva Udang ( <i>Artemia salina</i> Leach) .....	163
22. Tingkat inhibisi viabilitas sel kanker payudara MCF-7 dari fraksi enzim L-Glutaminase murni dari bakteri simbion <i>Cobetia marina</i> .....	164
23. Nilai IC <sub>50</sub> fraksi enzim terhadap sel kanker payudara MCF-7 .....	166



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Diagram Alir dan Tahapan Penelitian .....	183
2. Preparasi Sampel .....	184
3. Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Enzim L-Asparaginase dan L-Glutaminase .....	185
4. Tahapan Identifikasi Bakteri .....	187
5. Optimasi dan Produksi Enzim .....	188
6. Pemurnian Enzim (Fraksinasi Amonium Sulfat) .....	189
7. Pemurnian Enzim (Dialisis) .....	190
8. Tabel Tingkat Kejenuhan Amonium Sulfat dan Perhitungan Massa Amonium Sulfat untuk Fraksinasi.....	191
9. Penentuan Kadar Protein Enzim dengan Metode Lowry .....	192
10. Pembuatan Larutan Buffer Tris-HCl .....	193
11. Pembuatan Reagen <i>Nessler</i> .....	195
12. Penentuan Aktivitas Enzim dengan Metode <i>Nessler</i> .....	196
13. Karakterisasi Enzim L-Asparaginase dan L-Glutaminase.....	197
14. Uji Antibakteri dengan Metode Difusi Agar .....	201
15. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT.....	202
16. Perhitungan Uji BSLT dengan Metode Bliss.....	203
17. Uji Sitotoksitas Enzim L-Glutaminase terhadap Sel Kanker MCF-7 .....	204
18. Isolat Bakteri penghasil enzim L-glutaminase dari <i>Eucheuma spinosum</i> .....	205
19. Hasil pengamatan pertumbuhan isolat-isolat bakteri hasil isolasi.....	206
20. Karakterisasi Morfologi Isolat Bakteri L-Asparaginase Hasil Isolasi .....	207
21. Karakteristik Hasil Metabolisme Isolat Bakteri L- glutaminase .....	208
22. Urutan dan hasil pembacaan sequencing Basa Nukleotida Isolat ES 1.1.....	210
23. Hasil Sequencing Isolat ES 1.1 .....	212
24. Hasil Sequencing Isolat ES 2.2 .....	213

25. Kurva Standar <i>Bovine Serum Albumin</i> pada $\lambda$ 630 nm.....	214
26. Data Hasil Penentuan Waktu Produksi Optimum Protein dari Bakteri Simbion dan <i>Optical Density</i> .....	215
27. Perhitungan Penambahan Ammonium Sulfat pada Tahap Fraksinasi berbagai Tingkat Kejenuhan .....	216
28. Pengukuran Kadar Protein Dialisat Enzim L-Glutaminase .....	217
29. Kurva Standar $\text{NH}_4\text{Cl}$ pada $\lambda$ 390 nm .....	218
30. Tabel Aktivitas Enzim L-Glutaminase .....	219
31. Karakterisasi Aktivitas Enzim L-Glutaminase .....	220
32. Tabel Harga Probit .....	222
33. Perhitungan $\text{LC}_{50}$ .....	223
34. Perhitungan $\text{IC}_{50}$ .....	227
35. Hasil Pengamatan Uji Antibakteri Enzim L-Glutaminase .....	228
36. Hasil Pengamatan Uji MTT Enzim L-Asparaginase.....	229
37. Hasil Pengamatan Uji MTT L-Glutaminase .....	230
38. Klasifikasi Ilmiah Bakteri Simbion <i>Cobetia marina</i> dan <i>Alcanivorax marinus</i> .....	231
39. Klasifikasi Ilmiah dan Gambar Sampel Alga <i>Eucheuma spinosum</i> yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian .....	232
40. Hasil identifikasi rumput laut oleh PUI-P2RL .....	233
41. Beberapa dokumentasi kegiatan penelitian Enzim L-Asparaginase dan L- glutaminase .....	234

## DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

1. %	=	persen
2. <	=	Lebih kecil dari
3. >	=	Lebih besar dari
4. °C	=	derajat Celcius
5. µg	=	mikro gram
6. µL	=	mikro Liter
7. µM	=	mikro Molar
8. µmol	=	mikro mol
9. BSA	=	Bovine Serum Albumin
10. BSLT	=	Brine Shrimp Lethality Test
11. BHIB	=	Brain Heart Infusion Broth
12. g	=	gram
13. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	=	Hidrogen Peroksida
14. IU	=	International Unit
15. L	=	Liter
16. LC50	=	Lethal concentration 50
17. LD50	=	Lethal Dosis 50
18. M	=	Molaritas
19. MCA	=	Mac Conkey Agar
20. mL	=	mili liter
21. mM	=	mili Molar
22. MR-VP	=	Metil Red Voges Proskaur
23. MTT	=	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
24. MR	=	Methyl Red
25. MSA	=	Manitol Salt Agar
26. NA	=	Nutrien Agar
27. NB	=	Nutrien Broth
28. OD	=	Optical Density
29. p.a	=	Pro Analitik
30. pH	=	Potensial Hidrogen
31. ppm	=	part per million
32. RNA	=	Ribo Nucleic Acid
33. rpm	=	rotation per million
34. rRNA	=	reverse Ribo Nucleic Acid
35. SIM	=	Sulfid Indol Motility
36. sp.	=	Spesies
37. TSIA	=	Triple Sugar Iron Agar
38. U/mg	=	Unit Per Miligram
39. U/mL	=	Unit Per Mililiter
40. UV-Vis	=	Ultraviolet Visible
41. Tris-HCl	=	Tris(Hidroksimetil)aminometana
42. λ	=	lamda

## ABSTRAK

MUKRIANI. *Studi Bioktivitas Antimikroba dan Antikanker Enzim L-Asparaginase dan L-Glutaminase dari Bakteri Simbion Alga Merah Eucheuma Spinosum* (dibimbing oleh Ahyar Ahmad, Muh. Nasrum Massi, dan Prihantono).

Penelitian ini bertujuan mengeksplorasi dan mengidentifikasi bakteri simbion penghasil enzim *L-asparaginase* dan *L-glutaminase* dan *L-asparaginase* dikarakterisasi, diuji aktivitas antimikroba terhadap *E. coli* dan *S. aureus*, dan diuji aktivitas antikanker terhadap sel kanker MCF-7 secara in vitro. Hasil penelitian menunjukkan bahwa spesies bakteri dan simbion alga merah *Eucheuma spinosum* yang dapat menghasilkan enzim *L-asparaginase*, yaitu *Alcanivorax marinus* 2.2 dan *L-glutaminase*, yaitu *Cobetia marina* 1.1. Kondisi optimum enzim *L-asparaginase* ditemukan pada pH 7,5 suhu 37°C, waktu inkubasi 30 menit dengan logam Mg, Co sebagai aktivator dan logam Ca, Na, Cu, dan K sebagai inhibitor. Kondisi optimum *L-glutaminase* ditemukan pada pH 8, suhu 37°C, waktu inkubasi selama 30 menit dengan logam Mg, Co, dan Mn sebagai aktivator serta logam Na, Ca, Zn, K, dan Cu sebagai inhibitor. Aktivitas antimikroba dari enzim *L-asparaginase* bakteri simbion *Alcanivorax marinus* terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* tergolong bakteriostatik. Bersifat toksik dengan nilai LC<sub>50</sub> 64,20 µg/mL, sedangkan nilai IC<sub>50</sub> >1000 µg/mL sehingga tidak berpotensi sebagai antikanker. Adapun aktivitas enzim *L-glutaminase* bakteri simbion *Cobetia marina* dapat dikategorikan bekerja secara bakterisidal. Bersifat sangat toksik dengan nilai LC<sub>50</sub>, yaitu 14,43 µg/mL, serta pada uji sitotoksitas nilai IC<sub>50</sub> sebesar 64.24 µg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa *Cobetia marina* berpotensi sebagai bahan aktif antikanker payudara MCF-7. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan dan pengertian yang lebih baik terhadap senyawa bioaktif, sebagai antimikroba, dan antikanker dari bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum* yang dapat diperbaharui dan bersifat ramah lingkungan.

Kata kunci: bakteri *Simbion*, *L-asparaginase*, *L-gutaminase*, *Eucheuma spinosum*, antimikroba, antikanker



## ABSTRACT

MUKRIANI. *A Study on the Bioactivity of Antimicrobial and Enzyme L-Asparaginase and L-Glutaminase Anticancer from the Red Algae Symbiont Bacteria Eucheuma spinosum* (supervised by Alyar Ahmad, Muh Nasrum Massi, and Prihantone)

This research aims to explore and identify symbiotic bacteria that produce the enzymes L-asparaginase and L-glutaminase. L-glutaminase and L-asparaginase were characterized, tested for antimicrobial activity against *E. coli* and *S. aureus*, and tested for anticancer activity against MCF-7 cancer cells in vitro. The results of the research show that the bacterial species from red algae symbiont *Eucheuma spinosum* can produce enzyme L-asparaginase, i.e. *Alcanivorax marinus* 2.2 and L-glutaminase, i.e. *Cobetia marina* 1.1. The optimum conditions for L-Asparaginase enzyme are found at pH 7.5, temperature 37°C incubation time 30 minutes with Mg and Co metals as activators and Ca, Na, Cu, and K metals as inhibitors. The optimum conditions for L-Glutaminase are found at pH 8. temperature 37°C, incubation time for 30 minutes with Mg, Co, and Mn metals as activators, and Na, Ca, Zn, K and Cu metals as inhibitors. The antimicrobial activity of the L-Asparaginase enzyme of the symbiont bacteria *Alcanivorax marinus* towards *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria is classified as bacteriostatic. It is toxic with an LC<sub>50</sub> value of 64.20 µg/mL, while IC<sub>50</sub> value is >1000 µg/mL, so it has no potential as an anticancer. Meanwhile, the activity of the L-glutaminase enzyme of the symbiont bacteria *Cobetia marina* can be categorized as working bactericidally. It is very toxic with an LC<sub>50</sub> value of 14.43 µg/mL, and in the cytotoxicity test, the IC<sub>50</sub> value is 64.24 µg/mL. This shows that *Cobetia marina* has potential as an active ingredient for anti-breast cancer MCF-7. It is hoped that the results of this research will provide better knowledge and understanding of bioactive compounds, as anti-microbial and anti-cancer, from the symbiont bacteria of the red algae *Eucheuma spinosum* which can be renewed and are environmentally friendly.

Keywords: symbiotic bacteria. L-Asparaginase, L-Glutaminase, *eucheuma spinosum* antimicrobial, and anticancer



## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **A. Latar Belakang**

Penyakit infeksi dan kanker merupakan masalah kesehatan dengan kasus kematian yang terus meningkat setiap tahunnya. Bakteri adalah mikroorganisme patogen yang paling sering menyebabkan infeksi. Penyakit infeksi diperparah dengan munculnya kasus bakteri yang resisten terhadap antibiotik. Bakteri yang dilaporkan resisten terhadap antibiotik diantaranya 79% strain *Escherichia coli* resisten terhadap ampicilin, 30% strain resisten terhadap siprofloksasin dan 43% strain *Staphylococcus aureus* resisten terhadap metisilin. Kasus resisten ini tidak hanya menjadi permasalahan di Indonesia tetapi merupakan permasalahan global diseluruh dunia yang harus segera diatasi bersama antara peneliti, pemerintah, dan pelaku industri (Deslouches dan Di, 2017; Savitri 2019).

Sementara itu, data terbaru tahun 2020 menyebutkan jumlah kasus kanker di dunia mencapai 19,2 Juta kasus dan 9,9 Juta kasus kematian, dimana kasus kanker tertinggi adalah kanker payudara pada wanita yaitu 11,7 %, diikuti oleh kanker paru-paru sebesar 11,4 % dan kanker prostat sebesar 7,3 % (Sung dkk., 2021).

Sedangkan data Global Burden of Cancer Study dari World Health Organization mencatat, total kasus kanker di Indonesia pada 2020 mencapai 396.914 kasus dan total kematian sebesar 234.511 kasus (WHO, 2020).



Kanker payudara memiliki jumlah kasus baru tertinggi di Indonesia sebesar 68.858 kasus atau 16,6% dari total 396.914 kasus kanker. Sementara itu, untuk jumlah kematiannya mencapai lebih dari 22 ribu jiwa kasus (WHO, 2020).

Untuk mengatasi tingginya insidensi kanker payudara maka penelitian, penemuan serta pengembangan pengobatan kanker harus terus diupayakan.

Pada dasarnya penyakit infeksi dan kanker dapat ditangani dengan antibiotik (Radjasa et al., 2017) dan kemoterapi (Crosta, 2015), akan tetapi penanganan yang demikian menimbulkan dampak negatif. Menurut Radjasa et al. (2017), Penderita infeksi bakteri dapat diberikan terapi berupa antibiotik, akan tetapi pengaplikasian antibiotik yang tidak sesuai dapat menimbulkan terjadinya resistensi, mengakselerasi timbulnya multi drug resistance (MDR) (Wikananda dkk., 2019). Resistensi antibiotik merupakan suatu masalah global di negara maju maupun di negara berkembang, baik yang terjadi di rumah sakit maupun didalam komunitas. Infeksi oleh bakteri yang resisten secara umum merugikan dan telah mempengaruhi hasil terapi, biaya terapi, penyebaran penyakit, dan lama sakit (Ladyani dan Zahra., 2018).

Olehnya itu dibutuhkan agen obat baru yang mampu mengatasi hal tersebut. Salah satu alternatif pencarian obat baru adalah eksplorasi komponen aktif pada biota laut, terutama pada bakteri simbiotiknya.

Indonesia merupakan negara kepulauan yang dua pertiga wilayahnya adalah lautan, terdapat bermacam-macam makhluk hidup, baik

berupa tumbuhan, hewan, maupun mikroorganisme. Besarnya potensi biota laut telah mendorong para ilmuwan dan produsen senyawa antibiotik dunia mulai melirik laut sebagai sumber antibiotik potensial. Hal ini disebabkan biota laut merupakan bahan alam yang sangat kaya senyawa aktif dengan aktivitas biologi dan struktur yang unik. Sebanyak kurang lebih 10.000 senyawa bioaktif dilaporkan telah diekstraksi dari berbagai biota laut. Banyak di antaranya menunjukkan aktivitas farmakologi yang sangat potensial dikembangkan sebagai antivirus, antimikroba dan antikanker (Rumengan dkk.,2014).

Alga merupakan salah satu biota laut yang melimpah di perairan Indonesia, termasuk Sulawesi Selatan.

Alga merupakan salah satu biota laut yang menjanjikan untuk berbagai pengembangan karena diketahui mengandung senyawa metabolit yang aktif sebagai antioksidan, antialergi, anti-HIV, antikanker, antikoagulan, antibakteri dan antiinflamasi (Ammaranggana dan Wathoni, 2017). Alga terdiri atas tiga kelas, yaitu Rhodophyceae (ganggang merah), Phaeophyceae (ganggang coklat), dan Chlorophyceae (ganggang hijau) (Joshi et al., 2018). Di Indonesia terdapat sekitar 782 spesies alga dengan 196 spesies alga hijau, 134 spesies alga coklat, dan 452 spesies alga merah. Salah satu jenis alga merah yang potensial dan banyak dijumpai di Indonesia adalah *Eucheuma spinosum* ( Sepdwiyanti et al., 2012; Djakarta et al. 2018). Ada tiga wilayah di Indonesia yang banyak membudidayakan *Eucheuma spinosum* antara lain Bali, Madura, dan Sulawesi Selatan. Kabupaten Takalar merupakan satu-satunya wilayah di Sulawesi Selatan



yang mampu memproduksi 996.550 ton *Eucheuma spinosum* dengan luas areal budidaya ± 8.780 ha (Anonim, 2019).

Senyawa bioaktif dari Alga merah *Eucheuma spinosum* juga telah diteliti. Saat ini penelitian tidak hanya terfokus pada alga saja, tetapi juga pada bakteri simbion alga. Eksplorasi senyawa bioaktif dari bakteri ternyata lebih disukai karena beberapa kelebihan diantaranya bakteri mudah diisolasi dan dikultur dalam skala laboratorium, waktu pertumbuhan yang cepat dan dengan biaya yang lebih murah (Yulianti dkk., 2012). Selain itu, penggunaan bakteri simbion juga dapat menjadi salah satu solusi agar tidak terjadi eksploitasi secara berlebihan pada pemanfaatan alga.

Beberapa bakteri laut telah dilaporkan menunjukkan aktivitas antimikroba, khususnya bakteri yang bersimbion dengan organisme lain. Bakteri yang bersimbion tersebut memiliki kemampuan menghasilkan senyawa bioaktif yang hampir sama seperti inangnya. Senyawa aktif ini digunakan untuk mempertahankan diri dari bahaya lingkungan (Muftihah dkk., 2017).

Bakteri simbion mengandung ribuan senyawa kimia yang berpotensi untuk obat-obatan, supplement nutrisi, kosmetik, agrokimia, probe kimia dan enzim.

Sejauh ini belum banyak data penelitian yang mengeksplorasi enzim dari bakteri simbion Alga merah *Eucheuma spinosum* sebagai bahan antimikroba dan antikanker. Padahal pemanfaatan enzim telah banyak dikenal luas antara lain dalam industri makanan dan minuman, industri tekstil, industri kosmetik dan obat, industri kulit dan kertas di Indonesia

(Septiningrum dkk., 2008). Pakan ternak menggunakan enzim sebagai nutrisi yang dapat meningkatkan produktivitas hewan ternak. Pada bidang medis menggunakan enzim sebagai bahan diagnosis dan pengobatan. Diantara enzim yang dimanfaatkan dalam dunia medis adalah L-asparaginase dan L-glutaminase.

L- asparaginase dan L- glutaminase adalah protein enzim yang telah dikenal dalam dunia medis sebagai agen antitumor, disarankan sebagai enzim terapi untuk kanker khususnya leukimia akut. Disamping itu, banyak penelitian yang telah dilaporkan diketahui bahwa untuk menemukan suatu protein antikanker (ACPs), dapat dimulai dengan melihat aktivitas antimikrobanya, karena adanya korelasi positif dari kedua sifat bioaktivitas tersebut, meskipun hubungan mekanisme antikanker dan antimikroba belum sepenuhnya dipahami oleh para peneliti. Penelitian yang pernah dilaporkan menunjukkan bahwa protein antikanker (ACPs) umumnya berasal dari protein antimikroba (AMPs) (Tyagi dkk., 2013; Gaspar dkk., 2013; Chu dkk., 2015; Felicio dkk., 2017). Penelitian sebelumnya yang pernah dilakukan telah menunjukkan bahwa protein antimikroba (AMPs) kationik beracun terhadap sel bakteri tetapi tidak beracun bagi sel normal mamalia, serta setelah diuji aktivitas protein antikankernya yang berasal dari protein antimikroba (AMPs), menunjukkan spektrum yang luas terhadap berbagai sel kanker dan selektif menghambat sel kanker dan tidak mempengaruhi sel normal (Mader dkk., 2006; Hoskin dan Ramamoorthy, 2008).

