

**REVIEW ARTIKEL: PRODUKSI ENZIM METIONIN GAMMA-LYASE (MGL) SEBAGAI
ANTIKANKER DAN PENGEMBANGAN KEJU DENGAN TEKNOLOGI DNA
REKOMBINAN**

Reza Laila Najmi, Tina Rostinawati

Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran

Jl. Raya Bandung Sumedang Km.21, Jatinangor 45363

Rezalaila6@gmail.com

Diserahkan 03/07/2019, diterima 23/01/2020

ABSTRAK

Metionin gamma-lyase (MGL) adalah enzim yang mendegradasi asam amino yang mengandung belerang yang berperan dalam proses biologis . Enzim MGL ditemukan di beberapa bakteri anaerob, protozoa parasite, dan tumbuhan. MGL telah digunakan dan dikembangkan untuk kebutuhan terapetik terutama sebagai antikanker dan pengembangan keju dengan cara teknologi DNA rekombinan. Pengujian dilakukan dengan elektroforesis atau SDS PAGE dengan memisahkan DNA berdasarkan massa molekular .

Kata Kunci: Metionin Gamma lyase, Antikanker, Keju, Rekombinan, SDS PAGE

ABSTRACT

Methionine gamma-lyase (MGL) is an enzyme that degrades amino acids containing sulfur which play a role in biological processes. The MGL enzyme is found in several anaerobic bacteria, parasite protozoa, and plants. MGL has been used and developed for therapeutic needs especially as therapeutic needs especially as anticancer and cheese development by means of recombinant DNA technology. The test is carried out by electrophoresis or SDS PAGE by separating DNA based on molecular mass.

Keywords: *Methionine Gamma Lyase, anticancer, cheese, recombinant, SDS PAGE*

PENDAHULUAN

L-metionin- γ -lyase dikenal dengan metioninase, *L*-metionin- γ -demetilase, dan *L*-metionin metaniol-lyase (deaminasi), yang merupakan enzim yang bergantung pada *pyridoxalphosphate* (PLP). PLP mengurangi energi dalam konversi asam amino menjadi zwitterionic karbonion dan pada dasarnya apoenzim mengkatalisis pembelahan ikatan substrat yang menghasilkan produk. Enzim Metionin Gamma-lyase (MGL) memiliki berat molekul (Mr) sekitar 149 kDa hingga 173 kDa dan terdiri dari empat subunit identik dengan Mr sekitar 41 kDa hingga 45 kDa, kecuali MGL yang dimurnikan untuk homogenitas dari *Pseudomonas putida* dan terdiri dari dua subunit nonidentik berkisar 40 kDa hingga 48 kDa (R. Wolfenden, 2011).

Bakteri dan jamur merupakan sumber yang paling banyak di eksplorasi. Sumber *L*-metioninase pertama kali ditemukan dari filtrate kultus beberapa bakteri rumen, termasuk *Clostridium sp.*, *Escherichia coli*, dan *Aeromonas Sp.* (Khalaf, 2009). Enzim *L*-metioninase memiliki kelemahan yaitu imunogenitas yang tinggi, spesifisitas substrat rendah, dan efek berbahaya pada ginjal dan hati. Studi terapeutik enzim ini termasuk anti-homosistein dan pengobatan kemoterapi anti-metionin. Enzim ini banyak digunakan untuk pengobatan kanker yang bekerja dengan cara mengurangi pertumbuhan sel kanker dan memblokir jalur untuk pengambilan *L*-metionin dari sumber eksogen. (Kharayat, 2018)

