

ISOLASI, PURIFIKASI PARSIAL DAN KARAKTERISASI ENZIM L-ASPARAGINASE DARI BAWANG PUTIH (*Allium sativum*)

Martina Widhi Hapsari¹, Novia Anggraeni¹, Lina Rohana¹, Ester Lanywati¹, Nindy Kusumaningtias², Wuryanti²

¹ Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Nasional Karangturi, Jl. Raden Patah No. 182-192, Kota Semarang, 50127, Indonesia

² Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Jl. Prof. Sudarto No.13, Kota Semarang, 50275, Indonesia

Email: martina.widhi@unkartur.ac.id

Abstrak

Pada makanan, enzim L-Asparaginase dapat mencegah pembentukan akrilamida dengan mengkonversi asam amino L-Asparagin sebagai prekusornya menjadi bentuk asam amino lain yaitu asam L-Aspartat. Akrilamida merupakan zat beracun yang bersifat karsinogenik pada manusia. L-Asparaginase dapat ditemukan pada berbagai organisme salah satunya adalah bawang putih. Tujuan dari penelitian ini adalah mampu mengisolasi dan mengetahui karakter optimum L-Asparaginase dari bawang putih (*Allium sativum*). Enzim L-Asparaginase dari bawang putih diperoleh melalui beberapa tahap. Tahap pertama yaitu isolasi L-Asparaginase dari bawang putih dan pemurnian melalui pengendapan dengan amonium sulfat dan dialisis. Tahap kedua yaitu uji aktivitas spesifik dan karakterisasi L-Asparaginase dengan cara menghitung jumlah amonia yang terbentuk menggunakan pereaksi Nessler dan memperoleh kadar protein total dengan metode Lowry. Hasil penelitian ini menunjukkan aktivitas spesifik tertinggi L-Asparaginase dari bawang putih pada fraksi 5 (80-100%) yaitu 1054,444 U/mg protein. Kondisi optimum L-Asparaginase bebas yaitu pada suhu 37°C, pH 8,6 dan waktu inkubasi selama 30 menit.

Kata Kunci = L-asparaginase, Aktivitas spesifik, Antikanker

Abstract

In food, enzyme L-Asparaginase can prevent the formation of acrylamide by converting the amino acid L-Asparaginase as its precursor into another form of amino acid, L-Aspartic acid. Acrylamide is a toxic substance that is carcinogenic to humans body. L-Asparaginase can be found in various organism, example in the *Allium sativum*. The aim of this study was to obtain optimum L-Asparaginase character of *Allium sativum*. Enzyme L-Asparaginase from *Allium sativum* obtained through several stages. The first step is the isolation of L-Asparaginase from *Allium sativum* and purified by precipitation with ammonium sulfate and dialysis. The second is specific activity test and characterization of L-Asparaginase tested base on products ammonia used Nessler method and protein levels were tested by Lowry method. The results of this study which the highest specific activity of L-Asparaginase at fraction 5 (80-100%), is 1054,444 U/mg. The optimum conditions of L-Asparaginase is 37°C, pH 8.6 and 30 minutes incubation.

Keyword = L-asparaginase, Specific activity, Anticancer

1. Pendahuluan

L-asparaginase mempunyai kemampuan untuk menghidrolisis L-asparagin menjadi amonia dan aspartat (Sanghvi *et al.*, 2016). Enzim ini berpotensi untuk pengobatan leukemia limfoblastik akut (LLA) dan penyakit kanker lainnya (Shrivastava *et al.*, 2016). Pada makanan, enzim L-Asparaginase dapat mencegah pembentukan akrilamida dengan mengkonversi asam amino L-Asparagin sebagai prekursornya menjadi bentuk asam amino lain yaitu asam L-Aspartat (Anese dkk., 2011). Beberapa penelitian membuktikan bahwa *pre-treatment* menggunakan enzim L-Asparaginase terhadap kentang dan *dough* efektif mereduksi akrilamida tanpa merusak penampilan dan rasa dari hasil akhir produk makanan (Ciesarová, 2010).