Sejak ditemukannya sifat antitumor dari enzim L- asparaginase dan

L-glutaminase, kedua enzim tersebut menjadi perhatian utama dan mikroba penghasil enzim ini dieksplorasi dan dipelajari secara berkelanjutan. Enzim L-glutaminase (L-Glutamine amidohydrolase, EC.3.1.2) bekerja dengan menghidrolisis substratnya L-glutamin menjadi asam L-glutamat yang sangat dibutuhkan baik pada manusia maupun bakteri (Satish, 2011). Sedangkan L-asparaginase (L-Asparagine amidohydrolase, EC.3.5.1) adalah enzim yang mengkatalisis hidrolisis L-asparagine menjadi L-aspartat dan ammonia dengan memutuskan ikatan amida.

L-asparagin dan L-glutamin merupakan asam amino penting dan berfungsi sebagai sumber karbon dan nitrogen yang sangat dibutuhkan oleh sejumlah proses metabolisme pada sel kanker dan bakteri, terutama dalam pembentukan nukleotida (lewat sintesis purin dan pirimidin) yang sangat penting dan esensial dalam pembentukan sel-sel yang baru (Hasanul, 2009). Dengan demikian, konversi atau hidrolisis L-glutamin menjadi asam L-glutamat dan L-asparagin menjadi L-aspartat akan menyebabkan sel bakteri ataupun sel kanker mengalami kekurangan sumber karbon dan nitrogen, sehingga metabolisme sel bakteri ataupun sel kanker terganggu yang pada akhirnya mengganggu atau menghambat pertumbuhan & akhirnya dapat mematikan sel bakteri dan kanker tersebut.

Pada uraian di atas terlihat bahwa walaupun telah dilakukan penelitian terhadap enzim L-asparaginase dan L-glutaminase namun belum ada penelitian mengenai bakteri yang bersimbion dengan alga merah penghasil enzim L-asparaginase dan L-glutaminase yang memiliki potensi yang baik sebagai antimikroba dan antikanker, serta studi profil

perbandingan aktivitas enzim L-asparaginase dan L-glutaminase yang tepat untuk menghasilkan aktivitas antimikroba dan antikanker yang paling optimum. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan dan pengertian yang lebih baik terhadap enzim L-asparaginase dan L-glutaminase dari bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum* yang memiliki efektivitas dan sensitifitas yang tinggi sebagai agent antimikroba dan antikanker, sehingga dapat dikembangkan dan dimanfaatkan untuk membuat produk obat antimikroba dan antikanker yang baru dari bahan alam yang dapat diperbaharui dan ramah lingkungan.

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas maka dilakukan penelitian dengan judul “Studi Bioaktivitas Antimikroba dan Antikanker Enzim L-Asparaginase dan L-Glutaminase dari Bakteri Simbion Alga Merah *Eucheuma spinosum*.”

## **B. Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah jenis spesies bakteri / spesies bakteri apa saja yang dapat menghasilkan enzim L-asparaginase dan L-glutaminase dari simbion alga merah *Eucheuma spinosum* ?
2. Berapakah kadar protein dan bagaimana aktivitas enzim L-asparaginase dan L-glutaminase dari hasil pemurnian ?
3. Bagaimana pengaruh suhu, pH, kadar substrat, dan penambahan ion-ion logam terhadap aktivitas enzim L-asparaginase dan L-glutaminase.

4. Bagaimanakah profil perbandingan aktivitas antimikroba dan antikanker L-asparaginase dan L-glutaminase secara in vitro ?.

### **C. Tujuan Penelitian**

#### **1. Tujuan Umum**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil perbandingan aktivitas enzim L-asparaginase dan L-glutaminase dari simbion alga merah *Eucheuma spinosum* sebagai bahan obat antimikroba dan antikanker dengan karakteristik baru yang lebih baik.

#### **2. Tujuan Khusus**

Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum* penghasil enzim L-asparaginase dan L- glutaminase.
2. Mengetahui profil kadar protein dan aktivitas enzim L-asparaginase dan L-glutaminase dari hasil pemurnian.
3. Mempelajari pengaruh suhu, pH, kadar substrat, dan penambahan ion-ion logam terhadap aktivitas enzim L-asparaginase dan L-glutaminase.
4. Mengetahui profil aktivitas antimikroba dan antikanker enzim L-asparaginase dan L-glutaminase secara in vitro.

#### **D. Manfaat Penelitian**

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah:

1. Memberikan Informasi tentang jenis bakteri dari simbion alga merah *Eucheuma spinosum* yang dapat menghasilkan enzim L-asparaginase dan L-glutaminase sehingga dapat menambah informasi diversitas mikroba yang unik dan penting dalam bidang mikrobiologi dan bioteknologi.
2. Memberikan informasi mengenai perbandingan profil aktivitas antimikroba dan antikanker enzim L-asparaginase dan L-glutaminase, sehingga dapat dikembangkan sebagai bahan dasar obat antimikroba dan antikanker yang baru.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Tinjauan Umum Alga**

Alga merupakan salah satu sumber daya alam laut yang paling potensial di Indonesia. Alga atau ganggang merupakan organisme yang memiliki pigmen fotosintesis dengan keragaman yang sangat tinggi dari bentuk uniseluler hingga multiseluler, dengan karakteristik sebagai suatu organisme autotrofik (Jumadi, 2022).

Alga umumnya bersifat fotosintetik dan tumbuh di alam dengan melekatkan dirinya pada substrat tertentu seperti karang, lumpur, pasir, batu dan benda keras lainnya. Karena sifat melekatnya inilah alga disebut benthic algae.

Dalam dunia perdagangan dan juga dalam penggunaan sehari-hari, alga sering disebut rumput laut yang merupakan terjemahan dari istilah Inggris "seaweed". Para ahli mengklasifikasikan alga berdasarkan pigmentasinya, menjadi empat kelas, yaitu alga hijau (Chlorophyceae), alga coklat (Phaeophyceae), alga merah (Rhodophyceae) dan alga keemasan (Crysophyceae). Selain mengandung klorofil, alga juga mengandung zat warna lainnya sesuai dengan namanya, dan bersifat autotrop, yaitu dapat hidup sendiri tanpa tergantung dari makhluk lainnya. Pada umumnya alga mengandung air (27,8%), protein (5,4%), karbohidrat (33,3%), lemak (8,6%), serat kasar (3%) dan abu (22,25). Selain karbohidrat, protein, lemak dan serat, alga juga mengandung enzim, asam nukleat, asam amino, vitamin (A, B, C, D, E dan K) dan mineral seperti nitrogen, oksigen, kalsium,

selenium, zat besi, magnesium dan natrium. Kandungan asam amino, vitamin dan mineral alga mencapai 10-20 kali lipat dibandingkan dengan tanaman darat (Yudhi, 2009).

Secara garis besar, produk turunan alga dapat dikelompokkan menjadi pangan, pakan, pupuk, produk kosmetik, dan produk farmasi (Pudjiastuti, 2017). Oleh karena begitu luasnya penggunaan alga, tidak diragukan lagi bila komoditas ini menjadi salah satu produk penting dalam perdagangan internasional (Ferdouse et al., 2018).

Selain kandungan primernya yang bernilai ekonomis, penelitian tentang kandungan metabolit sekunder dari alga menunjukkan bahwa tanaman ini berpotensi sebagai produser metabolit bioaktif yang beragam dengan aktivitas yang sangat luas sebagai antibakteri, antivirus, antijamur dan sitotastik. Penelitian lain juga melaporkan bahwa alga laut memiliki aktivitas antibakteri dan antiinflamasi (Amaranggana dan Nasrul, 2016). Salah satu jenis alga laut yang dibudidayakan di Indonesia adalah alga merah *Eucheuma sp.* (Mattulada dkk., 2018).

### **3. Tinjauan Umum Alga Merah**

Alga merah atau Rhodophyta adalah salah satu filum dari alga berdasarkan zat warna atau pigmentasinya. Warna merah pada alga ini disebabkan oleh pigmen fikoeritrin dalam jumlah banyak dibandingkan pigmen klorofil, karoten, dan xantofil.

Alga merah merupakan produsen terbesar dari senyawa bioaktif (Abdel-Raouf et al., 2015). Makroalga berperan sebagai sumber potensial antimikroba (Pratiwy & Arifah, 2021). Menurut (Gómez-Guzmán et al.,



2018) bahwa sebagian besar kandungan dalam alga merah menunjukkan kemampuan biologis, terdapat beberapa kegunaan alga merah di antaranya sebagai antivirus, antitumor, antioksidan, antikoagulan, antimikroba, antidiabet, antiinflamasi, antialergi, dan analgesik.

Alga ini pada umumnya banyak sel (multiseluler) dan makroskopis. Panjangnya antara 10 cm sampai 1 meter dan berbentuk berkas atau lembaran.

Beberapa alga merah memiliki nilai ekonomi sebagai bahan makanan (sebagai pelengkap minuman penyegar ataupun sebagai bahan baku agar-agar). Alga merah sebagai bahan makanan memiliki kandungan serat lunak yang baik bagi kesehatan usus.

➤ Habitat

Sebagian besar alga merah hidup di laut, banyak terdapat di laut tropika. Sebagian kecil hidup di air tawar yang dingin dengan aliran deras dan banyak oksigen. Selain itu ada pula yang hidup di air payau. Alga merah yang banyak ditemukan di laut dalam adalah *Gelidium* dan *Gracilaria*, sedang *Euchema spinosum* menyukai laut dangkal.

➤ Perkembangbiakan

Alga merah berkembangbiak secara vegetatif dan generatif.

- a. Perkembangbiakan vegetatif ganggang merah berlangsung dengan pembentukan spora haploid yang dihasilkan oleh sporangium atau talus ganggang yang diploid. Spora ini selanjutnya tumbuh menjadi ganggang jantan atau betina yang sel-selnya haploid.

b. Perkembangbiakan generatif ganggang merah dengan oogami, pembuahan sel kelamin betina (ovum) oleh sel kelamin jantan (spermatium). Alat perkembangbiakan jantan disebut spermatogonium yang menghasilkan spermatium yang tak berflagel. Sedangkan alat kelamin betina disebut karpogonium, yang menghasilkan ovum. Hasil pembuahan sel ovum oleh spermatium adalah zigot yang diploid. Selanjutnya, zigot itu akan tumbuh menjadi ganggang baru yang menghasilkan aplanospora dengan pembelahan meiosis. Spora haploid akan tumbuh menjadi ganggang penghasil gamet. Jadi pada ganggang merah terjadi pergiliran keturunan antara sporofit dan gametofit.

➤ Manfaat

Alga merah dapat menyediakan makanan dalam jumlah banyak bagi ikan dan hewan lain yang hidup di laut. Jenis ini juga menjadi bahan makanan bagi manusia misalnya *Chondrus crispus* (lumut Irlandia) dan beberapa genus *Porphyra*. *Chondrus crispus* dan *Gigortina mamilosa* menghasilkan karagen yang dimanfaatkan untuk penyamak kulit, bahan pembuat krem, dan obat pencuci rambut. Alga merah lain seperti *Gracilaria lichenoides*, *Euchema spinosum*, *Gelidium* dan *Agardhiella* dibudidayakan karena menghasilkan bahan serupa gelatin yang dikenal sebagai agar-agar. Gel ini digunakan oleh para peneliti sebagai medium biakan bakteri dan fase padat pada elektroforesis gel, untuk pengental dalam banyak makanan, perekat tekstil, sebagai obat pencahar (laksatif), atau sebagai makanan penutup.

Alga merah berwarna merah sampai ungu, tetapi ada juga yang lembayung atau pirang atau kemerah – merahan, chromatofora berbentuk cakram atau lembaran dan mengandung klorofil a, klorofil b dan karoteboid. Akan tetapi, warna lain tertutup oleh warna merah fikoiiretrin sebagai pigmen utama yang mengadakan fluoresensi

a. Ciri Talus

1. Bentuknya berupa helaian atau berbentuk seperti pohon.
2. Tidak berflagella.
3. Selnya terdiri dari komponen yang berlapis – lapis.
4. Mempunyai pigmen fotosintetik fikobilin, memiliki pirenoid yang terletak didalam koroplas, pirenoid berfungsi untuk menyimpan cadangan makanan atau hasil asimilasi.

b. Cara Hidup

Alga merah umumnya bersifat autotrof, ada juga yang heterotrof, yaitu yang tidak memiliki kromatofora dan biasanya parasit pada ganggang lain.

#### **4. Tinjauan Umum Alga Merah *Eucheuma spinosum***

*Eucheuma spinosum* tergolong dalam kelas alga merah (Rhodophyceae) merupakan salah satu jenis rumput laut yang cukup potensial dan banyak dijumpai di perairan Indonesia (Sepdwiyantri et al, 2012). Di Indonesia, *Eucheuma spinosum* banyak di budidayakan di perairan Bali (Nusa Penida), Madura (Sumenep), dan Takalar (Sulawesi Selatan). Selain di Indonesia rumput laut spesies ini juga dibudidayakan secara komersial di Filipina, Cina, Malaysia (Sabah), Tanzania, dan Kiribati

(Ra et al., 2015).

*Eucheuma spinosum* mengandung karagenan, protein, karbohidrat, lemak, dan serat kasar. Selain itu, *Eucheuma spinosum* dapat mengandung senyawa bioaktif seperti flavonoid, alkaloid, saponin, tannin, dan turunannya yang memiliki sifat antibakteri (Sabdaningsih et al., 2013). Penelitian sebelumnya yang pernah dilakukan oleh Safitri et al. (2018) diketahui bahwa ekstrak kasar *Eucheuma spinosum* dapat menghasilkan senyawa aktif biologis yang mampu membunuh bakteri atau menghambat pertumbuhan bakteri.



**Gambar 1.** Morfologi *Eucheuma spinosum*.

Rumput laut ini dikenal dengan nama daerah agar-agar. Dalam dunia perdagangan, rumput laut ini dikenal dengan istilah spinosum yang berarti duri yang tajam. Rumput laut ini berwarna coklat tua, hijau coklat, hijau kuning, atau merah ungu (Sudradjat, 2008 dalam Alam, 2011).

Ciri fisik yang dimiliki spesies *Eucheuma spinosum* ini diantaranya talus yang kasar, agak pipih dan bercabang teratur, yaitu bercabang dua atau tiga, ujung-ujung percabangan ada yang runcing dan tumpul dengan permukaan bergerigi, agak kasar dan berbintil-bintil pada talusnya. Tumbuh

melekat ke substrat dengan alat perekat berupa cakram. Cabang-cabang pertama dan kedua tumbuh membentuk rumpun yang rimbun dengan ciri khusus mengarah ke arah datangnya sinar matahari. Cabang-cabang tersebut ada yang memanjang atau melengkung seperti tanduk (Lasinrang, 2014). *Eucheuma spinosum* adalah salah satu jenis rumput laut dari kelas Rhodophyceae (ganggang merah). Klasifikasi *Eucheuma spinosum* menurut Anggadiredja dkk., (2010) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae  
Divisi : Rhodophyta  
Kelas : Rhodophyceae  
Ordo : Gigartinales  
Famili : Solieriaceae  
Genus : *Eucheuma*  
Spesies : *Eucheuma spinosum*

## **B. Tinjauan Umum Bakteri Simbion Alga**

Pada umumnya organisme yang hidup di laut itu bersimbion atau berasosiasi dengan bakteri (Rahmayanti et al., 2019). Alga termasuk organisme laut yang kaya akan bakteri simbion (Chakraborty et al., 2017). Alga dan organisme laut lainnya berasosiasi dan bergantung pada bakteri untuk pertumbuhan, perkembangan, pasokan nutrisi, dan sebagai pelindung dari serangan predator (Egan et al., 2013).

Berdasarkan studi deskriptif, isolasi bakteri dari alga ditemukan kurang lebih 149 alga yang berasosiasi dengan bakteri, 36 diantaranya

berasal dari Chlorophyta, 46 dari Phaeophyceae, 55 dari Rhodophyceae, dan 12 alga belum ditentukan (Goecke et al., 2010). Beberapa bakteri yang pernah diisolasi dan dilaporkan dari alga merah (Rhodophyceae) disajikan pada Tabel 1.

Bakteri dapat diisolasi dari alga dengan menggunakan teknik kultur. Menurut Cappucino (2013), teknik kultur untuk mendapatkan biakan murni terbagi menjadi tiga macam yaitu metode spread plate (tebar/sebar), metode streak plate (gores), dan metode pour plate (tuang).

Metode spread plate merupakan teknik isolasi bakteri dengan cara menginokulasi kultur mikroba secara pulasan/sebaran di permukaan media agar yang telah memadat. Metode ini dilakukan dengan mengencerkan biakan kultur mikroba. Konsentrasi sel-sel mikroba pada umumnya tidak diketahui, sehingga pengenceran perlu dilakukan beberapa tahap.

**Tabel 1.** Bakteri simbion alga merah (*Rhodophyceae*)

No	Bakteri Simbion	Alga Merah ( <i>Rhodophyceae</i> )	Aktivitas
1	<i>Acaryochloris sp.</i>	<i>Ahnfeltiopsis flabelliformis</i>	Komponen fotosintesis
2	<i>Alteromonas sp.</i>	<i>Rhodymenia sp.</i>	Antisetlemen
3	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Schizymenia dubyi</i>	Antibiotik
4	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Glacilaria corticata</i>	Antimikroba
5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Laurenciae papillosa</i>	Antibakteri
6	<i>Bacillus antracis</i>	<i>Plocamium telvairiae</i>	Antimikroba
7	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Gelidium amansii</i>	Antimikroba
8	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Grateloupia filicina</i>	Antimikroba
9	<i>Bacillus firmicutes</i>	<i>Jania Rubens</i>	Antibakteri, antifungal
10	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Phorphyra yezoensis</i>	Antimikroba
11	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Chondrus ocellatus</i>	Antimikroba
12	<i>Pseudomonas sp.</i>	alga merah (tidak diketahui spesiesnya)	Antibiotik
13	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Ceratodictyon spongiosum</i>	Antibiotik
14	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Glacilaria corticata</i>	Antimikroba
15	<i>Vibrio owensii</i>	<i>Glacilaria corticata</i>	Antimikroba
16	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	<i>Digenea sp.</i>	Antibiotik

Sumber: Goecke *et al.*, 2010; Karthick dan Mohanraju, 2018

Metode *streak plate* merupakan teknik isolasi bakteri dengan cara

menggoreskan suspensi bahan yang mengandung bakteri pada permukaan medium agar yang telah memadat. Setelah inkubasi maka pada bekas goresan akan tumbuh koloni-koloni terpisah yang mungkin berasal dari 1 sel mikroba, sehingga dapat diisolasi lebih lanjut. Penggoresan yang sempurna akan menghasilkan koloni yang terpisah.

Metode pour plate merupakan teknik isolasi bakteri dengan cara menginokulasi medium agar yang sedang mencair pada suhu 45-50°C dengan suspensi bahan yang mengandung mikroba, dan menuangkannya ke dalam cawan petri steril. Setelah inkubasi akan terlihat koloni-koloni yang tersebar di permukaan agar yang mungkin berasal dari 1 sel bakteri, sehingga dapat diisolasi lebih lanjut.

### **C. Tinjauan Bahan Antimikroba**

Antimikroba adalah agen yang digunakan untuk membunuh mikroorganisme atau menekan perkembangbiakan dan pertumbuhannya (Nugroho 2018) . Ada perbedaan mendasar antara mikroba dan parasite, istilah mikroba mencakup virus, bakteri dan fungi sedangkan parasite meliputi protozoa dan cacing.

