

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

L-asparaginase adalah enzim yang menghidrolisis asparagin menjadi asam aspartat dan amonia (Shafqat *et al.*, 2023). Terdapat dua tipe dari *L-asparaginase* yang berasal dari sumber bakteri, yaitu *L-asparaginase* tipe I dan II. *L-asparaginase* tipe I yang dikode oleh gen *ansA* merupakan enzim yang terletak pada sitoplasma dan memiliki afinitas yang rendah terhadap asparagin, sedangkan *L-asparaginase* tipe II yang dikode oleh gen *AnsB* terletak pada periplasma dan memiliki afinitas yang tinggi terhadap asparagin (Souza *et al.*, 2017).

L-asparaginase dapat ditemukan secara luas pada mikroba, tumbuhan dan hewan. Enzim ini memiliki potensi baik dalam bidang pangan dan kesehatan. Enzim ini dimanfaatkan untuk mengurangi kadar akrilamid yang terdapat pada makanan terutama pada produk kentang goreng, roti, dan kopi pada bidang pangan. Enzim *L-asparaginase* dimanfaatkan sebagai terapi berbasis enzim untuk *acute lymphoblastic leukemia* (ALL) dan limfosarkoma (Jia *et al.*, 2021) pada bidang kesehatan. Asparagin adalah asam amino non-esensial yang diperlukan oleh sel. Sel ALL tidak memiliki, atau memiliki enzim *asparagine synthetase* dalam jumlah yang sedikit, sehingga sel ALL memerlukan asparagin yang bersumber dari eksternal. Enzim *L-asparaginase* dapat menginduksi apoptosis pada sel ALL dengan mengurangi kadar asparagin (Nemkov *et al.*, 2019).

Konsentrasi fisiologis asparagin dalam darah manusia berada pada kisaran 40-80 μM dan harus mencapai konsentrasi 0,1-0,2 μM agar kematian sel leukemia yang efisien dapat terjadi, hanya enzim dengan K_m sekitar 10^{-5} yang dapat memberikan efek tersebut. Tipe II memiliki K_m dua kali lipat lebih rendah dibandingkan tipe I yang hanya mencapai rentang milimolar. Enzim *L-asparaginase* II yang telah digunakan untuk pengobatan ALL karena memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap asparagin dibandingkan dengan tipe I (Sharafi *et al.*, 2017). *L-asparaginase* II memiliki peran sebagai obat untuk terapi enzim pada leukemia, terutama pada ALL.

Leukemia adalah salah satu bentuk keganasan hematologis yang ditandai dengan proliferasi tak terkendali pada leukosit yang belum matang. Leukemia terdiri atas berbagai sub tipe berdasarkan jenis sel punca hematopoietik dan status kematangan sel. Kelainan ini berasal dari mutasi somatik pada sel punca hematopoietik (Romero-Morelos *et al.*, 2024). Proliferasi tersebut terjadi dalam sumsum tulang yang menimbulkan peningkatan jumlah sel dari jalur hematopoiesis yang terdampak (Bispo *et al.*, 2020). Hal ini dapat menimbulkan kerusakan pada sel darah merah, sumsum tulang, dan imunitas tubuh (Ghaderzadeh *et al.*, 2021). Terdapat 474.519 kasus baru leukemia dan 311.594 kasus kematian akibat leukemia yang dilaporkan secara global pada tahun 2020 (Huang *et al.*, 2022). Prevelensi kasus baru leukemia di Indonesia di tahun 2022 menduduki peringkat ke-9 dengan angka kematian menduduki peringkat ke-7 (Globocan, 2024b).

Jenis leukemia bervariasi dalam hal patogenesis, penyebab, angka kejadian dan prognosis. Sel-sel leukemia berupa sel dewasa dominan ditemukan pada *chronic lymphocytic leukemia* (CLL), sedangkan pada leukemia akut sel-sel yang ditemukan adalah sel prekursor dari berbagai status kematangan sel, lalu kedua sel dewasa dan prekursor dapat ditemukan pada *chronic myeloid leukemia* (CML) (Dong *et al.*, 2020). *Acute lymphoblastic leukemia* (ALL) adalah salah satu jenis leukemia akut yang paling sering terjadi dengan kasus kejadian 75-80% dari seluruh kasus leukemia anak secara global. *Acute lymphoblastic leukemia* juga menjadi penyebab utama kematian pada anak-anak terutama pada negara berpenghasilan rendah hingga menengah, dimana terjadi 94% kematian akibat leukemia (Mohammadian-Hafshejani *et al.*, 2024).

