

Isolasi Enzim L-Asparaginase dari Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) dan Uji Potensi terhadap Kultur Sel Leukemia Tipe K562

Oktarina Puspitasari^a, Wuryanti^{a*}

^a Biochemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

* Corresponding author: wuryanti@live.undip.ac.id

Article Info

Keywords:

L-Asparaginase, anticancer, temulawak, MTT, ELISA Reader

Kata kunci:

L-Asparaginase, antikanker, temulawak, MTT, ELISA Reader

Abstract

Enzyme L-Asparaginase is an enzyme that hydrolyzes L-asparagin to L-aspartic acid and ammonia. L-Asparaginase can be used to treat cancer, which works by inhibiting protein synthesis of cancer cells without damaging normal cells. One of the L-Asparaginase source plants is temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). The objectives of this study were to isolate L-Asparaginase from temulawak rhizome, to determine the initial enzyme activity of L-Asparaginase, and to find potency of L-Asparaginase enzyme anticancer effect against K562 leukemia cell. Isolation and testing of L-Asparaginase enzyme potential from temulawak rhizomes were conducted in several stages. The first stage was the insulation and partial purification of L-Asparaginase enzyme from the temulawak rhizome. The second stage was a activity specific test of L-Asparaginase enzyme at optimum condition (37°C, pH 8,6, and incubation time 30 min). In the enzyme with the highest specific activity, an anticancer test was performed on cell leukaemia type K562 with cell viability method with addition of MTT and measurement using ELISA Reader. L-Asparaginase enzyme from Temulawak rhizome had specific activity of 77.18 unit/mg protein at fraction 4 (fraction with 60–80% saturation level). However, fraction 4 was less potential for leukaemia cell anticancer activity type K562 as obtained LC₅₀ of 534.89 µg/mL, while the standard of a bioactive compound as anticancer has LC₅₀ of 20 µg/mL.

Abstrak

Enzim L-Asparaginase merupakan enzim yang menghidrolisis L-asparagin menjadi asam L-aspartat dan amonia. L-Asparaginase dapat digunakan untuk mengobati penyakit kanker, yang bekerja dengan cara menghambat sintesis protein sel kanker tanpa merusak sel normal. Salah satu tumbuhan sumber L-Asparaginase adalah temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). Tujuan penelitian ini yaitu mengisolasi L-Asparaginase dari rimpang temulawak, menentukan nilai aktivitas spesifik enzim L-Asparaginase hasil isolasi, dan mengetahui potensi antikanker enzim L-Asparaginase hasil isolasi terhadap sel leukemia tipe K562. Isolasi dan uji potensi enzim L-Asparaginase dari rimpang temulawak dilakukan beberapa tahap. Tahap pertama yaitu isolasi dan pemurnian parsial enzim L-Asparaginase dari rimpang temulawak. Tahap kedua yaitu uji aktivitas spesifik enzim L-Asparaginase pada kondisi optimum (suhu 37°C, pH 8,6, dan waktu inkubasi 30 menit). Pada enzim dengan aktivitas spesifik tertinggi dilakukan uji antikanker terhadap sel leukemia tipe K562 dengan metode viabilitas sel dengan penambahan MTT dan pengukuran menggunakan ELISA Reader. Enzim L-Asparaginase dari rimpang temulawak mempunyai aktivitas spesifik sebesar 77,18 unit/mg protein pada fraksi 4 (fraksi dengan tingkat kejenuhan 60–80%). Namun fraksi 4 tersebut kurang potensial untuk aktivitas antikanker sel leukemia tipe K562 karena diperoleh LC₅₀ sebesar 534,89 µg/mL, sedangkan standart suatu senyawa bioaktif sebagai antikanker adalah LC₅₀ ≤ 20 µg/mL.