Antimikroba sering disebut sebagai antibiotik, sebuah istilah yang berasal dari kata antibios yang merujuk pada substansi yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme dan dapat menghambat pertumbuhan atau bahkan mematikan mikroorganisme lain dalam jumlah kecil. Penemuan antibiotik dimulai oleh Alexander Fleming pada tahun 1928, ketika ia mengamati adanya penghambatan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada



cawan petri oleh kontaminan yang kemudian diidentifikasi sebagai jamur *Penicillium notatum*. Zat aktif yang diisolasi dari *Penicillium notatum* ini kemudian diberi nama penicillin. Penicillin menjadi tonggak penting dalam sejarah kedokteran karena merupakan antibiotik pertama yang berhasil digunakan secara luas untuk mengatasi infeksi bakteri dan telah membuka jalan bagi penemuan antibiotik lainnya (Pertiwi.2020).

Antimikroba dapat berupa senyawa kimia sintetik atau produk alami dari makhluk hidup. Antimikroba sintetik dapat dihasilkan dengan membuat suatu senyawa yang sifatnya mirip dengan aslinya yang dibuat besar-besaran, sedangkan antimikroba alami didapatkan langsung dari organisme yang menghasilkan senyawa tersebut dengan melakukan proses pengekstrakan. Bahan kimia yang dapat membunuh organisme disebut *cidal*, seperti *bactericidal*. Sedangkan bahan kimia yang menghambat organisme disebut *static*, seperti *bacteriostatic* (Pertiwi. 2020).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antimikroba dapat dikelompokkan menjadi lima kategori utama. Pertama, ada kelompok yang bertugas menghambat sintesis dinding sel mikroba. Mekanisme ini bekerja dengan mencegah pembentukan atau mempengaruhi integritas dinding sel, yang pada gilirannya menghentikan pertumbuhan mikroorganisme tersebut. Kedua, terdapat kelompok antimikroba yang mengganggu keutuhan membran sel mikroba. Mekanisme ini merusak atau mengubah struktur membran sel, menyebabkan kebocoran dan kematian sel mikroba. Ketidakintegritasan membran menjadi cara efektif untuk mengatasi infeksi.

Ketiga, antimikroba juga dapat menghambat metabolisme sel mikroba. Ini berarti zat tersebut mengganggu proses kimia yang diperlukan oleh mikroorganisme untuk bertahan hidup dan berkembang biak. Dengan menghambat metabolisme, antimikroba dapat mengekang kemampuan mikroba untuk menyebabkan infeksi. Keempat, terdapat kelompok yang menghambat sintesis protein sel mikroba. Sintesis protein adalah langkah penting dalam kehidupan sel mikroba, dan dengan mengganggu proses ini, antimikroba dapat menghentikan produksi protein yang diperlukan untuk fungsi sel mikroba. Kelima, ada kelompok antimikroba yang menghambat sintesis asam nukleat sel mikroba. Sintesis asam nukleat, termasuk DNA dan RNA, adalah proses penting dalam reproduksi mikroorganisme. Dengan menghambat sintesis asam nukleat, antimikroba dapat memblokir kemampuan mikroba untuk mereplikasi diri. Dengan pemahaman yang mendalam tentang berbagai mekanisme kerja ini, pengembangan antimikroba menjadi lebih terarah, memungkinkan pilihan pengobatan yang lebih efektif dan spesifik terhadap berbagai jenis infeksi (Sovia.2019).

Dewasa ini istilah “antibiotik” tidak hanya ditujukan kepada zat yang dihasilkan oleh mikroorganisme, tetapi juga zat sintetik yang dihasilkan di laboratorium atau industri yang memiliki sifat antimikroba. Antibiotik semisintetik merujuk pada antibiotik alami yang telah dimodifikasi dalam laboratorium untuk meningkatkan kekuatan atau bioaktivitas antimikrobanya.

## **1. Jenis dan Klasifikasi Antibiotik**

Berbagai jenis antibiotik telah dikenal sejak dikemukakannya

konsep aktivitas antibiotik itu sendiri. Tabel 2 menyajikan sejarah perkembangan dan pengenalan kelas-kelas baru antibiotik (Wibisana, 2022). Sedangkan Tabel 3 menyajikan jenis-jenis senyawa antibiotik yang terkenal dan bermanfaat bagi manusia beserta mikroorganismenya dan penghasilnya.

**Tabel 2.** Sejarah pengenalan kelas-kelas baru antibiotik

Tahun Pengenalan	Kelas Antibiotik
1935	Sulfonamida
1941	Penisilin
1944	Aminoglikosida
1945	Sefalosporin
1949	Kloramfenikol
1950	Tetrasiklin
1952	Makrolida/ <i>lincosamides</i>
1956	Glikopeptida
1957	Rifamisin
1959	Nitroimidazola
1962	Quinolona
1968	Trimethoprim
2000	Oksazolidinon
2003	Lipopeptida

Senyawa antibiotik dapat dikelompokkan berdasarkan kelarutannya, basis bahan kimia alami, basis struktur kimia, maupun toksisitasnya terhadap animalia. Berdasarkan kelarutannya, senyawa antibiotik dapat dibagi atas:

1. Grup A. Larut dalam air dengan reaksi berbeda-beda, dan tidak larut dalam eter. Senyawa ini biasanya berbasis protein, basa organik, atau

senyawa pengadsorpsi pada molekul protein. Contohnya: aktinomisetin, streptomisin, penatin, dan piosianin.

2. Grup B. Larut dalam eter dan dalam air dengan reaksi tertentu. Contoh: penisilin, flavisin, sitrinin, asam penisilat, proaktinomisin.
3. Grup C. Tidak larut dalam air dan eter, meliputi gramisidin, tirosidin, subtilin, dan simplesin.
4. Grup D. Larut dalam eter dan tidak larut dalam air. Contoh: fumigasin, fumigatin, gliotoksin, actinomisin, piosianase, dan lain-lain.

Berdasarkan basis bahan kimia alami penyusunnya, senyawa antibiotik dapat dibagi atas:

1. Lipoid dan berbagai ekstrak mikrobial yang diperoleh dengan pelarut organik, seperti *pyocyanase*, asam piolipik, dan lain-lain.
2. Pigmen, yaitu piosianin, hemipiosianin, prodigiosin, fumigatin, klororafin, toksoflavin, aktinomisin, litmosidin, dan lain-lain.
3. Polipeptida, terdiri dari tirotrisin, gramisidin, tirosidin, kolisin, subtilin, basilin, dan aktinomisetin.
4. Senyawa mengandung sulfur, yakni berbagai jenis penisilin, gliotoksin, dan *chaetomin*.
5. Kuinon dan keton, yaitu sitrinin, spinulosin, klavasin, dan asam penisilat.
6. Basa organik, meliputi streptomisin, streptotrisin, dan proaktinomisin.

Antibiotik yang diklasifikasikan berdasarkan struktur kimianya yaitu sebagai berikut:

1. Senyawa mengandung C, H, dan O saja

Contoh: klavasin ( $C_7H_6O_4$ ), fumigatin ( $C_8H_8O_4$ ), asam penisilat ( $C_8H_{10}O_4$ ), sitrinin ( $C_{13}H_{14}O_5$ ), fumigasin ( $C_{32}H_{44}O_8$ ), dan lain-lain.

2. Senyawa mengandung C, H, O, dan N

Contoh: iodinin ( $C_{12}H_{20}O_4N_2$ ), streptomisin ( $C_{21}H_{37-39}O_{12}N_2$ ), aktinomisin ( $C_{41}H_{56}O_{11}N_8$ ), gramisidin, tirosidin, dan lain-lain.

3. Senyawa mengandung C, H, O, N, dan S

Contoh: penisilin ( $C_9H_{11}O_4SN_2.R$ ), gliotoksin ( $C_{13}H_{14}O_4N_2S_2$ )

4. Senyawa lainnya yang belum teridentifikasi secara penuh.

Contoh: ustin ( $C_{19}H_{15}O_5Cl_3$ )

Berdasarkan toksisitasnya terhadap animalia, senyawa antibiotik dapat digolongkan menjadi:

1. Senyawa nontoksik atau sedikit toksik, meliputi penisilin, streptomisin, flavisin, poliporin, dan aktinomisetin.
2. Senyawa dengan toksisitas terbatas, termasuk gramisidin, tirosidin, sitrinin, streptotrisin, dan fumigasin.
3. Senyawa toksisitas tinggi, seperti aktinomisin, gliotoksin, asam aspergilat, dan klavasin.

Pengelompokan yang lebih modern untuk senyawa antibiotik umumnya dilihat dari gugus penting di dalamnya yang terlibat dalam aktivitas antimikrobia maupun yang menjadi ciri khas dari struktur molekulnya. Beberapa kelompok antibiotik tersebut yaitu:

a. Antibiotik  $\beta$ -laktam

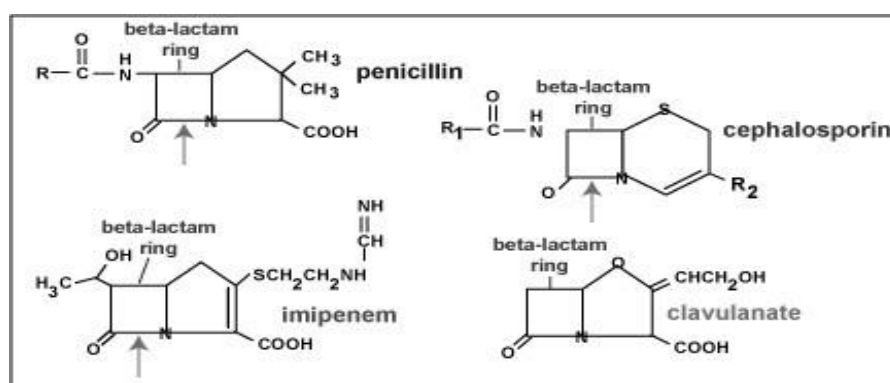
Ciri khas dari antibiotik golongan ini adalah memiliki gugus  $\beta$ -laktam.

Gugus  $\beta$ -laktam merupakan sebuah cincin dengan 2 atom C, 1 gugus

karbonil, dan 1 atom N. Jenis antibiotik ini merupakan yang paling terkenal dan penggunaan paling luas dalam dunia kesehatan (lebih dari 50% total penggunaan dan produksi dunia). Beberapa antibiotik yang termasuk golongan ini dapat dilihat pada Tabel 3, sedangkan struktur molekulnya dapat dilihat pada Gambar 3.

**Tabel 3.** Beberapa subkelas dan senyawa antibiotik  $\beta$ -laktam

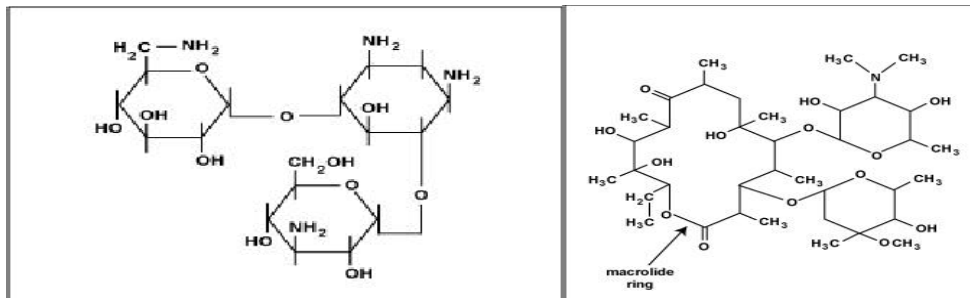
Subkelas	Senyawa Antibiotik	Mikroorganisme Penghasil		
		Fungi	Bakteri G <sup>+</sup>	Bakteri G <sup>-</sup>
<i>Penams</i>	Penisilin G	<i>Penicillium, Aspergillus</i>		-
<i>Cephems</i>	Sefalosporin C	<i>Cephalosporium</i>	-	-
	Sefamisin C	-	<i>Sterptomyces, Nocardia</i>	-
<i>Carbapenems</i>	Thienamisin	-	<i>Streptomyces cattleya</i>	<i>Serratia, Erwinia</i>
<i>Monobaktams</i>	Aztreonam	-	<i>Nocardia</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Clavams</i>	Asam klavulanat	-	<i>Streptomyces</i>	-
	Klavamisin	-	<i>Streptomyces</i>	-



**Gambar 2.** Struktur Molekul Beberapa Jenis Antibiotik  $\beta$ -laktam (sumber: faculty.ccbcmd.edu)

## b. Aminoglikosida

Kelompok ini merupakan antibiotik yang mengandung amino gula yang dihubungkan dengan ikatan glikosidik, sehingga dinamakan aminoglikosida. Beberapa jenis antibiotik yang tergolong aminoglikosida yaitu streptomisin (dihasilkan oleh *Streptomyces griseus*), kanamisin (Gambar 3a), neomisin, gentamisin, tobramisin, netilmisin, spektinomisin, dan amikasin. Streptomisin merupakan antibiotik pertama yang efektif dalam pengobatan *tuberculosis*. Antibiotik aminoglikosida tidak digunakan secara luas, di mana hanya mencakup 3% dari total semua antibiotik dihasilkan dan digunakan di dunia.



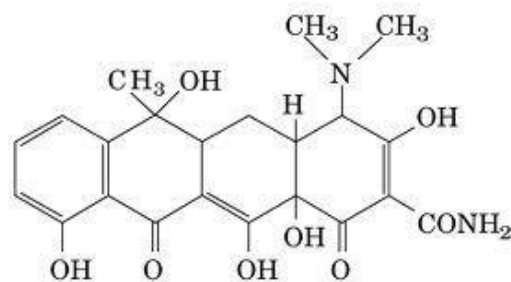
**Gambar 3.** Struktur Molekul a.Kanamisin (kiri); b.Eritromisin (kanan) (sumber: archive.microbelibrary.org)

### c. Makrolida

Antibiotik makrolida memiliki cincin lakton yang berikatan dengan gula. Variasi cincin lakton dan gula menghasilkan berbagai macam senyawa antibiotik jenis ini. Meskipun ukuran cincin antibiotik makrolida bervariasi antara 6 sampai 30, kebanyakan antibiotik makrolida yang digunakan memiliki ukuran cincin 14 atau 16. Eritromisin, jenis antibiotik makrolida yang paling banyak digunakan, memiliki ukuran cincin 14 (Gambar 3b). Secara keseluruhan, antibiotik makrolida mencakup 11% dari total produksi dan penggunaan antibiotik dunia.

### d. Tetrasiklin

Antibiotik tetrasiklin memiliki struktur yang terdiri dari cincin naftacena. Substitusi gugus dasar cincin naftacena dapat terjadi secara alami dan menghasilkan analog tetrasiklin yang baru. Antibiotik tetrasiklin merupakan antibiotik dengan penggunaan yang cukup luas setelah antibiotik  $\beta$ -laktam. Struktur molekul tetrasiklin dapat dilihat pada Gambar 4.

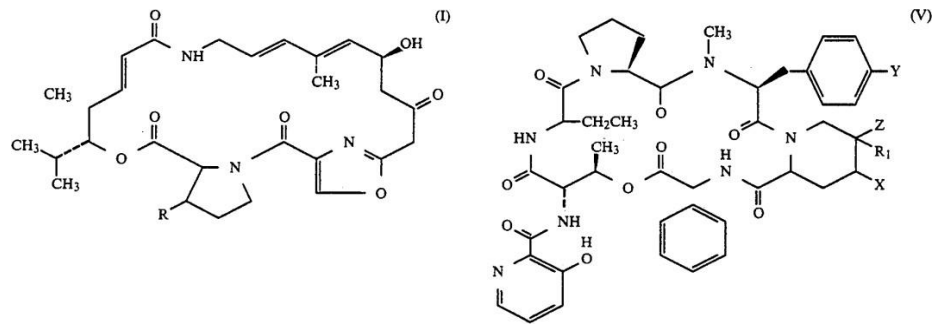


**Gambar 4.** Struktur Molekul Tetrasiklin (sumber: in.godowell.com)

#### e. Streptogramin

Merupakan jenis antibiotik yang umumnya dihasilkan oleh mikroorganisme genus *Streptomyces*. Streptogramin dibedakan atas dua jenis yaitu streptogramin A dan streptogramin B. Dalam mekanisme kerjanya, kedua jenis streptogramin bersinergi untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Salah satu contoh antibiotik streptogramin adalah pristinamisin, yang merupakan gabungan dari pristinamisin I<sub>A</sub> (sebuah makrolakton peptida yang termasuk streptogramin B) dan pristinamisin II<sub>A</sub> (sebuah makrolakton poliunsaturated yang termasuk streptogramin A). Struktur molekul pristinamisin dapat dilihat pada Gambar 5.

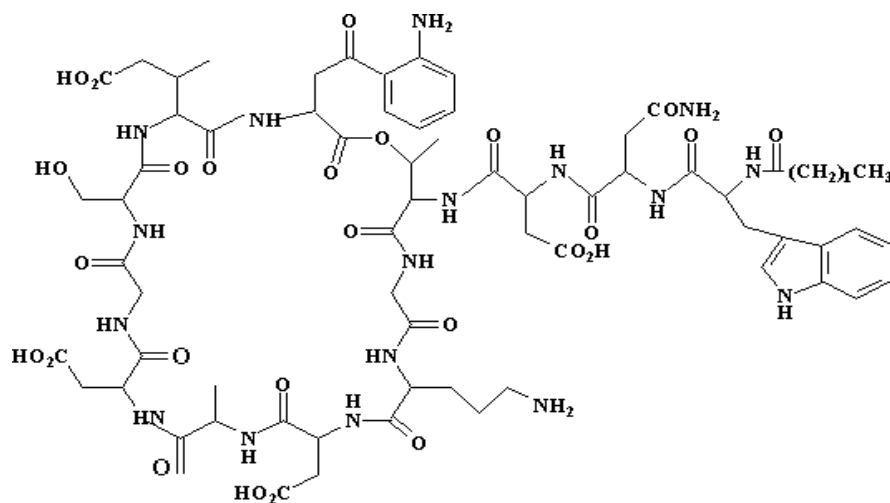




**Gambar 5.** Struktur Molekul Pristinamisin IIA dan Pristinamisin IA (sumber: [www.wikipatents.com](http://www.wikipatents.com))

#### f. Daptomisin

Daptomisin ( $C_{72}H_{101}N_{17}O_{26}$ ) merupakan antibiotik yang mengandung siklik lipopeptida. Umumnya dihasilkan oleh genus *Streptomyces*. Daptomisin digunakan untuk mengobati infeksi bakteri gram positif seperti staphylokokus dan streptokokus yang bersifat patogen. Cara kerjanya dengan mengikat secara spesifik pada membran sitoplasma bakteri, membentuk pori, dan mengakibatkan depolarisasi membran. Akibat depolarisasi, bakteri tidak dapat menghasilkan makromolekul seperti asam nukleat dan protein, dan akhirnya mati. Struktur molekul daptomisin dapat dilihat pada Gambar 6.



**Gambar 6.** Struktur Molekul Daptomisin (sumber: [www.usermeds.com](http://www.usermeds.com))

## **2. Mekanisme Aktivitas Antimikroba**

Antimikroba adalah bahan-bahan atau obat-obat yang digunakan untuk memberantas infeksi mikroba pada manusia termasuk diantaranya antibiotika, antiseptika, kemoterapeutika, dan pengawet. Obat-obat yang digunakan untuk membasmi mikroorganisme yang menyebabkan infeksi pada manusia, hewan ataupun tumbuhan, harus bersifat sangat toksik terhadap mikroorganisme penyebab penyakit tetapi relatif tidak toksik terhadap jasad dengan inang atau hospes (Djide, 2005).