Salah satu sumber enzim L-Asparaginase adalah tumbuhan, hal ini dibuktikan dari berbagai penelitian, antara lain oleh Butarbutar (2006) yang mengisolasi enzim L-Asparaginase dari bawang merah (*Allium ascalonicum* L). Pada penelitian yang lain, Romualdo (2011) telah mengisolasi enzim L-Asparaginase dari rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb). Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan purifikasi parsial enzim L-Asparaginase dari bawang putih (*Allium sativum*). Purifikasi parsial adalah proses pemurnian enzim secara sebagian dari komponen-komponen selain enzim. Pada proses purifikasi parsial masih mengandung beberapa non-enzim yang belum terpisah secara sempurna. Bongiorno *et al.*, (2008), melaporkan mengenai manfaat bawang putih dalam dunia kesehatan dan farmakologi. Bawang putih juga dapat digunakan sebagai *treatment* untuk

penyakit kardiovaskuler seperti, aterosklerosis, stroke, hipertensi, trombosis dan hiperlipidemias (Bongiorno *et al.*, 2008). Bawang putih juga memiliki kemampuan untuk terapi penyembuhan dan pencegahan alzheimer, diabetes dan kanker. Tujuan dari penelitian ini adalah mampu mengisolasi dan memperoleh karakter optimum L-Asparaginase dari bawang putih (*Allium sativum*).

2. Metode Penelitian

2.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah Sentrifugasi (Centrif-228), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), inkubator, lumpang dan mortar, timbangan, neraca analitik (kern 870), *magnetic stirer* (Quart), kulkas, membran selofan, kertas saring, gunting, tali, botol semprot, *aluminium foil*, *plastic wrap*, dan alat-alat gelas

Bahan yang digunakan ; Bawang putih, bufer tris-hidroksimetil aminometan, amonium sulfat, L-asparagin, *Trichloro acetate* (TCA), *Bovine serum albumine* (BSA), *Follin ciocalteau*, natrium alginat, kalsium klorida, barium klorida, akuades, akuabides, natrium karbonat, kalium natrium tartrat, tembaga sulfat, reagen Nessler (kalium iodida dan raksa (II) iodida).

2.2 Prosedur Kerja

2.2.1 Isolasi Enzim

Sampel penelitian berupa 250 gram bawang putih (*Allium sativum*) yang ditumbuk kemudian ditambahkan dengan 125 mL 0,2 M bufer tris-hidroksimetil aminometan pH 8,6 dan dihomogenkan. Homogenat yang diperoleh selanjutnya di didiamkan 1-2 jam pada suhu 5°C kemudian disaring dan filtratnya disentrifugasi pada 3400 rpm selama 10 menit. Diperoleh endapan berisi sisa komponen-komponen sel dan supernatan yang merupakan ekstrak kasar enzim (EK).

2.2.2 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 (dimasukkan dalam lemari es), 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.

2.2.3 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. Perendaman dilakukan dalam keadaan dingin dan tiap 2 jam buffer diganti. Setiap penggantian buffer, larutan diluar selofan diuji kandungan amonium sulfatnya dengan BaCl_2 0,01 M hingga tidak terbentuk endapan putih

2.2.4 Penentuan aktivitas enzim

Sebanyak 6 tabung yang masing-masing diisi dengan 1 mL larutan substrat L-asparagin 166,5 mM, 0,1 endapan yang disuspensi (EK, F1, F2, F3, F4, F5), dan 0,4 mL bufer Tris-hidroksimetil-aminometan 0,2 M pH = 8,5. Sampel tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, kemudian ditambah 1 mL larutan TCA 1,5 M. Setelah itu, sampel 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. 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 = 8,5 dan 0,5 mL larutan L-asparagin 0,1665 M. Aktivitas enzim ditentukan secara regresi linier terhadap kurva standar amonium sulfat.