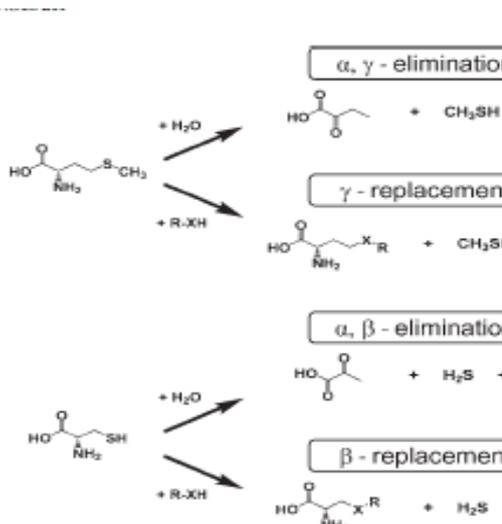
MGL dapat ditemukan pada bakteri anaerob, protozoa parasite dan tumbuhan.

Fungsi fisiologi dari enzim MGL pada tiap organisme berbeda. Pada bakteri anaerob dan protozoa parasite yang memiliki MGL, proses akan bergantung pada glikolisis dan asam amino degradasi untuk membangkitkan energi. Peran MGL pada bakteri misalnya pada *Pseudomonas putida* sebagai bagian dari operon yang menyebabkan *P. putida* mampu menghasilkan ATP, dan pada bakteri pematangan keju *Brevibacterium linen*, *Arabidopsis thaliana*. Peran MGL pada tanaman Aliana dan MGL terdapat pada berbagai jaringan. (Moya, 2009)

L-metioninase digunakan sebagai obat antikanker yang membutuhkan tingkat kemurnian tinggi. Produksi *L*-metioninase dari sumber mikroba sebagian besar bergantung pada metionin. *L*-metionin terdapat di media berair dan dapat segera di oksidasi melalui reaksi Maillard. (Kharayat, 2018)

POKOK BAHASAN

MGL mengkatalisis α,γ -eliminasi dari *L*-metionin dan turunannya seperti *L*-homosistein, *L*-ethionin, dan *L*-selenomethionine. MGL juga mengkatalisis α,β -eliminasi dari *L*-sistein dan analognya seperti S-metil-*L*-sistein (Gambar 1). Reaksi-reaksi berikut menghasilkan asam α -keto (2-oxobutyrate dan piruvat), amonia, dan tiol (metanatriol dan hidrogen sulfida). Enzim ini secara alternatif mengkatalisis reaksi penggantian β – atau γ –, dimana atom sulfur atau oksigen pada posisi β – atau γ – diganti dengan thiol. (Sato D. N., 2009)



Gambar 1. Reaksi katalis MGL, (atas) α, γ -eliminasi dan penggantian- γ *L*-metionin dan, (bawah) α, β -eliminasi dan penggantian- β *L*-sistein, X diindikasikan sebagai S atau Se. (Sato D. N., 2009)

Sel tumor memiliki pertumbuhan yang cepat dan tidak terkendali dibandingkan dengan sel normal, metionin. Telah ditingkatkan kebutuhan dari metionin untuk sintesis protein tinggi dan regulasi ekspresi DNA pada sel kanker (Sharma, 2014). *L*-metioninase memiliki efek terapeutik yang tinggi sebagai antikanker yang kuat terhadap berbagai jenis sel tumor seperti glioblastoma, ginjal, payudara, usus besar, dan kanker paru-paru. (Kharayat, 2018). Upaya terapeutik dengan metionin sebagai antikanker yaitu dengan mengobati sel melalui teknologi rekombinan MGL yang berasal dari *Pseudomonas putida* (PpMGL). Khasiat terapeutik ditemukan membaik ketika PpMGL-rekombinan di kombinasikan dengan obat antikanker seperti cisplatin, 5-fluorourasil, nitrosourea, dan vincristine (Hu, 2009)

Di bidang pangan, katabolisme metionin berperan dalam pengembangan rasa

keju, senyawa ini berasal dari degradasi metionin menjadi metanetiol sehingga memunculkan beragam senyawa seperti *dimetil disulfide* (DMDS), *dimetil trisulfida* (DMTS), dan *S-metiltiester* (Hanniffy, 2009)