Berdasarkan tingkat toksisitas selektifnya, Lay dan Sugyo (1994), membagi senyawa antimikroba atas:

### **a. Bakteriostatik**

Senyawa antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri namun, jika pemberian senyawa ini dihentikan atau habis, maka pertumbuhan dan perbanyakan dari bakteri akan kembali meningkat.

### **b. Bakterisida**

Senyawa antimikroba yang mampu membunuh dan menghentikan aktivitas fisiologis dari bakteri, meskipun pemberian senyawa tersebut dihentikan.

## **3. Metode Pengujian Antimikroba**

Dikenal beberapa cara pemeriksaan dan pengujian secara mikrobiologi terhadap kemampuan antimikroba dari bahan-bahan kemoterapeutika seperti antibiotika. Walaupun pada umumnya pengujian dilakukan terhadap kebanyakan antibiotika, namun ada juga bahan-bahan lain yang diduga mempunyai daya hambat atau membunuh mikroba.

Pengujian aktivitas mikroba dapat dilakukan secara *in vitro* maupun secara *in vivo*. Pengujian secara *in vitro* dilakukan untuk menentukan potensi agen antimikroba dalam larutan, konsentrasinya dalam tubuh atau jaringan, dan kepekaan mikroorganisme terhadap obat yang diketahui. Secara umum pengujian antimikroba secara *in vitro* dapat dilakukan dengan dua cara yaitu (Brooks dkk., 2005; Lay, 1994; Octaviani M, 2019):

#### 1. Metode Difusi (Penyerapan)

Pada metode ini kemampuan antimikroba ditentukan berdasarkan hambatan yang terjadi. Metode yang paling sering digunakan adalah metode difusi agar. Beberapa modifikasi metode ini adalah:

##### a. Metode difusi dengan silinder pipih

Cara ini didasarkan atas perbandingan antara luas daerah hambatan yang dibentuk larutan contoh terhadap pertumbuhan mikroba dengan daerah hambatan yang dibentuk larutan pembanding. Pada cara ini digunakan plat silinder yang diletakkan pada media kemudian larutan contoh dimasukkan ke dalamnya. Silinder yang digunakan adalah *stainless steel* tahan karat atau porselin dengan toleransi ukuran masing-masing lebih kurang 0,1 mm, diameter luar 8 mm, diameter dalam 6 mm dan tinggi 10 mm. Metode ini dapat dilihat pada Gambar 7.



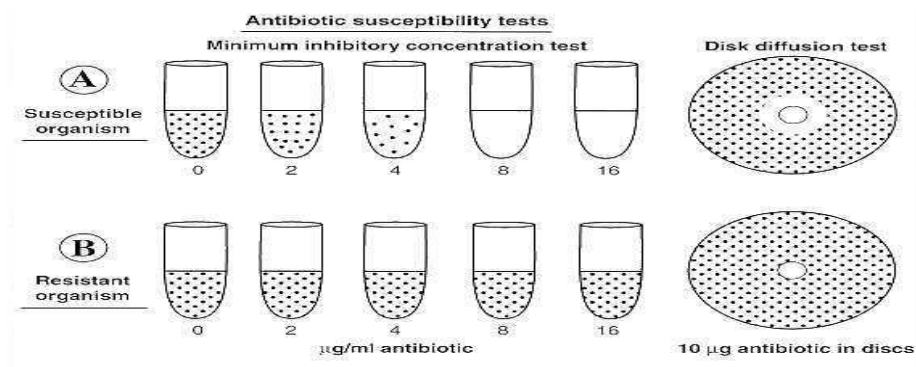
**Gambar 7.** Metode Difusi Silinder Pipih pada Pengujian Antimikroba (Bioweb, 2009)

b. Metode Difusi Mangkuk Pipih

Prinsip kerjanya sama dengan plat silinder. Perbedaan disini adalah menggunakan alat berupa 'cup plate' yaitu lubang atau semacam mangkok yang diletakkan langsung pada medium.

c. Metode Difusi dengan Kertas Saring atau Kirby-Bauer

Uji ini diperkenalkan oleh William Kirby dan Alfred Bauer tahun 1966. Cara ini menggunakan kertas saring dengan garis tengah 0,7-1 cm, yang nantinya dicelupkan ke dalam larutan pembanding. Penghambatan pertumbuhan mikroba terlihat sebagai wilayah jernih di sekitar pertumbuhan mikroba. Metode ini dapat dilihat pada Gambar 8.

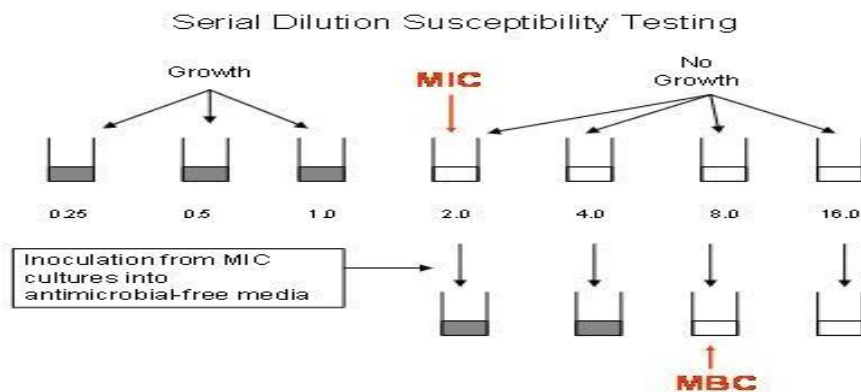


**Gambar 8.** Metode Difusi Kertas Saring pada Pengujian

## 2. Metode Dilusi (Pengenceran)

Metode ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap, baik dengan media cair atau padat. Kemudian media diinokulasikan bakteri uji dan diinkubasi. Tahap akhir antimikroba dilarutkan dengan kadar yang menghambat atau mematikan.

Uji kepekaan cara dilusi cair dengan menggunakan tabung reaksi, tidak praktis dan jarang dipakai; namun kini ada cara yang lebih sederhana dan banyak dipakai, yaitu dengan menggunakan *microdilution plate*. Keuntungan uji mikrodilusi cair adalah bahwa uji ini memberi hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah antimikroba yang dibutuhkan untuk membunuh mikroba. Metode dilusi secara skematik dapat dilihat pada Gambar 9.



**Gambar 9.** Metode Dilusi pada Penentuan MIC Aktivitas Antimikroba (Washington, 2009)

## 4. Resistensi Antimikroba

Bakteri telah berevolusi dengan berbagai mekanisme untuk menghindari obat antimikroba. Mutasi kromosom merupakan sumber penting perlawanan terhadap beberapa antimikroba. Akuisisi gen resistensi

atau kelompok gen, melalui konjugasi, transposisi, atau transformasi, merupakan suatu perlawanan yang paling rentan antara antimikroba dengan bakteri patogen, di mana mekanisme ini juga meningkatkan kemungkinan resistensi multidrug dari suatu antimikroba.

Faktor utama penyebab resistensi antimikroba adalah adanya penggunaan obat yang tidak tepat (tidak sesuai indikasi), penggunaan antibiotik yang berlebihan dan tidak mencapai dosis efektif yang dibutuhkan untuk pengobatan. Tingginya biaya pemenuhan kebutuhan hidup serta mahalnya pengobatan yang menggunakan antibiotik merupakan masalah global yang dihadapi oleh masyarakat di wilayah Negara berkembang, terutama yang berada jauh dari pelayanan kesehatan modern.

Jika dalam suatu populasi bakteri ditemukan strain yang resisten terhadap bakteri maka pemaparan terhadap obat antimikroba secara langsung mempengaruhi kelangsungan hidup mereka. Mengurangi tekanan seleksi antimikroba merupakan salah satu kunci untuk mencegah resistensi antimikroba dan melestarikan kegunaan obat yang tersedia untuk selama mungkin.

Prinsip besar resistensi antimikroba adalah *Survival of the Fittest*. Agen antibakteri membunuh bakteri rentan, tetapi organisme resisten bertahan untuk menginfeksi pasien lainnya. Pada saat yang sama, kemajuan dalam pengobatan memperbesar potensi pasien yang mengalami kelainan imun sehingga rentan terhadap infeksi oleh organisme yang historis adalah tidak berbahaya, tetapi dapat menimbulkan resistensi. Perlawanan dapat timbul melalui mutasi, transfer gen atau dengan

pemilihan inheren tahan spesies. Pentingnya proses ini bervariasi dengan organisme, agen antimikroba dan pengaturan klinis.

a. Mutasi

Mutasi adalah perubahan genetik spontan, yang timbul secara acak. Mereka dapat memberikan perlawanan oleh berbagai mekanisme, khususnya:

1. Peningkatan penghancuran agen antimikroba
2. Mengurangi penyerapan obat
3. Ekskresi obat meningkat
4. Mengubah target agen antimikroba yang sehingga tidak lagi terikat oleh obat

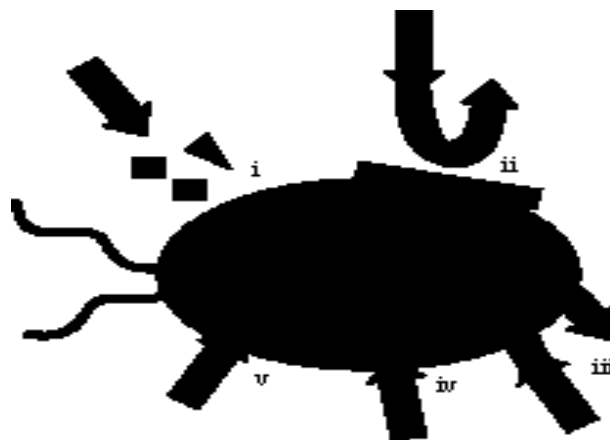
5. Mengaktifkan jalur metabolisme alternatif yang melewati target. Bakteri dapat membelah diri setiap 20-30 menit, sehingga semalam, satu sel dapat menghasilkan satu miliar. Setelah mutan resisten muncul, dengan cepat dapat menjadi bakteri dominan dalam populasi. Dalam kasus terburuk, mutan resisten dapat terpapar dalam terapi, menyebabkan kegagalan pengobatan pada pasien individu. Beberapa obat pilih tahan mutan dari sebagian besar spesies, yang juga potensial terhadap patogen tertentu.

b. Mekanisme Resistensi

Agen antibakteri, dapat diilustrasikan seperti peluru yang ditarik, kepala ke arah target seperti yang ditunjukkan pada Gambar 10. Perlawanan mungkin timbul:

- (i) jika tidak aktif sebelum mencapai target ini,

- (ii) jika sel bakteri menjadi kedap air, sehingga sasaran tidak tercapai,
- (iii) jika sel mengakuisisi kemampuan untuk memompa kembali keluar antibiotik,
- (iv) jika target telah diubah sehingga tidak lagi diakui oleh agen antibakteri,
- (v) jika bakteri memperoleh sebuah alternatif jalur metabolik, yang dilewati agen antibakteri.



**Gambar 10.** Ilustrasi Mekanisme Resistensi

### c. Transfer Gen

Bakteri dapat bertukar informasi genetik (DNA) melalui beberapa mekanisme. Paling penting, plasmid-loop DNA yang terpisah dari kromosom dapat membawa gen resistensi dan dapat mentransfer dari sel ke sel. Dalam gen plasmid resistensi, kemungkinan terletak pada transposon, yang lengket berakhir pada bagian DNA yang bisa melompat dari plasmid ke plasmid, dan kromosom meningkatkan penyebaran mereka. Plasmid individu dapat membawa gen resistensi, termasuk encoding agen antimikroba yang menonaktifkan enzim, target-memodifikasi atau melewati enzim dan obat dieksresikan melalui



pompa. Ini adalah salah satu contoh fungsi untuk menampilkan konsekuensi dari plasmid-mediated perlawanan.

Spektrum luas penisilin (ampisilin) diperkenalkan pada tahun 1963 dan pada awalnya memiliki aktivitas terhadap sebagian bakteri gram negatif, termasuk *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* dan *Neisseria gonorrhoeae*. Pada 1965, ampisilin tahan *Escherichia coli* dicatat dan ditemukan memiliki plasmid-mediated ampisillin degrading enzim, dijuluki 'TEM-1  $\beta$ -laktamase. Dalam 33 tahun berikutnya enzim ini telah menyebar ke 40-60% dari isolat *Escherichia coli* dan spesies terkait erat, dan juga telah mencapai *Haemophilus influenzae* dan *Neisseria gonorrhoeae*, dimana sekarang terjadi pada 5-15% dari Inggris dan di 30-50% dari mereka yang berasal dari Eropa Selatan dan Asia Tenggara. Asal-usul plasmid-mediated resistensi tidak jelas. Di bawah seleksi besar, plasmid sejak resistensi gen dari sumber kromosom, termasuk antibiotik yang memproduksi bakteri, yang harus melindungi diri terhadap produk mereka. Seperti 'lolos' jarang terjadi, tapi sekali gen pada plasmid lolos, potensi untuk penyebarannya sangat besar. Ada sumber lain DNA 'asing', selain plasmid. Resistensi gen mungkin masuk langsung dalam kromosom bakteri, mungkin dibawa oleh bakteriofag (Virus yang menginfeksi bakteri). Beberapa spesies *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitis* dan *Neisseria gonorrhoeae* dapat menyerap DNA dari sel spesies terkait dan masuk ke dalam kromosom mereka sendiri. The *mosaik* yang dihasilkan dapat mengkodekan gen yang resistan terhadap produk obat.

#### **D. Aktivitas Biologis Penghambatan Sel Kanker**

Aktivitas biologis untuk penghambatan sel kanker dapat dilakukan dengan mekanisme penghambatan sintesa DNA. Replikasi DNA dapat terjadi dengan adanya sintesis rantai nukleotida baru dimana rantai nukleotida lama berfungsi sebagai patron (cetakan). Prosesnya dengan menggunakan komplementasi pasangan basa untuk menghasilkan suatu molekul yang berfungsi sebagai cetakan (template) DNA baru yang sama dengan molekul DNA lama. Proses yang terjadi tersebut dipengaruhi oleh enzim helikase, enzim polimerase, ligase dan dNTP-dNTP. Adapun tahapan-tahapan yang terjadi adalah sebagai berikut:

1. Denaturasi mol DNA utas rangkap (*double helix*) menjadi DNA utas tunggal dilakukan oleh enzim unwindase.
2. Sintesa DNA baru dengan menggunakan DNA hasil denaturasi sebagai template (cetakan).
3. Agar point 2 dapat berlangsung harus tersedia dNTP<sup>2</sup>, enzim DNA polimerase.
4. Setelah rantai DNA baru sempurna disintesis maka oleh enzim ligase dibentuk DNA utas rangkap yang dapat terjadi melalui 2 metode yaitu:
  - a. Metode konservatif apabila DNA utas rangkap yang terbentuk hasil penggabungan rantai DNA lama dengan rantai DNA lama.
  - b. Metode semi konservatif apabila DNA utas rangkap yang terbentuk merupakan hasil penggabungan dari DNA lama

dengan DNA baru.

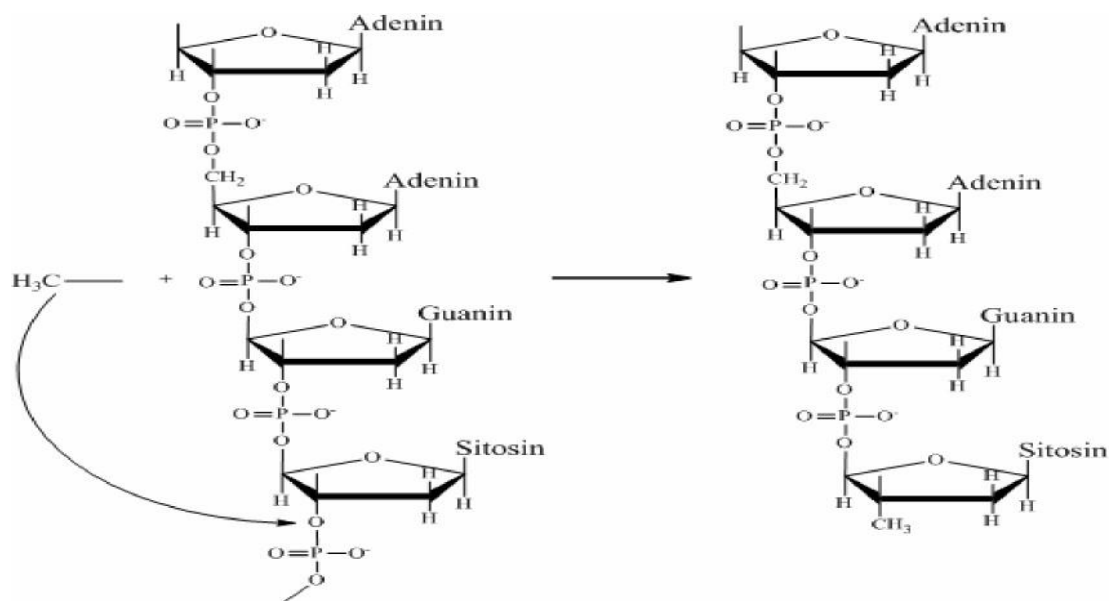
5. Untuk sel kanker diperlukan unsur tambahan selain dari pada komponen–komponen pada point 1 s/d 4 di atas yaitu enzim telomerase yang memotong rantai DNA awal menjadi fragmen–fragmen dimana urutan nukleotidanya sudah menemui unsur gen.

Ada tiga kemungkinan terjadinya replikasi DNA, yaitu konservatif, semikonservatif, dan dispersif.

1. Model konservatif, yaitu dua rantai DNA lama tetap tidak berubah, berfungsi sebagai cetakan untuk dua rantai DNA baru. Replikasi ini mempertahankan molekul dari DNA lama dan membuat molekul DNA baru.
2. Model semi konservatif, yaitu dua rantai DNA lama terpisah dan rantai baru disintesis dengan prinsip komplementasi pada masing-masing rantai DNA lama. Akhirnya dihasilkan dua rantai DNA baru yang masing-masing mengandung satu rantai cetakan molekul DNA lama dan satu rantai baru hasil sintesis.
3. Model dispersif, yaitu beberapa bagian dari kedua rantai DNA lama digunakan sebagai cetakan untuk sintesis rantai DNA baru. Oleh karena itu, hasil akhirnya diperoleh rantai DNA lama dan baru yang tersebar pada rantai DNA lama dan baru. Replikasi ini menghasilkan dua molekul DNA lama dan DNA baru yang saling berselang-seling pada setiap untai.

Penelitian tentang mencegah kanker melalui mekanisme DNA telah banyak dilaporkan oleh beberapa peneliti. Metilasi DNA dan

penekanan produksi Histon Deacetylase (HDAC) akibat rangsangan sulforaphane yang bekerja sama untuk mempertahankan fungsi sel normal, makin tinggi kadar sulforaphane maka semakin efektif untuk melawan kanker. Hal ini telah dibuktikan melalui penelitian terhadap kanker payudara pada tikus-tikus percobaan serta mencegah perkembangan sel-sel yang baru tumbuh. Apabila gugus metil dari senyawa organo sulfida mensubstitusi gugus –OH posisi C no 3 dari DNA, maka sintesa DNA pada sel kanker akan terhambat karena tidak terjadi perpanjangan rantai DNA seperti pada Gambar 11. Akibatnya masuknya metil pada Cytosin, maka perpanjangan DNA berikutnya akan terhambat karena pospat tidak dapat berikatan lagi pada atom C no. 3 sehingga sintesa DNA akan terhenti.