2.2.5 Penentuan kadar protein dengan metode lowry

Sebanyak 9,8 mL larutan Na_2CO_3 ditambah 0,1 mL larutan kalium natrium tartrat dan 0,1 mL larutan CuSO_4 kemudian dikocok perlahan. Campuran ini kemudian ditambahkan 0,1 mL larutan ekstrak kasar atau enzim (F1, F2, F3, F4 dan F5) dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar. Campuran ini ditambahkan 1 mL *folin-ciocalteau* kemudian diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu kamar. Larutan tersebut selanjutnya diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang optimum BSA (726 nm). Dibuat kurva standar BSA dengan berbagai macam konsentrasi. Kadar protein ditentukan secara regresi linier terhadap kurva standar BSA.

2.2.6 Karakterisasi enzim

Penentuan suhu optimum enzim

Larutan substrat L-Asparagin 1 mL, ditambah 0,05 mL enzim dan 2,5 mL bufer tris-hidroksimetil aminometan 0,2 M pH 8,6 dan diinkubasi selama 30 menit dengan variasi suhu (27, 32, 37, 42, 47)°C. Tahap selanjutnya ditambahkan larutan TCA 1,5 M sebanyak 1 mL. Filtrat ini diambil

sebanyak 0,5 mL lalu ditambahkan 4 mL akuades dan 1 mL pereaksi Nessler. Campuran ini kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang optimum (402 nm) dengan spektrometer UV-Vis. Aktivitas enzim ditentukan secara regresi linier terhadap kurva standar amonium sulfat.

Penentuan waktu inkubasi optimum enzim

Larutan substrat L-Asparagin 1 mL, ditambah 0,05 mL enzim dan 2,5 mL bufer tris-hidroksimetil aminometan 0,2 M pH 8,6 dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan variasi waktu inkubasi (10, 20, 30, 40, 50) menit. Campuran ini ditambahkan larutan TCA 1,5 M sebanyak 1 mL. Filtrat tersebut diambil sebanyak 0,5 mL lalu ditambahkan 4 mL akuades dan 1 mL pereaksi Nessler. Campuran ini kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang optimum (402 nm) dengan spektrometer UV-Vis. Aktivitas enzim ditentukan secara regresi linier terhadap kurva standar amonium sulfat.

Penentuan pH optimum enzim

Larutan substrat L-Asparagin 1 mL, ditambah 0,05 mL enzim dan 2,5 mL bufer tris-hidroksimetil aminometan 0,2 M dengan variasi pH (8,2; 8,4; 8,6; 8,8; 9,0) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Campuran ini ditambahkan larutan TCA 1,5 M sebanyak 1 mL. Filtrat tersebut diambil sebanyak 0,5 mL lalu ditambahkan 4 mL akuades dan 1 mL pereaksi Nessler. Campuran ini kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang optimum (402 nm) dengan spektrometer UV-Vis. Aktivitas enzim ditentukan

secara regresi linier terhadap kurva standar amonium sulfat.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Isolasi dan Purifikasi Enzim L-Asparaginase dari Bawang Putih (*Allium sativum*)

Isolasi enzim L-asparaginase dilakukan secara mekanik dengan diblender dan sentrifugasi sehingga terjadi pemecahan jaringan pada bawang putih. Hasil dari isolasi ini akan didapatkan ekstrak kasar enzim yang merupakan campuran protein enzim dan protein non enzim. Pemurnian enzim dilakukan dengan cara fraksinasi beringkat dengan menggunakan garam amonium sulfat. Penggunaan garam amonium sulfat dikarenakan sebagian besar protein enzim mampu bertahan pada garam tersebut, kelarutannya besar dalam air, mampu menstabilkan enzim dan merupakan garam divalen yang memiliki kekuatan ion yang lebih besar daripada garam monovalen (Purwanto, 2016).