Teknologi DNA rekombinan berkembang dengan sangat cepat mengingat angka penyakit yang semakin meningkat. Oleh karena itu, peneliti sebagian besar melakukan percobaan klinis pada pasien kanker. (Widyastuti, 2017)

Hasil penelurusan produksi *L*-metioninase atau MGL dengan teknologi DNA rekombinan yang memiliki potensi dalam pengobatan kanker dan peningkatan kualitas pangan meliputi:

(Pavani, 2014) Melakukan kloning dan ekspresi dengan enzim Metionin gamma-lyase (MGL) yang berasal dari bakteri *Brevibacterium linen*, bakteri ini diisolasi dengan mengencerkan sampel pada media TGY dan diamati pertumbuhan dalam pengenceran 10⁻⁶ setelah inkubasi selama 48 jam dan menghasilkan warna coklat kemerahan. Karakterisasi molekular berdasarkan sekuensi 16 rDNA untuk membuktikan kemurniannya menunjukkan rasio absorbansi dari 1,9 (A₂₆₀/A₂₈₀ dengan rasio 1,8-2,0 untuk menjadi murni), Lalu DNA dari dua organisme diisolasi dengan gen DNA coding, gen 16s rDNA diamplifikasi dengan PCR dan menghasilkan 735 pita DNA untuk *Brevibacterium linen*. Gen 16s rDNA secara enzimatik diperkuat oleh DNA Taq polymerase dengan menggunakan primer eubakterial untuk mengkonfirmasi bakteri tersebut adalah *Brevibacterium linen*.

Selanjutnya dilakukan isolasi gen MGL pada *B. linen*, amplifikasi dari DNA MGL dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa, sampel diurutkan dan dielus. Ekspresi gen dilakukan dengan analisis Fraksi enzim MGL dengan SDS-PAGE dan pita pada massa molekular 24 kDa. Dengan analisis spektrum penyerapan puncak pada 420 nm selain puncak 280 nm. Dilakukan manipulasi DNA untuk menyisipkan gen MGL dengan vector pRSET-A. dilakukan transformasi untuk pengenalan DNA rekombinan agar cocok dengan sel inang yaitu *E.coli DH5 α* dengan menyiapkan sel kompeten. Rekombinan dilakukan dengan skrining Blue-White, jika ligase berhasil, koloni bakteri akan menjadi putih, jika tidak koloni akan berwarna biru, untuk menganalisis produksi MGL dipindahkan dalam LB broth selama 24 jam. Dilakukan pengujian pH dan suhu selama 2 minggu, reaksi denaturasi menunjukkan kinetika orde pertama dan memiliki energi bebas standar aktivasi 186 kJ/mol. Dapat disimpulkan bahwa MGL yang diproduksi oleh *Brevibacterium linens* digunakan sebagai pengobatan kanker dan memberikan paradigma baru untuk terapi kanker.

(Morozova, 2013) Melakukan identifikasi parameter kinetik dan aktifitas toksisitas dari MGL rekombinan pada *Clostridium tetani*, *Clostridium sporogenes*, *Porphyromonas gingivalis* dan *Citrobacter freundii*. Pengujian ini dilakukan dengan kultur bakteri dan pemurnian enzim menggunakan *E.coli* BL21(DE3), sel mengandung gen MGL dari *C.sporogenes*, *C. tetani*, dan *P. gingivalis* dalam plasmid pET-