**Gambar 11.** Reaksi Penghambatan rantai DNA yang mengandung adenin, guanin dan sitosin (National Cancer Institute, 2008)

### E. Mekanisme Pembentukan Kanker

## **Kanker**

Kanker merupakan salah satu penyakit yang timbul akibat pertumbuhan sel yang tidak terkontrol, dan pada tahap awal perkembangannya, dapat muncul sebagai tumor jinak karena adanya proliferasi sel yang berlebihan. Tumor ini memiliki potensi untuk berubah menjadi tumor ganas yang berisiko merusak jaringan dan organ di sekitarnya. Seiring dengan pertumbuhannya, sel kanker membentuk massa atau klon jaringan ganas yang mampu menyerang jaringan di sekitarnya dengan bersifat invasif, dan bahkan dapat menyebar ke tempat lain dalam tubuh melalui proses yang disebut metastasis. Salah satu jenis kanker yang umum dialami oleh wanita adalah kanker payudara. Kanker payudara merupakan penyakit serius yang berkembang ketika sel-sel abnormal dalam jaringan payudara berkembang tanpa kendali. Keberadaan tumor ganas ini dapat menyusup ke jaringan di sekitarnya dan, jika tidak diatasi, dapat menyebar ke organ tubuh lainnya. Oleh karena itu, deteksi dini dan pengelolaan kanker payudara menjadi sangat penting untuk meningkatkan peluang kesembuhan dan mengurangi risiko komplikasi.

Pemahaman mendalam terhadap perkembangan kanker, mekanisme metastasis, dan jenis kanker tertentu seperti kanker payudara, menjadi dasar untuk penelitian dan pengembangan strategi pengobatan yang lebih efektif dalam menghadapi tantangan penyakit ini (Marfianti E, 2021).

Kanker payudara merupakan jenis kanker yang terjadi ketika jumlah sel dalam pembentukan payudara tumbuh secara terus menerus di luar

kendali (terjadi pembelahan sel yang abnormal). Kanker payudara itu pada prinsipnya merupakan tumor ganas yang dapat berasal dari kelenjar kulit, saluran kelenjar dan jaringan disebelah luar rongga dada. Dimana jaringan pada payudara terdiri dari dua tipe yaitu jaringan glandular (kelenjar) dan jaringan stromal (penopang). Sel kanker payudara sangat sulit dideteksi oleh system imun manusia dan terus melakukan pembelahan tanpa kita sadari hingga akhirnya sampai pada tahap telah menjadi tumor ganas dan menyebar ke organ lainnya (Sari Utami, 2018). Kanker payudara (*Carcinoma mammae*) merupakan penyakit dengan angka kematian yang tertinggi dengan tingkat insidensi yang semakin tinggi, penyakit ini terjadi umumnya dikarenakan terlambatnya penanganan dan pengobatan pada penderita sehingga kanker sudah berada pada stadium lanjut (Amir *et al.*, 2017).

## **5. Faktor Risiko Kanker Payudara**

Perkembangan zaman dan semakin berkembangnya teknologi belum cukup untuk mendeteksi dan menjawab penyebab pasti dari kanker payudara, hanya sedikit informasi yang diketahui tentang penyebabnya. Diduga ada banyak faktor yang saling berhubungan satu dengan yang lainnya. Penyebabnya dibagi menjadi dua faktor yang terdiri dari faktor risiko yang tidak dapat diubah (*unchangeable*) dan yang dapat diubah (*changeable*) (Khairunnisa 2021).

## **Faktor Risiko yang Tidak Dapat Diubah (*unchangeable*)**

### a. Genetika

Wanita yang memiliki satu atau bahkan dua jalur keturunan yang mengidap atau pernah menderita kanker payudara atau kanker indung telur memiliki risiko terkena kanker payudara dari pada wanita yang tidak memiliki riwayat keturunan yang pernah mengidap kanker. Walaupun diketahui bahwa kanker payudara bukan penyakit yang dapat diturunkan seperti penyakit-penyakit degeneratif (diabetes mellitus, alergi dan hemophilia). Akan tetapi menurut teori kanker payudara mungkin saja dapat diturunkan sekitar 5-10%, wanita yang tidak memiliki riwayat garis keturunan menderita kanker payudara 5,4 kali lebih tinggi kemungkinan tidak akan menderita penyakit kanker payudara apabila dibandingkan dengan wanita yang memiliki satu atau bahkan dua riwayat keluarga (dari ayah atau ibu bahkan keduanya) yang mengidap kanker payudara (OR = 5,4) (Khairunnisa 2021).

### b. Usia

Semakin tua seorang wanita maka akan semakin meningkatkan risiko menderita penyakit kanker payudara. Menurut data usia wanita dalam rentang 40 – 60 tahun sangat berisiko tinggi menderita kanker payudara, apalagi jika ditunjang dengan pola hidup yang buruk saat masih muda, sering mengkonsumsi obat-obatan utamanya yang mengandung hormone (estrogen dan progesterone) serta memasuki masa menopause pada usia 55 tahun akan semakin

menambah risiko dari mengidap kanker payudara (Khairunnisa 2021).

Berdasarkan penelitian Rianti,dkk (2012) dengan *desain case control*diperkirakan risiko kelompok wanita dengan usia > 50 tahun berisiko lebih tinggi terkena kanker payudara 5,8 kali jika dibandingkan dengan kelompok usia wanita  $\leq$  50 tahun (OR = 5,8) yang masa mudanya menjalani hidup sehat (tidak merokok, minum alcohol dan cukup rutin berolah raga).

c. Umur disaat memperoleh menstruasi pertama

Seorang wanita yang mengalami menstruasi dini (menstruasi diusia kurang dari 12 tahun) atau pubertas sebelum waktunya akan semakin meningkatkan risiko terkena kanker di saat dewasa. Hal ini dipengaruhi oleh kadar hormone estrogen dan progesterone merupakan hormone yang bertanggung jawab atas pertumbuhan sekunder pada wanita yaitu payudara dan bokong. Semakin cepat wanita terpapar hormone tersebut akan semakin besar kemungkinan untuk terkena kanker payudara disaat dewasa dan usia lansia.

Wanita yang memiliki riwayat umur menstruasi pertama < 12 tahun lebih besar menderita kanker payudara 52%. Wanita yang mempunyai riwayat umur menstruasi pertama  $\geq$  12 tahun berisiko 6,1 kali lebih tinggi untuk tidak menderita kanker payudara dibanding wanita usia < 12 tahun mendapatkan menstruasi pertamanya (OR = 6,1) (Khairunnisa 2021)

d. Menopause Usia Lanjut



Menurut Penelitian Pulungan MR 2010 untuk wanita yang mengalami menopause diatas usia 55 tahun berisiko lebih tinggi terkena kanker payudara dari pada yang menopause dibawah usia tersebut. Ada sekitar 25% kejadian kanker payudara sebelum memasuki masa menopause, jadi diperkirakan pertumbuhan tumor terjadi jauh sebelum masa menopause itu terjadi dan juga diakibatkan lamanya tubuh terpapar hormone estrogen.

e. Riwayat mengidap Penyakit Tumor Jinak

Ada beberapa tumor yang bersifat jinak pada organ payudara jika dibiarkan dan dipacu dengan obat-obatan hormonal akan membantu prosesnya menjadi tumor ganas, wanita yang pernah memiliki riwayat tumor jinak 48% dapat menderita kanker payudara dibandingkan dengan wanita yang tidak memiliki riwayat tumor jinak. Wanita yang memiliki riwayat tumor jinak 3,3 kali lebih tinggi risiko terkena kanker payudara jika dibandingkan dengan wanita yang tidak memiliki riwayat tumor jinak (Khairunnisa 2021).

**Faktor Risiko yang Dapat Diubah (*changeable*)**

a. Usia saat Kehamilan

Usia saat mengandung anak pertama yang terlalu belia/dini dan terlalu tua/lansia dapat meningkatkan risiko terkena kanker payudara. Idealnya rentang umur wanita untuk mengandung anak pertamanya adalah 20 – 35 tahun jika kurang dari 20 ataupun lebih dari 35 sangat berisiko tinggi untuk mengidap kanker payudara. Wanita yang memiliki riwayat umur hamil anak pertamanya di kisaran

20 – 35 tahun dapat berisiko 2,3 kali lebih tinggi tidak akan mengidap kanker payudara dibandingkan dengan wanita yang hamil anak pertamanya di usia kurang dari 20 dan lebih dari 30 tahun (Khairunnisa 2021).

Seiring dengan bertambahnya usia pada wanita saat mengandung anak pertamanya maka akan bertambah pula risiko terkena kanker payudara terutama untuk wanita yang hamil diusia lebih dari 35 tahun. Penyebab utamanya adalah pematangan organ payudara yang dilakukan oleh hormone pada saat proses kehamilan juga ikut mematangkan perkembangan dari tumor jinak jika ada, meningkatnya sensitifitas dari sel tumor pada masa-masa kehamilan usia diatas 35 tahun serta fisiologi tubuh yang tidak seprima usia direntang 20-35 tahun. Kehamilan anak pertama lebih berisiko untuk terkena kanker payudara dibandingkan kehamilan berikutnya.

#### b. Lama Menyusui

Memberikan asi pada bayi adalah hal yang penting untuk pertumbuhan dan perkembangan sang bayi. Menyusui tidak hanya baik dan bermanfaat untuk bayinya tetapi juga baik untuk ibunya karena memiliki efek proteksi terhadap penyakit kanker karena dapat merangsang pembentukan hormone oksitoksin (hormone cinta) yang dapat merangsang hipotalamus untuk terus merasa bahagia serta menekan hormone estrogen yang merupakan hormone pemacu kanker payudara.

Penelitian selanjutnya juga menyebutkan bahwa semakin lama

wanita menyusui bayinya maka semakin menurun pula kemungkinan terkena kanker payudara karena pada masa menyusui bahan-bahan pemicu kanker dikeluarkan dari dalam tubuh. Data menyebutkan bahwa terjadi penurunan sekitar 4,3% insiden kanker payudara setiap tahunnya pada wanita yang menyusui (Khairunnisa 2021)

c. Mengonsumsi Lemak Tinggi dan Obesitas setelah Menopause

Wanita yang obesitas dan memiliki kebiasaan buruk mengonsumsi makanan yang tinggi lemak memiliki risiko 2 kali lebih tinggi untuk mengidap kanker payudara dari pada wanita yang tidak obesitas dan tidak mengonsumsi makanan tinggi lemak karena lemak yang ditimbun (berupa kolesterol) merupakan bahan baku dalam pembuatan hormone kelamin wanita salah satunya estrogen dan juga lemak secara tidak langsung dapat memicu proliferasi sel semakin cepat diakibatkan dari tingginya kadar estrogen.

Data menunjukkan rata-rata tinggi badan pada penderita kanker payudara 158 cm dengan standar deviasi 4,9 cm sedangkan pada wanita yang bukan penderita kanker payudara memiliki rata-rata tinggi badan 155,9 cm dengan standar deviasi 4,4 cm. hasil OR = 0,91. Artinya setiap kenaikan 1 cm tinggi badan akan meningkatkan risiko kanker payudara 0,91 kali (Khairunnisa 2021).

d. Pemakaian Hormon Estrogen dan Progesterone

Wanita yang menopause dan diberi suntikan hormone eksogen (estrogen atau progesterone maupun keduanya) dalam kurung

waktu  $\geq 5$  tahun dapat meningkatkan risiko menderita kanker payudara diakibatkan dari fisiologi tubuh yang tidak sama lagi seperti saat usia muda dan diberi hormone yang sebenarnya sudah tidak diproduksi lagi ditubuh yang nantinya dapat merangsang sel-sel tumor jinak untuk berubah menjadi ganas.

e. Konsumsi Rokok dan Alkohol

Wanita yang sering mengkonsumsi alkohol dan rokok akan meningkatkan risiko terkena kanker payudara karena alkohol menyebabkan perlemakan hati, sehingga hati bekerja lebih keras dan lebih sulit memproses estrogen untuk dikeluarkan dari tubuh. Sedangkan kandungan kimia pada rokok dapat menginduksi perkembangan kanker payudara.

f. Konsumsi Makanan Siap Saji

Mengkonsumsi makanan siap saji (*junk food*) secara berlebihan dari usia dini dapat berisiko tinggi terkena kanker payudara diusia dewasa. Lemak tubuh akan meningkat apalagi tidak diimbangi dengan olahraga sehingga akan memicu peningkatan kadar estrogen membuat pertumbuhan payudara dan menstruasi lebih cepat.

g. Aktivitas Fisik

Penelitian dari Women's Health Initiative mengemukakan bahwa aktivitas fisik yang dilakukan wanita menopause dengan berjalan sekitar 30 menit perhari dikaitkan pada penurunan 20% risiko kanker payudara. Namun, pengurangan risiko terbesar ada diwanita yang

memiliki berat badan normal.

#### h. Riwayat Terpapar Radiasi

Semakin tinggi intensitas menerima pengobatan dengan radiasi maka semakin tinggi pula risiko untuk terkena kanker payudara dimasa depan. Didukung dengan penelitian Indriati di RS Dr.Kariadi Semarang dengan desain *case control* menunjukkan bahwa risiko wanita yang terpapar radiasi lebih dari 1 jam sehari untuk terkena kanker payudara 3,12 kali lebih tinggi (OR = 3,12) (Pulungan, 2010).

## 6. Klasifikasi Kanker Payudara

Berdasarkan WHO *Histological Classification of Breast Tumor* berdasarkan dari sifat serangannya, kanker payudara di klasifikasikan sebagai berikut (Rahmadani, 2015):

### **Non – Invasif Karsinoma**

Non-invasif karsinoma merupakan kanker yang masih berada pada tempatnya, kanker dini yang belum menyebar atau menyusup keluar dari tempat asalnya. Non-Invasif karsinoma terbagi menjadi dua, yaitu: karsinoma duktus in situ dan karsinoma lobulus in situ

### **Invasif Karsinoma**

Invasif karsinoma merupakan kanker yang telah menyebar ke jaringan lainnya, bisa terlokalisir (hanya pada payudara saja) maupun metastatik (telah menyebar kebagian tubuh lainnya). Sekitar 80% kanker payudara invasif adalah kanker duktal dan 10% adalah kanker lobuler. Invasive karsinoma ada beberapa jenis diantaranya :

a. Invasive Duktal Karsinoma

Invasif duktal karsinoma adalah kanker payudara invasive yang ditandai dengan penyebaran sel-sel kanker dimulai dari saluran air susu ke jaringan payudara dan kelenjar getah bening yang berada disekitarnya, terdiri dari beberapa bagian antara lain : Papilobular karsinoma, solid- tubular karsinoma, scirrhous karsinoma, *special type*, mucinous karsinoma dan medulare karsinoma

b. Invasive Lobular Karsinoma

Invasif lobular karsinoma adalah merupakan jenis kanker payudara yang berasal dari kelenjar penghasil susu atau lobules . Jenis sel kanker ini telah merusak keluar dari lobules dan memiliki potensi untuk menyebar ke area lain di tubuh. Karsinoma lobular invasive merupakan jenis yang jarang ditemui dari semua jenis kanker payudara. Jenis yang paling umum pada kanker payudara dimulai pada duktus (duktal karsinoma). Beberapa kanker payudara mengandung sel-sel kanker lobular dan duktal sekaligus. Karsinoma lobular invasive biasanya tidak membentuk benjolan lebih sering menyebabkan penebalan pada jaringan atau terasa penuh dan sesak disalah satu bagian dari payudara yang terdiri dari beberapa bagian, antara lain: adenoid carcinoma, medullary carcinoma, mucinous carcinoma dan inflammatory carcinoma.

c. *Paget's Disease*

*Paget's disease* adalah salah satu jenis kanker yang paling jarang terjadi menyerupai dermatitis (peradangan kulit berupa bercak kemerahan dan berasal dari kelenjar didalam atau dibawah kulit). Biasanya berasal dari kanker pada saluran air susu di payudara sehingga kanker ini biasanya ditemukan di sekitar puting susu.

## **7. Mekanisme Terbentuknya Kanker Payudara**

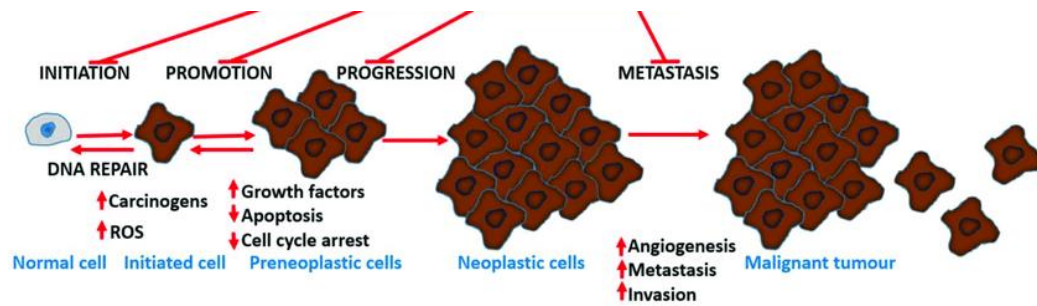
Proses Pembentukan sel Kanker (karsinogenesis) dibagi menjadi 4 tahap utama, yaitu : inisiasi, promosi, progresi (perkembangan) dan metastasis (Sari Utami, 2018). Tahap awal dari fase karsinogenesis adalah inisiasi (permulaan) melibatkan perubahan atau mutasi gen yang timbul secara spontan maupun diinduksi oleh paparan agen karsinogenik. Perubahan genetik dapat mengakibatkan disregulasi jalur pensinyalan biokimiawi yang terkait dengan proliferasi sel, kelangsungan hidup, dan diferensiasi yang dapat dipengaruhi oleh sejumlah faktor termasuk laju dan jenis metabolisme karsinogenik dan respons fungsi perbaikan DNA. Intinya pada tahap ini merupakan proses perubahan dari sel yang sehat bermutasi menjadi sel kanker (Imtiaz *et al.*, 2016)

Tahap promosi dianggap sebagai proses yang relatif panjang dan reversibel di mana sel-sel preneoplastik yang aktif berkembang biak. Dalam periode ini, prosesnya dapat diubah oleh agen kemopreventif dan mempengaruhi tingkat pertumbuhannya. Inti dari fase ini adalah pertumbuhan neoplastik (jaringan baru yang abnormal).

Fase progresi atau Kemajuan adalah tahap akhir dari transformasi

neoplastik, di mana perubahan genetik maupun fenotipik dan proliferasi sel terjadi. Ini melibatkan peningkatan cepat dalam ukuran tumor, di mana sel-sel dapat mengalami mutasi lebih lanjut dengan potensi invasif dan metastasis. Agen chemopreventive harus mampu bertindak lebih cepat pada proses inisiasi dan promosi karsinogenesis. Adapun fase akhirnya adalah metastasis melibatkan penyebaran sel-sel kanker dari situs utama ke bagian lain tubuh melalui aliran darah atau sistem getah bening. Agen kemopreventif diketahui menghambat angiogenesis dan invasi tumor primer, dan dengan demikian dapat digunakan untuk menghambat metastasis kanker (Imtiaz *et al.*, 2016).





**Gambar 12.** Fase Perkembangan Sel Kanker

## 8. MCF 7

Sel MCF-7 merupakan salah satu model sel kanker payudara yang banyak digunakan dalam penelitian. Sel tersebut diambil dari jaringan payudara seorang wanita Kaukasian berumur 69 tahun golongan darah O, dengan Rh positif, berupa sel adherent (melekat) yang dapat ditumbuhkan dalam media penumbuh DMEM atau RPMI yang mengandung foetal bovine serum (FBS) 10% dan antibiotik Penicilin-Streptomycin 1%. Sel MCF-7 memiliki karakteristik antara lain resisten agen kemoterapi, mengekspresikan reseptor estrogen (ER +), overekspresi Bcl-2 dan tidak mengekspresikan caspase-3. Sel MCF-7 tergolong cell line adherent yang mengekspresikan reseptor estrogen alfa (ER- $\alpha$ ), resisten terhadap doxorubicin (CCRC farmasi UGM.2008).