1. Pendahuluan

Kanker merupakan salah satu penyakit yang ditandai dengan pembelahan sel yang tidak terkendali dan kemampuan sel-sel tersebut untuk menyerang jaringan biologis lainnya, baik dengan pertumbuhan langsung di jaringan yang bersebelahan (*invasi*) atau dengan migrasi sel ke tempat yang jauh (*metastasis*). Kanker merupakan penyakit yang menempati peringkat kedua di dunia sebagai penyebab kematian. Berbagai usaha dilakukan untuk menyembuhkan penyakit kanker. Salah satu usaha yang sedang intensif dilakukan adalah melalui pencarian senyawa antikanker dari bahan alam. Umumnya pengobatan kanker dilakukan dengan obat-obat sintesis dan radiasi terapi yang digunakan tersebut banyak menimbulkan efek samping yang merugikan penderita [1]. Hal ini menyebabkan penelitian untuk menemukan obat-obat baru terus berkembang, salah satu cara yang dilakukan adalah dengan mengembangkan pengobatan dari bahan alam [2].

Enzim adalah molekul protein yang sangat besar yang dapat digunakan sebagai katalis organik yang mempercepat reaksi biologis berjuta-juta kali [3]. Sekarang ini penggunaan enzim telah semakin luas yaitu di bidang pangan dan kesehatan. Salah satu enzim yang sangat berperan di dalam bidang kesehatan yaitu L-Asparaginase.

L-Asparaginase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis L-asparagin menjadi L-aspartat dan amonia [4]. L-asparagin merupakan asam amino non-esensial [5] yang dibutuhkan oleh sel untuk sintesis protein dan pertumbuhan. Pada sel penderita leukemia limfoblastik akut, jumlah asparagin sintetase terbatas, sehingga ketersediaan asparagin bergantung dari luar sel [6], sedangkan pada sel normal asparagin sintetase dapat bekerja secara normal menghasilkan asparagin [5]. Adanya L-Asparaginase dalam tubuh akan mengakibatkan penurunan konsentrasi asparagin dalam darah sehingga asupan asparagin bagi sel kanker tersebut menjadi sangat terbatas dan sintesis protein pada sel tersebut akan terganggu yang pada akhirnya akan menghambat pertumbuhan sel kanker, dan mengakibatkan kematian sel kanker tersebut. Selain itu aktivitas L-Asparaginase tidak mengganggu sel normal, karena sel normal mampu menghasilkan enzim asparagin sintetase dalam jumlah yang semestinya, sehingga kebutuhan asparagin akan dapat dipenuhi oleh sel normal itu sendiri [5].

Indonesia merupakan negara tropis yang memiliki keanekaragaman hayati, sehingga berpotensi besar dalam memperoleh L-Asparaginase dari tumbuhan. Berdasarkan penelitian sebelumnya, salah satu tumbuhan yang dapat digunakan sebagai sumber L-Asparaginase adalah temulawak. Enzim L-Asparaginase pada fraksi ke-4 dari rimpang temulawak mempunyai aktifitas spesifik yang besar dibanding dengan fraksi-fraksi yang lain dalam rimpang temulawak, sehingga diharapkan memiliki potensi sebagai antikanker [7]. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui potensi enzim L-Asparaginase dari rimpang temulawak terhadap sel kanker.

2. Metodologi Penelitian

Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan adalah sentrifugator (*Centrif-228*), inkubator (*Memmert*), blender (*Philip*), neraca analitik (*Kern 870*), pHmeter (*Ezodo*), *magnetic stirer* (*Thermolyne Cimarec*), alat-alat kultur sel, spektrofotometer UV-Vis (*Shimadzu*), *laminar air flow*, *96-well plate* (*Nunc*), mikroskop fluoresen dan ELISA reader. Bahan-bahan yang digunakan adalah BSA (*Bovine Serum Albumin*), TCA (*Trichloroacetic acid*), Bufer Tris-hidroksimetil-aminometan, *Folin-ciocalteau*, Kalium-natrium tartrat, L-asparagin (*Merck*), Amonium sulfat, Raksa (II) klorida, Asam klorida, Natrium karbonat, Kalium iodida, Barium (II) klorida, Natrium hidroksida, Tembaga (II) sulfat, temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb), akuades, Sel Kanker leukemia tipe K562 yang dibiakkan oleh LPPT UGM, Larutan Bufer natrium fosfat 5 mM pH 7,2 yang mengandung 0,14 M NaCl, IMDM 1640 (*Iscove's Modified Dulbecco's Media*) (*Sigma*), FBS (*Fetal Bovine Serum*) 10% (v/v) (*Gibco*), RPMI (*sigma*), larutan MTT ([3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromida]) dan kertas saring yang semuanya berkualitas p.a, kecuali temulawak, akuades dan kertas saring.