Pengobatan yang biasanya diberikan untuk penyakit leukemia terdiri atas radioterapi, steroid, kemoterapi, dan pengobatan kombinasi intensif yang termasuk transplantasi sumsum tulang atau sel punca. Kemoterapi adalah pendekatan yang paling sering digunakan. Pengembangan pengobatan saat ini berfokus pada pengembangan pengobatan yang lebih efisien dan tidak toksik (Qeshmi *et al.*, 2018). Terapi enzim adalah salah satu pendekatan yang hemat biaya dan memiliki komplikasi lebih minim dibandingkan terapi konvensional seperti operasi, radioterapi, dan kemoterapi (Darvishi *et al.*, 2022). Terapi enzim menerapkan

strategi *amino acid deprivation therapy* (AADT) dengan menggunakan enzim yang dapat merusak asam amino tertentu yang diperlukan oleh sel kanker sebagai nutrisi. Hal ini mendorong kekurangan asupan nutrisi pada tumor secara eksogen dan dapat menghambat pertumbuhan kanker. Salah satu enzim bersumber dari mikroba pertama yang menggunakan strategi AADT adalah *L-asparaginase* (Dhankhar *et al.*, 2020).

L-asparaginase bekerja dengan cara menghidrolisis asparagin menjadi aspartat dan amonia, sel tumor memerlukan asparagin untuk metabolisme sel, namun tidak dapat menyintesis asparagin sehingga memerlukan asparagin dari sirkulasi. *L-asparaginase* menyebabkan deplesi asparagin yang cepat pada plasma sehingga metabolisme sel leukemia berkurang. Mekanisme ini dimanfaatkan untuk memicu apoptosis pada sel leukemia (De Morais *and* De Souza, 2021). Apoptosis adalah kematian sel terprogram yang bergantung pada ATP, dimediasi enzim dan terprogram secara genetik yang tidak menimbulkan ancaman bagi organisme tersebut (Akhtar *and* Bokhari, 2025). Apoptosis memiliki peran penting dalam mempertahankan homeostasis sel karena pada tumor, termasuk leukemia, terjadi alterasi jalur apoptosis karena mutasi genetik maupun alterasi fungsional pada protein-protein yang memicu apoptosis (Favale *et al.*, 2024).

Kemampuan anti-tumor enzim *L-asparaginase* pertama kali ditemukan pada tahun 1960, dimana enzim *L-asparaginase* dari *E. coli* pertama kali digunakan untuk pengobatan keganasan, terutama limfoma dan leukemia yang menunjukkan remisi yang bergantung dari dosis (Maese *and* Rau, 2022). Penelitian yang dilakukan oleh kerja sama kelompok onkologi pediatrik Italia, Belanda dan Hungaria mengamati pemberian *asparaginase* tambahan selama 20 minggu (sebagian besar *asparaginase Erwinia*) pada pasien yang dipilih secara random menunjukkan peningkatan kesembuhan dibandingkan dengan yang tidak menerima *asparaginase* (Pession *et al.*, 2005).

Saat ini *L-asparaginase* untuk keperluan terapi yang telah disetujui FDA berasal dari *E. coli* dan *Erwinia chrysanthemi* (Shishparenok *et al.*, 2023). Terdapat tiga tipe *L-asparaginase* yang digunakan sebagai obat yaitu, *asparaginase* dari *E. coli* (*E. coli-asparaginase*: Kidrolase[®], EUSA Pharma; Elspar[®], Ovation

Pharmaceuticals; Crasnitin™, Bayer; Leunase®, sanofi-aventis; Asparaginase medac™, Kyowa Hakko); bentuk *pegylated asparaginase* dari *E. coli* (*Polyethylene glycol* [PEG-ASNase]; Oncaspar™, Enzon Pharmaceuticals Inc) dan enzim *L-asparaginase* dari *Erwinia chrysanthemi* (Erwinase®, EUSA Pharma) (Pieters *et al.*, 2011).