## 9. Karakteristik BCL-2

Proses bunuh diri sel atau dikenal dengan apoptosis sangat berpengaruh dalam proses pertumbuhan dan perkembangan serta fungsi dari organisme multiseluler. Apoptosis juga mengontrol homeostatis sehingga kontrol yang ketat terhadap program apoptosis sangat penting, dikarenakan jika kematian sel terlalu banyak akan mengakibatkan penyakit

degeneratif, sebaliknya jika kematian sel terlalu sedikit dapat memicu kanker dan penyakit autoimun. (Cory et al. 2013 dalam prihantono. 2017).

Salah satu gen utama dalam mempercepat dan membatasi apoptosis adalah Bcl-2 (B Cell Limfoma-2). Gen ini merupakan proto-onkogen pada manusia dan terletak di kromosom 18q21.33, mengkodekan protein Bcl-2 yang merupakan protein membran terletak di membran RE, membran inti dan membran mitokondria (Cleary et al. 1986, Yip and Reed. 2008, Pihantono. 2017).

Bcl-2 merupakan protein regulator yang mengatur kematian sel (apoptosis) baik dalam proses induksi (pro-apoptosis) maupun dalam proses inhibisi (anti-apoptosis). Protein ini melakukan proses apoptosis melalui jalur intrinsic mitochondrial apoptosis pathway, protein ini mempengaruhi integritas mitokondria dengan mempertahankan keseimbangan protein pro-apoptosis dan anti-apoptosis. Apabila terjadi banyak pembentukan sel maka meningkatkan protein pro-apoptosis sehingga mitokondria mengeluarkan faktor-faktor apoptogenik (Cyc C) yang digunakan untuk membentuk apoptosome lalu mengaktivasi caspase yang akan diakhiri dengan kematian sel (apoptosis), sebaliknya jika protein anti-apoptosis yang terekspresi maka tidak akan terjadi proses apoptosis (shamas-Din et al. 2013, Frenzel et al. 2009, Pihantono. 2017)

## F. Pengujian Antikanker

Untuk menentukan suatu bahan alami atau sintetis yang dapat digunakan sebagai antikanker, terdapat beberapa istilah yang harus diperhatikan yaitu berdasarkan efek biologi dari suatu senyawa terhadap sel yang dicobakan yaitu sitotoksik, antitumor, dan antikanker.

- Sitotoksik adalah toksik terhadap sel dalam jaringan. Sifat ini dapat dibedakan menjadi sitostatik dan sitosidal. Sitostatik yaitu menghentikan pertumbuhan sel yang sering sekali reversible dan sitosidal yaitu pembunuhan terhadap sel.
- Antitumor yaitu efektif terhadap suatu model sistem tumor secara *in vivo*.
- Antikanker yaitu efektif dalam suatu percobaan terhadap suatu penyakit pada manusia.

Sedangkan untuk menetapkan suatu senyawa bersifat antikanker dilakukan beberapa tahap penelitian yaitu uji sifat farmakologi dan aktivitas terhadap berbagai sel (penapisan awal) adalah untuk menentukan toksisitas suatu senyawa. Uji toksikologi pra klinis dan farmakologi pada hewan percobaan untuk menentukan sifat anti tumor suatu senyawa, dan uji coba klinik pada manusia untuk menetapkan suatu senyawa sebagai obat antikanker.

Penentuan sifat toksisitas suatu senyawa dilakukan dengan uji sifat farmakologi dan aktivitasnya terhadap berbagai sel secara *in vitro* atau *in vivo*. Sel-sel yang digunakan antara lain sel P388 (sel limfositik yang berasal dari kanker pada tikus), lini sel L1210 (sel yang diisolasi dari limfa tikus), sel Hela (sel yang berasal dari kanker leher rahim

manusia), sel KB (*nasopharynx carcinoma*), sel sarcoma 180 A, sel walker 256.

Sel kanker yang dibiakkan dalam kultur jaringan secara *in vitro* dapat digunakan sebagai alat penapisan awal untuk mendeteksi sifat anti tumor suatu zat. Prosedur kultur jaringan untuk program penapisan zat anti kanker secara besar-besaran dan dengan prosedur tersebut telah berhasil menguji aktivitas senyawa antitumor sebanyak 17.000 jenis senyawa hasil fermentasi. Sel yang digunakan dalam kultur jaringan tersebut adalah sel MCF-7

Hasil pengujian yang diperoleh dibandingkan dengan pengujian secara *in vivo* pada tikus yang telah diinokulasi dengan tumor. Ada korelasi sebesar 70 % antara aktivitas anti tumor pada kultur jaringan dengan aktivitas pada tikus yang diinokulasi dengan tumor. Namun ada beberapa pengecualian yaitu ada zat yang sangat aktif pada kultur jaringan tetapi tidak aktif pada tikus percobaan dan sebaliknya ada zat yang aktif pada tikus percobaan tetapi tidak aktif pada kultur jaringan dengan tingkat konsentrasi yang sama. Maka dari kedua sistem tersebut dapat disimpulkan bahwa *in vitro* dan *in vivo* bersifat saling melengkapi.

Sejak tahun 1955–1975 lembaga kanker nasional Amerika (NCI, National Cancer Institute) menggunakan lini sel L1210 untuk penapisan awal zat anti kanker, zat-zat yang aktif terhadap lini sel L1210 kemudian di uji secara *in vivo* pada tikus yang diinokulasi dengan tumor. Program penapisan yang dilakukan NCI berhasil menguji aktivitas 40.000 senyawa. Senyawa yang menunjukkan aktivitas terhadap lini sel MCF-

7 diuji lebih lanjut terhadap suatu panel uji sel tumor tikus sebelum dilakukan uji klinik. Selanjutnya NCI menggunakan suatu desain dalam penapisan awal untuk mendeteksi aktivitas suatu zat antitumor berdasarkan model seleksi dari beberapa tumor padat pada tikus. Hasil seleksi yang dilakukan menghasilkan sel murine P388 digunakan sebagai uji penapisan awal, karena sel ini sangat sensitif terhadap bermacam golongan senyawa dan banyak sekali senyawa–senyawa yang menunjukkan aktivitas terhadap sel murine P388. Setelah diketahui bahwa suatu zat aktif pada penapisan awal maka diuji lebih lanjut terhadap sel kanker yang lebih spesifik yaitu suatu panel uji sel tumor tikus baik secara *in vitro* maupun secara *in vivo* dan selanjutnya di uji lagi dengan sel xenograft tumor manusia. Sel tumor tikus yang biasa digunakan untuk panel uji tersebut adalah lini sel L1210, sel Melanoma B16, sel tumor payudara CDFI, sel tumor usus, dan sel kanker paru–paru. Sedangkan sel xenograft tumor manusia digunakan sel tumor usus besar CX-1, sel tumor paru–paru LX-1, sel tumor payudara MX-1.

Penentuan dapat atau tidaknya suatu zat dikembangkan sebagai obat anti kanker didasarkan pada sifat toksisitasnya. NCI telah menetapkan kriteria aktivitas berdasarkan nilai *Inhibition Concentration 50* (IC<sub>50</sub>) yaitu konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan sel kanker sebesar 50%. Zat disebut bersifat sitotoksik bila aktivitas terhadap sel uji mempunyai nilai IC<sub>50</sub> < 200 µg/mL untuk suatu ekstrak, dan nilai IC<sub>50</sub> < 100 µg/mL untuk senyawa murni. Sedangkan

menurut Sajjadi, dkk (2015) nilai IC<sub>50</sub> sebesar  $\leq 20 \mu\text{g/mL}$  tergolong sangat kuat, IC<sub>50</sub> 21-200  $\mu\text{g/mL}$  tergolong sedang, IC<sub>50</sub> 201-500  $\mu\text{g/mL}$  tergolong lemah dan IC<sub>50</sub>  $>500 \mu\text{g/mL}$  tidak bersifat sitotoksik

Selain IC<sub>50</sub> untuk menentukan sifat sitotoksik suatu zat digunakan juga ukuran lain yaitu LD<sub>50</sub> yaitu dosis yang efektif untuk menghambat pertumbuhan sel sebesar 50%. Setelah lolos dari uji penapisan awal selanjutnya dilakukan uji toksikologi pra klinis dan farmakologis melalui pengujian secara *in vivo* dengan beberapa sistem tumor hewan yang dapat di transplantasikan dan telah ditentukan sifat-sifatnya pada hewan percobaan.

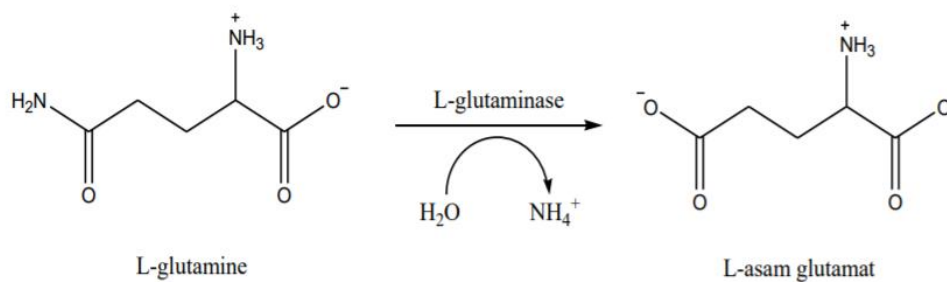
Kriteria yang ditetapkan pada hewan percobaan adalah berdasarkan nilai LD<sub>50</sub> (mg/Kg) yaitu dosis yang dapat menyebabkan kematian hewan percobaan sebesar 50%. Senyawa yang memberikan harapan yaitu senyawa yang tidak mempunyai toksisitas berlebihan dilanjutkan ke uji coba klinik fase I yaitu penelitian jaringan tempat efek toksik dan farmakologinya pada pasien kanker stadium lanjut. Konsentrasi awal yang dianggap aman untuk digunakan pada manusia adalah konsentrasi dengan nilai LD<sub>10</sub> pada hewan percobaan. Seterusnya dilakukan uji coba klinik fase II untuk menentukan jenis tumor tempat zat ini bermanfaat dan selanjutnya dilakukan uji coba klinik fase III untuk membandingkan zat tersebut dengan terapi standar terbaik. Untuk zat yang telah dinyatakan memenuhi standar tersebut diberi izin oleh *Food and Drug Administration* (FDA) untuk digunakan sebagai obat. Obat anti kanker yang ideal akan memusnahkan sel kanker tanpa merugikan jaringan

normal (National Cancer Institute, 2008).

## G. Tinjauan Umum Enzim L-Glutaminase dan L-Asparaginase

### Enzim L-Glutaminase

Enzim L-glutaminase merupakan kelompok hidrolase yaitu enzim yang menghidrolisis L-glutamin menjadi asam L-glutamat dan amoniak (Gambar 13) Enzim ini menghidrolisis ikatan amida sehingga diberi kode EC.3.5.1.2 yang spesifik untuk L-glutaminase. Enzim ini semakin populer karena berperan penting dalam bidang farmasi dan industri makanan (Sivakumar dkk., 2006).



**Gambar 13.** Reaksi Hidrolisis L-Glutamin menjadi L-asam glutamat oleh enzim L-Glutaminase

L-glutaminase juga berperan penting dalam mengontrol rasa lezat makanan fermentasi seperti kecap dan produk makanan umum lainnya dengan meningkatkan kandungan asam glutamat. Oleh karena itu, enzim ini menarik perhatian besar dalam industri makanan (Yulianti dkk., 2012).

Lingkungan laut diperkirakan sebagai sumber produksi enzim yang unik karena memiliki sifat toleran terhadap garam dan enzim yang diisolasi merupakan jenis enzim termostabil yang dibutuhkan dalam

industri makanan (Yulianti dkk., 2012). Enzim L-glutaminase merupakan enzim yang terdapat di setiap kehidupan biologis dan organisme mulai dari bakteri sampai manusia memiliki enzim ini. L-glutaminase memiliki peranan utama dalam setiap jaringan mamalia. Biasanya enzim ini dikategorikan sebagai L-glutaminase jenis hati dan ginjal dan kedua jenis tersebut telah dimurnikan dan dikarakterisasi (Satish, 2011).

Enzim L-glutaminase secara luas terdistribusi pada jaringan hewan, tumbuhan dan mikroorganisme termasuk bakteri, jamur dan ragi. Berbagai mikroorganisme, termasuk bakteri, ragi dan jamur filamen baik dari habitat tanah maupun laut dilaporkan menghasilkan L-glutaminase. Produksi L-glutaminase ditemukan pada bakteri *Aspergillus wentii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Streptomyces canaris* telah dilaporkan oleh Sinha dan Nigam (2016),

**Tabel 4.** Beberapa penelitian bakteri penghasil L-asparaginase dan L-glutaminase.

Bakteri	Sumber	Hasil	Peneliti
<i>Acrylaway</i>	Tanah	Aktivitas tertinggi sebesar 2,935 U/mL, optimum pada suhu 37°C dan pH 7,4	Tundusi et al., 2022
<i>Amidohydrolases</i>	Laut	Aktivitas tertinggi sebesar 60 U/mL, optimum pada suhu 37°C dan pH 7,5	Dobryakova et al., 2023
<i>Pseudomonas sp</i>	Tanah	Aktivitas tertinggi sebesar 0,309 U/mL, optimum pada suhu 37°C dan pH 8,5	Darnal et al., 2023



<i>Escherichia coli</i> and <i>Erwinia chrysanthemi</i>	Tanah dan lumut	Aktivitas tertinggi sebesar 20,57 U/mL, optimum pada suhu 30°C dan pH 7,0	Ashok et al., 2019
<i>Holopilic bacteria</i>	Lingkungan laut	Aktivitas tertinggi sebesar 47,12 U/mL, optimum pada suhu 37°C dan pH 7,4	Gooma, 2022
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Buah Iraqi Capsicum annum	Aktivitas tertinggi sebesar 1,8 U/mL, optimum pada suhu 35°C dan pH 8	Zbar, 2022

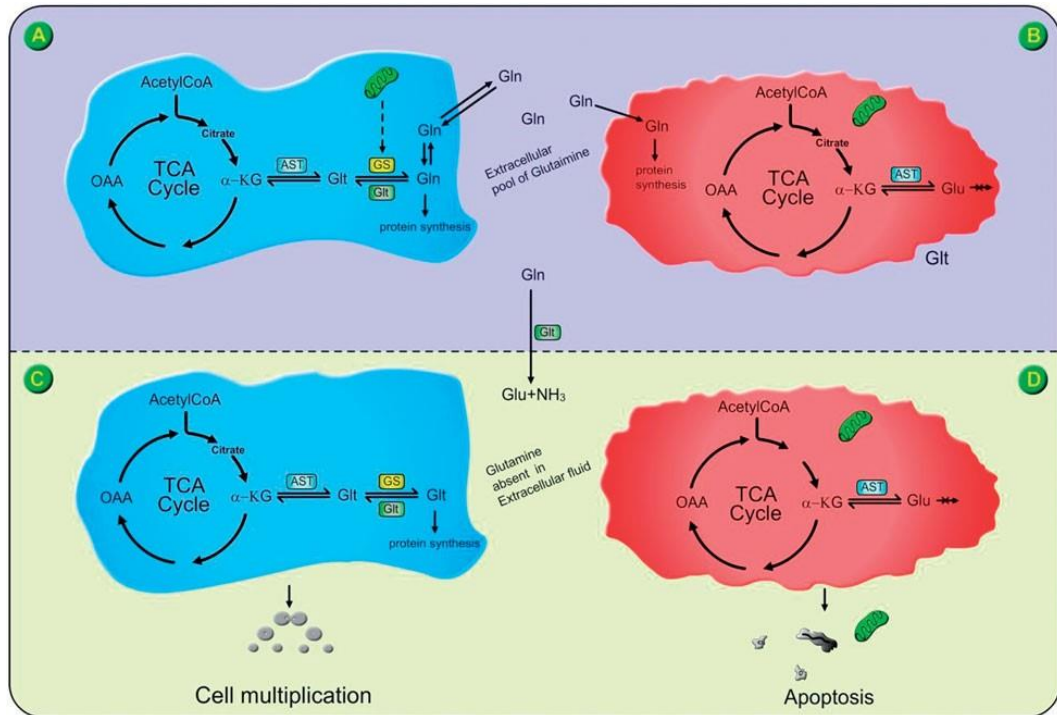
Ketertarikan terhadap amido hidrolase dimulai dengan penemuan sifat antitumor dari golongan enzim tersebut dan sejak saat itu banyak upaya dan penelitian-penelitian yang dilakukan tentang mikroba L-glutaminase dengan tujuan mengembangkan enzim tersebut sebagai agen antitumor. Selain itu ketertarikan lain dari aplikasi mikroba penghasil enzim ini yaitu pada industri makanan, terutama pada industri kecap dan industri-industri makanan fermentasi lainnya (Satish, 2011).

Produksi L-glutaminase juga dipengaruhi oleh komponen nutrisi yang terdapat dalam media. Karbon dan nitrogen merupakan sumber nutrisi penting untuk pertumbuhan bakteri penghasil L-glutaminase. Bakteri penghasil L-glutaminase memanfaatkan L-glutamin sebagai sumber karbon nitrogen. Hasil penelitian melaporkan bahwa penambahan glukosa 1,5% dan yeast ekstrak 1,5% dapat meningkatkan produksi enzim L-glutaminase pada *Citrobacter* sp. sehingga dapat disimpulkan bahwa penambahan sumber karbon dan nitrogen sebagai substrat mengakibatkan peningkatan produksi enzim ini (Kannan dkk., 2014).

Glutamin adalah pembawa utama nitrogen antar organ, dan asam amino paling banyak dalam plasma, glutamin juga merupakan nutrisi utama untuk berbagai proses intraseluler termasuk metabolisme oksidatif dan pembentukan ATP, biosintesis protein, lipid dan asam nukleat. Banyak sel kanker tidak dapat bertahan hidup tanpa adanya pasokan glutamin eksogen

Meskipun sebagian besar sel mamalia mampu mensintesis glutamin, kebutuhan asam amino ini bisa menjadi sangat besar selama proliferasi yang cepat sehingga diperlukan pasokan ekstraseluler tambahan; karenanya glutamin dianggap esensial secara kondisional.

Hal penting dalam peningkatan katabolisme glutamin adalah aktivasi enzim glutaminase yang mengkatalisis hidrolisis glutamin untuk menghasilkan glutamat dan amonia.



**Gambar 14.** Mekanisme selektif enzim L-Glutaminase (Amobonye, et.al 2019)

- A. Sel normal menghasilkan L-glutaminase (Gs) yang mengkatalisis biosintesis glutamin antar sel selain pasokan ekstraseluler, sehingga sel berfungsi normal.
- B. Sel tumor hanya bergantung pada pasokan glutamin ekstraseluler untuk metabolisme regulernya.
- C. Sel normal terus berfungsi tanpa adanya glutamin ekstraseluler.
- D. Sel tumor yang kekurangan glutamin eksternal dipaksa melakukan apoptosis.