Pemurnian dilakukan untuk mendapatkan enzim L-asparaginase dengan tingkat pemurnian yang tinggi dibanding dengan ekstrak kasar. Hasil pemurnian dengan garam amonium sulfat didapatkan fraksi endapan protein dengan berbagai tingkat kemurnian. Protein hasil pengendapan masih mengandung amonium sulfat sehingga perlu dilakukan pemurnian lanjutan dengan dialisis menggunakan membran selofan. Proses dialisis dapat dihentikan apabila BaCl_2 dalam buffer rendaman tidak menghasilkan endapan putih

BaSO₄ (Purwanto, 2016). Hasil dari dialisis diperoleh enzim L-asparaginase yang telah bebas dari amonium sulfat.

3.2 Aktivitas Spesifik Enzim L-asparaginase dari Bawang Putih (*Allium sativum*)

Penentuan aktivitas enzim L-asparaginase dengan cara mereaksikan enzim menggunakan substrat L-asparagin. L-asparagin akan mengkatalisis reaksi hidrolisis L-asparagin menjadi L-aspartat dan amonia. Aktivitas spesifik enzim dihitung dari unit aktivitas enzim per mg protein. Satu unit aktivitas enzim L-asparaginase didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dapat membentuk 1 $\mu\text{mol NH}_4^+$ per menit pada kondisi optimum (Kusumaningtias,

Nies, & Purbowatiningrum, 2016). Aktivitas enzim L-asparaginase diukur dari amonia yang dihasilkan dan dianalisis menggunakan pereaksi Nesler untuk menghasilkan kompleks berwarna coklat kekuningan pada setiap raksi. Absorbansi kemudian diukur dan nilai absorbansi terukur diplot pada kurva standar amonium sulfat untuk menentukan jumlah unit aktivitas yang ada dalam ekstrak kasar dan setiap fraksi.

Nilai aktivitas spesifik dapat ditentukan dengan mengukur unit aktivitas dan kadar protein setiap fraksi. Jumlah aktivitas spesifik adalah rasio unit aktivitas dan kadar protein. Nilai aktivitas spesifik dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Data penentuan aktivitas spesifik enzim L-asparaginase pada bawang putih

Fraksi	Unit Aktivitas (Unit/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg protein)	Tingkat Kemurnian
EK	659,224 $\pm$ 0,13	3,823 $\pm$ 0,38	172,436 $\pm$ 0,32	1,00
F1	1021,134 $\pm$ 0,25	2,752 $\pm$ 0,23	371,052 $\pm$ 0,17	2,15
F2	998,134 $\pm$ 0,18	2,503 $\pm$ 0,08	398,8861 $\pm$ 0,29	2,31
F3	1033,021 $\pm$ 0,15	1,834 $\pm$ 0,35	563,261 $\pm$ 0,07	3,27
F4	1049,363 $\pm$ 0,34	1,453 $\pm$ 0,45	722,204 $\pm$ 0,43	4,19
F5	1205,23 $\pm$ 0,21	1,143 $\pm$ 0,12	1054,44 $\pm$ 0,36	6,11

Tabel 1 menunjukkan bahwa setiap fraksi enzim memiliki aktivitas spesifik yang berbeda. Pada fraksi 5, nilai aktivitas spesifik tertinggi sebesar 1054,44 $\pm$ 0,36 U/mg protein dan terendah pada EK sebesar 172,436 $\pm$ 0,32 U/mg protein. Hasil ini menunjukkan bahwa fraksi 5 memiliki lebih banyak

enzim L-asparaginase daripada fraksi yang lain. Perbedaan aktivitas spesifik enzim juga dipengaruhi oleh dua faktor yaitu unit aktivitas enzim (unit/mL) dan kadar protein (mg/mL). Enzim L-asparaginase lebih banyak di fraksi 5 dibandingkan yang lain.