28a., yang di kultur dalam media "inducing" selama 24 jam, pemurnian di evaluasi dengan menggunakan elektroforesis dengan metode Laemmli, pita-pita dalam elektroforegrams diidentifikasi oleh pewarnaan Coomassie R-250 dan Western blot. Aktivitas satu unit enzim didefinisikan sebagai jumlah MGL yang mengkatalisis pembentukan dari 1.0 μ M/min α -ketobutyrate pada 30°C. aktifitas spesifik enzim dari *C.tetani*, *C.sporogenes*, *P.gingivalis*, dan *C.feundii* adalah 16.6, 12.8, 5.0 dan 10.2 U/mg. Produk dapat digunakan sebagai terapeutik dengan melakukan pengujian sitotoksitas dari bakteri tersebut. Sitotoksitas dari bakteri-bakteri tersebut diurutkan dari aktivitas sitotoksitas rendah hingga tinggi, sehingga bakteri yang memiliki tingkat toksisitas rendah memiliki potensi untuk kebutuhan terapeutik. Tes One Way ANOVA digunakan untuk membandingkan sitotoksitas enzim dari ketiga bakteri yaitu *C.freundii*, *C.sporogenes*, dan *C.tetani*. Hasil dengan software SPSS 11.5 menunjukkan sensitivitas yang relative tinggi dari sebagian besar sel dengan aksi MGL, hasil menunjukkan sitotoksitas MGL sebanding dengan enzim lainnya seperti *L-asparaginase*, tingkat sitotoksitas yang paling dekat dengan MGL dari *P.putida* adalah *C.sporogenes*. Parameter kinetik sitotoksik aktivitas MGL dari tiga sumber bakteri yaitu *C.sporogenes* menunjukkan hasil yang menjanjikan dan membutuhkan penelitian lebih lanjut yang ditandai dengan nilai Km minimal dibanding enzim yang lainnya dan sitotoksitas tertinggi menunjukkan hasil dari *P.putida*. Hasil yang diperoleh untuk kultur sel K562, McF7, dan

Pc-3 dilakukan untuk mempertimbangkan penelitian lebih lanjut ke dalam aktivitas antiproliferatif MGL *in vivo* dan *in vitro* dan dapat memungkinkann enzim untuk merancangn agen antitumor baru.

(Hanniffy, 2009) Melakukan produksi heterologis dengan Metionin gamma-lyase dari bakteri *Brevibacterium linen* dan membentuk senyawa sulfur volatile (VSC) yang sangat penting untuk pematangan keju dan bioteknologi dalam meningkatkan rasa. Pertama dilakukan kultur bakteri dengan media G-M17, lalu DNA plasmid dari *L.lactis* diisolasi dengan prosedur plasmid miniprep, pemurnian DNA plasmid dilakukan dengan kitMiniElute. Reaksi amplifikasi dilakukan dengan PCR. Optimalisasi codon dari urutan gen MGL bakteri *B.linen* dan kloning dan ekspresi dalam *L.lactis*. Plasmid pTnis digunakan untuk ekspresi MGL dalam *L.lactis*. Pemurnian MGL rekombinan dikultur induksi dengan nisin selama 3 jam pada suhu 30°C dan di sentrifugasi. MGL dianalisis dengan SDS-PAGE dan fraksi yang terpilih didialisis dengan larutan fosfat-buffered saline pH 7. Protein rekombinan di kuantifikasi dengan metode uji Bradford. Analisis VSC dilakukan dengan suspensi bakteri, bakteri disuspensikan dalam buffer 2 ml, dan fraksi yang tidak larut dihilangkan dengan supernatant sehingga diperoleh fraksi supernatant yang mengandung protein, lalu dicairkan dan dibekukan dalam nitrogen cair. Produk yang terbentuk ditentukan oleh Kromatografi Gas-Spektrometri Massa (GC-MS). Penelitian ini menunjukkan bahwa MGL rekombinan memiliki aktivitas dalam kondisi pematangan

keju dan membentuk dasar peningkatan sintesis VSC selama proses pematangan.