Glutamin adalah asam amino paling melimpah di tubuh manusia, merupakan 20% dari total asam amino bebas dalam darah. Glutaminase adalah enzim yang mengubah glutamin menjadi glutamat dan amonia menggunakan adenosin trifosfat (ATP). Glutaminase diekspresikan di hati,

ginjal, otot rangka, dan otak.

Karena glutamin menyediakan karbon dan nitrogen untuk biogenesis seluler, glutamin merupakan sumber daya yang disukai untuk metabolisme kanker. Glutamin memasok substrat untuk sintesis nukleotida, asam amino nonesensial, nikotinamida adenin dinukleotida fosfat (NADPH), dan glutathione (GSH). Dengan demikian, glutamin menyediakan bahan pembangun makromolekul, mengatur homeostasis pH, dan mengontrol keseimbangan redoks. Demikian pula, glutamin mengisi kembali  $\alpha$ -ketoglutarat ( $\alpha$ -KG) ke siklus asam trikarboksilat (TCA) setelah dikatabolisme, suatu proses yang disebut anaplerosis (Zhang, J., et.al., 2017)

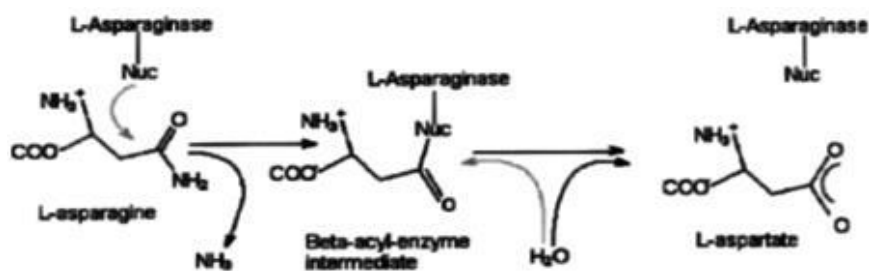
### **Enzim L-Asparaginase**

Fungsi suatu enzim ialah sebagai katalis untuk proses biokimia yang terjadi dalam sel maupun di luar sel. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10<sup>8</sup> sampai 10<sup>11</sup> kali lebih cepat dari pada apabila reaksi tersebut dilakukan tanpa katalis, selain itu enzim berperan dalam menurunkan energi aktivasi suatu reaksi kimia.

Enzim L-Asparaginase (L-Asparagin amidohidrolase, E.C.3.5.1.1) adalah enzim yang menghidrolisis asam amino L-Asparagin menjadi asam L-Aspartat dan amonia (Youseff dan Al-Omair, 2008; Puspitasari dan Wuryanti, 2010; Fauziah, 2012), seperti reaksi yang ditunjukkan pada Gambar 15. Enzim L-Asparaginase dalam bidang medis telah digunakan sebagai terapi penyakit kanker, terutama terapi leukemia pada anak-anak (acute lymphoblastic leukemia). Beberapa penelitian mengenai aktivitas

antikanker enzim L-Asparaginase juga dilakukan terhadap kanker payudara, kanker usus besar, kanker hati dan juga kanker paru-paru (Moharib, 2018).

Enzim L-asparaginase akan mereduksi suplai L-asparagin ke sel kanker dengan merubahnya menjadi bentuk asam amino lain, seperti yang ditunjukkan pada Gambar.



**Gambar 15.** Reaksi Hidrolisis L-Asparagin menjadi L-aspartat oleh L-Asparaginase (El-Bessoumy dkk., 2004).

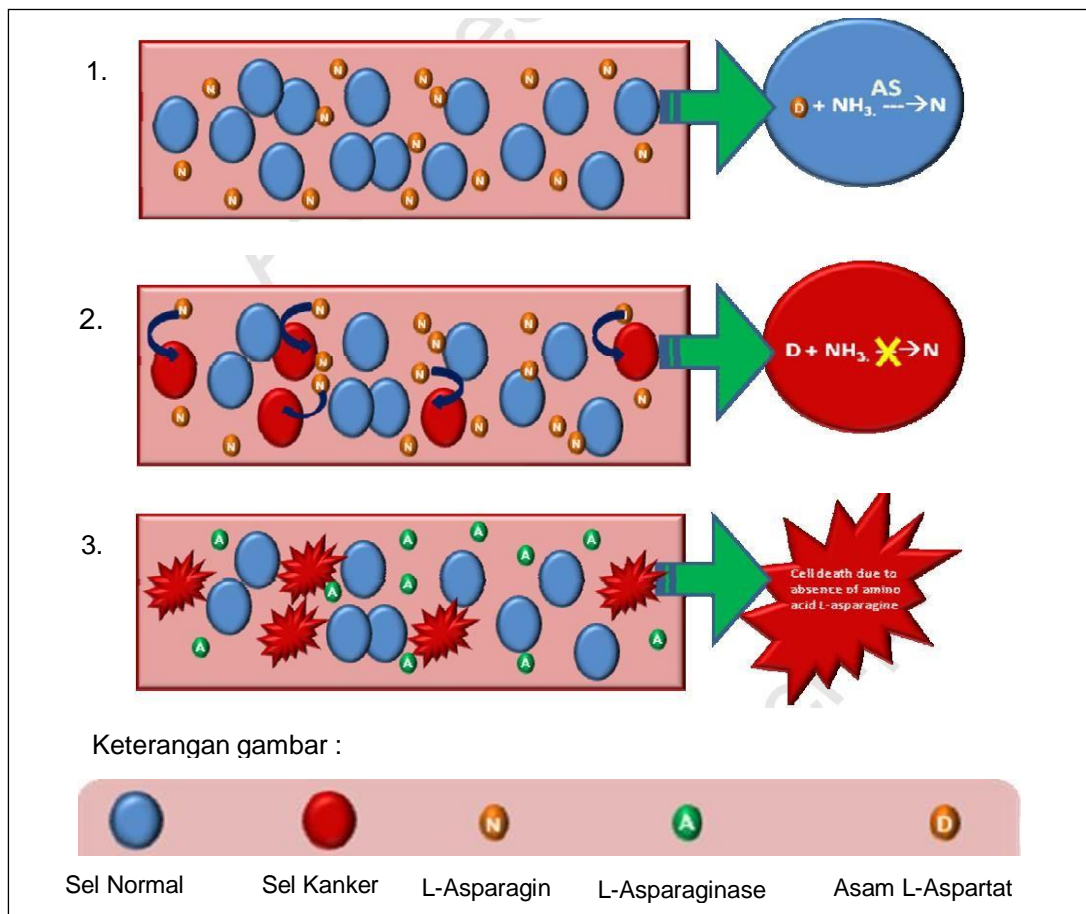
Sel normal maupun sel kanker membutuhkan asam amino asparagin yang merupakan nutrisi penting untuk sintesis protein sel (Hassan dkk., 2018). Sel kanker tidak memiliki enzim Asparagin sintase yang berfungsi untuk mensintesis asparagin. Oleh sebab itu, sel kanker mengambil asparagin dalam darah. Kehadiran enzim L-Asparaginase yang menguraikan asam amino L-Asparagin menjadi asam aspartat dan amonia menyebabkan sintesis protein sel kanker terhambat, sehingga tidak melakukan aktivitas pembelahan sel dan menyebabkan kematian sel (Shrivastava dkk., 2015; Alamsyah, 2017).

Mekanisme umum toksisitas selektif dari enzim L-Asparaginase (Gambar ) dapat dijelaskan sebagai berikut (Shrivastava dkk., 2015):

1. Sel-sel normal mensintesis asam amino L-Asparagin (N) dengan

bantuan enzim asparagin sintase (AS).

2. Sel-sel kanker tidak mampu untuk mensintesis asam amino L-Asparagin (N) karena tidak adanya enzim asparagin sintase (AS) dan sel-sel tersebut bergantung pada L-Asparagin ekstraseluler yang mereka serap untuk bertahan hidup.
3. Enzim L-Asparaginase menurunkan konsentrasi L-Asparagin ekstraseluler sehingga sel-sel kanker akan mati karena tidak mampu melakukan sintesis protein dan sel-sel normal akan tetap bertahan karena adanya enzim Asparagin sintase (AS).

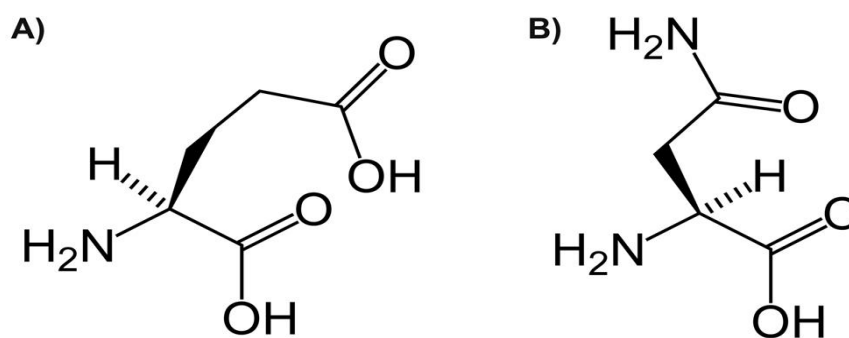


**Gambar 16.** Mekanisme umum toksisitas selektif enzim L-Asparaginase (Shrivastava et.al., 2015)

## H. Struktur L-Glutamin dan L-Asparagin

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 (Doroty, 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 (Doroty, 1992).



**Gambar 17.** Struktur Molekul Asam Amino L-Glutamin (A) dan Asparagin (B) (Dorothy, 1992)

## I. Tinjauan Umum Teknik Isolasi dan Pemurnian Enzim

Isolasi protein adalah suatu cara memisahkan protein dari makromolekul yang lain atau memisahkan protein dari protein lain yang tidak diinginkan. Secara sederhana, proses dari isolasi protein konsepnya

sama dengan isolasi DNA, hanya saja isolasi protein menggunakan buffer lisis untuk melisiskan sel. Beberapa hal perlu diperhatikan dalam isolasi enzim untuk memperoleh bentuk isolat enzim yang diinginkan. Untuk keperluan penelitian dan analisis, hasil isolasi enzim tidak diperlukan dalam jumlah banyak, tetapi mempunyai tingkat kemurnian yang tinggi. Teknik isolasi dan pemurnian enzim meliputi lima tahapan penting, yaitu pemecahan (lisis) sel, sentrifugasi, fraksinasi, dialisis, kromatografi kolom.

### **Pemecahan (Lisis) Sel**

Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi isolasi protein yaitu suhu, pH, radiasi, pelarut organik, ion logam, enzim-enzim, perlakuan mekanis, dan penambahan garam. Isolasi protein intraseluler secara umum meliputi proses lisis dan sentrifugasi. Metode pelisisan sel dapat dilakukan secara mekanik dan kimiawi. Secara mekanik berupa homogenisasi tingkat tinggi, ekstruksi tekanan tinggi, metode blending, penggerusan dan sonikasi. Adapun secara kimiawi berupa penambahan larutan buffer, detergen, kelator dan inhibitor protease.

#### **a) Penggerusan**

Penggerusan merupakan metode pelisisan sel secara mekanik. Penggerusan bertujuan untuk memecah dinding sel dan memperluas permukaan sampel agar dapat mempermudah proses ekstraksi sehingga interaksi antara sampel dan pelarut akan semakin luas.

#### **b) Penambahan Larutan Buffer**

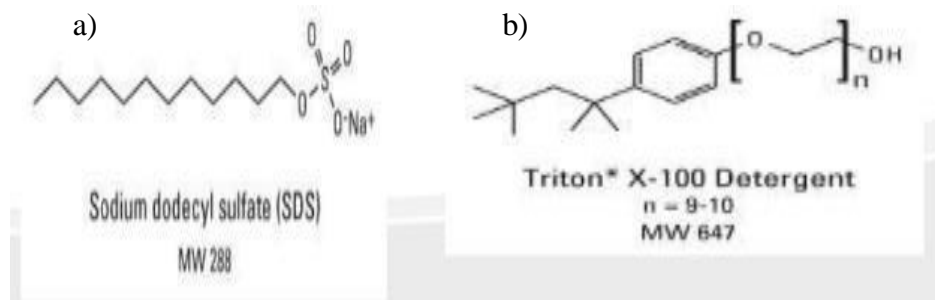
Penambahan larutan buffer merupakan metode pelisisan sel secara kimiawi. Penambahan buffer ekstrak selama penggerusan bertujuan



untuk mempertahankan agar kondisi komponen sel tetap optimum seperti keadaan yang sebenarnya dan tidak mengalami perubahan.

### c) Penambahan Detergen

Penambahan detergen selama penggerusan bertujuan untuk memecah membran sel yang penyusun utamanya fosfolipid sehingga akan terjadi reaksi saponifikasi antara fosfolipid dan detergen pada sel. Terdapat dua jenis detergen, yaitu detergen ionik yang dapat memecah interaksi protein-protein dan detergen nonionik yang dapat memecah interaksi lipid-lipid dan interaksi lipid-protein.



**Gambar 18.** Klasifikasi Detergen (a) Detergen Ionik, (b) Detergen Nonionik

### Sentrifugasi

Prinsip utama sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal sehingga substansi yang lebih berat akan berada di dasar. Sedangkan substansi yang lebih ringan akan terletak di atas (supernatan). Sentrifugasi adalah pemisahan partikel dari larutan/suspensi berdasarkan ukuran, bentuk, densitas, viskositas medium dan kecepatan rotor.



**Gambar 19.** Alat Sentrifugasi untuk Isolasi dan Pemurnian Enzim

Jadi cara sentrifugasi merupakan suatu teknik pemisahan berdasarkan kepada perbedaan kecepatan sedimentasi dari partikel-partikel molekul yang disebabkan oleh adanya gaya sentrifugal. Cara ini terutama digunakan untuk memisahkan endapan yang sukar disaring dengan saringan biasa (filter), dimana zat terlarut dapat dipisahkan dengan cepat menuju pusat medan sentrifugal.

### **Fraksinasi dan Presipitasi**

Fraksinasi merupakan salah satu cara pemurnian enzim melalui proses pengendapan, dimana dalam proses ini digunakan amonium sulfat bertingkat untuk memisahkan masing-masing protein dalam campuran fraksi demi fraksi, sehingga diperoleh tingkat kemurnian protein pada setiap fraksi. Penambahan garam ammonium sulfat akan menurunkan kelarutan protein karena terjadi kompetisi antara ion garam yang ditambahkan dengan protein yang terlarut sehingga terjadi efek *salting out* (Rejeki dkk., 2012).

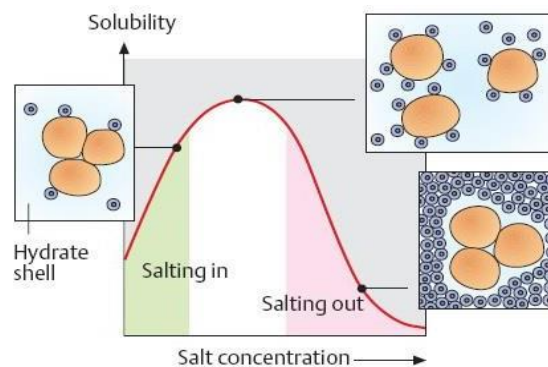
Presipitasi adalah pengendapan yang terjadi karena penggumpalan yang parsial. Presipitasi disebabkan oleh berkurangnya kelarutan protein

(perubahan fisik) yang terjadi karena perubahan kimia. Presipitasi dapat dilakukan dengan penambahan pelarut organik atau garam. Penambahan Ammonium sulfat untuk presipitasi garam secara *salting out*, sehingga menyebabkan interaksi hidropobik antar molekul protein. Interaksi hidropobik antar molekul protein akan mengakibatkan kelarutan protein menjadi rendah dan akan mengakibatkan penggumpalan, sehingga mudah dipisahkan dengan sentrifuse. Penggunaan ammonium sulfat lebih didasarkan pada sifat kelarutannya yang tinggi, tidak merusak struktur protein. Presipitasi juga terjadi akibat terganggunya kesetabilan koloid yang disebabkan oleh menurunnya muatan elektrostatis protein sehingga gaya gravitasi akan lebih dominan dibandingkan gaya tolak-menolak antar molekul.

Metode **Salting-in** dilakukan dengan menambahkan garam yang tidak jenuh atau pada konsentrasi rendah sehingga protein menjadi bermuatan dan larut dalam larutan garam. Kelarutan protein akan terus meningkat sejalan dengan peningkatan konsentrasi garam, apabila konsentrasi garam ditingkatkan terus, maka kelarutan protein akan turun, pada konsentrasi garam yang lebih tinggi, protein akan mengendap.

Pengendapan pada metode **salting-out** terjadi karena proses persaingan antara garam dan protein untuk mengikat air. Grup ion pada permukaan protein menarik banyak molekul air dan berikatan dengan sangat kuat. Contohnya Amonium sulfat yang ditambahkan ke dalam larutan protein akan menyebabkan tertariknya molekul air oleh ion garam. Hal tersebut disebabkan ion garam memiliki densitas muatan yang lebih

besar dibandingkan protein. Kekuatan ionik garam pada konsentrasi tinggi semakin kuat sehingga garam dapat lebih mengikat molekul air. Menurunnya jumlah air yang terikat pada protein menyebabkan gaya tarik menarik antara molekul protein lebih kuat bila dibandingkan dengan gaya tarik menarik antara molekul protein dan air (mempertinggi interaksi hidrofobik), sehingga protein akan mengendap dari larutan atau berikatan dengan kolom hidrofobik. Selama proses salting-out, konsentrasi garam harus tetap dijaga agar tidak menurun dalam larutan sehingga tidak terjadi pengendapan yang bersamaan antara protein yang ingin dimurnikan dan protein yang tidak diinginkan.



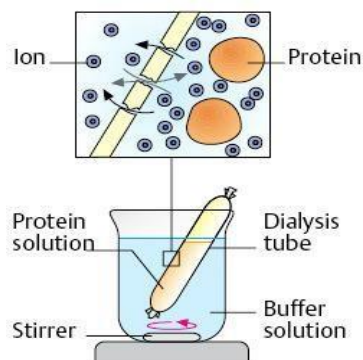
**Gambar 20.** Metode Salting in dan Salting out pada Presipitasi Protein Enzim

## Dialisis

Dialisis adalah suatu proses untuk menghilangkan garam-garam dari larutan protein. Proses dialisis diperlukan suatu membran yang bersifat semipermeabel, dapat menahan zat-zat molekul besar tetapi melewatkan zat-zat molekul kecil. Adapun membran yang dipakai pada umumnya adalah kantong selofan dengan ukuran ketebalan dan panjang yang

berbeda-beda. Rejeki dkk. (2012) melakukan proses dialisis untuk memurnikan enzim dari garam amonium sulfat yang masih tersisa dari hasil fraksinasi dengan presipitasi menggunakan garam ammonium sulfat. Biasanya pengujian dengan larutan  $\text{BaCl}_2$  untuk mengetahui sisa ammonium sulfat yang tertinggal pada fraksi tersebut.

Tujuan utama metode dialisis adalah untuk menghilangkan molekul pengganggu, seperti garam atau ion-ion lain yang berukuran kecil dengan cara suspensi protein yang mengandung garam dimasukkan ke kantong dialisis yang memiliki pori ultra halus (kantong selopahan). Proses dialisis dapat terjadi karena konsentrasi garam lebih tinggi di dalam membran dialisis daripada di luar membran, sehingga menyebabkan buffer atau air masuk ke dalam dialisat. Hal ini terjadi pada awal proses dialisis. Selanjutnya garam akan keluar melalui membran hingga tercapai kondisi keseimbangan, seperti yang ditunjukkan secara skematik pada Gambar 21.