Isolasi Enzim

Serbuk temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) sebanyak 1000 g ditambahkan 500 mL bufer Tris-hidroksimetil-aminometan 0,2 M pH = 8,6 dan diblender selama 20 menit. Campuran kemudian dibiarkan selama 1,5 jam pada suhu 5°C lalu disaring. Filtrat kemudian disentrifugasi pada 3400 rpm selama 10 menit. Filtrat yang diperoleh dari sentrifugasi pada 3400 rpm disebut ekstrak kasar (EK).

Fraksinasi Enzim

Fraksinasi enzim dilakukan dengan menggunakan amonium sulfat secara bertingkat dengan tingkat kejenuhan 0 - 20% (F₁), 20-40% (F₂), 40-60% (F₃), 60-80% (F₄), 80 - 100% (F₅). Amonium sulfat ditimbang sesuai fraksi yang dikehendaki agar diperoleh konsentrasi yang diinginkan, lalu dimasukkan ke dalam filtrat hasil akhir tahap isolasi enzim sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan *magnetic stirer* dalam penangas es. Campuran kemudian didiamkan selama 1 malam dalam keadaan dingin (5°C), kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 50 menit. Endapan yang diperoleh dipisahkan dari filtratnya dan disuspensi dengan 3 mL bufer Tris-hidroksimetil-aminometan 0,2 M pH = 8,6. Endapan yang disuspensi tersebut merupakan EK, F₁, F₂, F₃, F₄, F₅.

Dialisis Enzim

Dialisis dilakukan dengan menggunakan membran selofan yang telah direbus selama 30 menit dan dicuci dengan akuades. Selofan yang berisi suspensi hasil akhir fraksinasi enzim direndam dalam bufer Tris-hidroksimetil-aminometan 0,002 M pH = 8,6 dalam keadaan dingin dan tiap 2 jam bufer diganti serta diuji kandungan amonium sulfat pada larutan di luar selofan

dengan BaCl₂ 0,01 M hingga tidak terbentuk endapan putih.

Penentuan Unit Aktivitas Enzim

Disiapkan sebanyak 6 tabung dan masing-masing diisi dengan 1 mL larutan substrat L-asparagin 0,1665 M, 0,1 mL endapan yang disuspensi (EK, F₁, F₂, F₃, F₄, F₅), dan 0,4 mL bufer Tris-hidroksimetil-aminometan 0,2 M pH = 8,6 dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, kemudian ditambah 1 mL larutan TCA 1,5 M dan disentrifugasi pada kecepatan 3400 rpm selama 15 menit untuk memisahkan endapannya. Sebanyak 0,25 mL filtrat diambil lalu ditambah dengan 4,25 mL akuades dan 0,5 mL pereaksi Nessler, kemudian absorbansi larutan tersebut diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 420 nm. Sebagai kontrol adalah 0,1 mL endapan yang disuspensi, yang telah dihilangkan aktifitasnya (dengan dipanaskan), ditambah 0,4 mL bufer Tris-hidroksimetil-aminometan 0,2 M pH = 8,6 dan 0,5 mL larutan L-asparagin 0,1665 M. Aktivitas enzim ditentukan secara regresi linier terhadap kurva standar amonium sulfat.