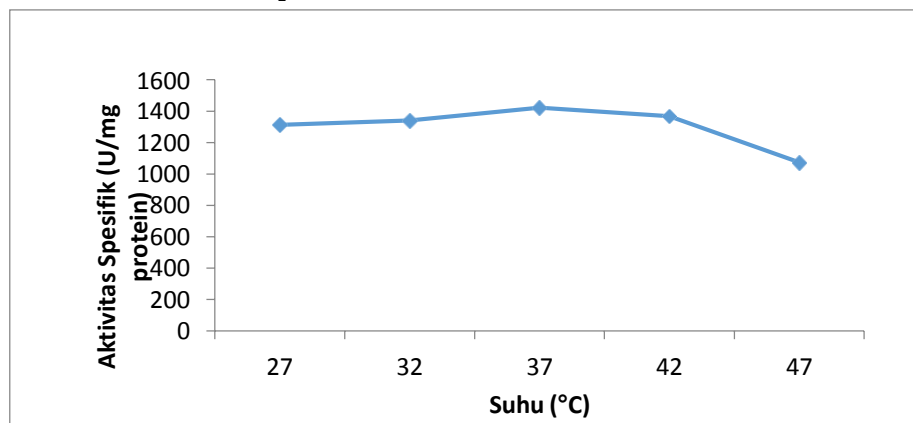
Kadar protein menurun disetiap perlakuan tingkat kemurnian karena penambahan garam pada konsentrasi tinggi mampu menurunkan kelarutan protein. Interaksi hidrofobik sesama molekul protein pada suasana ionik yang tinggi menyebabkan pengendapan protein atau disebut *salting out*. Pada proses dialisis, enzim L-asparaginase termasuk molekul ukuran besar akan tertahan di membran dan garam amonium sulfat (molekul kecil) akan bermigrasi keluar membran yang membuat enzim menjadi lebih murni.

Nilai aktivitas spesifik yang besar mengindikasikan enzim tersebut murni dan semakin efisien enzim tersebut bekerja. Hal ini dikarenakan jumlah protein (mg) semakin kecil, tetapi laju reaksi tetap sama atau meningkat karena berkurangnya interferensi dari inhibitor enzim. Aktivitas spesifik L-asparaginase pada *Rhizomucor miehei* didapat sebesar

1985 U/mg protein(Huang, Liu, Sun, Yan, & Jiang, 2014) (Huang et al., 2014), *Allium sativum* sebesar 1423,03 U/mg protein (Kusumaningtias et al., 2016), *Curcuma mangga Vall* fraksi 5 sebesar 2195,72 U/mg protein (Arpintasari, Wuryanti, & Rahmanto, 2008).

3.3 Karakterisasi Enzim L-asparaginase dari Bawang Putih (*Allium sativum*)

Karakterisasi enzim L-asparaginase bertujuan untuk mendapatkan kondisi optimum enzim hasil pemurnian. Fraksi yang digunakan dalam karakterisasi enzim menggunakan fraksi 5 yang memiliki aktivitas spesifik tertinggi. Karakterisasi enzim meliputi; suhu, waktu inkubasi dan pH. Hasil penentuan suhu optimum ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Grafik hubungan antara suhu dan aktivitas spesifik enzim L-asparaginase

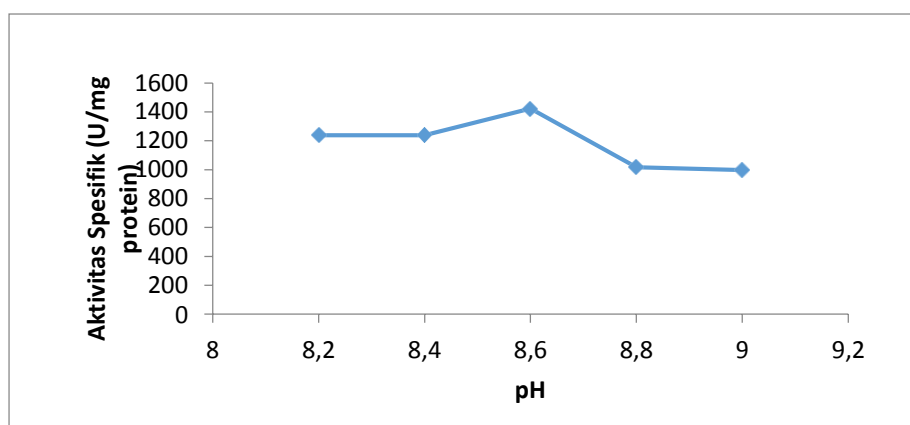
Berdasarkan Gambar 1 dapat dilihat bahwa aktivitas spesifik enzim tertinggi pada suhu 37°C. Enzim L-asparaginase pada mikrobial dan tumbuhan memiliki suhu optimal pada range 37°C-40°C (Muneer et al., 2020).