**Gambar 21.** Proses Dialisis Protein dengan Kantong Selopahan

### **Kromatografi Kolom**

Prinsip kerja kromatografi kolom adalah berdasarkan sifat fisik dan kimiawi. Pada kromatografi kolom, fasa diam (bahan dalam kolom) bersifat

sangat polar. Senyawa polar akan berikatan dengan bahan dalam kolom melalui ikatan hidrogen atau ikatan dipol-dipol. Akibatnya, senyawa polar akan terlepas secara lambat. Senyawa non-polar akan keluar dari kolom paling awal karena tidak membentuk ikatan dengan bahan pembentuk kolom, sedangkan senyawa polar akan keluar dari kolom lebih lambat. Untuk melepaskan ikatan antara senyawa polar dengan bahan dalam kolom, digunakan pelarut kurang polar di awal, kemudian secara bertahap digunakan senyawa pelarut yang lebih polar. Ada tiga macam kromatografi kolom, yaitu: kromatografi pertukaran ion, kromatografi interaksi hidrofobik dan kromatografi filtrasi gel (pemisahan berdasarkan ukuran molekul) seperti diuraikan berikut:

a. Kromatografi Pertukaran Ion

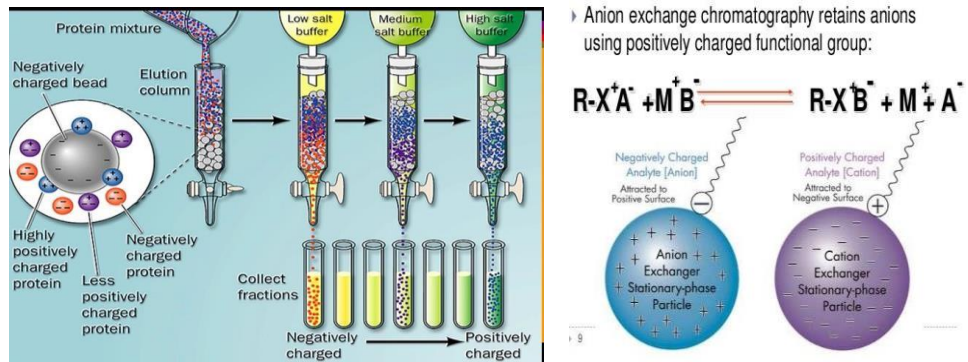
Kromatografi penukar ion merupakan metode pemisahan berdasarkan muatan molekul di bawah kondisi pH dan kekuatan ion tertentu. Interaksi elektrostatik dari berbagai jenis ligan bermuatan pada matriks dengan gugus yang dapat berionisasi pada protein akan menimbulkan mekanisme pemisahan. Penukar ion yang bermuatan positif dipilih untuk mengikat molekul asam, sedang penukar ion yang bermuatan negatif memberikan mekanisme pemisahan untuk molekul yang bersifat basa.

Protein memiliki muatan positif dan negatif terutama disebabkan oleh rantai samping dari asam amino penyusunnya. Muatan positif disumbangkan oleh asam amino histidin, lisin, arginin dan gugus amina dari N-terminal, sedangkan muatan negatif disumbangkan oleh aspartat,

glutamat dan karboksil pada C-terminal. Muatan bersih protein bergantung pada jumlah relatif gugus bermuatan positif dan negatif yang bervariasi berdasarkan pH lingkungan. Tingkat keasaman protein atau enzim dengan jumlah muatan positif dan negatif sama disebut sebagai “pH isoelektrik atau titik isoelektrik (PI)”. Umumnya protein memiliki nilai pH sekitar 5,0–9,0. Protein yang memiliki pH diatas nilai PI akan bermuatan negatif, sedangkan protein yang memiliki pH di bawah nilai PI akan bermuatan positif.

Ikatan suatu protein kepada penukar ion pada umumnya bersifat dapat balik dan kekuatannya ditentukan oleh pH dan kekuatan ionik larutan serta struktur enzim dan penukar ionnya. Pada umumnya, pH larutan bersifat tetap dan enzim dielusi dengan meningkatkan kekuatan ionik larutan. Terdapat ragam resin penukar ion yang luas sebagai pilihan, yang terbuat dari turunan selulosa dan gel berpori lebar. Turunan selulosa memiliki kapasitas rendah. Sefarosa (turunan agarosa) memiliki kapasitas yang lebih tinggi.

Prinsip kromatografi penukar ion adalah penggunaan matriks penukar ion yang mengikat secara kovalen gugus fungsional bermuatan negatif pada penukar kation, atau gugus fungsional yang bermuatan positif pada penukar anion seperti terlihat pada Gambar 22.



**Gambar 22.** Prinsip Kerja Kromatografi Kolom Penukar Ion

Matriks berupa polimer elastik dan mengandung senyawa resin sintetik yang terbuat dari dektran, selulosa atau sefadeks. Matriks penukar kation yaitu karboksimetil selulosa (CMC) dan matriks penukar anion yaitu dietilaminoetil (DEAE)-selulosa dan DEAE-sephadeks.

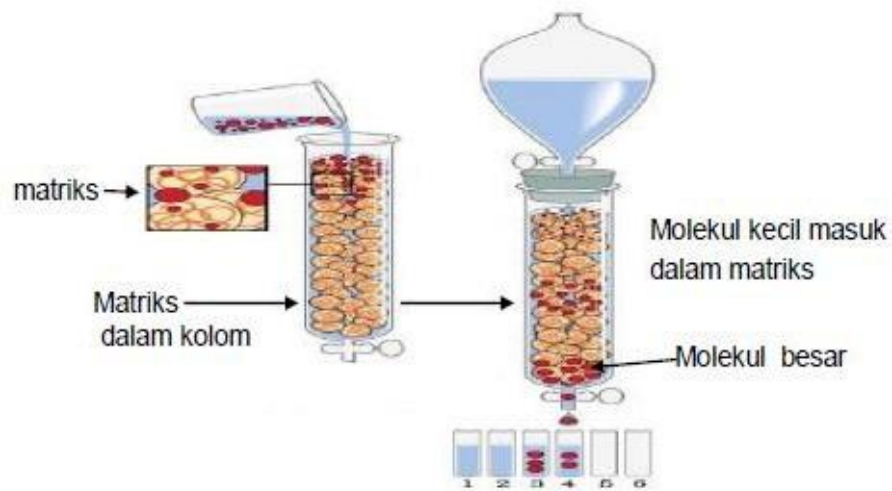
b. Kromatografi filtrasi gel

Kromatografi filtrasi gel merupakan teknik pemisahan protein dan makromolekul biologi lain berdasarkan ukuran. Proses pemisahan protein pada kromatografi filtrasi gel menggunakan dektran (polimer gula yang larut dalam air) dan mengalami reaksi ikatan silang (*cross linkage*) sehingga dektran menjadi tidak larut dalam air, akan tetapi masih dapat menyerap molekul air dalam molekul. Daya serap matriks bergantung pada jumlah ikatan silang yang terjadi di dalamnya. Matriks atau gel dektran biasa disebut sebagai sefadeks, misalnya sefadeks G-50. Huruf dan nomor menunjukkan bahwa sefadeks tersebut dapat dikembangkan (*swelling*) dengan air atau buffer dengan besar pengembangannya 50 kali.

Gel atau matriks ini berpori yang dikemas di dalam kolom dan dilusi dengan fase cair mobil. Molekul yang lebih kecil akan masuk ke dalam



pori matriks dan bergerak lebih lambat, sedangkan molekul yang lebih besar akan bergerak lebih cepat karena tidak tertahan di dalam pori matriks. Dengan demikian kromatogram molekul-molekul yang lebih besar akan muncul sebagai komponen awal seperti terlihat pada Gambar 23.



**Gambar 23.** Prinsip Kerja Kromatografi Filtrasi Gel untuk Pemurnian Protein

## J. Kerangka Teori

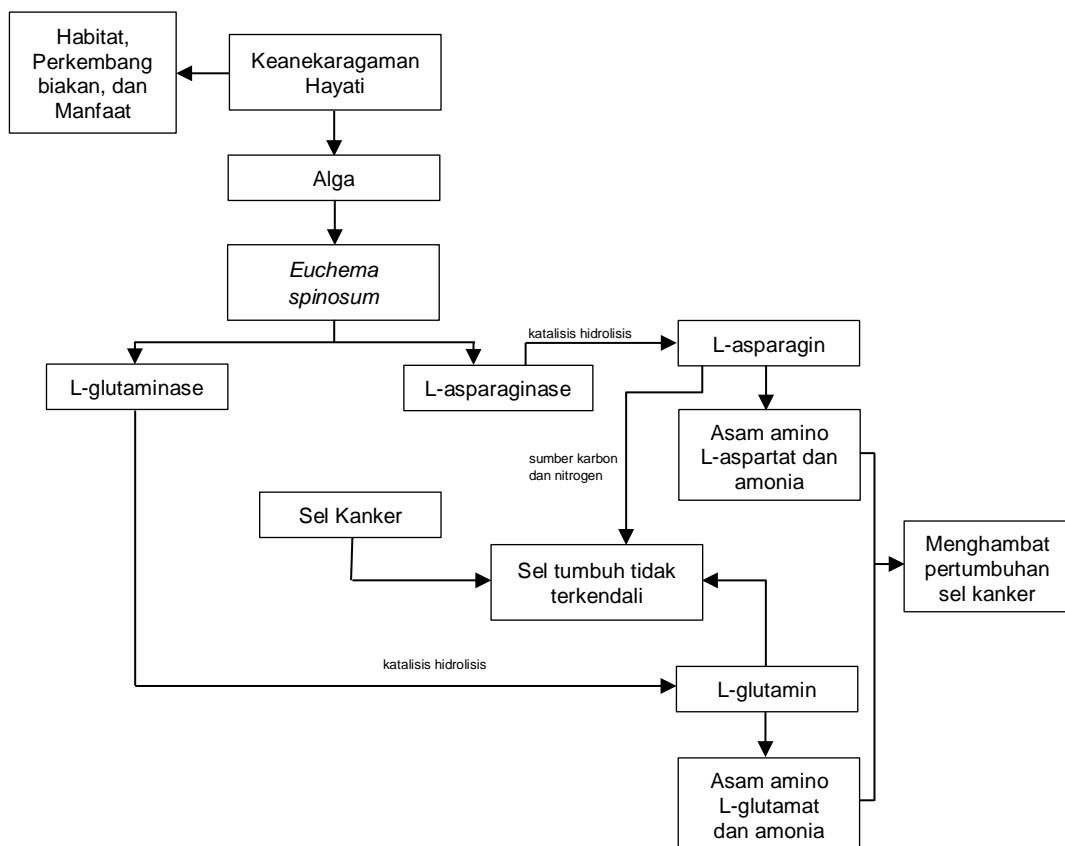
Beberapa hasil penelitian yang dapat mendukung kerangka teori penelitian dikemukakan sebagai berikut :

1. Putri (2015), mengisolasi enzim L-glutaminase dari bakteri *Klebsiella* spp. simbiosis yang menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.
2. Kirana dkk (2018), Efektivitas antibakteri ekstrak alga merah untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis*.
3. Nurvita (2019), Studi In Vitro Enzim L-Glutaminase dari Bakteri

simbiom Alga Merah *Eucheuma cottonii* Sebagai Antibakteri dan Anti kanker.

4. Kurniawan dkk (2019), Uji aktivitas antiproliferasi Ekstrak alga merah terhadap pertumbuhan sel kanker *Caco-2* secara *in vitro*.
5. Rafsanjany (2021), isolasi protein dan peptide bioaktif dari bakteri simbiom alga merah dan potensinya sebagai antikanker.
6. Gommaa (2022), Production, characterization, and antitumor efficiency of  $\gamma$ -glutaminase from *halophilic bacteria*

Untuk memudahkan pemahaman terhadap kerangka teori penelitian ini, maka dapat diterangkan secara skematik seperti pada Gambar 24.



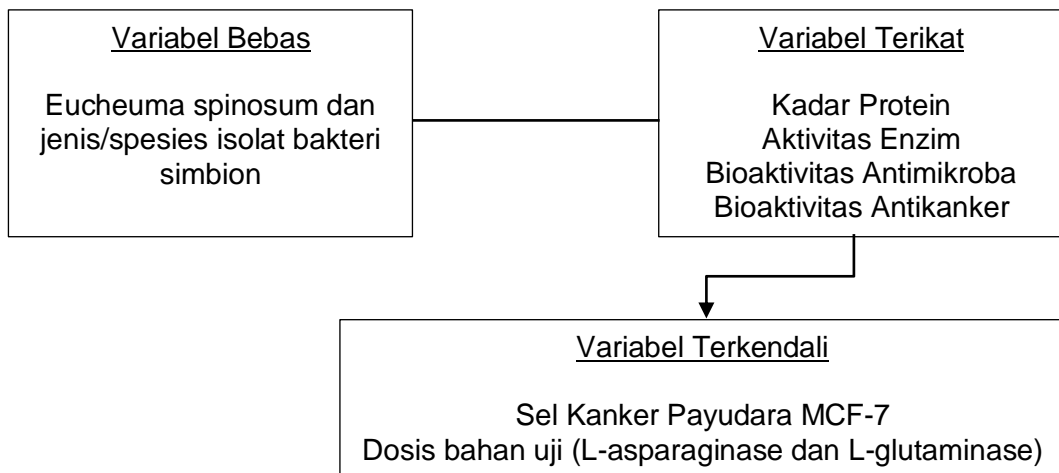
**Gambar 24.** Kerangka Teori Penelitian

## K. Hipotesis

1. Terdapat bakteri yang dapat menghasilkan enzim L–glutaminase dan L-asparaginase dari bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum* yang dapat diidentifikasi spesiesnya.
2. Enzim L–glutaminase dan L-asparaginase dari bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum* terpilih dapat dimurnikan.
3. Suhu, pH, kadar substrat, dan penambahan ion-ion logam dapat mempengaruhi aktivitas enzim L–glutaminase dan L-asparaginase.
4. Profil enzim L–glutaminase dan L-asparaginase memiliki keunikan aktivitas antimikroba dan antikanker secara *in vitro*.

## L. Kerangka Konsep dan Definisi Operasional

### Kerangka Konsep



Keterangan :

 Variabel yang diteliti

**Gambar 24.** Kerangka Konsep

## Definisi Operasional

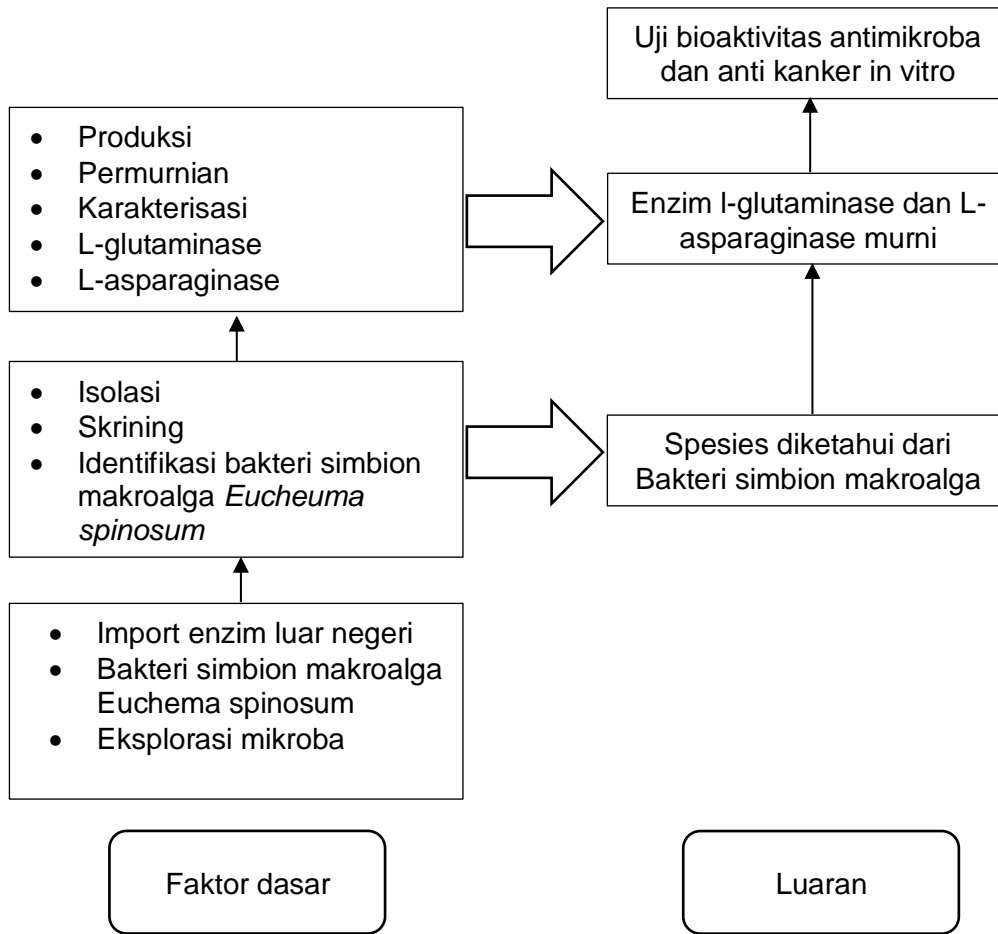
- Bakteri simbion adalah bakteri yang hidupnya menetap pada organisme lain, biasanya menghasilkan senyawa bioaktif yang sama seperti inangnya.
- *Eucheuma spinosum* adalah kelompok alga merah yang termasuk dalam kelas Rhodophyceae.
- Enzim L–glutaminase adalah jenis enzim hidrolase yang mengkatalis reaksi hidrolisis L–glutamin menjadi asam glutamat dan amonia dengan memutus ikatan amida.
- Enzim L-asparaginase adalah enzim yang mengkatalisis hidrolisis L-asparagin menjadi L-aspartat dan amonia dengan memutus ikatan amida.
- Kadar protein merupakan penentuan jumlah total unsur N (nitrogen) dari asam amino penyusun protein menggunakan metode Lowry dengan BSA sebagai larutan standar.
- Aktivitas enzim L-glutaminase dan L-asparaginase merupakan penentuan jumlah enzim yang mengkatalisis pembentukan amoniak secara kolorimetri berdasarkan metode Wriston dan Yellin menggunakan reagent Nessler.
- Uji aktivitas antimikroba adalah uji secara *in vitro* untuk mengetahui adanya daya hambat dari suatu senyawa uji. Sistem ini merupakan uji kuantitatif dengan cara mengukur diameter zona hambat pada pertumbuhan bakteri uji.
- Metode difusi agar paper disc adalah metode uji daya hambat suatu

senyawa menggunakan media agar dan *paper disc*.

- Uji aktivitas antimikroba adalah uji secara *in vitro* untuk mengetahui adanya daya hambat dari suatu senyawa uji terhadap proses perbanyakan sel mikroba pada hewan uji. Sistem ini merupakan uji kuantitatif dengan cara mengukur penurunan jumlah atau titer sel mikroba.
- Uji aktivitas antikanker secara *in vitro* adalah untuk mengetahui adanya daya hambat proliferasi sel kanker payudara MCF-7 dari pengaruh penambahan enzim L-glutaminase dan atau L-asparaginase.

### **M. Kerangka Pikir**

Berdasarkan latar belakang, masalah, dan landasan teori maka dapat disusun alur kerangka pikir yang diterangkan secara skematik pada Gambar 25.



**Gambar 26.** Alur Kerangka Pikir Penelitian