Penentuan Kadar Protein Enzim

Sebanyak 0,1 mL larutan protein hasil fraksinasi (EK, F₁, F₂, F₃, F₄, F₅) ditambah dengan 2 mL larutan Lowry C, diinkubasi pada suhu optimum (37°C) selama 30 menit sambil sesekali dikocok. Selanjutnya ditambah dengan 0,2 mL Lowry D dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar dengan sesekali dikocok, kemudian diukur absorbansinya. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang (λ) optimum BSA yaitu 720 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Kadar protein ditentukan secara regresi linier terhadap kurva standar BSA.

Kultur Sel Kanker Darah (Leukemia)

Sel leukemia yang telah siap dikultur dalam FBS dan IMDM, ketiganya diperoleh dari LPPT UGM Yogyakarta. Proses selanjutnya dikerjakan dengan teknik aseptik di bawah *laminair air flow cabinet* (LAFC).

Proses Thawing Sel Leukemia

Sel leukemia disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama lima menit pada suhu 4°C. Endapan sel ditanam pada botol kultur yang berisi media yang mengandung 10% FBS. Selanjutnya kultur disimpan dalam inkubator yang mengandung 95% CO₂ dan 5% O₂ pada suhu 37°C selama 24 jam.

Inisiasi Kultur Sel Leukemia

Disiapkan cawan petri steril tertutup. Homogenkan sel leukemia hasil *thawing* dan tuangkan ke masing-masing petri sebanyak 2 mL. Inkubasi dalam inkubator yang mengandung 95% CO₂ dan 5% O₂ pada suhu 37°C selama 24 jam. Hitung jumlah sel/mL $\geq 10^4$ sel/mL (Hidayat, 2002).

Uji Sitotoksik Terhadap Sel Leukemia

Larutan uji dibuat dengan seri dosis 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,625 µg/mL, 7,81 µg/mL, 3,90 µg/mL, 1,95

µg/mL, 0,97 µg/mL, 0,488 µg/mL, 0,244 µg/mL, 0,122 µg/mL, 0,061 µg/mL.

Kultur hasil inisiasi dihomogenkan. Kontrol terdiri dari sel, medium IMDM, dan larutan dapar natrium fosfat 5 mM pH = 7,2. Blanko terdiri dari medium IMDM, larutan dapar natrium fosfat 5 mM pH = 7,2 dan variasi konsentrasi sampel enzim L-Asparaginase. Perlakuan untuk uji sitotoksitas terdiri dari sel, medium IMDM, larutan dapar natrium fosfat 5 mM pH = 7,2 dan variasi konsentrasi sampel enzim L-Asparaginase. Sampel yang diuji adalah variasi konsentrasi sampel enzim L-Asparaginase dengan aktivitas spesifik tertinggi.

Penghitungan Persen Kematian Sel Menggunakan Metode MTT

Larutan MTT dimasukkan dalam sumuran. Sel yang hidup akan membentuk kristal formazan berwarna ungu yang intensitasnya dapat diukur dengan ELISA Reader. Absorbansi yang terbaca sebanding dengan jumlah sel hidup.

Analisis Hasil

Sitotoksitas variasi konsentrasi sampel enzim L-Asparaginase dianalisa dengan menghitung persentase kematian sel yang diperoleh dari perhitungan menggunakan rumus Abbot [8]:

$$\text{Persen kematian} = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

Keterangan:

A = Nilai rata-rata absorbansi dari beberapa kontrol

B = Nilai rata-rata absorbansi dari beberapa perlakuan

Efek toksisitas dianalisis dari pengamatan dengan persen kematian. Dengan mengetahui kematian sel kanker, kemudian dicari angka probit melalui tabel dan dibuat persamaan garis:

$$Y = Bx + A$$

di mana: Y = Angka probit dan X = log konsentrasi

Dari persamaan tersebut kemudian dihitung LC₅₀ dengan memasukkan nilai probit (50% kematian) [8].

3. Hasil dan Pembahasan

Isolasi dan Pemurnian Enzim L-Asparaginase dari Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Robx.)