Terdapat komplikasi dan toksisitas dari terapi enzim *L-asparaginase* seperti hipersensitifitas klinis, hipoproteinemia berat, reaksi alergi, hepatotoksitas, hiperglikemi, diabetes, pankreatitis, trombosis, ensefalopati dan hipertrigliseridemia. Penelitian oleh Schmidt *et al.*, (2021) menunjukkan profil toksisitas terkait pemberian enzim *L-asparaginase* yang berasal dari *E. coli* selama protokol kemoterapi lini pertama pada pasien ALL. Sebanyak 165 orang pasien, 82 orang pasien (49,7%) setidaknya memiliki 1 tipe toksisitas yang terkait dengan *L-asparaginase*. 40 orang pasien (24,1%) mengalami hipersensitifitas klinis, 32 orang pasien (19,4%) mengalami hepatotoksitas, 15 orang pasien (9,1%) mengalami hipoproteinemia berat, 7 orang pasien (4,2%) mengalami hiperglikemi, 11 orang pasien (6,7%) mengalami hipertrigliseridemia, 5 orang pasien (3%) mengalami pankreatitis, 6 orang pasien (3,7%) mengalami osteonekrosis, 4 orang pasien (2,4%) mengalami trombosis, dan 2 orang pasien (1,2%) mengalami *cerebral thrombosis*. Hal ini mendukung perlu dilakukannya eksplorasi untuk mencari *L-asparaginase* dari sumber mikroorganisme lain untuk meminimalisir risiko dan toksisitas, salah satunya adalah bakteri *Serratia plymuthica* UBCF_13.

Serratia plymuthica UBCF_13 adalah bakteri gram negatif dari famili *enterobacteriaceae* serta merupakan salah satu bakteri yang memiliki kemampuan memproduksi enzim *L-asparaginase* II. Penelitian sebelumnya oleh Fatiah *et al.*, (2021) telah melakukan *whole genome sequencing* dari isolat *S. plymuthica* UBCF_13. Sekuens genom lengkap dari *S. plymuthica* UBCF_13 telah dilaporkan dan dapat diakses pada *database* GenBank NCBI (CP068771.1). Analisis genom menunjukkan keberadaan gen *AnsB* yang mengkode enzim *L-asparaginase* II.

Gagasan terkait pengembangan protein terapeutik lainnya yang dapat diproduksi lebih cepat dan terjangkau melalui *E. coli* semakin berkembang setelah suksesnya ekspresi insulin rekombinan pada bakteri *E. coli* K-12 ditahun 1982

(İncir and Kaplan, 2024). Berkaitan dengan hal tersebut, pemanfaatan teknologi DNA rekombinan dengan sel *host E. coli* digunakan untuk meningkatkan produksi dan ekspresi dari *L-asparaginase* II asal *S. plymuthica* UBCF_13. Salah satu *strain* yang dimiliki bakteri ini adalah DH10B. *Strain* ini dirancang untuk propagasi gen target dalam ukuran yang besar dan sering digunakan untuk kloning DNA karena memiliki efisiensi transformasi DNA yang tinggi serta dapat mempertahankan plasmid berukuran besar secara stabil (Durfee *et al.*, 2008a). *Strain* DH10B dipilih untuk penelitian ini karena *strain* ini merupakan *substrain* dari *E. coli* K-12 yang sebelumnya telah berhasil mengekspresikan insulin rekombinan (Durfee *et al.*, 2008b).

E. coli dan *S. plymuthica* UBCF_13 merupakan bakteri dari famili *enterobacteriaceae* dan dapat memproduksi *L-asparaginase*. *L-asparaginase* dari *E. coli* telah digunakan untuk terapi secara komersial, namun terdapat laporan toksisitas dari penggunaan enzim *L-asparaginase* yang berasal dari *E. coli* native. *L-asparaginase* dari *S. plymuthica* UBCF_13 saat ini belum digunakan untuk terapi, dan diharapkan memiliki potensi yang lebih baik untuk terapi enzim dengan risiko toksisitas yang lebih rendah.