(Morcos D, 2015) Melakukan pemurnian dan karakterisasi Metionin Gamma-Lyase-Deaminasi (Mgld) dari oral patogenik organisme melalu reaksi deaminasi pada *Porphyromonas gingivalis*. *P.gingivalis* merupakan oral patogenik yang dapat menyebabkan halitosis (pernafasan yang buruk) dan priodontitis pada manusia. Kloning dan Ekspresi dilakukan dengan DNA genomic dari *P.gingivalis* W83 dengan *forward* dan *primer* yang dirancang untuk memperkenalkan situs NheI, dan akan di ligasi kedalam vector pGEM-T (Promega). Mgld di subkloning dari pGEM-T melalui proses pencernaan NheI dan EcoRI dan diligasi kedalam vector pET28a-TEV (Novagen) yang menyimpan N-terminal 6X-His Tag diikuti dengan pembelahan protease TEV. Vector yang dihasilkan, pET-Mgld dan diubah menjadi *E.coli* BL21(DE3). Pemurnian Mgld, supernatant lisat sel bakteri dimurnikan dengan kromatografi kolom nikel, dan diperoleh fraksi puncak elusi yang mengandung protein rekombinan His-tag dengan pengotor kecil dan berat molekul lebih rendah dibuktikan oleh SDS-PAGE. Puncak fraksi dari ukuran kolom mengandung homogenitas protein dengan MW ~43 kDa dan dibuktikan dengan SDS-PAGE. *Porphyromonas gingivalis* Mgld adalah enzim dengan aktivitas lyase dan deaminase yang membentuk alpha-ketobutyrate dari *L*-metionin tanpa akumulasi intermediet dalam *in vitro*. DL-proparglyglycine adalah inhibitor ampuh dari *P.gingivalis* Mgld dan memblok pembentukan metiltiol sehingga dapat

menganjurkan sebagai agen terapi yang disebabkan oleh *P.gingivalis*.

(Muharram, 2016) Melakukan teknik rekombinan dari *L*-metioninase dengan dua promotor dan ekspresi yang berbeda dan analisis *in vitro* sebagai antikanker. Dilakukan kloning gen *L*-metioninase dari *P.putida* menggunakan pT7Blue T-vektor dan dilakukan amplifikasi dengan PCR dan diperoleh produk 1365 bp yang dimurnikan dan sekuensing yang mengandung gen METase dan diligasi pada PT7Blue T-vektor (Novagene) pada EcoRV T-cloning site. Plasmid memperkenalkan diri ke sel-sel *E.coli* DH5 α menggunakan prosedur transformasi standar. Ekspresi rMETase dilakukan dengan klon positif tingkat tinggi rMETase memiliki warna kuning-oranye dan diinkubasi selama 24 jam, ikatan protein dengan massa molecular 42 kDa divisualisasikan dengan SDS-PAGE. Fermentasi dimulai dengan 10 μ L dari IPTG *incuced* sel *E.coli* BL21 (DE3). Pengaruh rMETase pada lini sel kanker dilakukan dengan menguji pada sel kanker manusia dan hasilnya sensitif terhadap penghambatan oleh rMETase. Pada nilai 1 U mL⁻¹ Colo 205 dan SW 620 sel kanker diobati dengan rMETase dan menghasilkan pertumbuhan hingga 88%. Sel kanker sel ovarium A2780 menunjukkan sensitivitas yang signifikan pada rMETase dimana tingkat pertumbuhannya dihambat hingga 54% relative. Protein metioninase menghambat pertumbuhan dari sel kanker kulit A375 dan kanker payudara MCF-7 sebanyak 45 dan 53%. Perbedaan antara tingkat pertumbuhan sel yang dilakukan dengan rMETase dan kontrol yang dapat

mengurangi tingkat tumor metionin. Maka di jurnal ini membahas mengenai rMETase yang menunjukkan toksisitas rendah dan kemanjuran yang tinggi sebagai antitumor selektif.