Enzim L-Asparaginase dapat diperoleh dari rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Robx.) dengan mengeluarkan enzim tersebut dari jaringan secara mekanik, yaitu dengan diblender dan penambahan bufer Tris-hidroksimetil-aminometan. Proses pemblanderan menghasilkan campuran coklat yang terdiri dari komponen sel, protein dan non-protein dari temulawak. Pemisahan protein dari komponen non-protein dan sel dilakukan dengan penyaringan dan sentrifugasi pada filtrat. Sentrifugasi pada kecepatan yang sama, yaitu pada 3400 rpm selama 10 menit diperoleh endapan yang berwarna coklat yang merupakan komponen-komponen sel dari temulawak dan filtrat sebanyak 900 mL berwarna merah kekuningan yang merupakan enzim kasar (*crude*

enzyme). Kemudian pengendapan protein menggunakan fraksinasi diikuti dengan sentrifugasi untuk memisahkan endapan dan supernatan. Endapan yang diperoleh merupakan protein enzim yang berwarna coklat dan masih mengandung amonium sulfat, maka dilakukan pemurnian lebih lanjut untuk memisahkan amonium sulfat dengan cara dialisis menggunakan membran selofan [9]. Hasil penelitian menunjukkan bahwa, penggantian bufer di luar membran dilakukan sebanyak enam kali, dengan volume setiap penggantian adalah 2000 mL. Apabila tidak terbentuk endapan putih diperoleh enzim yang telah terbebas dari amonium sulfat, kemudian selanjutnya dilakukan uji unit aktivitas enzim dengan metode Nessler dan pengukuran kadar protein dengan metode lowry.

Penentuan Unit Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Enzim L-Asparaginase

Penentuan aktivitas enzim L-Asparaginase dilakukan dengan mereaksikan enzim tersebut menggunakan substrat yang sesuai. Substrat yang digunakan pada reaksi enzimatik ini adalah L-asparagin. Penentuan aktivitas enzim L-Asparaginase dalam rimpang temulawak dilakukan melalui identifikasi amonia yang terbentuk dari proses penguraian tersebut dapat dianalisis dengan pereaksi Nessler.

Nilai aktivitas spesifik ini dapat digunakan sebagai ukuran besarnya kemurnian enzim hasil isolasi [5]. Kadar protein dapat ditentukan dengan metode Lowry. Penentuan aktivitas dan aktivitas spesifik terhadap enzim L-Asparaginase dari rimpang temulawak dilakukan pada EK, F1, F2, F3, F4, dan F5 yang diperoleh. Hasil penentuan aktivitas enzim spesifik disajikan pada tabel 1:

Tabel 1. Tabel penentuan aktivitas enzim spesifik L-Asparaginase

Fraksi	Aktivitas Enzim (Unit/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (Unit/mg protein)	Tingkat Kemurnian
EK	393,345	13,653	28,809	1,000
F ₁	360,071	10,020	35,935	1,247
F ₂	407,605	8,886	45,867	1,592
F ₃	433,749	7,720	56,185	1,950
F ₄	480,095	6,220	77,185	2,679
F ₅	327,985	5,486	59,778	2,074

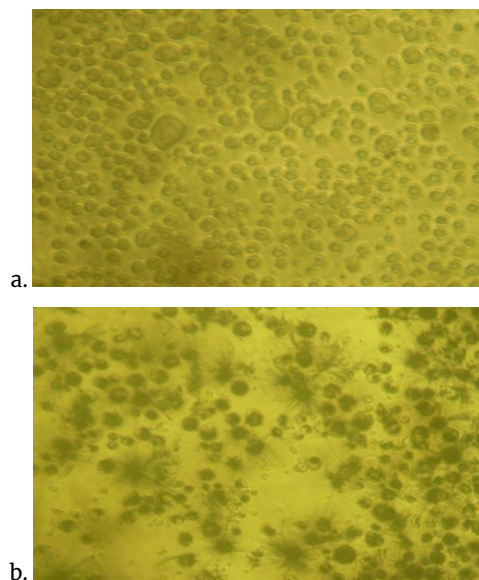
Pada tabel 1 dapat diketahui bahwa aktivitas spesifik terendah diperoleh pada F₁ dan aktivitas spesifik tertinggi diperoleh pada F₄ (60-80%) yaitu 77,109 Unit/mg protein dengan tingkat kemurnian yang tertinggi pula dibanding ekstrak kasar dan di antara fraksi-fraksi lainnya. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa enzim L-Asparaginase sebagian besar terdapat pada F₄. Pada penelitian sebelumnya [7] diperoleh aktivitas enzim spesifik pada kondisi optimum sebesar 75,091 Unit/mg protein. Perbedaan nilai aktivitas enzim spesifik yang diperoleh disebabkan perbedaan sumber temulawak dan kondisi temulawak yang digunakan dalam penelitian.