Penelitian yang dilakukan oleh Chi *et al.*, (2021) terkait enzim *L-asparaginase* rekombinan dari *Mycobacterium gordonae* yang diekspresikan pada *E. coli* BL21 (DE3) menunjukkan aktivitas spesifik enzim *L-asparaginase* tertinggi, yaitu 486,65 IU mg⁻¹ pada pH 9,0 suhu 50°C. Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Arredondo-Núñez *et al.*, (2023) menunjukkan aktivitas enzim pada 234,38 U mg⁻¹ dan aktivitas katalitik maksimum pada pH 9,0 dan suhu 60 °C. Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan keanekaragaman profil enzim rekombinan dalam aktivitas enzim, suhu dan pH optimum. Hal ini mendorong perlu dilakukannya penelitian terkait uji aktivitas enzim *L-asparaginase* dari *E. coli* DH10B native dan *E. coli* DH10B *pET28a(+)_AnsB* sebagai tahap awal dari karakterisasi enzim. *Strain* DH10B digunakan untuk mengetahui apakah terdapat peningkatan aktivitas enzim *L-asparaginase* dari *E. coli* DH10B rekombinan yang mengandung konstruksi *pET28a(+)_AnsB*.

Uji Aktivitas enzim *L-asparaginase* dapat diukur menggunakan metode *direct nesslerization*, prinsip metode ini adalah mengukur kadar amonia yang dihasilkan dari hidrolisis asparagin oleh enzim *L-asparaginase* dengan cara mereaksikan sampel dengan reagen Nessler (Ashok *et al.*, 2019). Warna kuning-oranye akan terbentuk dari larutan sampel, dan dapat diukur dengan spektrofotometri. Aktivitas enzim pada sampel dihitung dengan cara menyubtitusikan absorbansi sampel pada kurva standar amonia (Mohamed *et al.*, 2015). Satu unit enzim *L-asparaginase* (U) sesuai dengan jumlah enzim yang diperlukan untuk mengubah 1 μmol asparagin menjadi 1 μmol amonia per menit pada suhu 37°C (Magri *et al.*, 2018).

Berdasarkan penjelasan tersebut, peneliti tertarik untuk mengetahui perbedaan aktivitas enzim *L-asparaginase* II dari *E. coli* DH10B *native* dan *E. coli* DH10B rekombinan yang mengandung konstruksi *pET28a(+)_AnsB* sebagai pengembangan terapi berbasis enzim untuk *Acute Lymphoblastic Leukemia* (ALL). Masing-masing bakteri perlu diuji akvititasnya, karena *E. coli* DH10B *native* juga memproduksi *L-asparaginase*. Diharapkan terdapat peningkatan produksi, ekspresi dan aktivitas *L-asparaginase* II dari *E. coli* DH10B *pET28a(+)_AnsB* yang dapat mendukung penelitian lanjutan terkait terapi berbasis enzim dari enzim *L-asparaginase* rekombinan *S. plymuthica* UBCF_13 sebagai alternatif pengobatan yang lebih baik untuk penyakit ALL.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat perbedaan aktivitas enzim *L-asparaginase* II dari *E. coli* DH10B *native* dan *E. coli* DH10B rekombinan yang mengandung konstruksi *pET28a(+)_AnsB*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui perbedaan aktivitas enzim *L-asparaginase II* pada *E. coli* DH10B *native* dan *E. coli* DH10B rekombinan yang mengandung konstruksi *pET28a(+)_AnsB*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui nilai aktivitas dari enzim *L-asparaginase II* pada *E. coli* DH10B *native*.
2. Mengetahui nilai aktivitas dari enzim *L-asparaginase II* pada *E. coli* DH10B rekombinan yang mengandung konstruksi *pET28a(+)_AnsB*.
3. Membandingkan aktivitas enzim *L-asparaginase II* dari *E. coli* DH10B *native* dengan *E. coli* DH10B rekombinan yang mengandung konstruksi *pET28a(+)_AnsB*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Terhadap Penelitian

Dapat mengetahui aktivitas enzim *L-asparaginase II* dari *E. coli* DH10B rekombinan yang mengandung konstruksi *pET28a(+)_AnsB* yang dapat digunakan untuk penelitian dalam rangka meningkatkan produksi enzim *L-asparaginase* untuk keperluan terapi ALL.

1.4.2 Manfaat Terhadap Masyarakat

1. Masyarakat akan mendapatkan manfaat terapi ALL yang lebih terjangkau jika potensi enzim *L-asparaginase II* asal *S. plymuthica* UBCF_13 terbukti berpotensi untuk digunakan dalam terapi ALL.
2. Masyarakat memperoleh alternatif produksi enzim *L-asparaginase* yang bermanfaat di bidang industri farmasi.

1.4.3 Manfaat Terhadap Ilmu Pengetahuan

Menambah pengetahuan baru terkait karakteristik enzim *L-asparaginase II* yang berasal dari *S. plymuthica* UBCF_13.