(Huang, 2015) Melakukan ekspresi, pemurnian dan produksi skala besar *L*-metionin gamma lyase dari *Idiomarina* sebagai Obat Antileukimia. Penelitian ini telah mengidentifikasi sebuah gen MGL baru dari *Idiomarina* dan diekspresikan dalam *E.coli* dengan menggunakan PET-28a vector. *L*-metionin adalah pengobatan kanker aman dan efektif dengan studi *in vitro* dan *in vivo*. Produksi skala besar ini efektif untuk rMGL dengan menggunakan plasmid lebih *E.coli* BL21 (DE3) diikuti dengan pemurnian dan produksinya. rMGL efektif dalam menghambat proliferasi sel leukemia dan melakukan apoptosis sel. Pemurnian rMGL dilakukan dengan fermentasi, dan sentrifugasi, dan protein yang tidak diinginkan dicuci dengan buffer imidazole. rMGL dielusi bertahap dengan buffer yang mengandung imidazole 160,200,300,dan 400 mM, dan fraksi dikumpulkan dan diuji dengan SDS PAGE dengan massa molekular 46 kDa. rMGL menghambat proliferasi dari leukemia sel garis dengan menguji kelayakan baris sel leukemia dengan berbagai konsentrasi rMGL selama 48 jam menggunakan uji MTS. Hasil menunjukkan penekanan proliferasi baris sel leukemia tergantung dosis.

(Ebenezer, 2017) Melakukan sekuensing dan ekspresi gen metioninase dari *Pseudomonas putida*. Pengujian ini dilakukan dengan pemurnian pada kolom putar di dalam tabung sentrifugasi 5500 rpm selama 45 detik

untuk elusi fragmen DNA dan vector. Pada saat manipulasi DNA vector pREST-A diperkenalkan kedalam e.coli TOP 10. Untuk memasuki gen *L*-metioninDeamino α merkaptometana γ -lyase dimasukkan ke dalam pREST-A. Transformasi dipilih pada resistensi ampisilin yang mengandung media. Resistensi ampisilin di pindahkan dari media nutrient agar ke dalam nutrient broth. Nutrient broth digunakan untuk analisis rekombinan dari pemurnian enzim (HI-MEDIA). dan pemurnian dilakukan menggunakan kromatografi pertukaran anion selanjutnya dilakukan SDS PAGE dengan massa molekular 43 kDa. Dan ditentukan parameter kinetik dengan pH, model disempurnakan lebih lanjut dengan program ERRAT dan PROCHECK dan menunjukkan bahwa *L*-metioninDeamino α merkaptometana γ -lyase mampu menurunkan kadar metionin plasma dan menghambat pertumbuhan tumor dengan mengkloning *L*-metioninase dari *Pseudomonas putida*.

Dari hasil penelusuran produksi rekombinan *L*-metioninase dan MGL paling umum ditemukan pada *p.putida*. dengan vector dan media kultur yang beragam, dan sel inang yang paling umum digunakan adalah *Escherichia coli*. Pengujian dilakukan dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa ataupun SDS PAGE yang bertujuan memisahkan sampel DNA berdasarkan ukuran (berat molekular) dan struktur fisik molekulnya.

SIMPULAN

Produksi rekombinan enzim Metionin Gamma-lyase atau *L*-metioninase untuk pengobatan terapeutik dapat dilakukan dengan bakteri *Brevibacterium linens*, *Clostridium sporogenes*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas putida* dan pangan salah satunya dengan *Brevibacterium linens* BL21. Dalam penelitian yang telah dilakukan vector dan media kultur perlu diperhatikan serta sel inang yang paling banyak digunakan adalah *E. coli*. Hasil rekombinasi banyak di buktikan dengan SDS-PAGE.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Rizky Abdullah, Ph D., Apt. selaku dosen mata kuliah Metodologi Riset dan Biosistik yang telah memberikan arahan dalam proses penulisan review artikel. Serta kepada ibu Dr.Tina Rostinawati, M.Si, Apt. selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingannya dalam menyelesaikan penulisan review artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ebenezer, G. &. (2017). Sequencing and Expression of Methioninase Gene of *Pseudomonas putida*. . *International Journal of Industrial Chemistry and Biotechnology*. , Vol 3 No 1.
- Hanniffy, S. e. (2009). Heterologous Production of Methionine-Gamma-Lyase from *Brevibacterium linens* in *Lactococcus lactis* and Formation of Volatile Sulfur . *APPL ENVIRON MICROBIOL*, Vol 75 No 8.
- Hu, J. a. (2009). Methionine depletion wit recombinant methioninase: In vitro