Pengujian Enzim L-Asparaginase Aktivitas Tertinggi (Fraksi Empat) Pada Sel Kanker Leukemia(K562) Menggunakan Metode MTT

Enzim dengan nilai aktivitas spesifik tertinggi (F₄: 77,18 unit/mg) selanjutnya diujikan terhadap sel kanker leukemia tipe K562. Enzim yang diujikan terhadap sel leukemia tipe K562 dikeringkan dengan menggunakan freeze dryer. Freeze dryer adalah alat untuk proses liofilisasi, sehingga diperoleh enzim berupa serbuk kristal berwarna coklat.

Enzim yang telah dikeringkan tersebut diuji pada sel kanker leukemia dengan menggunakan metode MTT, yang mana pembacaan dilakukan dengan ELISA Reader. Prinsip kerja dari instrumen ini hampir sama dengan spektrofotometer pada umumnya, yaitu interaksi (berupa absorpsi atau penyerapan) antara materi dengan energi yang berupa cahaya. Metode MTT adalah suatu tes laboratorium dan suatu metode standar kolorimetri (suatu metode yang mengukur perubahan warna) untuk mengukur pertumbuhan sel.

Pada proses uji sitotoksik larutan uji berupa enzim L-Asparaginase dibuat dalam 15 variasi konsentrasi. Sampel yang diuji adalah variasi konsentrasi sampel enzim L-Asparaginase dengan aktivitas spesifik tertinggi. Sel yang masih hidup masih aktif melakukan aktivitas metabolisme sehingga adanya MTT pada lingkungannya akan segera dipecah oleh enzim reduktase suksinat tetrazolium yang terdapat di dalam mitokondria sel tersebut membentuk kristal formazan berwarna ungu [10].

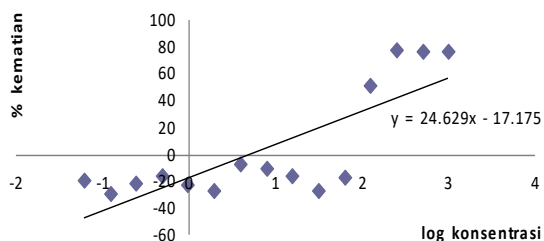


Gambar 2. (A) gambar sel leukemia sebelum ditambah dengan ekstrak enzim L-Asparaginase (B) gambar sel leukemia setelah ditambah dengan ekstrak enzim L-Asparaginase dan penambahan MTT

Pada gambar tersebut, sel-sel yang masih hidup berbentuk bulat utuh tidak mengalami perubahan bentuk, ukuran dan membentuk kristal formazan di sekitarnya, Sedangkan sel-sel yang mati ukurannya cenderung lebih kecil karena sebagian isi sel (sitoplasma)

keluar, hal ini disebabkan susunan atau integritas membran sel tersebut telah rusak.