Enzim dapat mengalami denaturasi pada suhu tinggi. Adanya perubahan suhu dapat menyebabkan perubahan konformasi yang dapat memberi pengaruh pada sisi aktif enzim, sehingga

enzim tidak bisa bekerja secara optimal (Crespo & Bøddeker, 2013).

Berdasarkan Gambar 2 dapat dilihat bahwa pH optimum enzim L-asparaginase dari bawang putih berada pada pH 8,6. Hal ini menunjukkan bahwa enzim berada pada konformasi yang tepat dalam mengikat substrat.

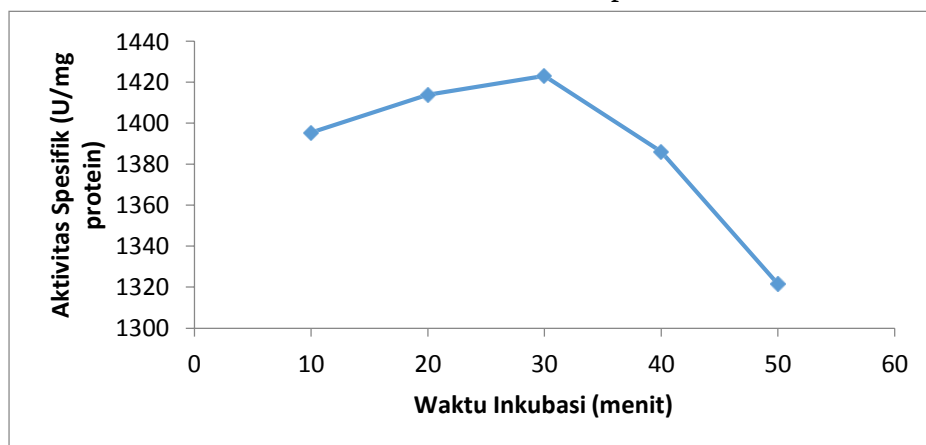
Kondisi pH yang terlalu ekstrim baik terlalu rendah atau terlalu tinggi menyebabkan perubahan konformasi enzim yang membuat aktivitas enzim menurun. Hampir semua L-asparaginase yang diisolasi dan mengalami tahap pemurnian memiliki range pH optimum pada pH 8-10 (Mahajan et al., 2014).



Gambar 2. Grafik hubungan antara pH lingkungan dan aktivitas spesifik enzim L-asparaginase

Waktu inkubasi yang tepat dapat membuat kerja enzim optimal. Pada penelitian ini menggunakan variasi waktu inkubasi 10, 20, 30, 40, dan 50

menit dalam pH dan suhu optimum enzim tersebut. Hasil penentuan waktu inkubasi optimum L-asparaginase dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Grafik hubungan antara waktu inkubasi dan aktivitas spesifik enzim L-asparaginase

Berdasarkan Gambar 3 waktu inkubasi optimal berada pada menit ke 30. Pada waktu inkubasi tidak pada titik optimum, aktivitas spesifik enzim rendah. Hal ini disebabkan sisi aktif enzim belum berikatan dengan substrat, sehingga kompleks enzim substrat dan produk yang dihasilkan masih sedikit (Crespo & Bøddeker, 2013).