- and In vivo Efficacy Against Neuroblastoma and its Synergism with Chemotherapeutic Drugs. *Int J Cancer* , 124, 1700-6.
- Huang, K. e. (2015). High Level Expression, Purification and Large-Scale Production of L-Methionine γ -Lyase from *Idiomarina* as a Novel AntiLeukemic Drug. *Mar Drugs* , Vol 13. ISSN 1660-3397.
- Khalaf, S. &.S. (2009). L-methioninase: production by filamentous fungi: I-screening and Optimization under submerged conditions. *Current Microbiology*, 58(3): 219-26.
- Kharayat, B. &. (2018). Microbial Production of L-Methioninase and its Biotechnology Application. *International Journal of Recent Scientific Research*, Vol.9 Issue *, pp 28439-28446.
- Morcós D, S. M. (2015). Purification and Characterization of Methionine Gamma Lyase Deaminase (Mgld) from the Oral Pathogenic Organism *Porphyromonas gingivalis*. *Biochem & Analytical Biochemistry*. , Vol 4 No 4.
- Morozova, E. e. (2013). Kinetic Parameters and Cytotoxic Activity of Recombinant Methionine γ -Lyase from *Clostridium tetani*, *Clostridium* . *ACTA NATURE*, Vol 5 No 3.
- Moya, I. S. (2009). Current and future perspectives on the chemotherapy of parasitic protozoa *Trichomonas vaginalis* and *Entamoeba histolytica*. . *Future Med. Chem*, vol 1 pp 619-43.
- Muharram, M. (2016). Recombinant Engineering of LMethioninase Using Two Different Promoter and Expression Systems and in vitro Analysis of Its Anticancer Efficacy on Different Human Cancer Cell Lines. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. , Vol 19 No 3.
- Pavani, K. &. (2014). Cloning and Expression of Methionine- γ -lysae (MGL) of *Brevibacterium linens*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, Volume 3 Number 3.
- R. Wolfenden. (2011). Benchmark reaction rates, the stability of biological in water and the evolution of catalytic power in enzymes. *Annual Review of Biochemistry* , vol 80 pp 645-667.
- Sato, D. &. (2009). Methionine Gamma Lyase: The Unique Reaction Mechanism, Physiological Roles, and Therapeutic Applications Against Infectious Disease and Cancers. *Critical Review*, 61(1): 1019-1028.
- Sato, D. d. (2009). Critical Review: EMthionine Gamma Lyase: The Unique Reaction Mechanism Physiological Roles, and Therapeutic Applications Against Infectious Disease and Cancers . *IUBMB Life* , 61(11):1019-1028.
- Sato, D. N. (2009). Critical Review: Methionine Gamma-Lyase: The Unique Reaction Mechanism, Physiological Roles, and Therapeutic Applications Against Infectious Diseases and Cancers. *Life*,, 61(11) pp 1019-1028.
- Sato, D. N. (2009). Methionine Gamma Lyase: The Unique Reaction Mechanism Physiological Roles, and Therapeutic Applications Against Infectious Disease and Cancers. *IUBMB Life*, 61(11):1019-1028.
- Sharma, B. S. (2014). L-Methionase: A Therapeutic Enzyme to Treat Malignancies. *BioMed Research International*.
- Widyastuti, D. (2017). Terapi Gen: Dari Bioteknologi untuk Kesehatan . *Journal of Biology*, 10(1).
- Wolfenden, R. (2011). "Benchmark reaction rates, the stability of biological molecules in water, and the evolution of catalytic power in *Biochemistry*, vol 80 pp 6445-667.