Hasil pembacaan absorbansi dengan Elisa Reader di plotkan dalam bentuk grafik. Data dan grafik hasil uji sitotoksitas enzim L-Asparaginase fraksi ke-4 dari temulawak terhadap sel leukemia tipe K562 yang dinyatakan dalam persen kematian dapat dilihat pada gambar 3 di bawah ini



Gambar 3. Mortalitas sel leukemia hasil uji MTT

Pada gambar 3 diperoleh persamaan $y = 24,629x - 17,175$. Persamaan tersebut selanjutnya digunakan untuk menghitung nilai LC_{50} dengan memasukkan nilai 50 sebagai y sehingga didapatkan nilai x . Nilai x menunjukkan nilai log dari konsentrasi fraksi ke-4 enzim L-Asparaginase. Konsentrasi fraksi ke-4 enzim L-Asparaginase adalah antilog 2,728 yaitu 534,89 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini berarti bahwa kematian dari sel kanker leukemia K562 mencapai 50% dengan adanya penambahan enzim L-Asparaginase dengan konsentrasi 534,89 $\mu\text{g/mL}$.

Enzim L-Asparaginase mampu menghambat serta mematikan sel kanker dapat di lihat dari berkurangnya sel kanker setelah penambahan enzim L-Asparaginase, namun menurut NCI (National Cancer Institute) jika suatu uji sitotoksik suatu senyawa menghasilkan harga $LC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$ maka senyawa tersebut dinyatakan memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai senyawa antikanker [11]. Karena nilai LC_{50} enzim L-Asparaginase fraksi ke-4 dari temulawak yang diuji lebih dari 20 $\mu\text{g/mL}$, maka senyawa bioaktif tersebut kurang potensial untuk digunakan sebagai antikanker. khususnya terhadap sel leukemia K562.

4. Kesimpulan

Temulawak mengandung enzim L-Asparaginase dan memiliki aktivitas spesifik tertinggi pada fraksi ke 4 (60 - 80%) dengan aktivitas spesifik 77,18 unit/mg protein pada kondisi optimum. Enzim L-Asparaginase fraksi ke-4 rimpang temulawak telah diujikan pada sel kanker leukemia tipe K562. Fraksi tersebut kurang potensial sebagai senyawa antikanker.

5. Daftar Pustaka

- [1] Sulistia G. Ganiswara, Farmakologi dan Terapi, 4 ed., Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, 1995.
- [2] Maksum Radji, Atiek Sumiati, Nuning Indani, Uji Mutagenisitas dan Anti Kanker Ekstrak Aseton dan n-Heksana dari Kulit Batang Sesoot (*Garcinia picrorrhiza* Miq.), *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1, 2, (2004) 69-78

- [3] Wesley A. Volk, Margaret F. Wheeler, Mikrobiologi Dasar, Markham, Erlangga, Jakarta, 1993.
- [4] Abraham White, Philip Handler, Emil L. Smith, Principles of Biochemistry, 6 ed., Mcgraw-Hill, 1978.
- [5] Albert L. Lehninger, Dasar-Dasar Biokimia, M. Thenawidjaja, Erlangga, Jakarta, 1990.
- [6] P. Konečná, B. Klejdus, H. Hrstková, Monitoring The Asparaginase Activity and Asparagine Levels in Children with Acute Lymphoblastic Leukaemia Treated with Different Asparaginase Preparations, *Scripta Medica (BRNO)*, 77, 2, (2004) 55-62
- [7] Didik Adika Haninda, Isolasi dan Karakterisasi Enzim L-Asparaginase dari Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) Dalam Sediaan Utuh dan Serbuk, Skripsi, Jurusan Kimia, Universitas Diponegoro, Semarang
- [8] B. N. Meyer, N. R. Ferrigni, J. E. Putnam, L. B. Jacobsen, D. E. Nichols, J. L. McLaughlin, Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents, *Planta Med*, 45, 05, (1982) 31-34 <http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-971236>
- [9] Felix Franks, Characterization of Proteins, Humana Press, 1988.
- [10] R. Ian Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Application, Lissing, New York, 1986.
- [11] M. Suffness, J. M. Pezzuto, Assay Related to Cancer Drug Discovery, in: K. Hostettman (Ed.) *Methods in Plant Biochemistry: Assay for Bioactivity*, Academic Press, London, 2009, pp. 71-133.