4. SIMPULAN

Enzim L-Asparaginase dapat diisolasi dari bawang putih dengan aktivitas spesifik 1054,444 U/mg protein pada fraksi 5 (80-100%). Hal ini menunjukkan bawang putih memiliki enzim L-asparaginase yang mampu digunakan untuk mereduksi akrilamida pada pengolahan pangan. Karakterisasi enzim L-asparaginase optimum terdapat pada suhu 37°C, waktu inkubasi 30 menit, dan pH 8,6.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Anese, M., Quarta, B., & Frias, J. (2011). Modelling the effect of asparaginase in reducing acrylamide formation in biscuits. *Food Chemistry*, 126(2), 435–440.
- Anese, M., Quarta, B., Peloux, L., & Calligaris, S. (2011). Effect of formulation on the capacity of l-asparaginase to minimize acrylamide formation in short dough biscuits. *Food Research International*, 44(9), 2837–2842.
- Arpintasari, A., Wuryanti, W., & Rahmanto, W. H. (2008). Isolasi dan Uji Potensi L-Asparaginase dari Rimpang Kunyit Putih (*Curcuma mangga* Vall) terhadap Leukimia Tipe K562. *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*, 11(3), 57–62.
- Capuano, E., Ferrigno, A., Acampa, I., Serpen, A., Açar, Ö. Ç., Gökmen, V., & Fogliano, V. (2009). Effect of flour type on Maillard reaction and acrylamide formation during toasting of bread crisp model systems and mitigation strategies. *Food Research International*, 42(9), 1295–1302.
- Ciesarová, Z. (2016). Impact of l-asparaginase on acrylamide content in fried potato and bakery products. *Acrylamide in Food [Internet]. Elsevier; [Cited 2020 Mar 28]*, 405–421.
- Crespo, J. G., & Bøddeker, K. W. (2013). *Membrane processes in separation and purification* (Vol. 272). Springer Science & Business Media.
- Harini, K., Babu, S., Ajila, V., & Hegde, S. (2013). Garlic: It's role in oral and systemic health. *Journal of Health and Allied Sciences NU*, 3(04), 17–22.
- Huang, L., Liu, Y., Sun, Y., Yan, Q., & Jiang, Z. (2014). Biochemical characterization of a novel L-Asparaginase with low glutaminase activity from *Rhizomucor miehei* and its application in food safety and leukemia treatment. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(5), 1561–1569.
- Kukurová, K., Ciesarová, Z., Mogol, B. A., Açar, Ö. Ç., & Gökmen, V. (2013). Raising agents strongly influence acrylamide and HMF formation in cookies and conditions for asparaginase activity in dough. *European Food Research and Technology*, 237(1), 1–8.
- Kusumaningtias, N., Nies, S. M., & Purbowatiningrum, R. S. (2016).

- Kalsium Alginat Sebagai Pendukung Amobilisasi L-Asparaginase Dari Bawang Putih (*Allium Sativum*). *Jurnal Kimia Dan Pendidikan Kimia*, 1(2), 7–15.
- Mahajan, R. V, Kumar, V., Rajendran, V., Saran, S., Ghosh, P. C., & Saxena, R. K. (2014). Purification and characterization of a novel and robust L-asparaginase having low-glutaminase activity from *Bacillus licheniformis*: in vitro evaluation of anti-cancerous properties. *PLoS One*, 9(6), e99037.
- Muneer, F., Siddique, M. H., Azeem, F., Rasul, I., Muzammil, S., Zubair, M., ... Nadeem, H. (2020). Microbial L-asparaginase: purification, characterization and applications. *Archives of Microbiology*, 1–15.
- Pedreschi, F., Mariotti, M. S., & Granby, K. (2014). Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(1), 9–20.
- Pedreschi, F., Mariotti, S., Granby, K., & Risum, J. (2011). Acrylamide reduction in potato chips by using commercial asparaginase in combination with conventional blanching. *LWT-Food Science and Technology*, 44(6), 1473–1476.
- Purwanto, M. G. M. (2016). The role and efficiency of ammonium sulphate precipitation in purification process of papain crude extract. *Procedia Chemistry*, 18, 127–131.
- Qeshmi, F. I., Homaei, A., Fernandes, P., & Javadpour, S. (2018). Marine microbial L-asparaginase: biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry. *Microbiological Research*, 208, 99–112.
- Sharma, A., & Mishra, S. (2017). Asparaginase: A promising aspirant for mitigation of acrylamide in foods. *Int. J. Food Sci. Nutr*, 2, 208–214.